

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES PRÉCURSEURS
ET DÉRIVÉS DE LA NORBELLADINE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
MARIE-PIERRE GIRARD

MARS 2023

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

*« Quand nous voulons une chose,
tout l'Univers conspire à nous permettre
de réaliser notre rêve »*

Paulo Coelho, *L'Alchimiste*

REMERCIEMENTS

Pour commencer, j'aimerais remercier ma directrice principale, Dre Isabel Desgagné-Penix, de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur ce projet, d'avoir cru en moi tout au long de mes études, et de m'avoir poussé à dépasser mes limites. C'est en ayant le courage de se surpasser que nous pouvons découvrir l'étendue de notre vrai potentiel. J'aimerais aussi remercier mon codirecteur, le Dr Lionel Berthoux, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et au sein de sa merveilleuse équipe. Merci beaucoup pour le partage de vos espaces et votre matériel, de votre savoir et de tous vos conseils avisés. J'aimerais remercier Dre Natacha Mérindol, qui m'a supervisé tout au long de ma maîtrise, pour sa gentillesse et sa patience. Merci de m'avoir permis d'acquérir autant de connaissances. Un merci spécial à Marianne Héneault et Dr Gervais Bérubé, qui ont synthétisé les composés que j'ai étudiés tout au long de ma maîtrise. Sans vous, ce projet n'aurait pas été possible. Je voudrais aussi remercier Dr Tagnon Missihoun et Dr Hugo Germain pour l'accès à leur laboratoire et à leur matériel.

Je voudrais offrir mes remerciements à des gens très spéciaux, mes collègues de laboratoire, dont Amita Singh, Ghada Elfayres et Ricky Paswan. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée ainsi que tous nos moments agréables de fous rires. Je voudrais aussi remercier mes collègues des autres laboratoires pour le support, l'entraide et les moments agréables que nous avons pu passer.

J'aimerais remercier ma famille, Louise Paillé, Raymond Girard, Mathieu Girard et Véronique Côté, ainsi que mon conjoint et sa mère, Kenny Bélizaire et Kettely Bélizaire. Merci pour tout le support que vous m'avez apporté, et merci de m'avoir encouragé à toujours persévérer malgré les difficultés. Je voudrais également remercier mes deux fidèles partenaires d'étude, Zahia et Flokie, qui ont toujours été présents pour moi.

RÉSUMÉ

Les virus à ARN sont reconnus comme étant la classe d'agents pathogènes la plus souvent responsable de l'apparition de nouvelles maladies humaines. Par exemple, le virus de la dengue (DENV) infecte 390 millions de personnes par année. Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), une autre maladie causée par un virus à ARN, a engendré jusqu'à 40,1 millions de décès depuis ses débuts. Aucun traitement ne permet de soigner les cas de dengue sévère, et aucun traitement ne permet de soigner définitivement le syndrome de l'immunodéficience humaine. Les plantes de la famille des *Amaryllidaceae* sont reconnues dans le monde entier pour leurs diverses propriétés thérapeutiques. Leur puissance médicinale est attribuée à la présence de métabolites spécialisés du groupe des alcaloïdes. Par exemple, la lycorine exerce un effet inhibiteur sur les *Flavivirus* tels que DENV. Récemment, nous avons aussi démontré que la cherylline, la pancracine, l'haemanthamine et l'haemanthidine, ont des effets antiviraux contre DENV. La biosynthèse de l'ensemble des alcaloïdes des *Amaryllidaceae* (AAs) découle d'un même précurseur, la norbelladine. Cependant, très peu d'études ont été effectuées sur les capacités pharmaceutiques des alcaloïdes de cette famille. Présentant une structure moins rigide que les autres familles d'alcaloïdes, notre hypothèse était que ceux-ci pourraient avoir plus de facilité à se lier à une cible de l'hôte et/ou virale. Le but de cette étude était donc de découvrir les propriétés biologiques d'une série d'alcaloïdes synthétisés chimiquement de la famille de la norbelladine, dont leurs activités cytotoxiques et antivirales. Nous avons évalué les propriétés cytotoxiques de ces molécules par dosage de l'ATP sur deux lignées cellulaires, dont les Huh7, des cellules de type hépatocytaire, et les THP-1, des cellules de type monocytaire. Dans les cellules THP-1, la norcraugsodine était hautement cytotoxique ($CC_{50} = 27,0 \mu\text{M}$), tandis que dans les cellules Huh7, la norbelladine était la plus cytotoxique ($CC_{50} = 72,6 \mu\text{M}$). Nous avons ensuite évalué leur potentiel antiviral par cytométrie en flux en effectuant des infections avec un vecteur propagatif DENV_{GFP} et un vecteur non propagatif HIV-1_{GFP}. Les infections par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) n'ont été inhibées qu'à des concentrations cytotoxiques. Le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, la 3'-*O*-méthylnorbelladine et la norcraugsodine ont réduit le pourcentage d'infection par DENV avec des EC_{50} allant de 24,1 à 44,9 μM . Les résultats obtenus permettent d'approfondir davantage nos connaissances sur la relation structure/activité des alcaloïdes de la famille de la norbelladine. Le développement de thérapies antivirales basées sur les AAs pourrait apporter des solutions médicales décisives aux pandémies catastrophiques. Puisque beaucoup de ces molécules exercent leur action antivirale en ciblant des facteurs de l'hôte, elles offrent la possibilité de développer des traitements à large spectre qui sont moins susceptibles d'évoluer vers une résistance aux médicaments.

Mots-clés : Alcaloïde, norbelladine, dengue, virus de l'immunodéficience humaine, lycorine, *Amaryllidaceae*

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Mise en contexte et problématique.....	1
1.2 Les alcaloïdes des <i>Amaryllidaceae</i>	3
1.3 Biosynthèse des alcaloïdes des <i>Amaryllidaceae</i>	4
1.4 Les précurseurs et alcaloïdes de la famille de la norbelladine.....	8
1.5 Les virus à ARN	9
1.6 Les <i>Flavivirus</i>	10
1.6.1 Structure du génome des <i>Flavivirus</i>	10
1.6.2 Cycle de réplication des <i>Flavivirus</i>	11
1.6.3 Effet antiviral des alcaloïdes des <i>Amaryllidaceae</i> contre les <i>Flavivirus</i>	13
1.7 Le virus de l'immunodéficience humaine	16
1.7.1 Structure du génome du VIH-1.....	16
1.7.2 Cycle de réplication du VIH-1.....	17
1.7.3 Effet antiviral des alcaloïdes des <i>Amaryllidaceae</i> contre le VIH-1.....	20
1.8 Hypothèses et objectifs.....	21
1.9 Originalité des travaux.....	23
CHAPITRE II	
CHEMICAL SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF NORBELLADINE DERIVATIVES AND PRECURSORS.....	24
2.1 Contribution des auteurs.....	24
2.2 Résumé de l'article	25

2.3	Article complet : Chemical synthesis and biological activities of norbelladine derivatives and precursors	26
	Abstract.....	26
	Introduction	27
	Results	29
	Chemical Synthesis.....	29
	Cytotoxic Assay.....	30
	Antiviral Assay	32
	Choline Esterase and Prolyl oligopeptidase Inhibitory Effect.....	34
	Molecular Docking of Norbelladine Derivatives with BuChE.....	35
	Discussion.....	38
	Materials and Methods	41
	Chemical Synthesis and Purification of Alkaloids	41
	Preparation of Lycorine, 3,4-DHBA, Tyramine, and other Commercial Inhibitor Stocks.....	44
	Cell Lines and Culture	45
	Cytotoxicity Assay.....	45
	Viral Vectors.....	46
	Antiviral Assays.....	46
	Anti-acetylcholinesterase (AChE) and -Butyrylcholinesterase (BuChE) Activity.....	47
	Prolyl oligopeptidase (POP) Inhibition Assay.....	48
	Docking of Norbelladine Derivatives with BuChE	48
	Statistical Analysis.....	49
	Conclusions	49
	Acknowledgments	51
	Appendix A.....	52
	References	55
	CHAPITRE III	
	DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	61
3.1	Retour sur la problématique	61
3.2	Cytotoxicité des précurseurs et dérivés de la norbelladine.....	62

3.3	Effet antiviral des précurseurs et dérivés de la norbelladine	64
3.4	Rôle de la structure des alcaloïdes de type norbelladine dans l'activité biologique	67
3.5	Les différents types de mécanismes d'action antiviraux	69
3.6	Limites et perspectives	73
3.7	Conclusion	80
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	81
	ANNEXE A	
	MÉTHODOLOGIE	99
	ANNEXE B	
	REVUE DE LITTÉRATURE	102

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1	Structure des alcaloïdes des <i>Amaryllidaceae</i>	5
1.2	Voie de biosynthèse des principaux types d'alcaloïdes des <i>Amaryllidaceae</i> ...	7
1.3	Structure du génome des <i>Flavivirus</i>	11
1.4	Cycle d'infection des <i>Flavivirus</i>	13
1.5	Structure du génome du VIH-1	17
1.6	Cycle de réplication du VIH-1	19
1.7	Structures chimiques des précurseurs et dérivés de norbelladine	22
 Tableau		
1.1	Les différents groupes d'alcaloïdes des <i>Amaryllidaceae</i>	4

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AAs	Alcaloïdes des <i>Amaryllidaceae</i>
AChE	Acétylcholinestérase
AD	Maladie d'Alzheimer
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHFV	Virus de la fièvre hémorragique d'Alkhurma
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATF4	Facteur de transcription activateur 4
ATP	Adénosine triphosphate
A549	Cellules épithéliales basales alvéolaires humaines adénocarcinomiques
BuChE	Butyrylcholinestérase
C	Protéine de la capsid
CC ₅₀	Concentration cytotoxique médiane
¹³ C NMR	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
CCR5	Récepteur à C-C chimiokine de type 5
CD14	Groupe de différenciation 14
CD4	Groupe de différenciation 4
CHIKV	Virus du chikungunya
COX-1	Cyclooxygénase 1
COX-2	Cyclooxygénase 2
Covid-19	Maladie à coronavirus 2019
CRFK	Cellules rénales félines Crandell-Rees
CXCR4	Récepteur à C-X-C chimiokine de type 4

CYP96T1	Enzyme du cytochrome P450
DENV	Virus de la dengue
3,4-DHBA	3,4-Dihydroxybenzaldéhyde
DHF	Fièvre hémorragique de la dengue
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSS	Syndrome de choc de la dengue
DTMUV	Virus de Tembusu du canard
E	Protéine d'enveloppe
EC ₅₀	Concentration effectrice médiane
ELISA	Test immuno-enzymatique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FBS	Sérum foetal bovin
Fc	Fragment cristallisable
<i>gag</i>	Gène viral « groupe spécifique d'antigènes »
GFP	Gène rapporteur de fluorescence verte
4-HPR	N-(4-hydroxyphenyl)retinamide
H1N1	Hémagglutine de type 1 et neuraminidase de type 1
H3N2	Hémagglutine de type 3 et neuraminidase de type 2
H5N1	Hémagglutine de type 5 et neuraminidase de type 1
HCoV-NL63	Coronavirus humain NL63
HCoV-OC43	Coronavirus humain OC43
HCV	Virus de l'hépatite C
HL-60	Lignée cellulaire humaine de promyéloblastes
¹ H NMR	Résonance magnétique nucléaire du proton

Huh7	Lignée cellulaire de carcinome dérivé d'hépatocytes différenciés
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IFN-I	Interféron de type 1
IFN- α	Interféron alpha
IFN- β	Interféron bêta
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
IL-10	Interleukine 10
IMP α	Importine alpha
IMP β 1	Importine bêta 1
IMPDH	Inosine monophosphate déshydrogénase
IN	Intégrase
IP15	Lignée cellulaire mésangiale glomérulaire humaine
IR	Spectroscopie infrarouge
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée
JAK1	Janus kinase 1
JEV	Virus de l'encéphalite japonaise
K562	Lignée cellulaire humaine immortalisée de leucémie myélogène
K _i	Constante d'inhibition enzymatique
LC-MS	Spectrométrie de masse par chromatographie liquide
LLC-PK ₁	Lignée cellulaire épithéliale dérivée de reins de cochon
LTR	Longue répétition terminale
Mcl-1	Protéine de différenciation des cellules de leucémie myéloïde
MERS-CoV	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient
MOI	Multiplicité de l'infection

MPro	Protéase principale
MT-4	Lignée cellulaire de lymphocytes T humains
NBS	Norbelladine synthase
N4OMT	Norbelladine 4'- <i>O</i> -méthyltransférase
<i>Nef</i>	Protéine virale du facteur négatif
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
NLS	Signal de localisation nucléaire
NPC	Cellules progénitrices neurales
NR	Norgrausodine/noroxomariditine réductase
NS	Protéine non-structurale
NTPase	Nucléoside-triphosphatase
Nup93	Nucléoporine 93
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Cadre de lecture ouvert
PBMC	Cellules mononuclées de sang périphérique
pH	Potentiel hydrogène
<i>pol</i>	Gène viral de la polymérase
POP	Prolyl oligopeptidase
PR	Protéase
prM	Protéine pré-membranaire
qRT-PCR	Transcription inverse quantitative/Réaction en chaîne par polymérase
RC	Complexe de réplication
RdRp	ARN polymérase ARN dépendante
RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux

Rev	Protéine virale de régulation de l'expression des protéines virales
RNP	Complexe ribonucléoprotéique viral
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Transcriptase inverse
SFV	Virus de la forêt de Semliki
SH-SY5Y	Lignée cellulaire de neuroblastome humain
SI	Indice de sélectivité
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SINV	Virus Sindbis
SMAD3	Mères contre l'homologue décapentaplégique 3
SNC	Système nerveux central
SARS-CoV	Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère
SARS-CoV-2	Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2
SUP-T1	Lignée cellulaire de lymphocytes T humains
TAR	Traitement antirétroviral (ART en anglais)
Tat	Protéine virale « trans-activateur de transcription »
TBEV	Virus de l'encéphalite à tiques
THP-1	Lignée cellulaire monocyttaire de leucémie humaine
TLR3	Récepteur de type Toll 3
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TYK2	Tyrosine kinase 2
U251	Lignée cellulaire humaine de glioblastome
UTR	Région non traduite
VEEV	Virus de l'encéphalite équine vénézuélienne
Vero	Cellules épithéliales rénales de singe vert africain

Vif	Protéine virale « facteur d'infectivité des virions »
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1 en anglais)
VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (HIV-2 en anglais)
VP	Paquet de vésicules
Vpr	Protéine virale R
Vpu	Protéine virale U
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VSV-G	Protéine G du virus de la stomatite vésiculaire
WNV	Virus du Nil occidental
YFV	Virus de la fièvre jaune
ZIKV	Virus Zika

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte et problématique

Les virus à ARN font partie des agents infectieux les plus souvent responsables de l'apparition de nouvelles maladies humaines, avec un taux de deux à trois nouveaux virus qui émergent annuellement [1]. Ils sont constitués de plusieurs familles de virus pouvant présenter des différences importantes au niveau de leur type de génome et ainsi de leur cycle viral [2]. La croissance continue de la population, la mondialisation et la fragmentation des habitats sont tous des facteurs responsables de l'interaction croissante de l'homme avec les environnements sauvages et les populations fauniques, ce qui a permis l'émergence d'infections causées par des virus tels que le DENV et le VIH [1, 3, 4]. La dengue est une maladie virale causée par le DENV de la famille des *Flavivirus* [4]. Elle est transmise par les moustiques femelles de type *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées [5]. Elle peut causer des symptômes allant du simple rhume à une fièvre hémorragique grave, appelée la dengue sévère [6]. Selon l'OMS, la dengue engendrerait jusqu'à 390 millions de cas par année, dont 96 millions seraient symptomatiques. D'ailleurs, 3,9 milliards de personnes à travers 129 pays seraient à risque de contracter la maladie.[5]. Le SIDA est une autre maladie infectieuse causée par un virus à ARN, le VIH de la famille des rétrovirus [7]. Il est transmis par l'échange de différents fluides corporels, tels que le sang, le lait maternel, le sperme et les sécrétions vaginales [8]. Les symptômes du VIH dépendent du stade de l'infection [8]. Après plusieurs années, une immunodéficience marquée apparaît et les individus peuvent présenter plusieurs types d'infections opportunistes ou de cancers [8]. Depuis ses débuts, le VIH a causé 40,1 millions de décès [9]. À la fin de l'année 2021, les estimations ont indiqué que 38,4 millions de personnes étaient infectées par le VIH et que 25 % des gens atteints par la maladie n'avaient toujours pas accès à un traitement, en raison notamment du coût élevé [9, 10].

La recherche de molécules antivirales pour contrer les infections causées par le DENV et le VIH-1 est cruciale. Jusqu'à aujourd'hui, aucun traitement n'est disponible pour soigner les cas de dengue sévère [5]. Il existe un vaccin (Dengvaxia), mais son utilisation est limitée aux personnes âgées de 9 à 45 ans qui ont déjà présenté une première infection et qui vivent dans les régions endémiques [5]. Un puissant inhibiteur viral a récemment été découvert et testé *in vivo* chez les rongeurs (JNJ-A07) [11], mais il n'est toujours pas approuvé pour le traitement de la maladie. En ce qui concerne le VIH, aucun vaccin n'est disponible jusqu'à ce jour [12]. La combinaison de deux ou trois agents antiviraux, ou plus dans certains cas, permet de réduire les niveaux d'infection à un point où le virus est pratiquement indétectable chez le patient et quasi non transmissible, mais ce système thérapeutique (TAR) ne permet pas d'éradiquer la maladie et engendre des effets secondaires importants.[13, 14]. De plus, le VIH est un virus présentant un taux de mutation élevé et peut rapidement devenir résistant à plusieurs médicaments [15]. Il existe donc un besoin continu de découvrir de nouveaux composés présentant un pouvoir antiviral.

Les plantes contiennent une variété de molécules bioactives pouvant présenter une importance particulière en recherche pharmacologique. Les alcaloïdes, de petits métabolites spécialisés, peuvent être extraits à partir de plusieurs espèces, dont les *Amaryllidaceae* [16]. Cette classe de composés présente plusieurs propriétés qui expliquent l'intérêt qui leur est accordé. Par exemple ils affichent une grande diversité de structure et peuvent être assimilés à différentes classes en accord avec leur squelette moléculaire, telles que les quinolines, les indoles, les isoquinolines, les tropanes, les stéroïdes, les pyridines et les pyrrolizidines [17]. Ils portent aussi plusieurs groupements fonctionnels leur conférant des caractéristiques uniques, qui peuvent être modifiés par les chercheurs en introduisant d'autres groupements dans le but de moduler leurs propriétés physiques et leur activité biologique [18]. En raison de leur caractère basique, ils sont solubles dans différents milieux, augmentant ainsi leur biodisponibilité [18, 19]. De plus, ils respectent les critères de Lipinski, qui reposent sur quatre propriétés permettant de définir le potentiel médicinal d'un composé, dont : (1) la molécule doit avoir moins de cinq donneurs de liaisons hydrogènes, (2) moins de dix accepteurs de liaisons

hydrogènes, (3) une masse molaire de moins de 500 daltons, et (4) un coefficient de partition de moins de 5 [18, 20].

De nombreuses études ont mis de l'avant les propriétés antivirales exceptionnelles des alcaloïdes extraits des *Amaryllidaceae* en particulier, à l'image de la lycorine, qui inhibe un large éventail de virus tel que des *Alphavirus*, des *Flavivirus*, des coronavirus et des rétrovirus [21-26]. Nous avons donc effectué une recherche approfondie sur les découvertes récentes des propriétés antivirales des AAs. Plusieurs passages de l'introduction de ce mémoire sont adaptés d'une revue de littérature que nous avons publiée en ligne et qui est disponible en annexe.

1.2 Les alcaloïdes des *Amaryllidaceae*

Les *Amaryllidaceae* sont une famille de plantes monocotylédones appartenant à l'ordre des Asparagales et se retrouvant dans les régions tropicales, subtropicales et chaudes du monde, dont l'Amérique du Sud, le bassin méditerranéen et l'Afrique australe [27]. Elles sont composées de 1100 espèces et 75 genres. Les *Amaryllidaceae* sont utilisées en médecine traditionnelle, mais aussi en tant que plantes ornementales (p. ex. : narcisses, jonquilles) [28]. Depuis des siècles, elles sont reconnues à travers le monde pour leurs propriétés thérapeutiques [27]. L'une des premières preuves de l'utilisation médicinale des *Amaryllidaceae* remonte à 400 ans avant notre ère, lorsque Hippocrate de Kos proposait l'utilisation d'huile de *Narcissus poeticus* L. pour soigner les symptômes de tumeurs utérines [29]. Leur pouvoir médicinal est aujourd'hui reconnu comme étant attribué à la présence de métabolites spécialisés, spécifiquement des alcaloïdes isoquinoliniques, une classe de molécules aux propriétés basiques présentant différentes structures et possédant au moins un atome d'azote affichant un état oxydatif négatif dans un noyau généralement hétérocyclique [28]. Les *Amaryllidaceae* font partie des quelques 20 % d'espèces végétales pouvant produire des alcaloïdes [19]. Les alcaloïdes ne contribuent pas directement à la croissance de la plante, mais plutôt à sa défense contre les agents pathogènes, les insectes nuisibles et les herbivores [30]. La première publication sur les AAs remonte à 1877, décrivant la découverte de la

lycorine [31], et depuis, des études ont montré qu'elle présentait un large spectre d'activités biologiques, dont un pouvoir antitumoral, antibactérien, antifongique, antipaludique, antiviral, analgésique ainsi qu'une activité anticholinestérase [24, 32-37].

1.3 Biosynthèse des alcaloïdes des *Amaryllidaceae*

Jusqu'à aujourd'hui, plus de 650 alcaloïdes de structures différentes ont été isolés des *Amaryllidaceae* et classifiés en plusieurs groupes basés sur la structure des cycles et leur squelette de carbone [28, 38, 39]. Bien que la classification des alcaloïdes soit différente d'un auteur à l'autre, nous les présenteront ici sous la forme de neuf groupes distincts, dont la norbelladine, la cherylline, la galanthamine, la lycorine, la lycorenine, la crinine, la narciclasine, la tazettine, et la montanine, en fonction de leur origine biosynthétique (Tableau 1.1, Figure 1.1) [28].

Tableau 1.1

Les différents groupes d'alcaloïdes des *Amaryllidaceae*

Type d'alcaloïdes	Structure des cycles (IUPAC)	Couplage phénol	Alcaloïdes représentatifs
Norbelladine	4-({[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]amino}methyl)benzene-1,2-diol	n.a.	Norbelladine, Rystilline
Cherylline	(4S)-4-(4-Hydroxyphenyl)-6-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-7-isoquinolinol	n.a.	Cherylline, Gigantelline
Galanthamine	(4aS,6R,8aS)- 5,6,9,10,11,12- hexahydro- 3-methoxy- 11-methyl- 4aH-[1]benzofuro[3a,3,2-ef] [2] benzazepin- 6-ol	para-ortho'	Narwedine, Galanthamine
Lycorine	(1S,2S,12bS,12cS)-2,4,5,7,12b,12c-Hexahydro-1H-[1,3]dioxolo[4,5-j]pyrrolo[3,2,1-de]phenanthridine-1,2-diol	ortho-para'	Lycorine, Galanthine
Lycorenine	(7 α)-9,10-Dimethoxy-1-methyllycorenan-7-ol	ortho-para'	Homolycorine, Hippeastrine
Crinine	(3 α)-1,2-Didehydrocrinan-3-ol	para-para'	Crinine, Haemanthamine

Type d'alcaloïdes	Structure des cycles (IUPAC)	Couplage phénol	Alcaloïdes représentatifs
Narciclasine	(2S,3R,4S,4aR)-2,3,4,7-Tetrahydroxy-3,4,4a,5-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-6(2H)-on	para-para'	Narciclasine, Pancratistatine
Tazettine	(3S,4aS,6aS,13bS)-3-Methoxy-5-méthyl-3,4,4a,5,6,6a-hexahydro-8H-[1,3]dioxolo[6,7]isochromeno[3,4-c]indole	para-para'	6a-Deoxytazettine, Pretazettine
Montanine	(6R,6aS,8S,9S,11S)-5,6a,7,8,9,11-Hexahydro-9-méthoxy-6,11-méthano-6H-benzo[b]-1,3-benzodioxolo[5,6-e]azepin-8-ol	para-para'	Pancracine, Montanine

Légende : Le tableau 1.1 présente les neuf familles d'alcaloïdes des *Amaryllidaceae* en fonction de leur structure chimique (IUPAC) ainsi que quelques alcaloïdes représentatifs de chaque groupe, selon la classification de Desgagné-Penix [28]. Les couplages de type phénol sont aussi affichés. N.A., non-applicable

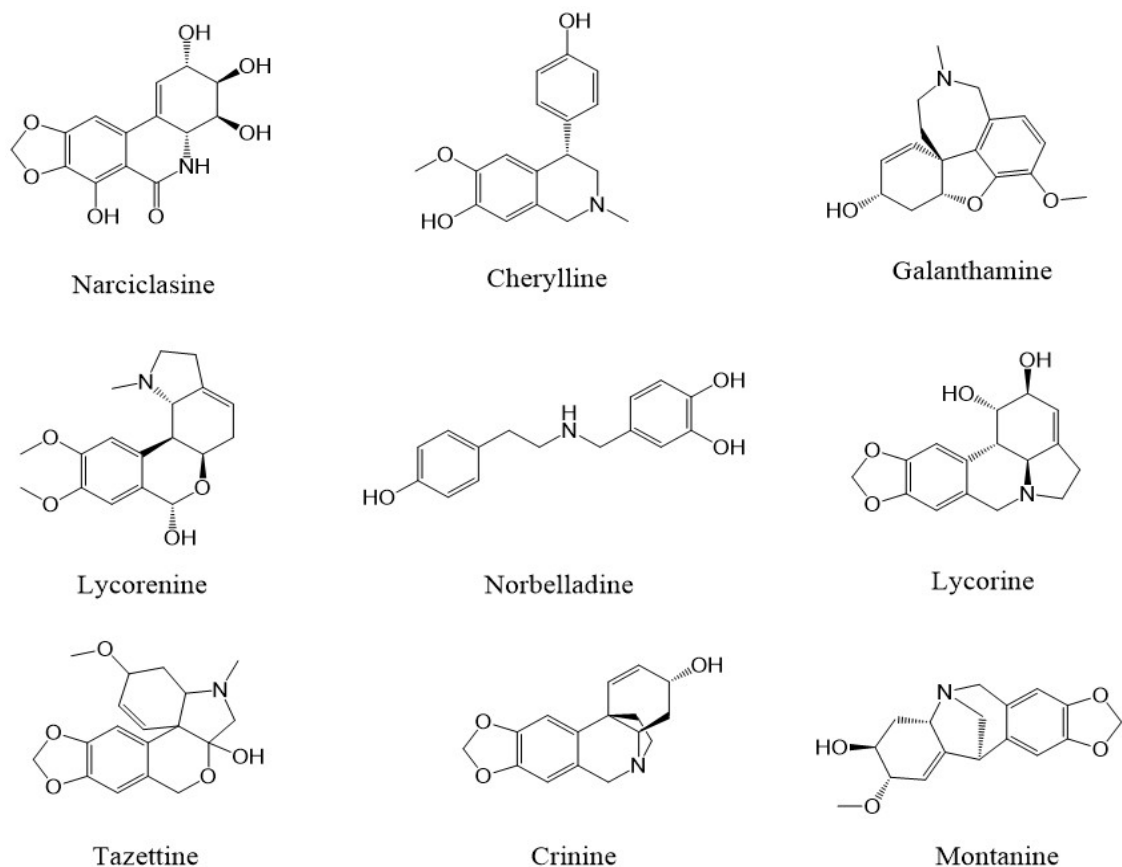


Figure 1.1 Structure des alcaloïdes des Amaryllidaceae.

Les 9 groupes d'alcaloïdes des *Amaryllidaceae* sont présentés par un alcaloïde type et classifiés selon l'origine biosynthétique, selon la classification de Desgagné-Penix [28]. La norbelladine est le précurseur de la biosynthèse de chaque type d'alcaloïde des *Amaryllidaceae*.

Malgré leur grande diversité de structure, les AAs découlent tous d'un précurseur commun, la norbelladine, formée grâce à la condensation de la tyramine et du 3,4-DHBA par la NBS suivie d'une réduction par la NR (Figure 1.2) [40-42]. La norbelladine peut ensuite subir différents types de réactions biochimiques, menant à la formation des autres alcaloïdes (Figure 1.2). L'ordre des réactions et les enzymes nécessaires pour obtenir les alcaloïdes de type cherylline ne sont pas encore élucidés, mais impliquent la méthylation, l'hydroxylation, la déshydratation, la cyclisation et la tautomérisation [28]. Les enzymes permettant d'obtenir les autres formes d'alcaloïdes de type norbelladine n'ont pas été découvertes non plus, il est probable qu'une *N*-méthyltransférase soit responsable de la formation de la belladine [28]. La norbelladine peut aussi être méthylée par la N4OMT afin d'obtenir la 4'-*O*-méthylnorbelladine (Figure 1.2) [43]. À partir de la 4'-*O*-méthylnorbelladine, il peut y avoir cyclisation selon trois différents couplages phénol-phénol', menant à la formation des autres types d'alcaloïdes (Figure 1.2) [44]. Le couplage para-ortho' est associé aux alcaloïdes de type galanthamine, ortho-para' aux alcaloïdes de type lycorine et lycorenine, et para-para' aux alcaloïdes de type crinine, narciclasine, tazettine et montanine (Figure 1.2). Ces couplages phénol-phénol' sont potentiellement catalysés par les enzymes du cytochrome P450, dont CYP96T1, les laccases ou des peroxydases [45].

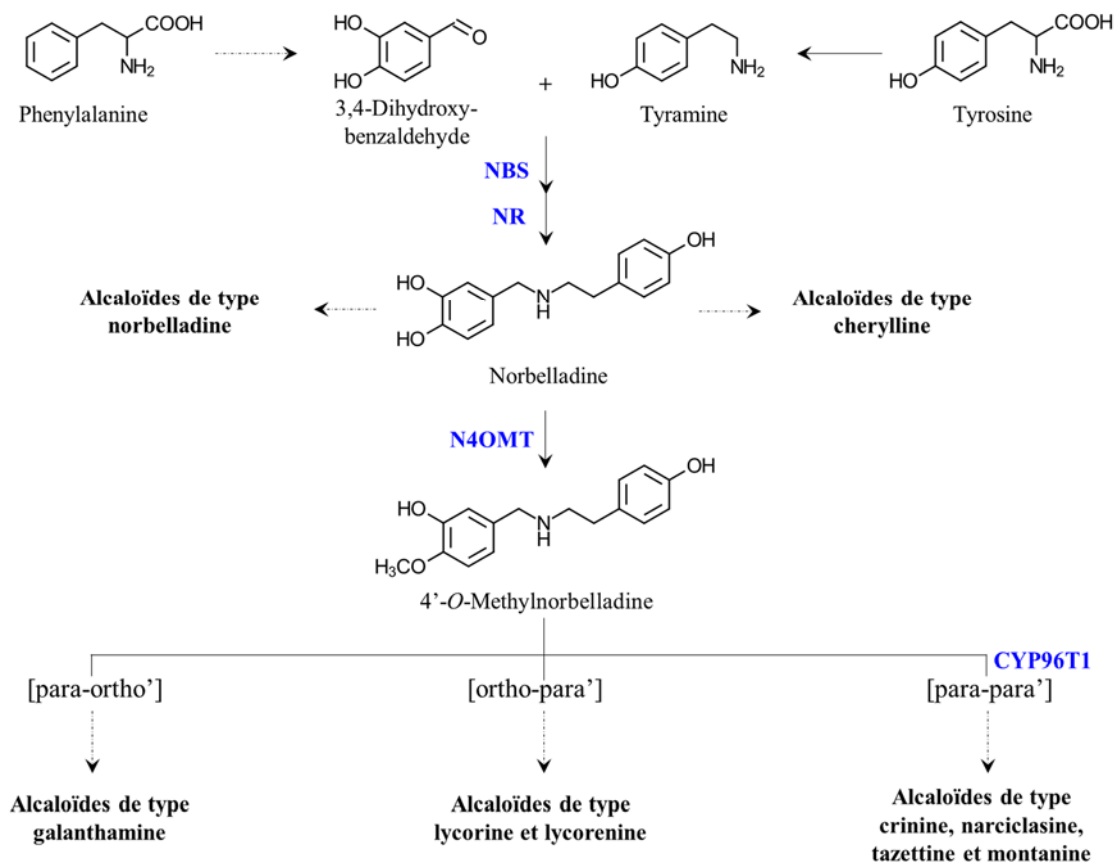


Figure 1.2 Voie de biosynthèse des principaux types d'alkaloïdes des *Amaryllidaceae*.

La flèche pleine représente une réaction biochimique tandis que la flèche brisée représente plus d'une réaction biochimique. La condensation de la tyramine et du 3,4-DHBA par la **NBS** puis la réduction par la **NR** permettent la formation de la norbelladine, qui est le précurseur de tous les autres types d'alkaloïdes des *Amaryllidaceae*. La norbelladine peut ensuite subir divers types de réactions (p. ex. : méthylation, hydroxylation, cyclisation) afin d'obtenir les alkaloïdes de type cherylline et norbelladine. La méthylation par la **N4OMT** permet d'obtenir la 4'-O-méthylnorbelladine, qui peut ensuite subir une cyclisation par couplage oxydatif phénol-phénol' régiosélectif, ce qui permet d'obtenir les formes couplées C-C en para-ortho' (p. ex. : précurseur des alkaloïdes de type galanthamine), ortho-para' (p. ex. : alkaloïdes de type lycorine et lycorénine), et para-para' par la **CYP96T1** (p. ex. : alkaloïdes de type crinine, narciclasine, tazettine et montanine).

1.4 Les précurseurs et alcaloïdes de la famille de la norbelladine

Le 3,4-DHBA et la tyramine sont les précurseurs de la norcaugsodine, un alcaloïde de la famille de la norbelladine. Quelques études ont été effectuées en ce qui concerne leurs propriétés biologiques. En effet, selon des analyses *in silico*, le 3,4-DHBA pourrait présenter des interactions avec la MPro du SARS-CoV-2, avec une énergie de liaison de -71,9725 Kcal/mol [46]. Il afficherait aussi un bon niveau d'absorption, de solubilité et ne serait pas toxique [46]. Une autre étude rapporte que le 3,4-DHBA prévient les dommages cérébraux engendrés par les peptides A β -amyloïdes en interférant avec l'augmentation de la concentration de calcium, la libération du glutamate, la génération d'ERO et l'activité de la caspase 3 [47]. La tyramine, quant à elle, présente un effet antioxydant sur la peroxydation de l'acide linoléique et démontre une activité inhibitrice des ERO, probablement dû à la présence de ses groupements hydroxyle et amine [48].

La norbelladine est le précurseur de la biosynthèse de tous les alcaloïdes chez les *Amaryllidaceae*. Elle forme une famille d'alcaloïdes dont peu de membres ont été identifiés chez les végétaux, tels que la norcaugsodine, la norbelladine, la 3'-*O,N*-diméthylnorbelladine, l'hydroxy-*O,N*-diméthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, la *N*-deméthylbelladine, la belladine et la rystilline [28]. Jusqu'à aujourd'hui, le potentiel biologique de ce type de molécules a été peu étudié. Il a été démontré que la norbelladine permet d'inactiver les ERO, d'inhiber l'activité des enzymes COX-1 et COX-2, et d'empêcher l'expression de ces mêmes enzymes en inhibant l'activation du facteur NF- κ B, ce qui permet de mettre en lumière son pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire *in vitro* [49]. Dans une autre étude, les auteurs ont synthétisé une série d'alcaloïdes de type norbelladine dérivés de la carltonine A et B. Ils ont ensuite testé les composés afin de déterminer s'ils avaient un potentiel d'inhibition de l'AChE et de la BuChE, des enzymes impliquées dans la progression de la AD [50]. La majorité des composés ont présenté une inhibition élevée de la BuChE, et de faible à modérée pour l'AChE [50].

Tel que mentionné précédemment, de nombreuses études ont démontré le potentiel antiviral de plusieurs AAs. Cependant, aucune investigation n'a encore été effectuée sur

l'activité antivirale et la cytotoxicité des alcaloïdes de la famille de la norbelladine. Dans le cadre de ce projet, une série d'alcaloïdes de type norbelladine a été synthétisée dans le laboratoire du Dr Gervais Bérubé (Université du Québec à Trois-Rivières, Canada), incluant la norcraugsodine, la norbelladine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine et la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine. D'autres formes d'alcaloïdes de type norbelladine, qui n'ont encore jamais été répertoriées chez les *Amaryllidaceae*, ont aussi été synthétisées par *O*-méthylation des différents groupes hydroxyles, dont la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine et la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude du potentiel biologique de ces composés.

1.5 Les virus à ARN

Les virus à ARN constituent 70 % de l'ensemble des virus répertoriés et englobent plusieurs familles de virus qui peuvent être regroupées en fonction de la nature chimique et de la polarité de leur génome [51]. Ils sont représentés par quatre des sept classes de virus de la classification de Baltimore, dont les groupes III, IV, V et VI, correspondant respectivement à des virus présentant un génome de type ARN double-brin, ARN simple-brin à polarité positive et ARN simple-brin à polarité négative [2]. Le groupe VI est aussi constitué de virus abordant un génome de type ARN simple-brin à polarité positive, mais avec la présence d'ADN intermédiaire dans le cycle de vie [2]. En fonction de leur génome, le mécanisme de répllication va varier d'un virus à un autre [52]. Les virus du groupe III, présentant un ARN génomique double-brin, sont transcrit en ARNm dans la cellule à partir du brin négatif par la RdRp [53]. Les virus du groupe IV, abordant un ARN simple-brin à polarité positive, miment la structure des ARNm en présentant la même polarité, et peuvent donc être traduit directement par l'ARN polymérase [2]. Les virus du groupe V, portant un ARN simple-brin à polarité négative, présente une polarité inverse à l'ARNm cellulaire, et doivent donc être transcrit en ARN de polarité positive afin de pouvoir servir ensuite d'ARNm et être traduit. Les virus du groupe VI, possédant un génome d'ARN à polarité positive, présente une particularité qui les différencie du groupe IV; leur génome ribonucléique doit être transcrit en ADN

complémentaire et intégrer dans le génome de l'hôte pour ensuite être transcrit en ARNm [2, 51]. Dans le cadre de mon projet, nous nous intéressons davantage au *Flavivirus*, dont le DENV, et au rétrovirus, dont le VIH-1, faisant partie des groupes IV et VI respectivement. Puisqu'ils présentent des mécanismes viraux très différents, il semble peu probable que l'un des précurseurs ou dérivés de la norbelladine puisse cibler spécifiquement les deux virus. Cependant, il est tout de même possible que l'un des composés interagissent avec des facteurs cellulaires impliqués dans le cycle de vie du DENV et du VIH-1.

1.6 Les *Flavivirus*

Les *Flavivirus* sont des virus enveloppés transmis par l'intermédiaire de moustiques ou de tiques [54]. Ils font partie de la famille des *Flaviviridae* et comprennent plus de 70 virus, dont près de la moitié sont capables d'infecter l'humain tels que le DENV, le ZIKV, le YFV, le WNV, le JEV et le TBEV, qui sont les plus connus [54]. Dans le cas du DENV, quatre sérotypes différents, DENV 1-4, peuvent infecter et réinfecter les hôtes et mener à la dengue sévère [6].

1.6.1 Structure du génome des *Flavivirus*

Les *Flavivirus* présentent un génome ARN de polarité positive de 10 à 11 kilobases. Les virions ont une taille d'environ 50 nanomètres et ne contiennent qu'une seule copie d'ARN [54]. Le génome ne contient qu'un seul ORF flanqué par des régions non traduites très structurées, les UTR [55]. L'ARN est coiffé en 5' selon une structure $^{\text{N7Me}}\text{GpppA}_{2'}^{\text{OMe}}\text{-ARN}$, 'Me' pour groupement méthyle, mimant la structure 5' de l'ARNm cellulaire, essentiel à l'initiation de la traduction et permettant à l'ARN viral d'éviter d'être détecté comme un ARN étranger non coiffé (Figure 1.3) [56, 57]. L'ARN viral ne contient pas de queue poly(A) mais un 3'UTR possédant un motif CU hydroxylé qui sert de site de reconnaissance pour la réplication de l'ARN [58]. Cette région comprend de nombreuses structures secondaires et motifs conservés qui sont essentiels pour le cycle des *Flavivirus*, ainsi que des séquences de cyclisation [58].

Leur génome code pour dix protéines, incluant trois protéines structurales, soit la protéine E, la protéine prM et la protéine C, et sept protéines non-structurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 [6]. D'intérêt particulier en tant que cibles thérapeutiques, NS5 porte un domaine de RdRp et un domaine méthyltransférase nécessaires à la réplication et la traduction de l'ARN viral [59-61], alors que NS3 porte les domaines sérine protéase (en complexe avec NS2B), hélicase d'ARN et NTPase essentiels pour cliver la polyprotéine virale précurseur, mais aussi pour la réplication de l'ARN et la formation de la coiffe [59, 62, 63].

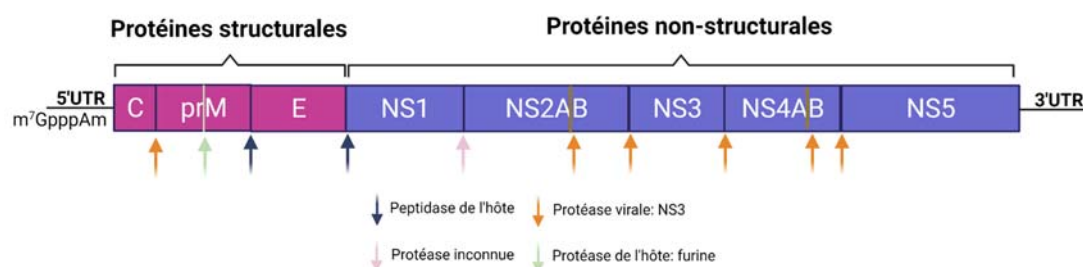


Figure 1.3 Structure du génome des *Flavivirus*.

Le génome des *Flavivirus* code pour une grande polyprotéine, qui est clivée en 3 protéines structurales, dont la protéine C, la protéine prM et la protéine E, ainsi que 7 protéines NS, dont NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5. Les flèches indiquent les sites de clivage par les protéases et autres enzymes. Figure adaptée de [6]. Figure créée avec BioRender.com.

1.6.2 Cycle de réplication des *Flavivirus*

Les *Flavivirus* pénètrent dans différents types de cellules par endocytose activée après liaison de leurs protéines E à des facteurs d'attachement de carbohydrates liés à l'asparagine sur des récepteurs de type intégrine, phosphatidyl-sérine, ou tyrosine kinase [64]. Dans le cas spécifique de DENV, les glycoprotéines E interagissent aussi avec les récepteurs Fc lorsque associées à un anticorps sous-neutralisant, les molécules associées à CD14, le glycosaminoglycane, le sulfate d'héparane (aussi utilisé par YFV, WNV, TBEV et JEV) ou des récepteurs de lectine de type C à la surface des cellules, et l'endocytose des virus est induite par des molécules de clathrine (Figure 1.4) [54, 65-69]. La protéine E permet la fusion de la membrane virale avec la membrane endosomale suite

à un changement de conformation induit par l'acidification des endosomes tardifs, libérant ainsi la nucléocapside dans le cytoplasme [69]. Le processus de décapsidation a lieu dans le cytoplasme et la traduction, la réplication subséquente et l'assemblage du virion se produisent en association avec la membrane du RER [69]. L'ARN viral est traduit en une seule grande polyprotéine précurseur qui est clivée pendant et après la traduction par des protéases virales et cellulaires, produisant les protéines virales (Figure 1.4) [56]. Ce même ARN sert de matrice pour la réplication de l'ARN génomique dans des organites de réplication spécifiques formés de protéines virales et cellulaires [70]. Ces usines de réplication virale dérivent du RER et ont une architecture caractéristique avec trois sous-structures : 1) les VP, composés de membranes de RE invaginées dans lesquelles la réplication a lieu, 2) les sacs de virus, ressemblant à de larges citernes dans le RE où les virions sont assemblés et accumulés de manière ordonnée, et 3) les membranes convolutées ayant un rôle possible dans la modulation de la réponse de l'hôte [71-73]. Les VP sont formés par et constitués de nombreux facteurs de l'hôte et du virus, en particulier les protéines NS et l'ARN viral, regroupés en un RC [74]. Tous les facteurs (cellulaires et viraux) le constituant représentent des cibles d'intérêt thérapeutique pour bloquer la réplication des *Flavivirus*. Au sein du RC, l'ARN de polarité positive est répliqué en ARN de polarité négative par la RdRp (NS5), ce qui génère un intermédiaire d'ARN double brin, à partir duquel une phase exponentielle de synthèse d'ARN de polarité positive débute [75]. L'ARN viral nouvellement synthétisé est utilisé pour la traduction de protéines virales [76]. Il est aussi complexé avec les protéines C pour former la nucléocapside, qui est enveloppée par une bicouche lipidique portant les protéines E et prM [77, 78]. Les virions immatures sont ensuite transportés à travers l'appareil de Golgi, dans lequel la conformation des protéines E et prM est modifiée, dû à la présence d'un pH légèrement acide [79-81] et à la protéase furine qui clive le peptide pr de la protéine prM (Figure 1.4) [82]. Les virions matures sont sécrétés hors de la cellule par exocytose [80].

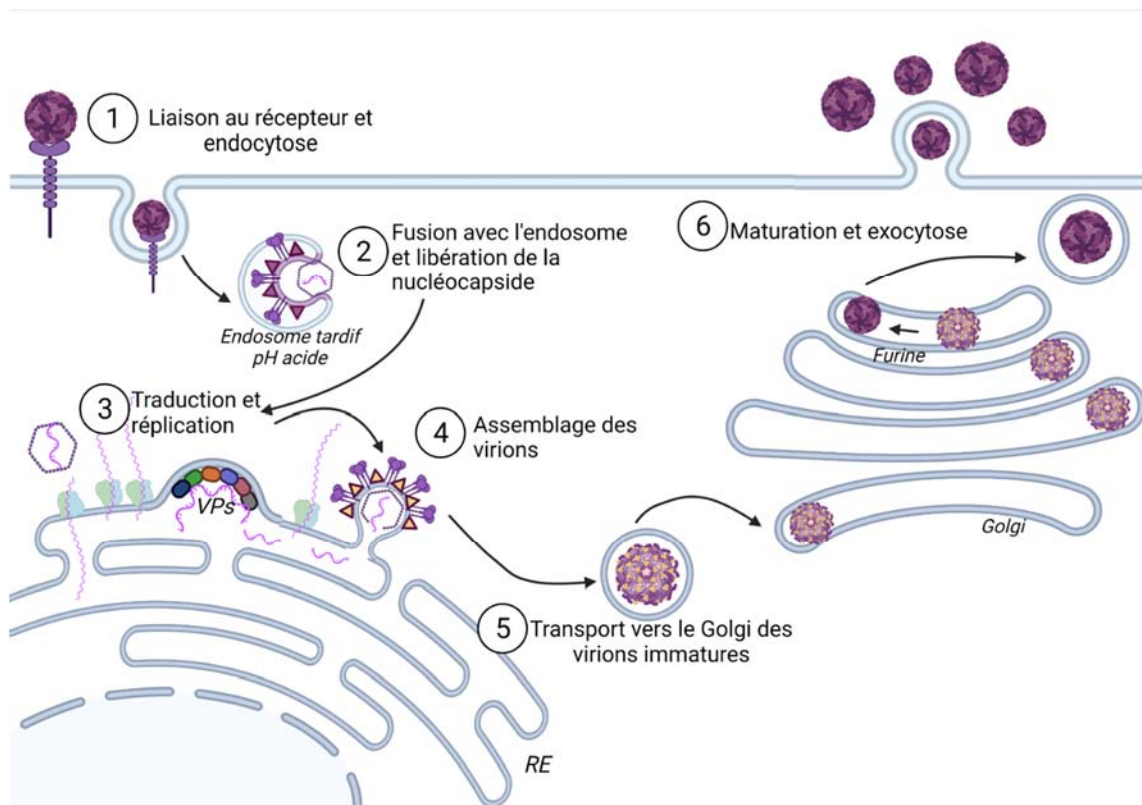


Figure 1.4 Cycle d'infection des *Flavivirus*.

Les virions se lient à des récepteurs et pénètrent par endocytose dans la cellule hôte. L'acidification de l'endosome permet la fusion des membranes virales et endosomales, suivie du relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme. L'ARN viral est traduit en une polyprotéine sur la membrane du RE qui est ensuite clivée par des protéases virales et cellulaires, permettant d'obtenir les trois protéines de structure (C, prM et E) et les sept protéines NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). Les protéines NS s'assemblent avec la membrane endosomale pour former le complexe de réplication responsable de la réplication de l'ARN viral dans des VP. L'assemblage des virions se produit aussi sur la membrane du réticulum endoplasmique. Les virions immatures sont transportés à l'appareil de Golgi, où prM est clivée par une protéase cellulaire, la furine. Les virions matures sont ensuite sécrétés hors de la cellule.

1.6.3 Effet antiviral des alcaloïdes des *Amaryllidaceae* contre les *Flavivirus*

Des études effectuées sur des extraits de *Crinum macawonii*, *Crinum jagus* et *Pancreatum trianthum* soulignent le potentiel antinflaviviral des *Amaryllidaceae* [16, 83, 84]. Par exemple, des extraits méthanoliques de *C. macawonii* inhibent les infections *in cellulo* causées par YFV et JEV, avec respectivement, des EC₅₀ de 4,3 µg/mL

et 5,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [83]. De même, des extraits de *C. jagus* et de *P. trianthum* bloquent les infections par DENV *in cellulo* avec des EC_{50} de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et de $2,9 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement (Tableau 1.2) [16, 84]. *C. macawonii*, *C. jagus* et *P. trianthum* comportent une multitude d'alcaloïdes, dont la lycorine, la crinine, et plusieurs autres, ce qui pourrait expliquer leurs propriétés biologiques [16, 84-86]. En effet, il a été rapporté que plusieurs AAs, dont la narciclasine, la lycoricidine, la lycorine, la pancratistatine, et la trans-dihydroxynarciclasine présentent un effet antiviral contre DENV *in cellulo* (Tableau 1.2) [22], et que la pancratistatine exerce un fort effet sur la survie de souris infectées avec JEV [22]. La narciclasine, la pancratistatine et la trans-dihydroxynarciclasine inhibent aussi l'infectivité du ZIKV *in cellulo* avec des index de sélectivité de 4,0, 3,7 et 7,0 respectivement, ce qui est plutôt faible en raison d'une forte cytotoxicité [87]. La plupart des médicaments antimicrobiens approuvés présentent en général des SI supérieur à 100, tels que le molnupiravir (SARS-CoV-2, $\text{SI} \Rightarrow 100$) et l'atazanavir (VIH-1, $\text{SI} = 6500-23800$) [88, 89]. Cependant, quelques molécules présentant des SI inférieurs à 10 sont aussi utilisées lorsqu'il n'existe pas de traitement alternatif, tels que le remdesivir (SARS-CoV-2, $\text{SI} \Rightarrow 7,69$), au tout début de la pandémie de Covid-19 [90]. Dans ce cas-ci, ces molécules s'avèrent peu intéressantes en tant que futur médicament pour traiter les infections causées par ZIKV, puisque d'autres composés présentent de meilleurs résultats. Par exemple, la trans-dihydrolycoricidine bloque la réplication des deux souches de ZIKV sur des NPC, dont PE-243 et FSS-13025, avec des $\text{SI} > 500$, démontrant une bien meilleure sélectivité [91]. Il serait très intéressant d'étudier davantage son mécanisme afin de découvrir sa cible moléculaire et de tester son effet sur d'autres *Flavivirus*, tels que DENV, JEV, YFV et WNV. L'effet antiviral de la lycorine a, quant à lui, été confirmé dans de nombreuses études [21, 23, 92], dont l'une récente rapporte des SI de 90,6 (DENV) et 35,4 (ZIKV) (Tableau 1.2), ce qui est plutôt remarquable [16]. *In vivo*, la lycorine protège les souris AG6 contre la létalité induite par ZIKV en diminuant la charge virale dans le sang [23]. De plus, la lycorine inhibe les infections par WNV *in cellulo*, soit avec un SI de 104, et diminue fortement l'infection par YFV [92]. Son activité antivirale est élevée et s'étend à plusieurs *Flavivirus*, ce qui en fait un composé d'intérêt.

Plusieurs analogues de la lycorine ont été synthétisés afin d'augmenter son potentiel antiviral contre WNV et de réduire sa cytotoxicité [92]. La modification des groupes hydroxyles en position C1 et C2 réduit la cytotoxicité des composés, et une oxydation du groupement hydroxyle en position C2 augmente son potentiel antiviral [92]. Cependant, une ouverture du cycle E et/ou une oxydation en position C7 diminuent l'activité des composés [92]. L'un des nouveaux dérivés, la 1-*O*-acetyl-2-oxolycorine, a permis une inhibition plus élevée de WNV avec moins de cytotoxicité, soit avec un SI de 1578, et pourrait donc être envisagé en tant que futur traitement prometteur [92]. La 1-acetyllycorine, la 1-*O*-acetyl-2-oxolycorine et la 2-oxolycorine, présentent une activité antinflavivirale contre DENV2 sur des cellules adénocarcinomiques A549 avec des SI de $> 750,0$, $> 166,7$ et $113,2$, démontrant une grande sélectivité [21].

La lycorine exerce aussi un effet inhibiteur *in cellulo* contre le AHFV [93] et contre le DTMUV, avec respectivement, des SI de 9 et $\approx 9,5$, ce qui est beaucoup moins sélectif que pour les autres *Flavivirus*. Elle cible l'internalisation et l'entrée du DTMUV dans les cellules hôtes [94], tandis que pour d'autres *Flavivirus*, son mécanisme d'inhibition est spécifique de l'étape de réplication de l'ARN [16]. Des analyses *in silico* suggèrent que la lycorine agit en ciblant la RdRp NS5 de ZIKV [23] ou encore le peptide 2K de NS5 de WNV qui joue un rôle essentiel dans la maturation de la polyprotéine et le réarrangement des membranes du RE servant d'échafaudage pour la formation du RC des *Flavivirus* [92]. La cherylline, isolée de *C. jagus*, présente également un potentiel antiviral contre DENV et ZIKV avec respectivement des SI > 28 et $> 12,3$ (Tableau 1.2) [16]. La trans-dihydrolycoricidine et la lycorine ont démontré une bien meilleure sélectivité contre DENV et ZIKV respectivement. Cependant, la cherylline exerce tout de même une activité antivirale non-négligeable qui pourrait être améliorée suite à l'optimisation de sa structure. Elle cible elle aussi l'étape de réplication de l'ARN mais sa cible moléculaire n'est pas connue. Des expériences *in silico* indiquent que la cherylline n'est similaire à aucun inhibiteur de protéines virales connus dans les bases de données examinées [16]. Ces analyses prédisent que plusieurs protéines humaines, telles que les récepteurs de la dopamine et des œstrogènes, ainsi que les transporteurs de neurotransmetteurs et la protéine kinase 5 de la division cellulaire, interagissent avec celle-ci, suggérant ainsi

qu'elle agit en ciblant des protéines cellulaires de l'hôte impliquées dans le cycle viral [16]. Le RC de DENV est composé de ses protéines non-structurales en interaction avec plusieurs protéines cellulaires [95-98]. Il est possible que la cherylline agisse sur l'une des protéines cellulaires ayant un rôle dans le complexe en question. Récemment, nous avons également découvert que l'haemanthamine, la pancracine et l'haemanthidine, isolés de *Pancreatum maritimum*, inhibaient les infections causées par DENV, avec des SI de 65,8, 72,4 et 35,3 respectivement, ce qui est intéressant mais pas aussi sélectif que la lycorine (Tableau 1.2) [99].

1.7 Le virus de l'immunodéficience humaine

Les rétrovirus sont des virus à ARN utilisant leur propre RT pour rétrotranscrire leur ARN en ADN [100]. Le VIH appartient au genre des *Lentivirus* de cette famille [101]. Il en existe deux types, dont le VIH-1 qui est responsable de la pandémie de SIDA mondiale actuelle, et le VIH-2 qui est moins pathogène et principalement présent en Afrique de l'Ouest [3]. La maladie progresse généralement assez lentement en affaiblissant le système immunitaire au moyen de l'infection de lymphocytes T CD4⁺, de macrophages et de cellules dendritiques. En absence de traitement, le stade SIDA est atteint lorsque la charge plasmatique virale est élevée et que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 200 cellules/mm³ [102].

1.7.1 Structure du génome du VIH-1

Le VIH-1 est un rétrovirus enveloppé qui contient deux copies identiques d'ARN simple brin présentant un génome d'environ 10 000 nucléotides [103]. Le LTR 5', situé dans le génome proviral, comporte notamment le promoteur permettant la transcription des protéines virales [104]. Ensuite, se situent les gènes *gag* et *pol*. *Gag* code pour les protéines de la matrice (MA, p17), de la capside (CA, p24), et de la nucléocapside (NC, p7), les domaines p6 et des peptides espaçant (SP1 et 2) (Figure 1.5). Le gène *pol* code pour les trois enzymes nécessaires au cycle viral, soit la protéase (p12), la transcriptase inverse (p66/p51) et l'intégrase (p32). *Env* code pour une glycoprotéine,

gp160, qui est ensuite clivée en gp120, la protéine de surface, et gp41, une protéine de fusion transmembranaire [105]. Les autres gènes codent pour d'importantes protéines de régulation. *Tat* code pour la protéine transactivatrice de transcription, et *Rev* code pour le régulateur d'épissage de l'ARN, permettant l'export nucléaire de l'ARN génomique (Figure 1.5) [106]. Les autres protéines dites « accessoires », dont le facteur *Nef*, le facteur *Vif*, la protéine *Vpr* et la protéine *Vpu*, augmentent la réplication virale notamment par l'inhibition d'effecteurs antiviraux cellulaires [100].

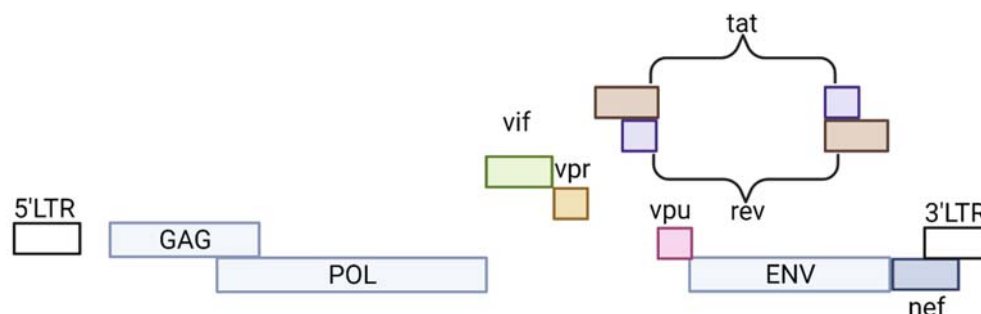


Figure 1.5 Structure du génome du VIH-1.

La région 5' est constituée du promoteur permettant la transcription des protéines virales. Le gène *gag* code pour les protéines du noyau (p17), de la capsid (p24) et de la nucléocapsid (p7). Le gène *pol* code pour des enzymes virales (transcriptase inverse, protéase, intégrase et ribonucléase H). Le gène *env* code pour des glycoprotéines impliquées dans la liaison des virions et l'entrée dans la cellule (gp120, gp41). Les autres gènes codent pour d'importantes protéines de régulation, dont VIF, VPR, VPU NEF, TAT et REV. Figure adaptée de [107]. Figure créée avec BioRender.com.

1.7.2 Cycle de réplication du VIH-1

La première étape du cycle de réplication du VIH-1 consiste en l'attachement à une cellule et la fusion membranaire entre celle-ci et l'enveloppe du virus. D'abord, la liaison de gp120 avec son récepteur CD4 induit un changement de conformation qui augmente son affinité avec le corécepteur CCR5 ou CXCR4 (Figure 1.6). Cette deuxième interaction induit à son tour un changement de conformation de gp41 qui s'insère dans la membrane cellulaire, conduisant à la fusion avec l'enveloppe virale [108]. La capsid entre alors dans le cytoplasme et interagit avec de multiples protéines cellulaires, protégeant ainsi le génome viral, la RT et l'IN, contre la détection ou l'attaque par des facteurs antiviraux

cellulaires [109]. L'initiation de la transcription inverse se fait à l'intérieur de la capsidie dans le cytoplasme de la cellule et le cœur viral est transporté au noyau à travers les microtubules, y pénétrant par les pores nucléaires (Figure 1.6). La rétrotranscription et la décapsidation y sont complétées près des sites d'intégration [110, 111], tel qu'observé par tomographie cryo-électronique [112, 113]. L'ADN viral est intégré dans le génome cellulaire par l'IN virale, et le provirus utilise la machinerie cellulaire en plus de ses propres enzymes pour produire ses protéines virales et se répliquer [7]. En premier lieu, les ribosomes synthétisent la protéine Gag jusqu'à ce qu'ils rencontrent un codon stop, reculent d'un nucléotide grâce à un mécanisme de décalage du cadre de lecture et traduisent le gène *pol* [114, 115]. Ce mécanisme permet d'instaurer un important ratio d'environ 20 protéines Gag pour chaque molécule GagPol synthétisée [116]. Gag et GagPol sont ensuite ancrées à la membrane cellulaire du côté cytoplasmique, y induisant une courbure. Elles y sont assemblées en un treillis d'hexamères immatures. Le précurseur Env (gp160) est à son tour dirigé vers la membrane plasmique en transitant par l'appareil de Golgi, où il est clivé par des protéases hôtes de type furine en gp120 et gp41. Le processus d'assemblage des virions se poursuit à la membrane cellulaire, encapsidant les dimères d'ARN viral génomique, et les virions immatures bourgeonnent par fission membranaire (Figure 1.6) [117, 118]. Durant le bourgeonnement, la protéase virale se charge de cliver les précurseurs de Gag, processus qui est suivi d'un réarrangement spatial menant à la maturation des virions qui peuvent alors infecter d'autres cellules [119, 120].

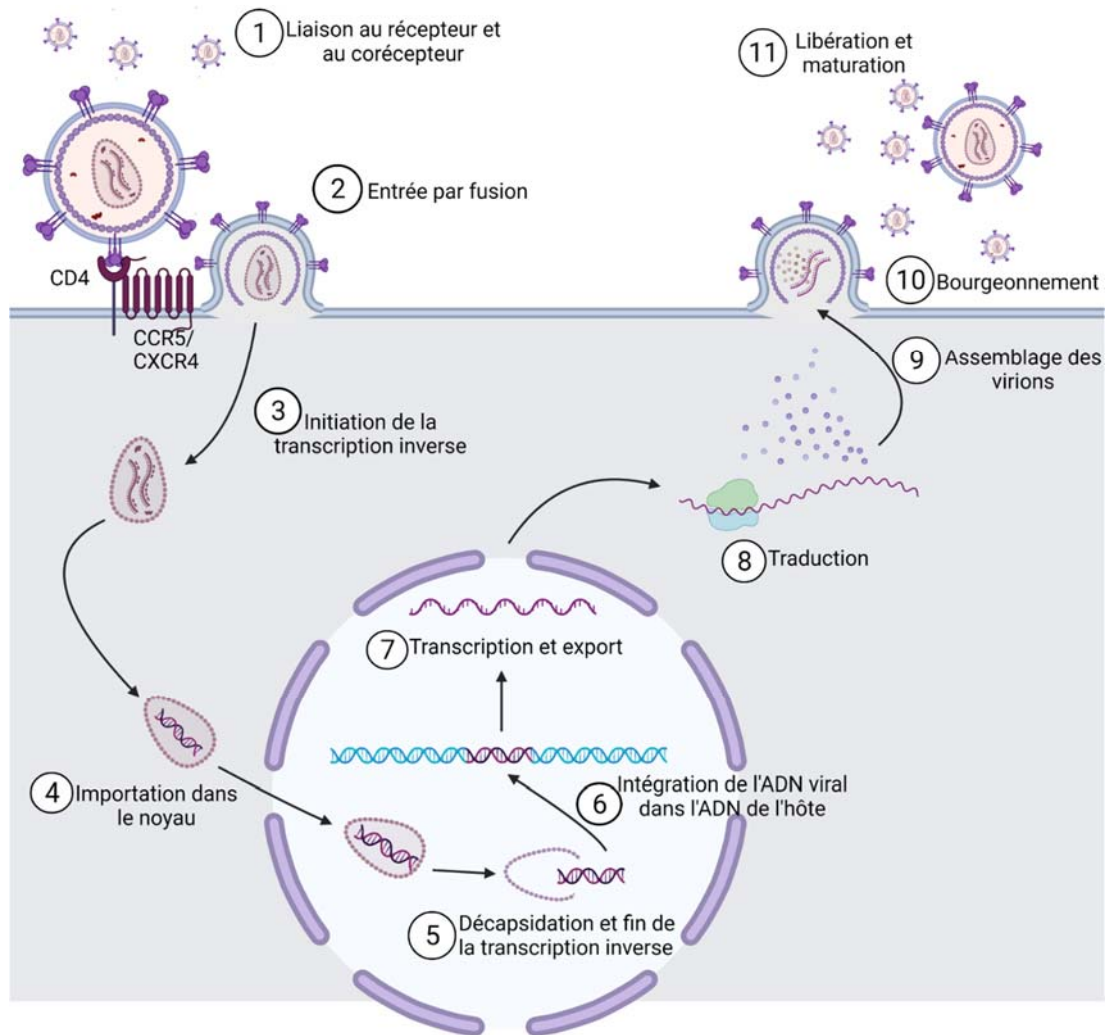


Figure 1.6 Cycle de réplication du VIH-1.

1. Les virions se lient aux récepteurs et corécepteurs; **2.** Les virions pénètrent dans la cellule hôte par fusion; **3.** Transcription inverse de l'ARN viral et transport jusqu'au noyau cellulaire par les microtubules; **4.** Importation du noyau viral dans la cellule; **5.** Décapsulation et terminaison de la transcription inverse; **6.** Intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte sous forme de provirus; **7.** Transcription et exportation hors du noyau; **8.** Traduction des ARN messagers; **9.** Encapsulation et assemblage des virions à la membrane cellulaire; **10.** Bourgeonnement; **11.** Libération des virions et maturation. Figure adaptée de [121]. Figure créée avec BioRender.com.

1.7.3 Effet antiviral des alcaloïdes des *Amaryllidaceae* contre le VIH-1

Quelques extraits provenant des *Amaryllidaceae* présentent une activité contre le VIH-1. Par exemple, un extrait méthanolique de *Crinum asiaticum var. japonicum* diminue les infections causées par le VIH-1 dans des cellules MT-4 avec un SI de 16, et inhibe directement l'activité de la RT de 70,8 % (Tableau 1.3) [122]. L'extrait méthanolique de *Pamianthe peruviana Stapf*, réduit l'activité de la RT du VIH-1 de 72 %, à une concentration de 66 µg/mL [123]. Selon des analyses *in silico* incluant 313 molécules, la 6-hydroxypowelline, un alcaloïde de type crinine, présente le score de liaison le plus élevé au site actif de la RT (G-score = 12.7 kcal/mol), et la pseudolycorine-1, un alcaloïde de type lycorine, affiche le meilleur score (13.6 kcal/mol) en ce qui concerne l'interaction avec la protéase du VIH-1 [124]. La littoraline, un alcaloïde provenant de *Hymenocallis littoralis*, exerce un faible effet inhibiteur sur la RT du VIH-1 avec une IC₅₀ de 142,0 µg/mL [125]. En comparaison, l'emtricitabine, qui est un médicament approuvé pour le traitement du VIH-1, inhibe la RT avec une IC₅₀ de 0.0003–0.158 µg/mL [126]. Il est donc peu probable que la littoraline soit un jour envisagé en tant que traitement contre le VIH-1. Dans une autre étude, il a été observé que la lycorine conduit à une réduction de la quantité d'ARN viral du VIH-1 dans des cellules de type lymphoblastiques SUP-T1 [127]. Récemment, en utilisant des virus pseudotypés, nous avons mesuré l'effet antiviral contre le VIH-1 de la lycorine, de l'haemanthamine, de l'haemanthidine et de la pancracine, et nous avons respectivement obtenu des SI de 0,4, 0,9, 1,3 et 1,4, témoignant de leur faible sélectivité [99]. À ces concentrations, 40-50 % des cellules meurent, soulignant la contribution non-spécifique de la cytotoxicité plutôt que de directement diminuer l'infection [99]. Selon des analyses *in silico*, la lycorine pourrait cibler de nombreux gènes de l'hôte, tel que Smad3, un régulateur négatif de la prolifération cellulaire [127]. Les recherches sur l'effet antiviral de la lycorine contre le VIH-1 sont controversées, car certaines études démontrent une inhibition de l'infection tandis que d'autres n'ont pas confirmé ces observations [22, 125]. D'autres analyses indiquent que la diminution de la quantité de virus n'est pas le résultat de la destruction directe des cellules hôtes par la lycorine, mais plutôt d'un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire [127].

1.8 Hypothèses et objectifs

Le développement de thérapies antivirales basées sur les AAs pourrait apporter des solutions médicales décisives aux pandémies catastrophiques. Puisque beaucoup de ces molécules exercent en partie leur action antivirale en ciblant des facteurs de l'hôte, il existe un risque plus élevé d'observer des effets secondaires chez celui-ci. Cependant, elles offrent la possibilité de développer des traitements pouvant cibler un large éventail de virus et qui sont moins susceptibles d'engendrer une résistance aux médicaments [128].

À ce jour, peu d'études ont été réalisées sur le potentiel biologique des AAs de type norbelladine. Il a été démontré que la norbelladine elle-même possède de légères propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes *in vitro* [49]. Dans une autre étude, des AAs de la famille de la norbelladine, dérivés synthétiquement de la carltonine A et B, ont montré des propriétés anti-BuChE, une enzyme considérée comme étant une cible intéressante dans le traitement de la AD [50]. Cependant, les propriétés pharmacologiques des précurseurs et des alcaloïdes de type norbelladine en relation avec les infections virales et la cytotoxicité sur les cellules humaines restent largement inconnues. Nous nous sommes donc intéressés à une série d'alcaloïdes de type norbelladine incluant la norbelladine, la norcraugsodine, la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine, ainsi que ses précurseurs, dont la tyramine et le 3,4-DHBA (Figure 1.7).

Nous avons formulé l'hypothèse que la norbelladine et plusieurs autres formes dérivées, dont la norcraugsodine, la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine, ainsi que ses précurseurs, dont la tyramine et le 3,4-DHBA, pourraient présenter des propriétés antivirales contre les virus DENV et/ou VIH-1 (Figure 1.7). Le premier objectif de ce projet était d'évaluer la cytotoxicité des composés étudiés sur des cellules humaines. Ensuite, les deuxième et troisième objectifs étaient de mesurer le potentiel antiviral de ces mêmes molécules contre le DENV et le VIH-1 par cytométrie en flux. La norbelladine et

la norcraugsodine présentent trois groupements hydroxyles, et pourraient donc possiblement former davantage de liaisons hydrogènes que les formes méthylées et être plus réactives, ce qui pourrait inclure un effet antiviral ou une cytotoxicité plus élevée. La 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine et la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine présentent tous les quatre une *O*-méthylation. La 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine et la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine, quant à elles, présentent deux *O*-méthylations. Il est possible de croire que plus une forme est méthylée, moins elle sera active. Cependant, selon une étude effectuée sur des flavonoïdes, la méthylation de la génistéine et du kaempférol augmente leur affinité pour les protéines, dont l'ovalbumine et l'albumine [129]. Une autre étude rapporte que la 7-*O*-méthylation de la naringinine, un autre flavonoïde, augmente son activité antifongique contre *Pyriculariu oryzae* [130]. Il est donc possible que les formes méthylées des alcaloïdes de type norbelladine puissent présenter un effet antiviral intéressant.

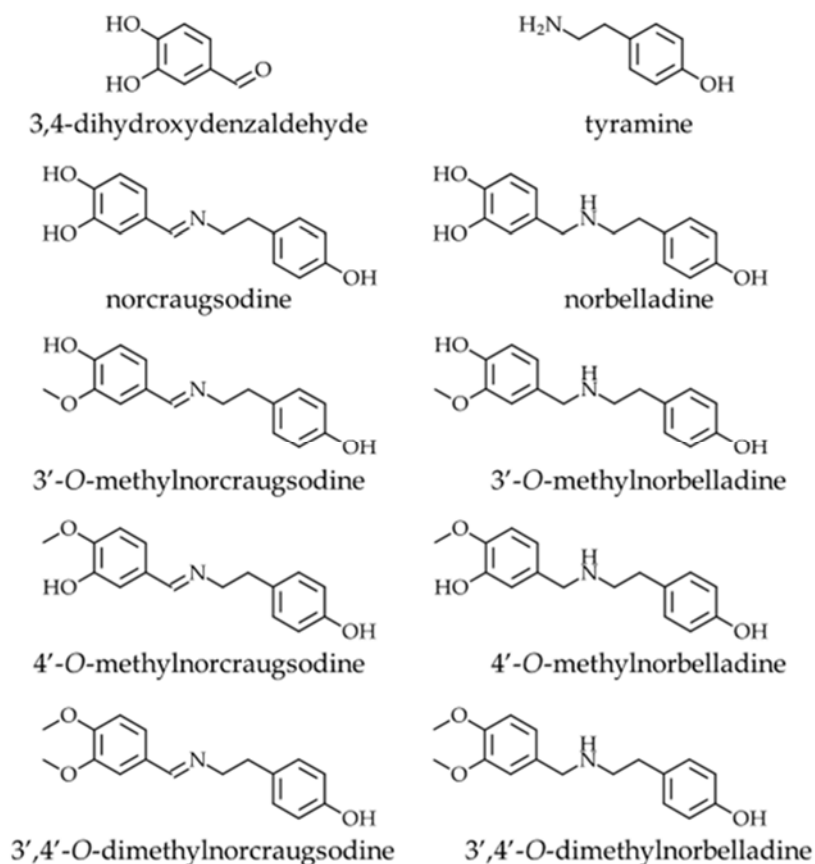


Figure 1.7 Structures chimiques des précurseurs et dérivés de norbelladine.

Précurseurs d'alcaloïdes des *Amaryllidaceae* (3,4-DHBA et tyramine); intermédiaires (norcraugsodine et norbelladine); leurs dérivés *O*-méthylés correspondants (3'-*O*-méthylnorcraugsodine, 3'-*O*-méthylnorbelladine, 4'-*O*-méthylnorcraugsodine, 4'-*O*-méthylnorbelladine, 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine et 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine).

1.9 Originalité des travaux

Au fil des siècles, plusieurs alcaloïdes produits par les *Amaryllidaceae* ont été extraits et étudiés afin de découvrir leur potentiel thérapeutique. Plusieurs de ceux-ci ont été décrits comme ayant des propriétés biologiques intéressantes, à l'image de la galanthamine, qui est aujourd'hui utilisée dans le traitement de la AD [131, 132]. La norbelladine est le précurseur de la biosynthèse de tous les alcaloïdes produits chez les *Amaryllidaceae*, et ironiquement, très peu d'investigations ont été effectuées sur ses propriétés pharmaceutiques [40]. Cette étude est la première à rapporter des informations sur l'effet cytotoxique et antiviral des alcaloïdes de cette famille. En comparant la structure de la norbelladine avec celle des autres types d'alcaloïdes, il est possible de constater que celle-ci semble moins rigide et pourrait donc présenter une capacité plus élevée d'interaction avec des protéines virales ou de l'hôte. Ainsi, plusieurs dérivés *O*-méthylés de la norbelladine ont été étudiés en ce qui a trait à leur cytotoxicité et à leur potentiel antiviral contre le DENV et le VIH-1. Ce projet a permis d'observer que malgré leur grande ressemblance au niveau structurel, une simple réduction sur un groupement d'azote ou une méthylation de certains groupements hydroxyles peuvent faire en sorte qu'une molécule soit active ou non. Ce projet a aussi permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la relation structure-activité des alcaloïdes de type norbelladine.

CHAPITRE II

CHEMICAL SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF NORBELLADINE DERIVATIVES AND PRECURSORS

Marie-Pierre Girard^{1,†}, Vahid Karimzadegan^{1,†}, Marianne Héneault¹, Francis Cloutier¹,
Gervais Bérubé¹, Lionel Berthoux², Natacha Merindol¹, Isabel Desgagné-Penix^{1,*}

¹ Département de Chimie, biochimie et physique, Université du Québec à Trois-Rivières,
3351, Boul. des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, G8Z 4M3, Canada

² Département de Biologie médicale, Université du Québec à Trois-Rivières,
3351, Boul. des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, G8Z 4M3, Canada

* Correspondence: Isabel.Desgagne-Penix@uqtr.ca

† These authors contributed equally to this work.

Le contenu de ce chapitre est écrit sous la forme d'un article scientifique qui a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue « Molecules », le 31 août 2022.

2.1 Contribution des auteurs

Marie-Pierre Girard a conçu et effectué les expériences en vue d'analyser l'effet cytotoxique et antiviral des précurseurs et dérivés de la norbelladine, en plus d'avoir créé les figures s'y reliant et participé à la rédaction du manuscrit. Vahid Karimzadegan s'est occupé de la conception et de la réalisation des expériences d'inhibition de l'AChE, de la BuChE et de la POP par les précurseurs et dérivés de la norbelladine, ainsi que des études *in sillico* sur l'interaction de la norbelladine avec la BuChE. Il a aussi créé les figures associées à ces expériences et participé à la rédaction du manuscrit. Marianne Héneault et Francis Cloutier ont conçu et effectué les expériences de synthèse des dérivés de norbelladine. Le professeur Gervais Bérubé a participé à la conception des expériences de synthèse des dérivés de norbelladine et rédigé cette partie du manuscrit.

Natacha Mérindol, associée de recherche, a participé à la démarche méthodologique, la conception des expériences et à leur analyse, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit. L'élaboration du projet, dont la problématique et le choix des objectifs ont été déterminés par Isabel Desgagné-Penix (Directrice de maîtrise) et Lionel Berthoux (Codirecteur de maîtrise). La révision du manuscrit a été effectuée par tous les auteurs.

2.2 Résumé de l'article

Les AAs constituent une famille d'alcaloïdes structurellement diversifiée, reconnue pour ses diverses propriétés thérapeutiques, telles que les propriétés antivirales, anticholinestérases et anticancéreuses. La norbelladine et ses dérivés, dont les propriétés biologiques sont peu étudiées, sont des intermédiaires clés nécessaires à la biosynthèse de tous les ~650 AAs signalés. Pour mieux comprendre leur potentiel thérapeutique, nous avons synthétisé une série d'alcaloïdes de type norbelladine *O*-méthylés et évalué leur effet cytotoxique sur deux types de lignées cellulaires cancéreuses, leur effet antiviral contre le DENV et le VIH-1, ainsi que leurs propriétés anti-Alzheimer (anticholinestérase et -prolyl oligopeptidase). Dans les cellules de leucémie monocyttaire, la norcraugsodine était hautement cytotoxique ($CC_{50} = 27,0 \mu\text{M}$), tandis que la norbelladine était la plus cytotoxique pour les cellules d'hépatocarcinome ($CC_{50} = 72,6 \mu\text{M}$). L'infection par le VIH-1 n'a été altérée qu'aux concentrations cytotoxiques des composés. Le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (SI = ,2), la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine (SI = 4,8), la 4'-*O*-méthylnorbelladine (SI > 4,9), la 3'-*O*-méthylnorbelladine (SI > 4,5) et la norcraugsodine (SI = 3,2), ont réduit le pourcentage de cellules infectées par le virus DENV avec des EC_{50} variant de 24,1 à 44,9 μM . La *O*-méthylation de la norcraugsodine a aboli son potentiel anti-DENV. La norbelladine et ses formes *O*-méthylées ont également présenté des propriétés inhibitrices de la BuChE (IC_{50} allant de 26,1 à 91,6 μM). Dans l'ensemble, les résultats fournissent des indications sur la relation structure-activité des alcaloïdes de type norbelladine, une connaissance importante pour le développement de nouveaux inhibiteurs du DENV et de la BuChE.

2.3 Article complet : Chemical synthesis and biological activities of norbelladine derivatives and precursors

Abstract

Amaryllidaceae alkaloids (AAs) are a structurally diverse family of alkaloids recognized for their many therapeutic properties, such as antiviral, anti-cholinesterase, and anticancer properties. Norbelladine and its derivatives, whose biological properties are poorly studied, are key intermediates required for the biosynthesis of all ~650 reported AAs. To gain insight into their therapeutic potential, we synthesized a series of *O*-methylated norbelladine-type alkaloids and evaluated their cytotoxic effects on two types of cancer cell lines, their antiviral effects against the dengue virus (DENV) and the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), and their anti-Alzheimer's disease (anti-cholinesterase and -prolyl oligopeptidase) properties. In monocytic leukemia cells, norcraugsodine was highly cytotoxic ($CC_{50} = 27.0 \mu\text{M}$), while norbelladine was the most cytotoxic to hepatocarcinoma cells ($CC_{50} = 72.6 \mu\text{M}$). HIV-1 infection was impaired only at cytotoxic concentrations of the compounds. The 3,4-dihydroxybenzaldehyde (selectivity index (SI) = 7.2), 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine (SI = 4.8), 4'-*O*-methylnorbelladine (SI > 4.9), 3'-*O*-methylnorbelladine (SI > 4.5), and norcraugsodine (SI = 3.2) reduced the number of DENV-infected cells with EC_{50} values ranging from 24.1 to 44.9 μM . The *O*-methylation of norcraugsodine abolished its anti-DENV potential. Norbelladine and its *O*-methylated forms also displayed butyrylcholinesterase-inhibition properties (IC_{50} values ranging from 26.1 to 91.6 μM). Altogether, the results provided hints of the structure–activity relationship of norbelladine-type alkaloids, which is important knowledge for the development of new inhibitors of DENV and butyrylcholinesterase.

Keywords: Amaryllidaceae; alkaloid; norbelladine; dengue virus, anti-cholinesterase; specialized metabolism; *O*-methylation; galanthamine; Alzheimer's disease; anti-viral

Introduction

Amaryllidaceae are a family of monocotyledonous plants of the order Asparagales, which is composed of 1100 species and 75 genera that are found in tropical, subtropical, and warm regions of the world [1]. For centuries, Amaryllidaceae plant extracts have been recognized worldwide for their varied therapeutic properties, including anti-acetylcholinesterase (AChE), anti-microbial, and anti-tumor properties [2,3,4,5]. Their medicinal potency is mostly attributed to the presence of specialized metabolites of the alkaloid group, which are named the Amaryllidaceae alkaloids (AAs) [2,6]. To date, more than 650 AAs have been reported and classified into norbelladine-, cherylline-, galanthamine-, lycorine-, lycorenine-, crinine-, narciclasine-, tazettine-, and montanine-type based on the proposed biosynthetic origin of the ring structure and their carbon skeleton [1,6,7]. All AAs are derived from norbelladine, which is a common metabolic intermediate formed through the condensation of tyramine and 3,4-dihydroxybenzaldehyde (3,4-DHBA) [8,9].

AAs are known to have various pharmacological properties [10]. For example, several AAs, such as sanguinine and galanthamine (Figure 1), are strong anti-acetylcholinesterase inhibitors, with the latter being currently used as a treatment for symptoms of Alzheimer's disease (AD) [11,12]. Lycorine, like many other AAs, exhibits anticancer (i.e., cytotoxic activity) [13,14,15,16,17], but also exerts an inhibitory effect against flaviviruses, such as DENV (dengue virus), and viruses belonging to other families [18,19,20,21]. Recently, we demonstrated that the AAs cherylline, pancracine, haemanthamine, and haemanthidine display antiviral effects against DENV, and except for cherylline, also against human immunodeficiency virus (HIV-1) [22,23]. The development of antiviral therapeutics based on AAs may provide decisive medical solutions to catastrophic pandemics. Since many of these molecules exert their antiviral action by targeting host factors, they present opportunities to develop broad-spectrum treatments that are less susceptible to the emergence of drug resistance [24].

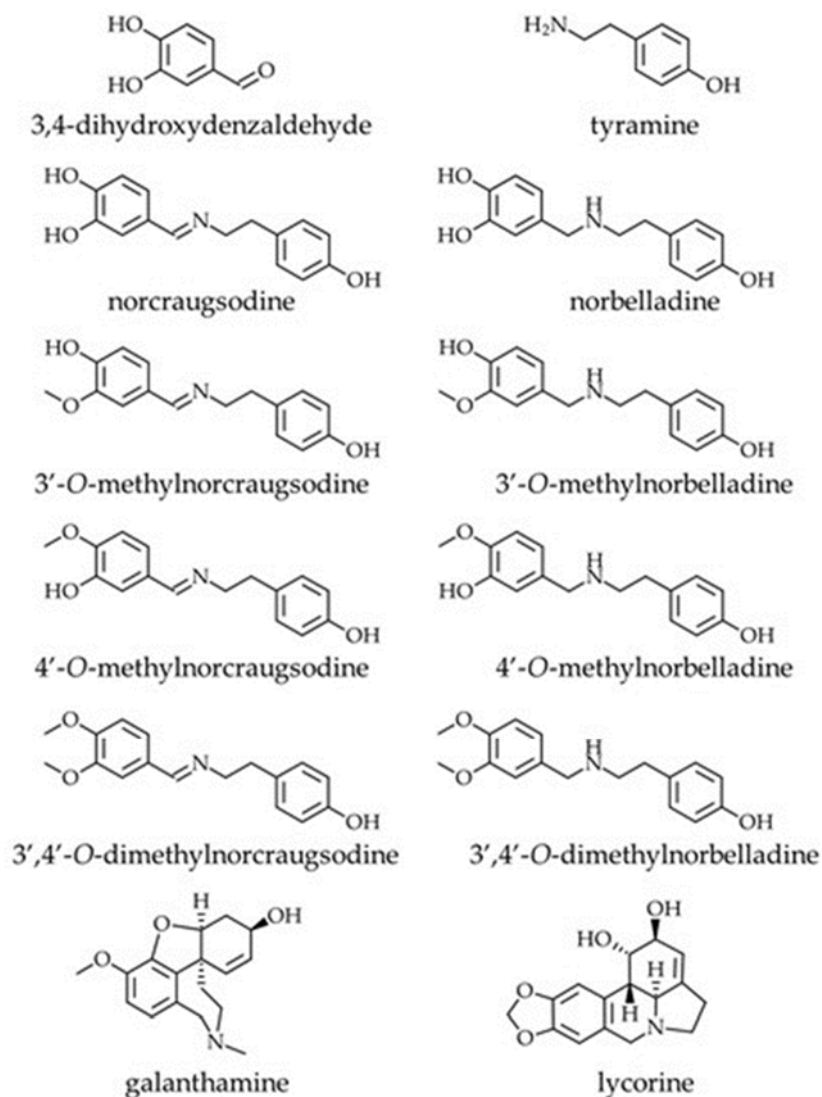


Figure 1. Chemical structures of the molecules used in this study. Amaryllidaceae alkaloid precursors (3,4-dihydroxybenzaldehyde and tyramine), intermediates (norcraugsodine and norbelladine), their corresponding *O*-methylated derivatives (3'-*O*-methylnorcraugsodine, 3'-*O*-methylnorbelladine, 4'-*O*-methylnorcraugsodine, 4'-*O*-methylnorbelladine, 3',4'-*O*-dimethylnorcraugsodine, and 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine), and the well-known AAs galanthamine and lycorine.

To date, few studies have been performed on the biological potential of norbelladine-type AAs. One study demonstrated that norbelladine itself has slight *in vitro* anti-inflammatory and anti-oxidant properties [25]. In another study, synthetically designed complex alkaloid derivatives of carltonin A and B of the norbelladine-type were shown to exhibit anti-butyrylcholinesterase (BuChE) and -prolyl oligopeptidase (POP) properties, both of which are considered interesting targets for AD [26,27,28]. However,

the pharmaceutical properties of norbelladine-type alkaloids in relation to AD, viral infections, and cytotoxicity remain largely unknown.

In this study, we investigated the biological activities of norbelladine-type molecules. Since Amaryllidaceae plants do not accumulate high levels of such metabolites, we report on the chemical synthesis of norbelladine, norcraugsodine, and their *O*-methylated derivatives (i.e., 3'-*O*-methylnorbelladine, 3'-*O*-methylnorcraugsodine, 4'-*O*-methylnorbelladine, 4'-*O*-methylnorcraugsodine, 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine, and 3',4'-*O*-dimethylnorcraugsodine) (Figure 1). We assessed their antiviral potential *in cellulo*, as well as that of their precursors, namely, 3,4-dihydroxybenzaldehyde (3,4-DHBA) and tyramine, using propagative DENV_{GFP} vector and a non-propagative HIV-1_{GFP} vector. We analyzed their cytotoxicity against acute monocytic leukemia THP-1 cells and hepatocytic-cellular-carcinoma-derived Huh7 cells. We also measured their anti-AD potential through an assessment of anti-AChE, -BuChE, and -POP activity. We report for the first time that 3,4-DHBA and *O*-methylated norbelladine derivatives inhibited DENV infection and that norbelladine displayed anti-butyrylcholinesterase activity.

Results

Chemical Synthesis

The synthesis of norbelladine and the different methylated analogs was performed following a two-step reaction sequence reported in the literature for norbelladine [9,25]. Initially, the condensation of the relevant aldehyde with tyramine led to the imide intermediates with excellent yields (98% to 100%). Next, simple catalytic hydrogenation allowed us to generate the final derivatives with yields ranging from 43% to 99%.

Cytotoxic Assay

Several alkaloids of the Amaryllidaceae family were reported to be cytotoxic [29]. Therefore, we evaluated the cytotoxic activity of the AA precursors, namely, 3,4-DHBA and tyramine, and the eight norbelladine-derived molecules on two types of cancer cell lines, including human monocytic leukemia cells (THP-1) and human hepatocarcinoma cells (Huh7). Tyramine is a natural by-product of the breakdown of the amino acid tyrosine and is found in plants and animals. As expected for both cell lines, tyramine was not cytotoxic and did not affect the cell viability, whereas lycorine was cytotoxic [30] at concentrations below 50 μM (Figure 2, Table 1). For THP-1 cells, norcraugsodine and 3,4-DHBA at 100 μM and norbelladine and 3'-*O*-methylnorbelladine at 200 μM were highly cytotoxic, killing a majority of the cells (Figure 2a). For Huh7 cells, norbelladine, norcraugsodine, 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine, and 3,4-DHBA at 200 μM were cytotoxic, producing 50% cell death (Figure 2b).

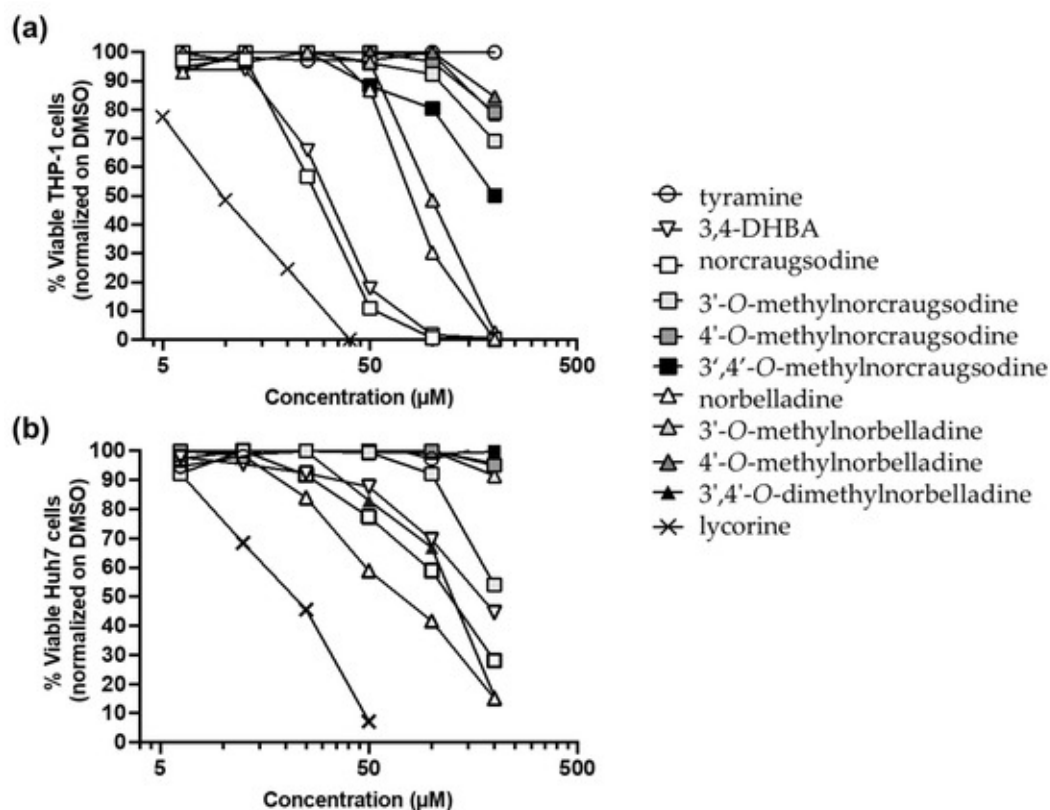


Figure 2. Cytotoxic effects of norbelladine precursors and their derivatives on Huh7 and THP-1 cells. To assess the cell viability, the cellular ATP levels were measured on

(a) THP-1 and (b) Huh7 cells 72 h after alkaloid addition at concentrations of 6.25 μM to 200 μM . Lycorine was utilized as a positive control at concentrations of 0.3 μM to 40 μM . Results were normalized to equivalent concentrations of DMSO and the x -axis is displayed in \log_{10} . DMSO: dimethylsulfoxide; ATP: adenosine triphosphate.

Table 1. EC_{50} , CC_{50} , and SI values of norbelladine precursors and derivatives with antiviral effects. EC_{50} : median effector concentration; CC_{50} : median cytotoxic concentration; SI: selectivity index.

Alkaloids	EC_{50} HIV-1 (μM)	CC_{50} THP-1 (μM)	SI HIV-1	EC_{50} DENV (μM)	CC_{50} Huh7 (μM)	SI DENV
Tyramine	> 200 ⁻	> 200 ⁻	< 1.0	> 200 ⁻	> 200 ⁻	< 1.0
3,4-DHBA	51.5*	31.65	0.6	24.1*	173.1	7.2
Norbelladine	50.5	82.2	1.6	50.4	72.6	1.4
Norcraugsodine	55.5	27.0	0.5	37.7	121.8	3.2
3'- <i>O</i> - methylnorcraugsodine	107.2*	>200	> 1.9	176.3*	> 200	> 1.1
3'- <i>O</i> - methylnorbelladine	134.7*	99.01	0.73	44.9*	> 200	> 4.5
4'- <i>O</i> - methylnorbelladine	108.3*	> 200	> 1.8	40.5*	> 200	> 4.9
4'- <i>O</i> - methylnorcraugsodine	> 200 ⁻	> 200 ⁻	< 1.0	> 200 ⁻	> 200 ⁻	< 1.0
3',4'- <i>O</i> - dimethylnorbelladine	98.3*	> 200	> 2.0	27.5	131.4	4.8
3',4'- <i>O</i> - dimethylnorcraugsodine	> 200 ⁻	> 200 ⁻	< 1.0	> 200 ⁻	> 200 ⁻	< 1.0
Raltegravir	0.098	> 10 ⁻	> 102	u.i.	u.i.	u.i.
Lycorine	u.i.	10.7	u.i.	0.090	17.4	193.3

EC_{50} and CC_{50} values of antiviral compounds (norbelladine, norcraugsodine, 3'-*O*-methylnorcraugsodine, 3'-*O*-methylnorbelladine, 4'-*O*-methylnorbelladine, 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine, and 3,4-DHBA) were calculated using QuestGraph IC50 calculator (MLA Quest Graph™ IC50 Calculator. AAT Bioquest, Inc). $\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$. “-”: EC_{50} or CC_{50} was not achieved. “*”: compound addition did not yield complete viral inhibition. “u.i.”: unidentified.

The median cytotoxic concentrations (CC_{50}) that caused a 50% decrease in cell viability were estimated for all alkaloids reaching this value (Figure 2, Table 1). Norcraugsodine, 3,4-DHBA, norbelladine, and 3'-*O*-methylnorbelladine were highly cytotoxic to THP-1 cells, with CC_{50} values ranging from 27.0 μ M to 99.0 μ M (Table 1). The 3'- and 4'-*O*-methylnorcraugsodine, 3'-*O*-methylnorbelladine, 3',4'-*O*-dimethylnorcraugsodine, and 4'-*O*-methylnorbelladine exhibited only moderate cytotoxicity (<50% of cell death) at 200 μ M on THP-1 cells (Figure 2a, Table 1). The norbelladine, norcraugsodine, 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine, and 3,4-DHBA were cytotoxic to Huh7 cells (Figure 2b), with CC_{50} values ranging from 72.6 μ M to 173.1 μ M (Table 1). The 3'-*O*-methylnorcraugsodine was weakly cytotoxic to Huh7 cells at the tested concentrations (Figure 2b). All other tested molecules were not cytotoxic (Figure 2b; Table 1).

In summary, 3,4-DHBA, norcraugsodine, and norbelladine were the most cytotoxic to both types of cell lines, whereas 3'-*O*-methylnorbelladine displayed cytotoxic specificity to THP-1, and 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine to Huh7 cells (Figure 2; Table 1).

Antiviral Assay

Several studies shed light on the outstanding antiviral properties of alkaloids extracted from Amaryllidaceae, such as lycorine, cherylline, haemanthamine, haemanthidine, and pancracine [17,21,22]. Hence, we measured the antiviral activity of 3,4-DHBA, tyramine, and the eight norbelladine-derived molecules toward HIV-1_{GFP} and DENV_{GFP} in THP-1 and Huh7 cells, respectively. Infection levels were measured 72 h post-infection, where a dose-dependent inhibition of HIV-1_{GFP} (Figure 3, Appendix A Figure A1) and DENV_{GFP} (Figure 4, Appendix A Figure A2) was generated. In addition, the effective concentration inhibiting infection by 50% (EC_{50}) was calculated, along with the selectivity index (SI) that was determined by the ratio of CC_{50} and EC_{50} (Table 1).

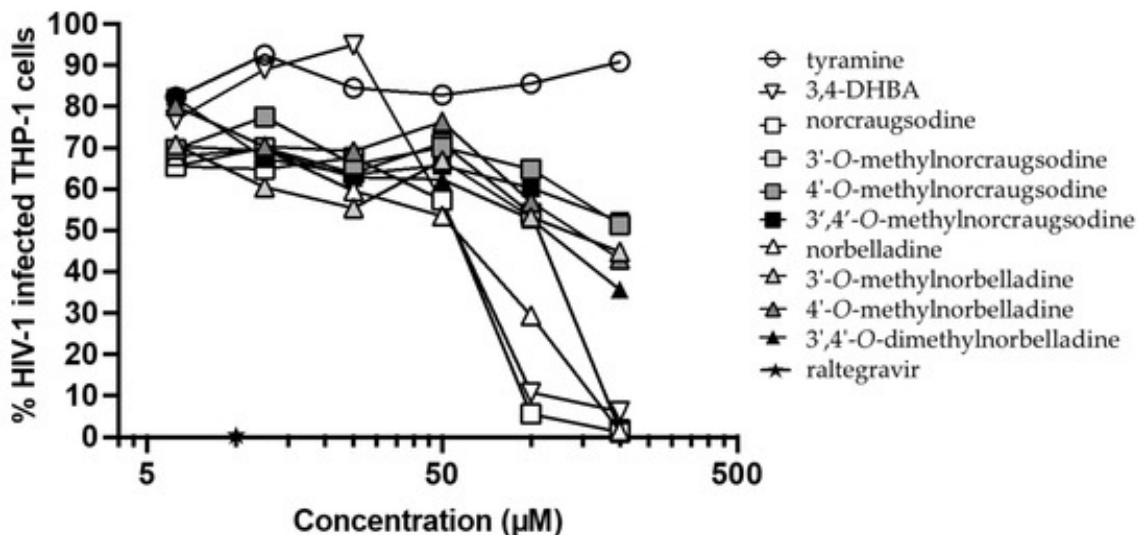


Figure 3. Antiretroviral effect of norbelladine precursors and derivatives on HIV-1_{GFP}. The antiviral activities against HIV-1_{GFP} of norbelladine precursors and derivatives were evaluated 72 h post-infection using THP-1 cells via flow cytometry at concentrations ranging from 6.25 μM to 200 μM. Infections were performed with non-propagative HIV-1_{GFP} virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. Raltegravir served as a positive control and DMSO as a negative control at concentrations equivalent to the tested alkaloids. Results were normalized to the value with HIV-1_{GFP} infection without treatment and the *x*-axis is displayed as log₁₀.

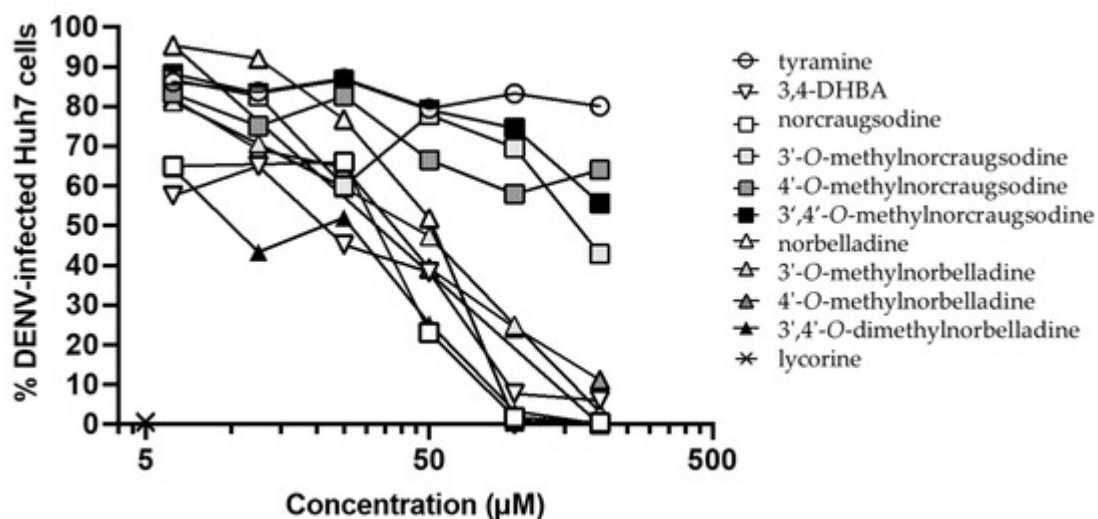


Figure 4. Antiflaviviral effects of norbelladine precursors and derivatives on DENV_{GFP}. The antiviral activities against DENV_{GFP} of norbelladine precursors and derivatives were evaluated 72 h post-infection using Huh7 cells via flow cytometry at concentrations ranging from 6.25 μM to 200 μM. Infections were performed with propagative DENV_{GFP} virus at an MOI of 0.025. Lycorine was used as a positive control and DMSO as a negative control at concentrations equivalent to the tested alkaloids. Results were normalized to the value of DENV_{GFP} infection without treatment and the *x*-axis is displayed as log₁₀.

Inhibition of HIV-1_{GFP}

Norcraugsodine, 3,4-DHBA, and norbelladine prevented HIV-1 infection in most cells at 100 μM , while their methylated forms and tyramine were mostly inactive. At 200 μM , all three compounds and 3'-*O*-methylnorcraugsodine impeded HIV-1 infection (from 94% to 99% inhibition) (Figure 3, Appendix A Figure A1), with EC_{50} values ranging from 50.5 μM to 107.2 μM , and selectivity indices (SIs) ranging from 0.5 to 1.6 (Table 1). Hence, at these concentrations, AAs were also associated with significant toxicity, raising concerns about the specificity of their antiretroviral properties.

Inhibition of DENV_{GFP}

3,4-DHBA, 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine, norcraugsodine, 4'-*O*-methylnorbelladine, 3'-*O*-methylnorbelladine, and norbelladine showed strong inhibition of DENV_{GFP} infection at 50, 100, and 200 μM . Huh7 cells treated with 200 μM of these compounds resulted in an 89% to 100% decrease in infection, with the EC_{50} values ranging from 24.1 μM to 50.4 μM , and SI ranging from 1.5 to 6.2 (Table 1, Figure 4; Appendix A Figure A2). 3,4-DHBA, 4'-*O*-methylnorbelladine, 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine, and 3'-*O*-methylnorbelladine were the most selective with $\text{SI} > 4.5$. The other alkaloids tested showed little or no specific antiviral effect against DENV_{GFP} infections.

Choline Esterase and Prolyl oligopeptidase Inhibitory Effect

Enzymatic inhibitions were first trialed using 1 mM of compounds in duplicates (Appendix A Table A1). Further experiments were carried out only on selected active molecules. Of all the compounds tested, only norcraugsodine, 3'-*O*-methylnorcraugsodine, and 3'-*O*-methylnorbelladine inhibited POP activity, where norcraugsodine was the most potent with $\text{IC}_{50} = 463.8 \mu\text{M}$ (Figure 5a). Among all the AAs and precursors, only 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine exhibited a moderate level of inhibition of AChE, with $\text{IC}_{50} = 319.6 \mu\text{M}$ (Figure 5b). Among the 10 molecules tested, only norbelladine and its methylated forms significantly blocked BuChE activity using both acetylthiocholine and butyrylthiocholine as the substrate (Figure 5c,d).

Norbelladine was the most potent, with IC_{50} values of 33.26 μM and 26.13 μM , respectively (Appendix A Table A1). The addition of two methyl groups in the 3'- and 4'-*O* positions lead to a ~3-fold decrease in inhibition.

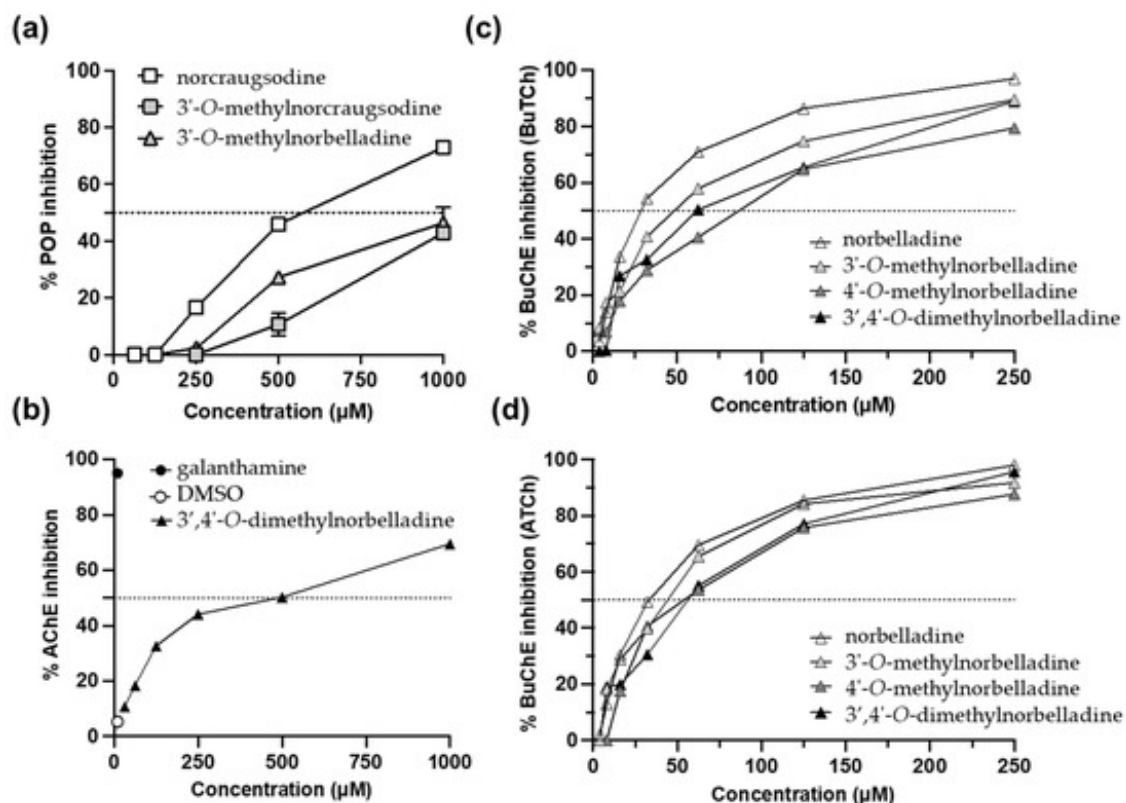


Figure 5. Anti-Alzheimer's disease properties. (a) Prolyl oligopeptidase inhibition by norcraugsodine, 3'-*O*-methylnorcraugsodine, and 3'-*O*-methylnorbelladine. (b) Acetylcholinesterase inhibition of 3',4'-*O*-methylnorbelladine using acetylthiocholine as the substrate. (c) Butyrylcholinesterase (BuChE) inhibition of norbelladine and derivatives using butyrylthiocholine (BuTCh) as the substrate. (d) Butyrylcholinesterase inhibition of norbelladine and derivatives using acetylthiocholine (ATCh) as the substrate. Galanthamine (10 μM) was used as the positive control for the AChE assays, while rivastigamine (2 mM) was used for the BuChE assays (100% inhibition not shown on the graph).

Molecular Docking of Norbelladine Derivatives with BuChE

To better understand the interactions between the norbelladine derivatives and BuChE, we performed docking using the crystal structure of human BuChE (PDB: 4BDS) (Table 2, Figure 6). The active site of BuChE is located at the bottom of a profound gorge

(20 Å) comprising six conserved aromatic residues and six aliphatic (Leu286 and Val288) and polar residues [28]. It includes a catalytic triad (Ser198, Glu325, and His438) that mediates the choline esters hydrolysis; an anionic site (Trp82, Tyr128, Phe329), which is essential for the reaction; and an oxyanion hole (Gly116, Gly117, Ala199) that stabilizes the transition state through hydrogen-bond interactions. Meanwhile, the acyl pocket (Ala199, Leu286, and Val288) is responsible for substrate specificity [31], and the peripheral anionic site (PAS or P-site) (Asp70, Tyr332) at the entry of the active gorge, which interacts with the cationic substrate guiding them down the gorge to the catalytic triad, is implicated in interactions with beta-amyloid and in the binding with many inhibitors [32,33] (Figure 6). The docking scores were very similar for norbelladine and its derivatives, ranging from -6.68 to -7.03 kcal/mol (Table 2). All the molecules interacted with the key residue of the anionic site Trp82. The hydrophobic and H-bonds that interacted with Trp82 were stabilized by aromatic π - π stacking in the case of norbelladine and 3'-*O*-methylnorbelladine, which is consistent with other inhibitors, such as tacrine [34], while the docking conformation of the 4'-*O*-methylated compounds did not allow for such an interaction. In the case of norbelladine and 3'-*O*-methylnorbelladine, the interaction with BuChE was also supported with H-bonds with PAS amino acids (Tyr332 and Asp70, respectively), and with other binding site residues (Tyr440 for norbelladine, Thr120 and Trp430 for 3'-*O*-methylnorbelladine). In addition, 3'-*O*-methylnorbelladine was H-bonded to the catalytic residue His438. Thus, the docking results were consistent with inhibition mechanisms like those of other previously reported inhibitor molecules, such as tacrine, and possibly reflected a stronger and more stable inhibition potential for norbelladine and 3'-*O*-methylnorbelladine compared with the 4'-*O*-methylated norbelladine derivatives (Figure 5 and Figure 6).

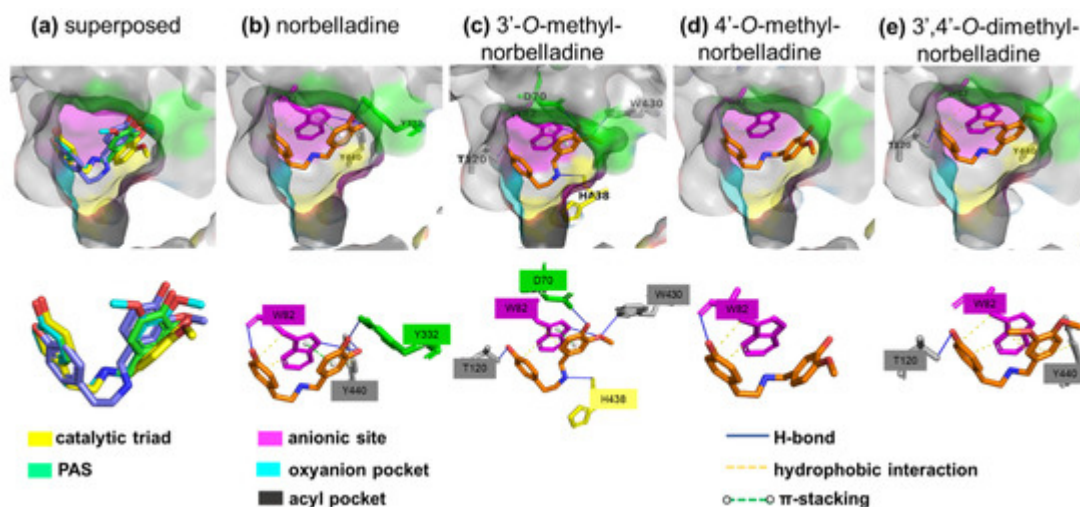


Figure 6. Prediction of norbelladine derivatives' interactions with butyrylcholinesterase. Grey surface representation of BuChE (4BDS) active site with key subsites highlighted in different colors (catalytic triad is in yellow, pre-anionic site (PAS) is in green, anionic site is in pink, oxyanion pocket is in turquoise, and the acyl pocket is in dark grey). (a) Superimposition of docked ligands in the BuChE active site (norbelladine is in green, 3'-*O*-methylnorbelladine is in purple, 4'-*O*-methylnorbelladine is in yellow, and 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine is in turquoise). (b) Non-covalent (H-bond, hydrophobic, and P-stack) interactions of norbelladine with Trp82 from the anionic site, Tyr332 from the PAS, and Tyr440 from the binding site. (c) Non-covalent interactions of 3'-*O*-methylnorbelladine with W82 from the anionic site, Asp70 from the PAS, His438 from the catalytic triad, and Trp430 from the binding site. (d) Non-covalent interactions of 4'-*O*-methylnorbelladine with Trp82 from the anionic site. (e) Non-covalent interactions of 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine with Trp82 from the anionic site and Thr120 and Tyr440 from the binding site.

Table 2. Predictions of norbelladine derivatives' interactions with butyrylcholinesterase.

	Score (kCal/mol)	Interaction		
		H-bonds	Hydrophobic	π stack
Norbelladine	-6,6829	Trp82, Tyr332, Tyr440	Trp82, Tyr440	Trp82
3'- <i>O</i> -Methylnorbelladine	-6,8174	Asp70, Trp82, Thr120, Trp430, His438	Trp82	Trp82
4'- <i>O</i> -Methylnorbelladine	-6,8119	Trp82	Trp82	n.d.
3',4'- <i>O</i> -Dimethylnorbelladine	-7,0368	Thr120	Trp82, Tyr440	n.d.

n.d.: none detected.

Discussion

Norbelladine and its *O*-methylated forms are mandatory intermediates in the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids [8,35], yet their biological properties remain poorly studied. Norbelladine itself was shown to possess anti-inflammatory and cyclooxygenase inhibitory effects [25], while 3'-*O*-methylnorbelladine and a few complex synthetic derivatives of norbelladine and belladine were shown to display anti-cholinesterase activity [26].

We obtained the precursor imines norcraugsodine, 3'-*O*-methylnorcraugsodine, 4'-*O*-methylnorcraugsodine, and 3',4'-*O*-dimethylnorcraugsodine, from which we made norbelladine [9], 3'-*O*-methylnorbelladine, 4'-*O*-methylnorbelladine, and 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine via catalytic hydrogenation. Their chemical synthesis was a straightforward process and the products were generally obtained in good to excellent yields.

Cytotoxic assays revealed that 3,4-DHBA, norcraugsodine, and norbelladine were the most cytotoxic compounds, both in monocytic leukemia THP-1 cells and hepatocarcinoma Huh7 cells (Figure 2, Table 1). Interestingly, the 3'-*O*-methylnorbelladine was selectively toxic to THP-1 cells, while 3',4'-*O*-

dimethylnorbelladine was selectively toxic to Huh7, hinting toward different mechanisms of cytotoxicity between the two cell lines.

Norbelladine, norcraugsodine, and 3,4-DHBA also strongly impeded HIV-1_{GFP} and DENV_{GFP} infections (Table 1, Figure 3 and Figure 4). The concentrations required to inhibit HIV-1 infection were cytotoxic to THP-1 cells (Table 1, Figure 3). Hence, the decrease in HIV-1 infection caused by these alkaloids was more consistent with progressive depletion of cell viability rather than a specific antiviral effect. In the case of DENV, viral inhibition was more specific, occurring at non-cytotoxic doses. Some non-cytotoxic alkaloids, such as 3'- and 4'-*O*-methylnorbelladine, also efficiently inhibited DENV_{GFP} replication at >100 μ M. The 3'-*O*-methylnorcraugsodine, 4'-*O*-methylnorcraugsodine, and 3',4'-*O*-dimethylnorcraugsodine showed little or no antiviral activity in contrast to norcraugsodine, revealing the importance of *O*-methylation to the toxic and antiviral nature of alkaloids (Table 1, Figure 4).

Several studies demonstrated the antiviral effect of AAs against several types of viruses [18,19,20,21,22,23,36,37,38]. Here, the virus used to perform DENV_{GFP} infections corresponded to dengue serotype 2. Recently, we also uncovered that the Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, pancracine, and haemanthidine, which were isolated from *Pancreatum maritimum*, inhibited DENV-2 infection [23]. This study added to the growing evidence that AA structures could be optimized to develop potent inhibitors against this potentially fatal disease. Future studies should address the potency of these compounds toward other serotypes (DENV-1, -3, and -4), and other flaviviruses [39,40].

Investigation of the inhibitory properties of alkaloids on POP, AChE, and BuChE activity confirmed that the *O*-methylation and reduction state of AAs significantly affected their potencies. POP is a post-proline cleaving enzyme of the central nervous system, whose alteration is implicated in memory loss; Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases; and other neurodegenerative diseases [41]. Norcraugsodine, 3'-*O*-methylnorcraugsodine, and 3'-*O*-methylnorbelladine were the only compounds to inhibit POP at high concentrations > 500 μ M (Figure 5). Mamun et al. also reported

limited efficiency of synthetic norbelladine and belladine derivatives to inhibit this enzyme [26].

AChE activity is dominant in regulating acetylcholine levels in healthy brains, while in an Alzheimer's disease (AD) patient's brain, the activity of BuChE is increased [42]. Thus, both enzymes are considered major therapeutic targets that can be used to fight AD. With the exception of 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine, none of the molecules inhibited AChE activity in our experiments. The use of DMSO as a solvent could have masked their activity up to a certain level. However, norbelladine and *O*-methylated derivatives consistently inhibited the BuChE-catalyzed hydrolysis of both butyrylcholine and acetylcholine. Norbelladine was the most potent, while there was a 3-fold loss of inhibition in the case of 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine. These results, which were in line with Mamun et al.'s screening [26], emphasized the interest in norbelladine as a backbone when developing butyrylcholinesterase inhibitors.

BuChE is a serine hydrolase enzyme that can hydrolyze several choline esters, including acetylcholine, succinylcholine, and butyrylcholine [28]. Although its role is not fully understood, its levels are increased in AD patients and it could promote amyloid plaque formation [43]. The active site of this enzyme consists of (1) the catalytic site composed of Ser198, His438, and Glu325 [44]; (2) an acyl pocket with Ala199, Leu286, and Val288 interacting with an acyl group of the esters [45]; (3) an anionic site with Trp82 that binds to a quaternary nitrogen of choline; and (4) an enzyme gorge lip consisting of Asp70 and Tyr332 guiding substrate toward the catalytic site [46].

In a study conducted by Nachon et al. (2013), human BuChE was crystalized in a complex with tacrine, which is a strong inhibitor of BuChE. According to this study, aromatic π - π stacking between tacrine and Trp82 is essential for its inhibitory effect [47]. A similar interaction was predicted by docking norbelladine and its *O*-methylated forms with BuChE, which was consistent with the relatively strong inhibitory effect observed in our in vitro enzymatic assays (Figure 6). Furthermore, an additional interaction between Tyr332 and the hydroxyl group of norbelladine ring was obtained in our model that can

potentially reduce the accessibility of BuChE to the substrate since Tyr332 was proposed to direct the substrate to the active site of the enzyme. It should be noted that a weak interaction between Tyr332 and tacrine was also observed [47].

Materials and Methods

Chemical Synthesis and Purification of Alkaloids

The starting material, reactant, and solvents were obtained commercially and used as such or purified and dried using standard methods [48]. The infrared spectra were recorded on a Nicolet Impact 420 FT-IR spectrophotometer. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian 200 MHz NMR apparatus. Samples were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO)-d₆ for data acquisition using the residual solvent signal as an internal standard (δ 2.49 ppm for ¹H NMR and 39.95 ppm for ¹³C NMR). Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm), whereas the coupling constants (J) are expressed in hertz (Hz). Multiplicities are described using the following abbreviations: s for singlet, d for doublet, t for triplet, m for multiplet, and bs for broad singlet.

Two-step synthesis of norbelladine and methylated analogs:

Norcaugsodine, norbelladine, 3'-*O*-methylnorcaugsodine, 3'-*O*-methylnorbelladine, 4'-*O*-methylnorcaugsodine, 4'-*O*-methylnorbelladine, 3',4'-*O*-dimethylnorcaugsodine, and 3',4'-*O*-dimethylnorbelladine were obtained using organic synthesis following a two-step reaction sequence as described below. The products were characterized via infrared (IR) spectroscopy, as well as proton (¹H NMR) and carbon nuclear magnetic resonance (¹³C NMR) spectroscopy.

Step 1: General procedure for the preparation of the imine intermediates.

An equimolar quantity of the relevant benzaldehyde and tyramine were added as powders to a flask containing dichloromethane (20 mL). The solution was stirred gently

overnight (about 12 h) at room temperature to yield the imine intermediate. The solvent was evaporated under reduced pressure using a rotatory evaporator, followed by mechanical pumping to remove the residual solvent and water. The resulting imines were obtained in excellent yields and were sufficiently pure to be used as such in the hydrogenation step.

Norcraugsodine: Step 1 with 3,4-dihydroxybenzaldehyde (537 mg, 3.88 mmol), tyramine (533 mg, 3.88 mmol), and dichloromethane (20 mL). Norcraugsodine (0.99 g, 99%). IR (cm^{-1}): 3345 (OH), 3038 (aromatic), and 1648 (C = N); ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.98 (1H, s, CH imine), 7.15 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, CH-Ar), 6.99 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, CH-Ar), 6.90 (1H, dd, $J_1 = 2$ Hz and $J_2 = 8.2$ Hz, CH-Ar), 6.65 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, CH-Ar), 6.63 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, CH-Ar), 3.63 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, CH = NCH₂CH₂), 2.73 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH = NCH₂CH₂); ^{13}C NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.9, 155.9, 149.5, 146.1, 130.5, 130.1, 127.8, 121.9, 115.8, 115.4, 113.9, 62.4, and 36.8.

3'-O-methylnorcraugsodine: Step 1 with 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin) (561 mg, 3.68 mmol), tyramine (506 mg, 3.68 mmol), and dichloromethane (20 mL). 3'-O-Methylnorcraugsodine (0.98 g, 98%). IR (cm^{-1}): 3008 (OH) and 1639 (C = N); ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.37 (1H, s, CH imine), 6.99 (4H, m, CH-Ar), 6.69 (3H, m, CH-Ar), 3.73 (2H, m, CH = NCH₂CH₂ and 3H, s, OMe), 2.79 (2H, t, $J = 7.03$ Hz, CH = NCH₂CH₂); ^{13}C NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 166.4, 156.1, 152.6, 148.6, 130.1, 129.7, 123.5, 118.5, 117.8, 115.5, 114.9, 59.9, 56.1, and 36.3.

4'-O-methylnorcraugsodine: Step 1 with 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (isovanillin) (561 mg, 3.68 mmol), tyramine (506 mg, 3.68 mmol), and dichloromethane (20 mL). 4'-O-methylnorcraugsodine (1.00 g, 100%). IR (cm^{-1}): 3508, 2900 (OH), and 1638 (C = N); ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.8 (1H, OH), 8.04 (1H, s, CH imine), 7.19 (1H, d, $J = 1.56$ Hz, CH-Ar), 6.97 (4H, m, CH = Ar), 6.65 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, CH-Ar), 3.77 (3H, s, OMe), 3.64 (2H, t, $J = 7.03$ Hz, CH = NCH₂CH₂), and 2.74 (2H, t,

$J = 7.03$ Hz, $\text{CH}=\text{NCH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C NMR (200 MHz, DMSO-d_6) δ : 160.8, 155.9, 150.4, 147.1, 130.5, 130.1, 129.8, 121.2, 115.4, 113.6, 111.9, 62.8, 55.9, and 36.7.

3',4'-O-dimethylnorcraugsodine: Step 1 with 3,4-dimethoxybenzaldehyde (582 mg, 3.50 mmol), tyramine (481 mg, 3.50 mmol), and dichloromethane (20 mL). 3',4'-O-dimethylnorcraugsodine (1.00 g, 100%); IR (cm^{-1}): 2938 (OH) and 1638 (C = N); ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.05 (1H, OH), 8.13 (1H, s, CH imine), 7.32 (1H, s, CH-Ar), 7.15 (1H, d, $J = 7.81$ Hz, CH-Ar), 6.99 (3H, m, CH-Ar), 6.66 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, 3.77 (6H, s, 2 x OMe), 3.67 (2H, t, $J = 7.03$ Hz, CH = NCH_2CH_2), and 2.77 (2H, t, $J = 7.03$ Hz, CH = NCH_2CH_2); ^{13}C NMR (200 MHz, DMSO-d_6) δ : 160.7, 155.9, 151.4, 149.4, 130.4, 130.1, 129.6, 122.8, 115.4, 111.6, 109.4, 62.9, 55.9, 55.8, and 36.7.

Step 2: General procedure for the preparation of the final amine products.

The relevant imine was dissolved in a mixture of ethylacetate/methanol (9:1, 10 mL) and hydrogenated to the amine using 30 mol% palladium on carbon (Pd/C 10%) under a H_2 atmosphere using a balloon. The hydrogen was bubbled three times ($t = 0, 30,$ and 60 min) during the hydrogenation process. The mixture was agitated for 2 to 3 h (or until the disappearance of the starting material via TLC) and then filtered on a silica gel using ethylacetate/methanol (4:1 mixture) to remove the Pd/C. The solvent was evaporated under reduced pressure using a rotatory evaporator, followed by mechanical pumping to yield the desired amine. The final amines were obtained in yields ranging from 43% to 98%.

Norbelladine: Step 2 with norcraugsodine (150 mg, 0.58 mmol), under a H_2 atmosphere, 10% Pd/C (40 mg), and ethyl acetate/methanol (10 mL). Norbelladine (130 mg, 86%). IR (cm^{-1}): 3021 (-OH and NH); ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6) δ : 6.94 (2 H, d, $J = 8.6$ Hz, CH-Ar), 6.63 (4 H, m, CH-Ar), 6.52 (1H, dd, $J_1 = 1.7$ Hz and $J_2 = 7.7$ Hz, CH-Ar), 3.49 (2H, s, Ar- CH_2 -NH), and 2.58 (4 H, m, NH- CH_2CH_2 -Ar); ^{13}C NMR (200 MHz, DMSO-d_6) δ : 155.8, 145.4, 144.3, 132.1, 130.9, 129.8, 119.2, 116.0, 115.6, 115.5, 53.1, 51.1, and 35.4.

3'-O-methylnorbelladine: Step 2 with 3'-O-methylnorcrugsodine (182.5 mg, 0.67 mmol), under H₂ atmosphere, 10% Pd/C (40 mg), and ethyl acetate/methanol (10 mL). 3'-O-methylnorbelladine (182.5 mg, 99%). IR (cm⁻¹): 2934 (OH and NH); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 6.98–6.65 (7H, m, CH-Ar), 3.81 (2H, s, Ar-CH₂-NH), 3.71 (3H, s, OMe), and 2.64 (4H, m, NH-CH₂CH₂-Ar); ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 160.8, 152.7, 151.8, 134.8, 134.6, 129.1, 126.0, 123.2, 120.3, 116.4, 60.8, 55.2, 55.1, and 39.4.

4'-O-methylnorbelladine: Step 2 with 4'-O-methylnorcrugsodine (266 mg), under H₂ atmosphere, 10% Pd/C (40 mg), and ethyl acetate/methanol (10 mL). 4'-O-methylnorbelladine (114 mg, 43%). IR (cm⁻¹): 2989 (OH and NH); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 6.96–6.62 (7H, m, CH-Ar), 3.71 (3H, s, OMe), 3.55 (2H, s, Ar-CH₂-NH), and 2.60 (4H, br s, NH-CH₂CH₂-Ar); ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 155.9, 146.8, 146.7, 133.6, 130.7, 129.8, 119.0, 115.9, 115.5, 112.4, 56.1, 52.9, 51.0, and 35.3.

3',4'-O-dimethylnorbelladine: Step 2 with 3',4'-O-dimethylnorcrugsodine (404 mg, 1.41), under H₂ atmosphere, 10% Pd/C (70 mg), and ethyl acetate/methanol (10 mL). 3',4'-O-dimethylnorbelladine (400 mg, 98%). IR (cm⁻¹): 3261 (OH) and 2953 (OH and NH); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 6.97–6.55 (7H, m, CH-Ar), 3.69 (6H, s, OMe), 3.60 (2H, br s, Ar-CH₂-NH), and 2.61 (4H, br s, NH-CH₂CH₂-Ar); ¹³C NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 155.9, 149.0, 147.9, 133.9, 130.9, 129.8, 120.2, 115.4, 112.1, 111.9, 55.9, 55.8, 53.0, 51.1, and 35.4.

Preparation of Lycorine, 3,4-DHBA, Tyramine, and other Commercial Inhibitor Stocks

Lycorine was isolated from *Crinum jagus* according to the method reported in [49] and was provided by Antonio Evidente (Universita di Napoli Federico II, Naples, Italy). 3,4-DHBA (purity: 97%, formula: C₇H₆O₃, molar mass: 138.12, CAS number: 139-85-5) was obtained from Acros Organics. Tyramine (purity: ≥98%, formula: C₈H₁₁NO, molar mass: 137.18, CAS number: 51-67-2) was obtained from Sigma Aldrich. Raltegravir

(purity: 99.85%, formula: C₂₀H₂₀FN₆O₅K, molar mass: 482.52, CAS number: 871038-72-1) was obtained through the NIH HIV Reagent Program, Division of AIDS, NIAID (Isentress; MK-0518). Each compound was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a final concentration of 100 mM and stored at -20 °C until subsequent use. Rivastigmine and galanthamine hydrobromide were purchased from Millipore Sigma (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and solubilized in water at 20 mM just before the experiments.

Cell Lines and Culture

The human hepatocarcinoma Huh7 cell line was kindly provided by Hugo Soudeyns (University of Montréal, Montréal, QC, Canada). Huh7, Crandell-Rees Feline Kidney Cell (CRFK), and Vero cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin solution (all from Wisent, Inc., Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada). The human leukemia monocytic THP-1 cell line was maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin solution (all from Wisent, Inc., Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada). All cell lines were kept in an incubator at 37 °C and 5% CO₂.

Cytotoxicity Assay

Cytotoxicity assays of norbelladine and its derivatives were performed on Huh7 and THP-1 cells by measuring ATP levels using the Cell-Titer GLO assay kit (Promega, Madison, WI, USA). Briefly, 7.5×10^3 Huh7 cells/well or 2×10^4 THP-1 cells/well were plated in black 96-well plates and incubated at 37 °C for 24 h. The next day, precursors, norbelladine, its derivatives, DMSO, and lycorine were serially diluted by a factor of 2 in DMEM complete medium (for Huh7) or RPMI complete medium (for THP-1) at room temperature. Each dilution was added to the cell plates to obtain final concentrations of 6.25 μM to 200 μM for alkaloids and DMSO, and 0.39 μM to 50 μM for lycorine. DMSO was used as a negative control, while lycorine was used as a positive control since

its cytotoxic effect was previously demonstrated [50]. The plates were then incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 72 h. Cell-Titer GLO reagent was added to the plates previously equilibrated to room temperature. The plates were then mixed on an orbital shaker for 2 min and incubated for 10 min at room temperature. The luminescence signal was measured with a microplate spectrophotometer (Synergy H1, Biotek, Dorval, QC, Canada). Viability percentages were obtained by calculating the ratio of the signal corresponding to each alkaloid concentration to the signal of the equimolar DMSO control. All experiments were performed at least twice. Median cytotoxic concentrations (CC₅₀) were calculated using QuestGraph IC50 calculator software (MLA Quest Graph™ IC₅₀ Calculator, AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, USA).

Viral Vectors

To investigate the antiviral effect of norbelladine and its derivatives, we used a dengue virus propagative vector (DENV_{GFP}) and a non-propagative human immunodeficiency virus (HIV)-1 pseudotyped VSV-G vector (HIV-1_{GFP}), both of which encoded green fluorescent protein (GFP). The plasmid used to obtain the DENV_{GFP} vector (pFK-DVs-G2A) was provided by Ralf Bartenschlager (Heidelberg University, Heidelberg, Germany) and Laurent Chatel-Chaix (Institut National de la Recherche Scientifique, Laval, QC, Canada) [22,51]. The 2 plasmids used to obtain the HIV-1_{GFP} vector were PMD2.G and pNL4-3-GFPΔEnvΔNef [52]. For DENV_{GFP}, viral titer was measured using a plaque assay in Vero cells, as described in [53]. For HIV-1_{GFP}, the viral titer was obtained by measuring the infectivity of serially diluted vectors in CRFK cells, as described in [54].

Antiviral Assays

Briefly, 7.5×10^3 Huh7 cells/well or 2×10^4 THP-1 cells/well were plated in 96-well plates at 37 °C for 24 h. The next day, norbelladine and its derivatives, as well as the DMSO-dissolved lycorine (Huh7) or DMSO-dissolved raltegravir (THP-1), were serially diluted by a factor of 2 in DMEM or RPMI medium, respectively. Each dilution was added

to the cell plates to obtain final concentrations of 1.56 μM to 200 μM for alkaloids and matched concentrations of DMSO, and 0.05 μM to 6.4 μM for lycorine or 0.078 μM to 10 μM for raltegravir. Lycorine and raltegravir were used as DENV and HIV-1 inhibitor controls, respectively [18,55]. DENV_{GFP} and HIV-1_{GFP} were then added at multiplicities of infection (MOIs) of 0.025 and 0.1, respectively. Plates were placed in an incubator at 37 °C and 5% CO₂ for 72 h. Afterward, the cells were fixed in 3.7% formaldehyde and the percentage of infection was measured using flow cytometry with an FC500 MPL cytometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Data analysis was performed using Flowjo software (BD, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). All experiments were performed at least twice. EC₅₀ values were calculated using QuestGraph IC50 calculator software (MLA Quest Graph™ IC50 Calculator. AAT Bioquest, Inc. <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> (accessed on 1 July 2022)).

Anti-acetylcholinesterase (AChE) and -Butyrylcholinesterase (BuChE) Activity

Pharmacological properties specific to AD were tested first on AChEs (electric eel) according to the kit (ab138871, Abcam) that provides a colorimetric measure of enzyme activity and inhibition. Briefly, the reaction was performed in a final volume of 100 μL in 96-well microplates. A preliminary screen to identify the most potent AChE inhibitors was performed. For this, DMSO-dissolved test compounds were added to a final concentration of 1 mM (1% DMSO) in duplicates. Next, a 5 μL reaction mixture containing equal amounts of acetylthiocholine (20X) and DTNB (20X) was added to each well. Ultimately, the enzyme solution was added to a final concentration of 0.25 U/mL and the absorbance was measured at 412 nm in kinetic mode for 10 min using a microplate reader (Synergy H1, Biotek, Dorval, QC, Canada). The same procedure was utilized for the BuChE (equine, Sigma-Aldrich) activity test, except that the enzyme concentration was 2 U/mL per reaction. DTNB (Bis(3-carboxy-4-nitrophenyl) disulfide, Ellman's Reagent), acetylthiocholine iodide, and butyrylthiocholine iodide were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Galanthamine (10 μM) and rivastigmine (2 mM) were used as positive controls for the AChE and BuChE assays, respectively. Molecules showing inhibition during preliminary screenings were selected for further assessment of

IC₅₀ values using serially diluted concentrations. Experiments were performed at least twice. Inhibition was calculated as follows [26]:

$$I = 100 \times (1 - \Delta i / \Delta e)$$

where Δi is the difference in the absorbance between two time points in the presence of the inhibitor, and Δe is the difference in the absorbance using two time points in presence of DMSO or an appropriate solvent.

Prolyloligopeptidase (POP) Inhibition Assay

POP enzyme activity was measured using the Fluorogenic POP Assay Kit (BPS Bioscience Inc., San Diego, CA, USA). The reaction was carried out in a final volume of 50 μ L in a low-binding NUNC microtiter plate. All compounds were tested at a final concentration of 250 μ M in duplicate. A DPP substrate was added to a final concentration of 2.5 μ M and the POP enzyme solution was subsequently added to a final concentration of 1 ng/ μ L. Optical densities at 440 nm were recorded using a microplate reader (Synergy H1, Biotek, QC, Canada).

Docking of Norbelladine Derivatives with BuChE

Docking was performed using the crystal structure of human BuChE in a complex with tacrine (PDB: 4BDS) using MOE 2020.09 software (Chemical Computing Group). Tacrine was removed. Structure issues were corrected using the structure preparation tool and amino acids were protonated using the protonate3D tool. Ligands were protonated at pH = 7 using the protomer option. Ligands were protonated at pH = 7 using the protomers tool. The active site (Asn68, Ile69, Asp70, Gln71, Ser72, Gly78, Ser79, Trp82, Tyr114, Gly115, Gly116, Gly117, Gln119, Thr120, Gly121, Thr122, Leu125, Tyr128, Glu197, Ser198, Ala199, Trp231, Glu276, Ala277, Val280, Gly283, Thr284, Pro285, Leu286, Ser287, Val288, Asn289, Phe290, Ala328, Phe329, Tyr332, Phe398, Trp430, Met437, His438, Gly439, Tyr440, Ile442) was predicted using the site finder tool of the MOE software and validated with literature data. Dummy atoms across the active site were

created and used as docking sites. Water and solvent molecules were removed, residues further than 8 Å from dummy atoms were fixed, and active site residues were tethered using the QuickPrep default parameters. The triangle matcher method was used to place ligands in the active site using the London dG score with 200 poses, and an induced fit was used as a refinement option with 10 poses and the GBVI/WSA score. The first pose of the most abundant configuration was chosen to be conserved for the ligand–protein interaction analysis. This corresponded to the 1st pose for all ligands except 3',4'-*O*-methylnorbelladine, for which the 1st pose displayed a flipped structure; hence, the 2nd pose was selected. The Protein–Ligand Interaction Profiler (PLIP) was used to analyze the interaction of the ligands with the binding site following the docking procedure [56]. Pymol (Schrödinger) was used to visualize and present the PLIP results.

Statistical Analysis

All the analyses and related graphs were performed and produced, respectively, using GraphPad Prism version 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Conclusions

In summary, precursors and norbelladine derivatives did not exhibit antiviral effects against HIV-1_{GFP} infections. However, they did possess appreciable inhibitory activity against DENV_{GFP} infections and butyrylcholinesterase.

The antiviral and inhibitory activities detected in this study were detected at doses associated with some cytotoxicity. These compounds should be optimized to increase their selectivity index. In future studies, viral targets should be identified to ascertain the mechanism of the compounds' antiviral activity. This would enable structure–activity relationship analysis, which is necessary knowledge for designing optimal antiviral drugs and preventing the development of a drug-resistant virus.

Some of the compounds could still have activity against HIV-1 that we would not have detected, as the pseudotyped particles used in this study did not include HIV-1 entry and release steps. In addition, the anti-flavivirus activity should be confirmed using wild-type dengue and Zika viruses. Finally, considering the broad activity of Amaryllidaceae alkaloid in general, other RNA viruses will be tested in future studies.

The results obtained in this study increased our knowledge of the structure–activity relationship of alkaloids with a norbelladine backbone. They provide further insight into the biological potency of norbelladine-type molecules, depending on the nature and location of the different *O*-methyl groups. This new knowledge could help to better guide the selection and optimization of AAs for the development of new inhibitors to fight Alzheimer’s disease and infections caused by flaviviruses.

Author Contributions

Conceptualization, N.M. and I.D.-P.; methodology, M.-P.G., V.K., M.H., F.C., G.B., L.B., N.M. and I.D.-P.; software, M.-P.G. and N.M.; validation, M.-P.G., V.K., M.H., F.C., G.B., L.B., N.M. and I.D.-P.; formal analysis, M.-P.G., V.K. and N.M.; investigation, M.-P.G., V.K., M.H., F.C. and N.M.; resources, L.B., G.B. and I.D.-P.; writing-original draft preparation, M.-P.G., V.K., M.H., N.M. and I.D.-P.; writing-review and editing, L.B., G.B., N.M. and I.D.-P.; supervision, L.B., G.B., N.M. and I.D.-P.; project administration, N.M.; funding acquisition, I.D.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada—Discovery Grants Program Award No. RGPIN-2021–03218 to I.D.-P. and by the Canada Research Chair on Plant Specialized Metabolism Award No. 950-232164 to I.D.-P. Many thanks are extended to the Canadian taxpayers and the Canadian government for supporting the Discovery and the Canada Research Chairs Program.

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 author.

Acknowledgments

The authors would like to thank all the lab members for their technical support and useful advice. Warm thanks to Professor Hugo Germain and his team for kindly providing advice, materials, and equipment.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability

Samples of the compounds are not available from the authors.

Appendix A

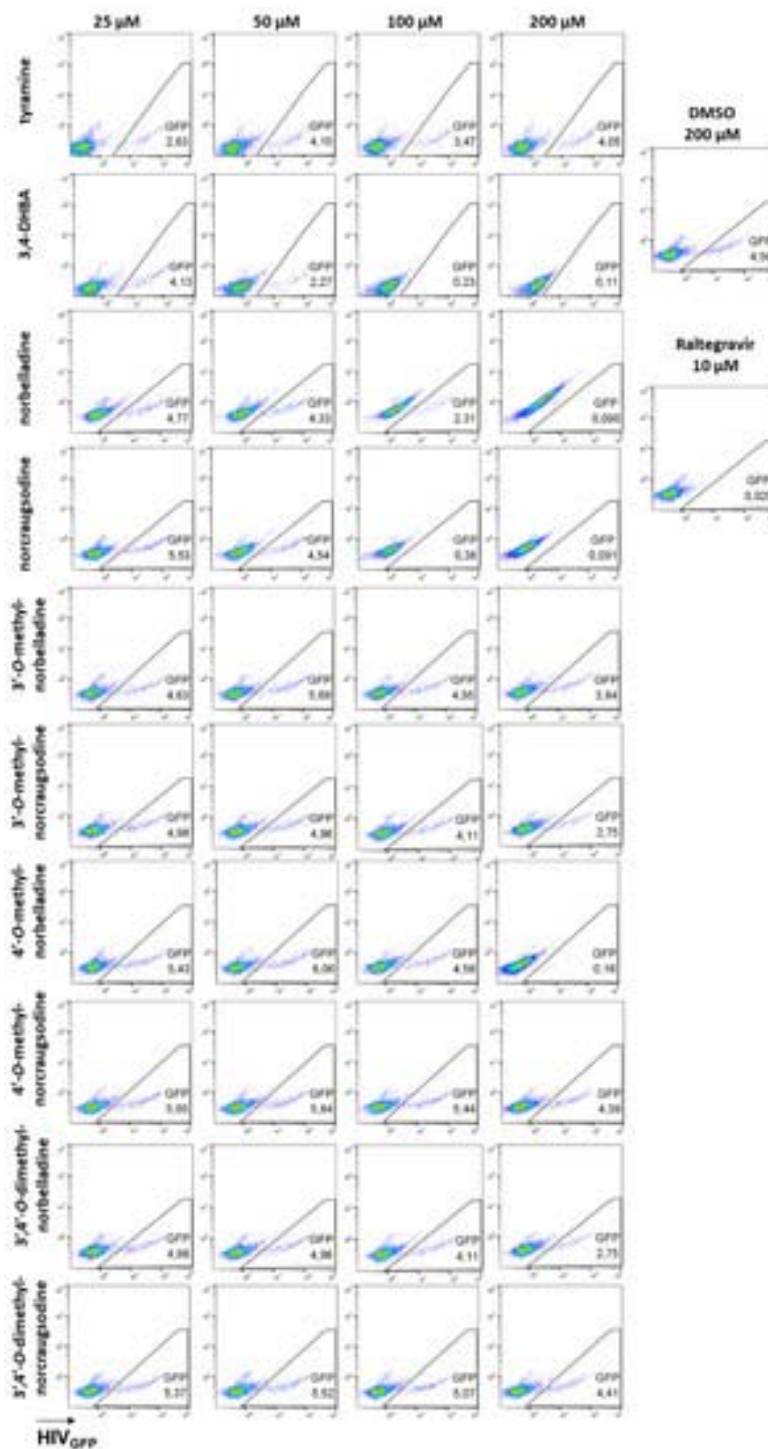


Figure A1. Antiretroviral effects of four concentrations (25, 50, 100, and 200 μM) of norbelladine precursors and derivatives on HIV-1_{GFP} in THP1 cells. Representative dot plots are presented. DMSO (200 μM) and raltegravir (10 μM) were included as the negative and positive controls, respectively.

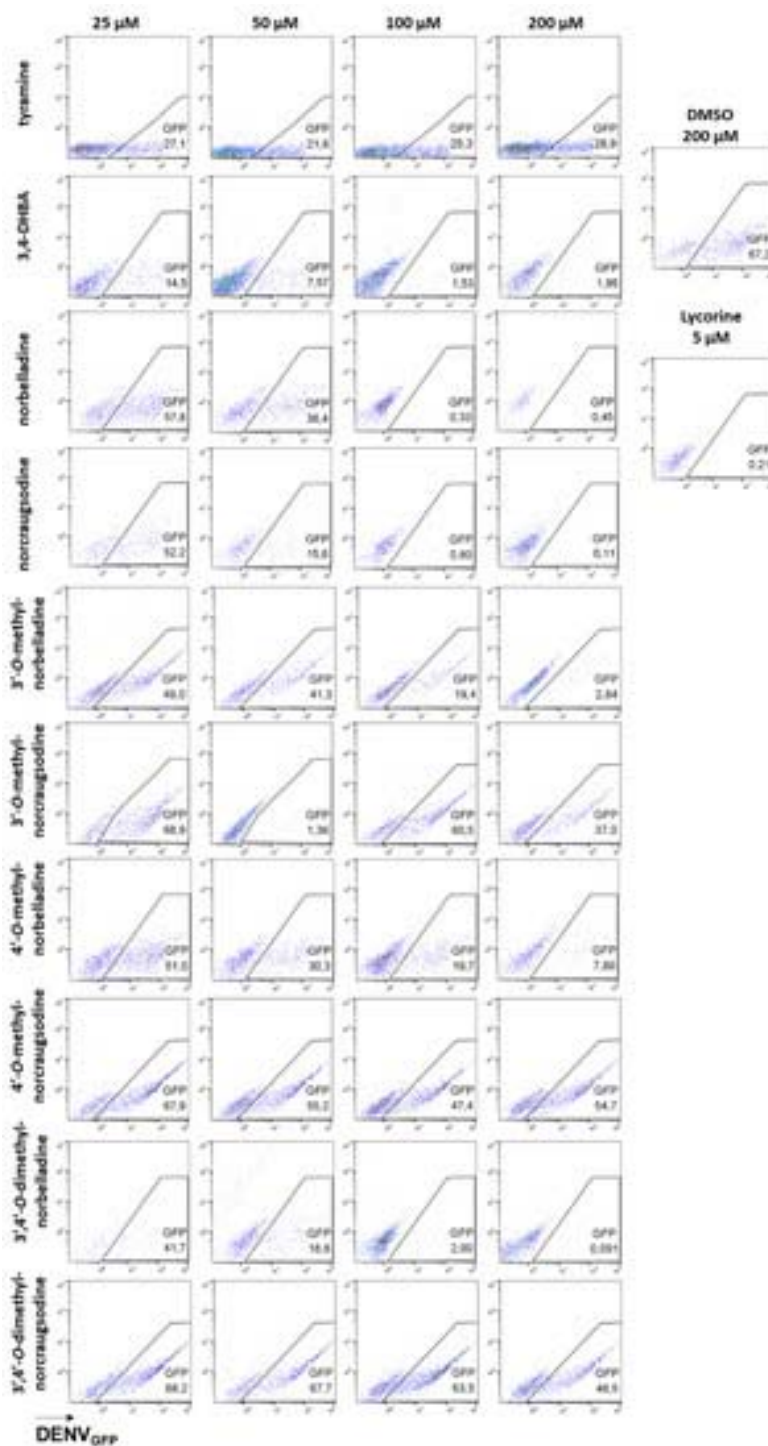


Figure A2. Antiflaviviral effects of norbelladine precursors and derivatives on DENV_{GFP}. The antiviral activity against DENV_{GFP} was evaluated 72 h post-infection using Huh7 cells via flow cytometry at four concentrations (25, 50, 100, and 200 μM) of norbelladine precursors and derivatives. Lycorine (5 μM) was included as the positive control and DMSO (200 μM) as the negative control. Representative dot plots are presented.

Table A1. Inhibitory properties (IC₅₀ values) of norbelladine precursors and derivatives toward enzymes implicated in Alzheimer's disease.

	POP	AChE	BuChE	
	DPP	ATCh	BuTCh	ATCh
3,4-DHBA	nid	nid	nid	nid
Tyramine	nd	nid	nid	nid
Norcraftiodine	567.30	nid	nid	nid
Norbelladine	nid	nid	26.13	33.26
3'-O-Methylnorcraftiodine	1146.01	nid	nid	nid
4'-O-Methylnorcraftiodine	nid	nid	nid	nid
3',4'-O-Dimethylnorcraftiodine	nid	nid	nid	nid
3'-O-Methylnorbelladine	1230.60	nid	58.95	40.22
4'-O-Methylnorbelladine	nid	nid	91.61	42.92
3',4'-O-Dimethylnorbelladine	nid	319.6	87.86	87.80

IC₅₀ values are expressed in μM , nid stands for no inhibition detected at 1 mM. POP: prolyl oligopeptidase, DPP: Ala-Pro-AMC dipeptide, AChE: acetylcholinesterase, ATCh: acetylthiocholine, BuTCh: butyrylthiocholine, BuChE: butyrylcholinesterase.

References

1. Ka, S.; Koirala, M.; Mérindol, N.; Desgagné-Penix, I. Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules* 2020, *25*, 4901. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
2. Ding, Y.; Qu, D.; Zhang, K.-M.; Cang, X.-X.; Kou, Z.-N.; Xiao, W.; Zhu, J.-B. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: A review. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2017, *19*, 53–100. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
3. Cahlíková, L.; Benesová, N.; Macáková, K.; Urbanova, K.; Opletal, L. GC/MS Analysis of Three Amaryllidaceae Species and Their Cholinesterase Activity. *Nat. Prod. Commun.* 2011, *6*, 1255–1258. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
4. Cheesman, L.; Nair, J.J.; van Staden, J. Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). *J. Ethnopharmacol.* 2012, *140*, 405–408. [Google Scholar] [CrossRef]
5. Habartová, K.; Cahlíková, L.; Řezáčová, M.; Havelek, R. The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. *Nat. Prod. Commun.* 2016, *11*, 1587–1594. [Google Scholar] [CrossRef]
6. Desgagné-Penix, I. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: A review. *Phytochem. Rev.* 2021, *20*, 409–431. [Google Scholar] [CrossRef]
7. Jin, Z.; Yao, G. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 2019, *36*, 1462–1488. [Google Scholar] [CrossRef]
8. El Tahchy, A.; Boisbrun, M.; Ptak, A.; Dupire, F.; Chretien, F.; Henry, M.; Chapleur, Y.; Laurain-Mattar, D. New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures. *Acta Biochim. Pol.* 2010, *57*, 75–82. [Google Scholar] [CrossRef]
9. Singh, A.; Massicotte, M.A.; Garand, A.; Tousignant, L.; Ouellette, V.; Bérubé, G.; Desgagne-Penix, I. Cloning and characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis. *BMC Plant Biol.* 2018, *18*, 338. [Google Scholar] [CrossRef]
10. Hotchandani, T.; Desgagne-Penix, I. Heterocyclic Amaryllidaceae Alkaloids: Biosynthesis and Pharmacological Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 2017, *17*, 418–427. [Google Scholar] [CrossRef]

11. Han, S.-Y.; Mayer, S.C.; Schweiger, E.J.; Davis, B.M.; Joulleé, M.M. Synthesis and biological activity of galanthamine derivatives as acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. *Bioorganic. Med. Chem. Lett.* 1991, *1*, 579–580. [Google Scholar] [CrossRef]
12. Heinrich, M.; Lee Teoh, H. Galanthamine from snowdrop--the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 2004, *92*, 147–162. [Google Scholar] [CrossRef]
13. Sun, Y.; Wu, P.; Sun, Y.; Sharopov, F.S.; Yang, Q.; Chen, F.; Wang, P.; Liang, Z. Lycorine possesses notable anticancer potentials in on-small cell lung carcinoma cells via blocking Wnt/ β -catenin signaling and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Biochem Biophys Res. Commun.* 2018, *495*, 911–921. [Google Scholar] [CrossRef]
14. Wang, C.; Wang, Q.; Li, X.; Jin, Z.; Xu, P.; Xu, N.; Xu, A.; Xu, Y.; Zheng, S.; Zheng, J.; et al. Lycorine induces apoptosis of bladder cancer T24 cells by inhibiting phospho-Akt and activating the intrinsic apoptotic cascade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, *483*, 197–202. [Google Scholar] [CrossRef]
15. Cao, Z.; Yu, D.; Fu, S.; Zhang, G.; Pan, Y.; Bao, M.; Tu, J.; Shang, B.; Guo, P.; Yang, P.; et al. Lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity. *Toxicol. Lett.* 2013, *218*, 174–185. [Google Scholar] [CrossRef]
16. Ji, Y.; Yu, M.; Qi, Z.; Cui, D.; Xin, G.; Wang, B.; Jia, W.; Chang, L. Study on apoptosis effect of human breast cancer cell MCF-7 induced by lycorine hydrochloride via death receptor pathway. *Saudi Pharm. J* 2017, *25*, 633–637. [Google Scholar] [CrossRef]
17. Hu, M.; Peng, S.; He, Y.; Qin, M.; Cong, X.; Xing, Y.; Liu, M.; Yi, Z. Lycorine is a novel inhibitor of the growth and metastasis of hormone-refractory prostate cancer. *Oncotarget* 2015, *6*, 15348–15361. [Google Scholar] [CrossRef]
18. Gabrielsen, B.; Monath, T.P.; Huggins, J.W.; Kefauver, D.F.; Pettit, G.R.; Groszek, G.; Hollingshead, M.; Kirsii, J.J.; Shannon, W.M.; Schubert, E.M.; et al. Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. *J. Nat. Prod.* 1992, *55*, 1569–1581. [Google Scholar] [CrossRef]
19. Li, S.Y.; Chen, C.; Zhang, H.Q.; Guo, H.Y.; Wang, H.; Wang, L.; Zhang, X.; Hua, S.N.; Yu, J.; Xiao, P.G.; et al. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antivir. Res.* 2005, *67*, 18–23. [Google Scholar] [CrossRef]

20. Wang, P.; Li, L.F.; Wang, Q.Y.; Shang, L.Q.; Shi, P.Y.; Yin, Z. Anti-dengue-virus activity and structure-activity relationship studies of lycorine derivatives. *ChemMedChem* 2014, *9*, 1522–1533. [Google Scholar] [CrossRef]
21. Zou, G.; Puig-Basagoiti, F.; Zhang, B.; Qing, M.; Chen, L.; Pankiewicz, K.W.; Felczak, K.; Yuan, Z.; Shi, P.Y. A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology* 2009, *384*, 242–252. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
22. Ka, S.; Merindol, N.; Sow, A.A.; Singh, A.; Landelouci, K.; Plourde, M.B.; Pépin, G.; Masi, M.; Di Lecce, R.; Evidente, A.; et al. Amaryllidaceae alkaloid cherylline inhibits the replication of dengue and Zika viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021, *65*, e0039821. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
23. Masi, M.; Di Lecce, R.; Méridol, N.; Girard, M.-P.; Berthoux, L.; Desgagné-Penix, I.; Calabrò, V.; Evidente, A. Cytotoxicity and Antiviral Properties of Alkaloids Isolated from *Pancreatium maritimum*. *Toxins* 2022, *14*, 262. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
24. Tan, S.; Banwell, M.G.; Ye, W.-C.; Lan, P.; White, L.V. The Inhibition of RNA Viruses by Amaryllidaceae Alkaloids: Opportunities for the Development of Broad-Spectrum Anti-Coronavirus Drugs. *Chem. Asian J.* 2022, *17*, e202101215. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
25. Park, J.B. Synthesis and characterization of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound. *Bioorg Med. Chem Lett* 2014, *24*, 5381–5384. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
26. Mamun, A.A.; Pidany, F.; Hulcova, D.; Marikova, J.; Kucera, T.; Schmidt, M.; Catapano, M.C.; Hrabínova, M.; Jun, D.; Muckova, L.; et al. Amaryllidaceae Alkaloids of Norbelladine-Type as Inspiration for Development of Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Biological Activity Evaluation, and Docking Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, *22*, 8308. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
27. Babkova, K.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Kuca, K. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: Attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. *Future Med. Chem.* 2017, *9*, 1015–1038. [Google Scholar] [CrossRef]
28. Darvesh, S.; Hopkins, D.A.; Geula, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003, *4*, 131–138. [Google Scholar] [CrossRef]
29. Nair, J.J.; Bastida, J.; van Staden, J. In vivo Cytotoxicity Studies of Amaryllidaceae Alkaloids. *Nat. Prod. Commun.* 2016, *11*, 121–132. [Google Scholar] [CrossRef]

30. Cao, Z.; Yang, P.; Zhou, Q. Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Sci. China Chem.* 2013, *56*, 1382–1391. [Google Scholar] [CrossRef]
31. Chen, X.; Tikhonova, I.G.; Decker, M. Probing the mid-gorge of cholinesterases with spacer-modified bivalent quinazolinimines leads to highly potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, *19*, 1222–1235. [Google Scholar] [CrossRef]
32. Macdonald, I.R.; Martin, E.; Rosenberry, T.L.; Darvesh, S. Probing the peripheral site of human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* 2012, *51*, 7046–7053. [Google Scholar] [CrossRef]
33. Bajda, M.; Wieckowska, A.; Hebda, M.; Guzior, N.; Sottriffer, C.A.; Malawska, B. Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int J. Mol. Sci.* 2013, *14*, 5608–5632. [Google Scholar] [CrossRef]
34. Zhang, Z.; Fan, F.; Luo, W.; Zhao, Y.; Wang, C. Molecular Dynamics Revealing a Detour-Forward Release Mechanism of Tacrine: Implication for the Specific Binding Characteristics in Butyrylcholinesterase. *Front. Chem.* 2020, *8*, 730. [Google Scholar] [CrossRef]
35. Mann, J.D.; Fales, H.M.; Mudd, S.H. Alkaloids and Plant Metabolism: VI. O-methylation in vitro of norbelladine, a precursor of amaryllidaceae alkaloids. *J. Biol. Chem.* 1963, *238*, 3820–3823. [Google Scholar] [CrossRef]
36. Chen, H.; Lao, Z.; Xu, J.; Li, Z.; Long, H.; Li, D.; Lin, L.; Liu, X.; Yu, L.; Liu, W.; et al. Antiviral activity of lycorine against Zika virus in vivo and in vitro. *Virology* 2020, *546*, 88–97. [Google Scholar] [CrossRef]
37. Shen, L.; Niu, J.; Wang, C.; Huang, B.; Wang, W.; Zhu, N.; Deng, Y.; Wang, H.; Ye, F.; Cen, S.; et al. High-Throughput Screening and Identification of Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Coronaviruses. *J. Virol.* 2019, *93*, e00023-19. [Google Scholar] [CrossRef]
38. Jin, Y.H.; Min, J.S.; Jeon, S.; Lee, J.; Kim, S.; Park, T.; Park, D.; Jang, M.S.; Park, C.M.; Song, J.H.; et al. Lycorine, a non-nucleoside RNA dependent RNA polymerase inhibitor, as potential treatment for emerging coronavirus infections. *Phytomedicine* 2021, *86*, 153440. [Google Scholar] [CrossRef]
39. Zhao, R.; Wang, M.; Cao, J.; Shen, J.; Zhou, X.; Wang, D.; Cao, J. Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development. *Life* 2021, *11*, 615. [Google Scholar] [CrossRef]
40. Mustafa, M.S.; Rasotgi, V.; Jain, S.; Gupta, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med. J. Armed Forces India* 2015, *71*, 67–70. [Google Scholar] [CrossRef]

41. Siatka, T.; Adamcova, M.; Opletal, L.; Cahlikova, L.; Jun, D.; Hrabínova, M.; Kunes, J.; Chlebek, J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). *Molecules* 2017, *22*, 1181. [Google Scholar] [CrossRef]
42. Greig, N.H.; Lahiri, D.K.; Sambamurti, K. Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int. Psychogeriatr.* 2002, *14*, 77–91. [Google Scholar] [CrossRef]
43. Darvesh, S.; Cash, M.K.; Reid, G.A.; Martin, E.; Mitnitski, A.; Geula, C. Butyrylcholinesterase is associated with beta-amyloid plaques in the transgenic APPSWE/PSEN1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *J. Neuropathol Exp. Neurol* 2012, *71*, 2–14. [Google Scholar] [CrossRef]
44. Lockridge, O.; Bartels, C.F.; Vaughan, T.A.; Wong, C.K.; Norton, S.E.; Johnson, L.L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 1987, *262*, 549–557. [Google Scholar] [CrossRef]
45. Vellom, D.C.; Radic, Z.; Li, Y.; Pickering, N.A.; Camp, S.; Taylor, P. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* 1993, *32*, 12–17. [Google Scholar] [CrossRef]
46. Masson, P.; Xie, W.; Froment, M.T.; Levitsky, V.; Fortier, P.L.; Albaret, C.; Lockridge, O. Interaction between the peripheral site residues of human butyrylcholinesterase, D70 and Y332, in binding and hydrolysis of substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, *1433*, 281–293. [Google Scholar] [CrossRef]
47. Nachon, F.; Carletti, E.; Ronco, C.; Trovaslet, M.; Nicolet, Y.; Jean, L.; Renard, P.Y. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: Elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem. J.* 2013, *453*, 393–399. [Google Scholar] [CrossRef]
48. Armarego, W.L.F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 8th ed.; Butterworth-Heinemann Press: Oxford, UK, 2017. [Google Scholar]
49. Ka, S.; Masi, M.; Merindol, N.; Di Lecce, R.; Plourde, M.B.; Seck, M.; Górecki, M.; Pescitelli, G.; Desgagne-Penix, I.; Evidente, A. Gigantelline, gigantellinine and gigancrinine, cherylline- and crinine-type alkaloids isolated from *Crinum jagus* with anti-acetylcholinesterase activity. *Phytochemistry* 2020, *175*, 112390. [Google Scholar] [CrossRef]
50. Lamoral-Theys, D.; Andolfi, A.; Van Goietsenoven, G.; Cimmino, A.; Le Calve, B.; Wauthoz, N.; Megalizzi, V.; Gras, T.; Bruyere, C.; Dubois, J.; et al. Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: An investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *J. Med. Chem.* 2009, *52*, 6244–6256. [Google Scholar] [CrossRef]

51. Fischl, W.; Bartenschlager, R. High-throughput screening using dengue virus reporter genomes. *Methods Mol. Biol.* 2013, *1030*, 205–219. [Google Scholar]
52. He, J.; Chen, Y.; Farzan, M.; Choe, H.; Ohagen, A.; Gartner, S.; Busciglio, J.; Yang, X.; Hofmann, W.; Newman, W.; et al. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 1997, *385*, 645–649. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
53. Chatel-Chaix, L.; Bartenschlager, R. Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: The enemy inside--caught in the web. *J. Virol.* 2014, *88*, 5907–5911. [Google Scholar] [CrossRef]
54. Merindol, N.; El-Far, M.; Sylla, M.; Masroori, N.; Dufour, C.; Li, J.X.; Cherry, P.; Plourde, M.B.; Tremblay, C.; Berthou, L. HIV-1 capsids from B27/B57+ elite controllers escape Mx2 but are targeted by TRIM5alpha, leading to the induction of an antiviral state. *PLoS Pathog* 2018, *14*, e1007398. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
55. Summa, V.; Petrocchi, A.; Bonelli, F.; Crescenzi, B.; Donghi, M.; Ferrara, M.; Fiore, F.; Gardelli, C.; Gonzalez Paz, O.; Hazuda, D.J.; et al. Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. *J. Med. Chem.* 2008, *51*, 5843–5855. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
56. Salentin, S.; Schreiber, S.; Haupt, V.J.; Adasme, M.F.; Schroeder, M. PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* 2015, *43*, W443–W447. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

CHAPITRE III

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

3.1 Retour sur la problématique

Plusieurs virus ont eu un impact significatif sur la santé humaine. Par exemple, la dengue, une maladie engendrée par l'arbovirus DENV, est l'une des principales causes de morbidité dans différentes régions du monde, telles que l'Asie du Sud-Est, l'Inde et l'Océanie [133]. L'OMS estime qu'annuellement, environ 500 000 personnes seraient touchées par la DHF, dont la majorité sont des enfants [5]. La DHF peut évoluer vers un DSS dont le taux de mortalité est d'environ 1 à 2,5 % [134]. En absence de soins appropriés, le taux de mortalité de la DSS peut dépasser les 20 % [134]. En ce qui concerne le virus de l'immunodéficience humaine, beaucoup d'efforts ont été déployés depuis son émergence afin de réduire sa transmission. Cependant, 1,5 millions de personnes ont tout de même été nouvellement infectées en 2021 [9]. Jusqu'à aujourd'hui, aucun traitement antiviral ne permet de soigner les cas de dengue sévère, et aucun traitement ne permet de soigner définitivement le VIH-1 [5, 8]. Ainsi, la découverte de nouvelles molécules antivirales demeure un enjeu mondial prioritaire.

Nous nous sommes donc intéressés à la famille des *Amaryllidaceae*, car elles sont reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques engendrées par les métabolites qu'elles contiennent, plus précisément, les alcaloïdes [28]. Par exemple, la lycorine a démontré des capacités antivirales contre plusieurs *Flavivirus*, tels que DENV, ZIKV, JEV, YFV, WNV, AHFV et DTMUV [16, 22, 23, 92-94, 135], et la littoraline a présenté un léger effet inhibiteur sur la RT du VIH-1 [125].

La norbelladine présente une structure moins encombrée que celle de la lycorine, et pourrait donc interagir avec davantage de cibles moléculaires. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, très peu d'études ont été effectuées sur le potentiel biologique de cette famille

d'alcaloïdes. Nous avons donc évalué la cytotoxicité d'une série de dérivés de la norbelladine ainsi que de ses précurseurs, dont la tyramine et le 3,4-DHBA, sur des cellules humaines, ainsi que leur effet antiviral contre le DENV et le VIH-1 par cytométrie en flux. Les résultats obtenus nous ont permis de calculer les EC₅₀, les CC₅₀ et les indices de sélectivité.

3.2 Cytotoxicité des précurseurs et dérivés de la norbelladine

Même si les propriétés toxiques des *Amaryllidaceae* sont largement compensées par leur potentiel thérapeutique, il est important de les évaluer dans le cadre de recherche sur leur pouvoir médicinal. Les effets toxiques des *Amaryllidaceae* sont divers, pouvant provoquer des symptômes gastro-intestinaux, tels que des vomissements et de la diarrhée, des effets hallucinogènes et neurotoxiques sur le SNC, des troubles cardiopulmonaires, tels qu'une paralysie respiratoire et un arrêt cardiaque, et même la mort chez certains individus [136-138]. Par exemple, *Boophone disticha* est utilisée dans la tradition San, un groupe de chasseurs-cueilleurs originaire d'Afrique, pour son effet contre l'anxiété, l'inflammation et le cancer, mais elle est aussi utilisée en tant que poison et narcotique [136, 139-141]. En effet, il a été démontré que des extraits éthanoliques de 250 mg/Kg ou plus administrés à des rats de type « Sprague Dawley » entraînaient des symptômes tels que des convulsions, une détresse respiratoire, une tachypnée et une paralysie flasque, suivie de la mort entre 30 minutes et 3 heures après l'administration [142]. Une autre étude rapporte l'effet cytotoxique de cinq extraits méthanoliques de plantes de type *Amaryllidaceae*, dont *Cyrtanthus breviflorus*, *Amaryllis belladonna*, *Crinum variable*, *Haemanthus pubescens* et *Nerine filifolia*, dans des lignées cellulaires de glioblastome, U251 et U87, et dans une lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y, à des IC₅₀ en dessous de 100 µg/mL [143]. L'effet toxique des *Amaryllidaceae* est majoritairement engendrée par la présence d'alcaloïdes [138, 144]. Par exemple, la lycorine est reconnue pour son effet inhibiteur sur la division et l'élongation cellulaire ainsi que sur la synthèse des protéines *in cellulo* [145]. Elle présente aussi un effet antiprolifératif sur une variété de cellules cancéreuses qui est en partie engendré par un mécanisme d'apoptose [146-150]. Une autre étude effectuée sur les alcaloïdes extraits de

Pancratium maritimum démontre le potentiel cytotoxique de quelques AAs, dont la lycorine, l'haemanthamine, la pancracine, l'haemanthidine, la 11-hydroxyvitattine, la tazettine et l'obliquine sur des cellules THP-1, avec des CC_{50} allant de 4,61 μM à 136,90 μM [99].

Le premier objectif de ce projet était d'évaluer l'activité cytotoxique par dosage de l'ATP cellulaire de précurseurs et d'alcaloïdes dérivés de la norbelladine, dont le 3,4-DHBA, la tyramine, la norbelladine, la norcraugsodine, la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine et la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine, dans des cellules monocytiques humaines THP-1 et dans des cellules d'hépatocarcinomes humaines Huh7. Les CC_{50} causant une diminution de la viabilité des cellules de 50 % ont été estimées pour tous les alcaloïdes atteignant cette valeur chez les 2 lignées cellulaires cancéreuses.

En ce qui concerne les cellules THP-1, la norcraugsodine, le 3,4-DHBA, la norbelladine et la 3'-*O*-méthylnorbelladine se sont avérés les plus cytotoxiques, avec des CC_{50} allant de 27,0 μM , à 99,01 μM , et tuant la totalité des cellules à 200 μM . La 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine, la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine et la 4'-*O*-méthylnorbelladine présentent une cytotoxicité modérée à 200 μM sur les cellules THP-1 et entraînent la mort de moins de 50 % des cellules. La tyramine, quant à elle, ne présente pas de cytotoxicité sur ce type de cellules.

Ensuite, pour les cellules Huh7, la norbelladine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, le 3,4-DHBA et la norcraugsodine ont présenté une cytotoxicité élevée, avec des CC_{50} allant de 72,6 μM à 173,1 μM , et en tuant plus de 50 % des cellules à 200 μM . La 3'-*O*-méthylnorcraugsodine présente une cytotoxicité modérée, avec une $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$, et tuant moins de 50 % des cellules à 200 μM . -La 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine et la tyramine présentent peu ou pas de cytotoxicité sur les cellules de type Huh7.

En somme, la norbelladine, la norcraugsodine, le 3,4-DHBA, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine et la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine sont cytotoxiques sur les deux types de lignées cellulaires utilisées. La 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-norbelladine et la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine présentent une cytotoxicité modérée seulement sur les cellules monocytaires THP-1, et sont non-cytotoxiques sur les cellules hépatocytaires Huh7, ce qui démontre la présence d'un mécanisme de cytotoxicité ciblé. La tyramine, quant à elle, ne présente aucune cytotoxicité sur aucune des deux lignées cellulaires étudiées. Les THP-1 sont des cellules dérivées d'un patient atteint de leucémie monocyttaire aiguë, pouvant aussi se différencier en macrophages [151]. Les Huh7, quant à elles, sont des hépatocytes provenant d'un carcinome du foie [152]. Jusqu'à aujourd'hui, aucune étude n'a été effectuée sur les mécanismes de cytotoxicité des alcaloïdes sur ces deux lignées cellulaires. Cependant, quelques études portent sur des mécanismes de cytotoxicité ciblée de la lycorine sur différents types de cellules. Par exemple, il a été démontré que la lycorine induit l'apoptose des cellules de promyéloblastes HL-60, en régulant à la hausse l'expression du facteur de TNF- α et l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante p21 [153]. Dans une autre étude, il a été démontré que l'effet apoptotique de la lycorine sur les cellules érythroleucémiques K562 se manifestait via la voie mitochondriale intrinsèque par une inhibition de la traduction de Mcl-1, une protéine ayant un rôle important dans la survie d'une variété de cellules tumorales [154]. Ainsi, en fonction de la lignée cellulaire utilisée, les alcaloïdes peuvent manifester différents mécanismes de cytotoxicité ciblés. Les récepteurs exprimés à la surface des cellules vont aussi varier d'un type cellulaire à un autre, ce qui peut aussi expliquer la sélectivité observée. Nous avons atteint le premier objectif en analysant la cytotoxicité des précurseurs et dérivés de norbelladine. Cependant, puisque certains composés ont présenté une cytotoxicité élevée, il serait intéressant d'en faire l'optimisation afin de vérifier s'il est possible de diminuer celle-ci.

3.3 Effet antiviral des précurseurs et dérivés de la norbelladine

Jusqu'à aujourd'hui, aucune étude n'a été effectuée sur le potentiel antiviral des précurseurs et des dérivés de la norbelladine. Les deuxième et troisième objectif de ce

projet consistaient à mesurer l'activité antivirale du 3,4-DHBA, de la tyramine et des 8 molécules dérivées de la norbelladine contre DENV_{GFP} et HIV-1_{GFP} respectivement, par cytométrie en flux en utilisant deux types de lignées cellulaires cancéreuses, dont les Huh7 pour les infections par DENV_{GFP}, et les THP-1 pour les infections par HIV-1_{GFP}. Les pourcentages d'infection ont été mesurés 72 heures postinfection. Une inhibition « dose-dépendant » de DENV_{GFP} et HIV-1_{GFP} a été observée en fonction des concentrations croissantes en alcaloïdes. Les EC₅₀ causant une diminution du pourcentage d'infection des cellules de 50 % ont été estimées pour tous les alcaloïdes atteignant cette valeur.

En ce qui concerne les infections effectuées avec le vecteur DENV_{GFP}, la norcraugsodine, la norbelladine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine et le 3,4-DHBA ont présenté une forte inhibition des pourcentages d'infection allant de 89 % à 100 % à une concentration de 200 µM, avec des EC₅₀ de 24,1 µM à 50,4 µM. Cependant, la norcraugsodine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, la norbelladine et le 3,4-DHBA sont très cytotoxiques à partir de 100 µM, et causent la mort de 55 % à 85 % des cellules à 200 µM. De plus, les EC₅₀ obtenus pour ces molécules sont très élevés en comparaison au contrôle positif, la lycorine, qui a présenté une EC₅₀ de 0,090 µM et un SI de 193,3. La 4'-*O*-méthylnorbelladine et la 3'-*O*-méthylnorbelladine présentent une cytotoxicité modérée, éliminant respectivement de 26 % à 39 % des cellules à 200 µM, avec des indices de sélectivité de > 4,9 et > 4,5, ce qui est plutôt faible. La 3'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine et la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine ont présenté une inhibition modérée de l'infection à 200 µM allant de 43 % à 64 %, avec des EC₅₀ de 176,3 µM à 200 µM, ce qui aussi très élevé par rapport à la lycorine. Elles sont très peu cytotoxiques à cette même concentration, engendrant la mort de moins de 8 % des cellules, mais présentent des indices de sélectivité faibles allant de < 1,0 à 1,1. La tyramine n'a pas présenté d'effet inhibiteur sur le virus.

En ce qui concerne les infections effectuées avec le vecteur HIV-1_{GFP}, la norcraugsodine, la norbelladine, la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine et le 3,4-DHBA ont

présenté une forte inhibition des pourcentages d'infection de 94 % à 99 % à une concentration de 200 μM , avec des EC_{50} de 50.5 μM à 107.2 μM . Cependant, ceux-ci sont très cytotoxiques aux concentrations nécessaires pour mesurer un effet inhibiteur appréciable, c'est-à-dire entre 100 et 200 μM , tuant plus de 50 % des cellules. En effet, ils présentent une faible sélectivité avec des SI de 0,5 à 1,9, démontrant ainsi que l'inhibition observée du pourcentage d'infection par HIV-1_{GFP} correspond davantage à une déplétion progressive des cellules plutôt qu'à un effet antiviral. Le raltegravir est une molécule reconnue comme ayant un effet antiviral contre le VIH-1 et a ici servi de contrôle positif [155]. Il a présenté une EC_{50} de 0,098 μM avec un SI de > 102 . Il est donc possible de voir que la norcraugsodine, la norbelladine, la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine et le 3,4-DHBA possèdent des EC_{50} très élevés et de faibles SI. La 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine et la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine présentent une inhibition modérée des pourcentages d'infection allant de 36 % à 52 %, avec des EC_{50} allant de 98,3 μM à > 200 μM . Cependant, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine et la 3'-*O*-méthylnorbelladine sont cytotoxiques et engendrent la mort de 30 à 50 % des cellules avec respectivement, des indices de sélectivité de 0,73 à 2,0, ce qui est aussi très faible en comparaison avec le raltegravir. La 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine et la 4'-*O*-méthylnorbelladine sont peu cytotoxiques et engendrent la mort de moins de 22 % des cellules, mais présentent tout de même des indices de sélectivité faibles allant de 1,0 à 1,8. La tyramine quant à elle, n'inhibe pas l'infection.

En somme, les précurseurs et dérivés de norbelladine étudiés présentent une faible sélectivité en ce qui concerne l'inhibition des infections réalisées avec le vecteur HIV-1_{GFP}. En ce qui concerne les infections effectuées avec le vecteur DENV_{GFP}, le 3,4-DHBA, la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine et la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine présentent une meilleure sélectivité avec des SI allant de 4,5 à 7,2. Cependant, d'autres alcaloïdes affichent des indices de sélectivité beaucoup plus élevés et s'avèrent davantage intéressants en tant que futur traitement du DENV, tels que la lycorine (SI = 90,6), la 1-acétylycorine (SI = 750), la 1-*O*-acetyl-2-oxolycorine

(SI => 166,7), la 2-oxolycorine (SI = 113,2) et la trans-dihydrolycoricidine (SI => 500) [16, 21]. Certains alcaloïdes de type norbelladine démontrent tout de même une activité intéressante. Il pourrait être avantageux de les optimiser avec d'autres types de modifications chimiques que la *O*-méthylation afin d'évaluer davantage leur potentiel antiviral. Le DENV et le VIH-1 présentent tous les deux un génome de type ARN de polarité positive. Cependant, leur cycle de vie viral est très différent, ce qui explique probablement que certains composés aient présenté une activité contre le DENV mais pas contre le VIH-1. Il est possible que les molécules en question aient agi sur des protéines virales spécifiques ou sur des facteurs cellulaires impliqués dans le cycle de vie de DENV et non du VIH-1. Nous avons pu accomplir les objectifs 2 et 3 avec succès. Cependant, davantage de recherches seraient nécessaires afin d'obtenir des informations sur le mécanisme d'action de ces composés. Malgré leur grande ressemblance structurale, les précurseurs et les dérivés de norbelladine mènent à différents résultats en ce qui concerne leur cytotoxicité et leur effet antiviral.

3.4 Rôle de la structure des alcaloïdes de type norbelladine dans l'activité biologique

La norbelladine et la norcraugsodine sont deux molécules qui se ressemblent beaucoup, et diffèrent l'une de l'autre seulement par la réduction du groupement imine de la norbelladine. Les dérivés de la norcraugsodine, dont la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine et la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine, diffèrent de celle-ci par l'ajout d'un groupement méthyle sur l'un des groupements hydroxyle en position C3 ou C4, ou par l'ajout de deux groupements méthyles sur les deux groupements hydroxyle en question. Il en est de même pour la norbelladine et ses dérivés, dont la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine et la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine. Cette étude a permis de constater que malgré leur grande ressemblance, leur potentiel biologique diffère en fonction de leur structure.

Par exemple, la norcraugsodine était la plus cytotoxique sur les cellules THP-1 ($CC_{50} = 27,0 \mu\text{M}$), alors que la norbelladine était la plus cytotoxique sur les cellules Huh7

($CC_{50} = 72,6 \mu\text{M}$). Aussi, les formes *O*-méthylées de la norcraugsodine et de la norbelladine semblent moins cytotoxiques que celles-ci, empêchant possiblement la formation de liaisons hydrogènes dû à un encombrement stérique plus élevé. Selon une étude, il a été observé *in vitro* que les composés portant des groupements hydroxyles en position C3 et C4 sur le cycle A de la norbelladine présentaient une meilleure activité de piégeage des radicaux libres que les composés phénoliques avec un seul groupe hydroxyle ou un groupe hydroxyle modifié, tels que l'acide *p*-hydroxybenzoïque et l'acide vanillique [49]. Il semble que la présence de ces groupements hydroxyles intacts soient responsables en partie de l'activité des alcaloïdes de type norbelladine, ce qui pourrait expliquer pourquoi les formes *O*-méthylées sont moins toxiques, puisqu'elles seraient moins réactives. Cependant, en ce qui concerne l'effet antiviral contre le DENV *in cellulo*, les molécules qui ont présenté une sélectivité notable sont des composés méthylés, dont la 4'-*O*-méthylnorbelladine (SI => 4,9), la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine (SI = 4,8) et la 3'-*O*-méthylnorbelladine (SI => 4,5). Il semble donc qu'une simple ou une double méthylation des groupements hydroxyles en position C3 ou C4 de la norbelladine permet de réduire sa cytotoxicité tout en conservant un léger potentiel antiviral. La molécule qui a présenté la meilleure sélectivité est le 3,4-DHBA (SI = 7,2), un aldéhyde phénolique portant deux groupements hydroxyles et un groupement aldéhyde sur un benzène, agissant comme précurseur dans la biosynthèse de la norbelladine. Sa petite taille aurait pu expliquer son meilleur potentiel, mais la tyramine, une phényléthylamine, possède aussi une petite taille et ne présente pas d'effet antiviral contre le DENV. Il est donc possible que son groupement aldéhyde soit en parti responsable de sa sélectivité supérieure contre le virus. En effet, les aldéhydes aromatiques ont été rapportés comme ayant un potentiel biologique varié, et présenteraient une activité antiinflammatoire *in cellulo* et antivirale *in silico* [46, 156, 157]. La méthylation des groupements hydroxyles en position C3 ou/et C4 de la norcraugsodine annule totalement son effet inhibiteur contre le DENV. En ce qui concerne le VIH-1, les précurseurs et dérivés de norbelladine ne présentent aucun effet intéressant contre ce virus.

Une étude rapporte que l'introduction d'un groupement halogène en C2, tel que le brome ou le chlore, sur le cycle A de la 4'-*O*-méthylnorbelladine augmente sa capacité

d'inhibition de l'enzyme AChE [158]. La présence d'un atome d'halogène dans les analogues de la norbelladine permettrait des interactions intermoléculaires qui contribueraient favorablement à la stabilité des complexes entre les alcaloïdes en question et l'enzyme [158]. Il serait intéressant de synthétiser d'autres dérivés de la norbelladine en introduisant divers groupements halogènes afin de tester leur pouvoir antiviral sur les virus à ARN. Étonnamment, il a aussi été rapporté que l'absence d'un groupement hydroxyle sur le cycle B d'un dérivé de la 4'-*O*-méthylnorbelladine augmentait son pouvoir inhibiteur de l'AChE et de la BuChE [158]. Cette modification pourrait aussi être intégrée chez certains des dérivés de la norbelladine afin de vérifier si elle pourrait avoir un impact sur l'effet antiviral de ces composés. De plus, nous pourrions également tester d'autres molécules de type aldéhyde aromatique puisque le 3,4-DHBA a présenté la meilleure sélectivité.

3.5 Les différents types de mécanismes d'action antiviraux

Les virus sont des parasites obligatoires qui utilisent la machinerie cellulaire de leur hôte pour accomplir leur cycle de vie [159]. Les molécules antivirales peuvent permettre d'inhiber/diminuer les infections, soit en agissant sur des facteurs cellulaires, soit en agissant sur une cible virale, ou les deux en même temps. En fonction du génome et du cycle de vie du virus, plusieurs facteurs viraux et cellulaires seront nécessaires à son développement, tels que des récepteurs, des protéines et des enzymes, qui sont tous des cibles intéressantes pour le développement de médicaments.

Plusieurs composés ont démontré un effet antiviral en agissant sur des protéines cellulaires importantes dans le cycle de vie d'un virus. Par exemple, certaines molécules pharmaceutiques ont présenté une activité antivirale contre le DENV en ciblant des cibles cellulaires telles que l'IMPDH [160], l'IMPα/β1 [161], l'IFN-α [162], les ribosomes [163] et la furine [164]. L'IMPDH est une enzyme impliquée dans la conversion de l'inosine 5'-monophosphate en xanthosine 5'-monophosphate [160]. Ainsi, un inhibiteur de l'IMPDH, tel que le 10-allyl-7-chloro-9(10H)-acridone, inhibe la synthèse des nucléotides de type guanosine et interfère donc avec la réplication de l'ARN viral [160].

Les IMP α et IMP β 1 sont des protéines cellulaires qui transportent d'autres protéines dans le noyau de la cellule en se liant aux séquences NLS [161]. Il a été démontré que la RdRp du DENV entre dans le noyau cellulaire pendant l'infection en se liant aux IMP α et IMP β 1, possiblement pour supprimer la production d'IL-8 et se protéger de son effet antiviral [165]. Un inhibiteur de l'association entre la RdRp et les IMP α et IMP β 1, le 4-HPR, a permis de diminuer l'accumulation de la RdRp dans le noyau cellulaire, ce qui a réduit considérablement la production de particules infectieuses du DENV [161]. En présence d'une infection virale, les récepteurs IFN- α sont stimulés par des interférons de type I, ce qui provoque l'activation des kinases JAK1 et TYK2 par phosphorylation de la tyrosine et conduit subséquemment à la transcription de gènes impliqués dans l'induction d'une réponse antivirale [162]. Le celastrol, un triterpène appartenant à la famille des méthides de quinone, inhibe la réplication du DENV en augmentant l'expression de l'INF- α [162]. Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques essentiels qui permettent la traduction des ARNm en protéines. Les virus en sont déficients et doivent donc utiliser ceux qui sont présents chez leur hôte. La lactimidomycine, un produit naturel isolé de *Streptomyces amphibiosporus*, permet d'inhiber les infections par le DENV en se liant au site E des ribosomes cellulaires [163]. Lors d'une infection par un *Flavivirus*, la furine cellulaire catalyse l'élimination du segment pr du précurseur prM de la glycoprotéine membranaire M, qui interagit par la suite avec la glycoprotéine E de l'enveloppe virale [164]. Selon une étude, certains inhibiteurs peptidiques permettent d'inhiber les infections par le DENV et le WNV en entravant l'activité de la furine [164]. Une autre molécule, le maraviroc, permet d'inhiber le VIH-1 en se liant au corécepteur cellulaire CCR5, empêchant ainsi le virus de pénétrer dans les cellules [166].

D'autres composés sont plutôt reconnus pour exercer leur effet antiviral en agissant sur des protéines virales impliquées dans les différentes étapes du cycle de vie du virus ciblé, telles que le processus d'entrée, de réplication, d'assemblage et de maturation des virions. Par exemple, pour le DENV, les cibles virales les plus prometteuses sont la protéine E, la protéase de NS3/NS2B ainsi que la RdRp de NS5 [6, 167-169]. La protéine E permet l'entrée du virus dans les cellules par endocytose activée. Selon une étude, de petites molécules de cyanohydrazone peuvent se lier à la protéine E, provoquer

un changement de conformation, et empêcher ainsi la fusion de la membrane virale avec la membrane endosomale [167]. La protéase de NS3, en association avec le peptide court de NS2B, permet de cliver la polyprotéine virale précurseur [168]. Ainsi, son inhibition pourrait permettre d'arrêter la transformation des protéines virales et diminuer les taux d'infection. En effet, il a été vu qu'un petit inhibiteur allostérique, le N,N'-[(9-oxo-9H-fluorene-2,7-diyl)-bis (oxyethane-2,1-diyl)]-bis(N,N-diethyldecan-1-aminium), permet de réduire les taux d'infection par le DENV-2 en bloquant l'interaction entre NS2B et NS3 [168]. La RdRp est une enzyme qui catalyse la réplication virale d'un brin d'ARN complémentaire à partir d'un brin d'ARN matrice [169]. Ainsi, son inhibition entrave la réplication de l'ARN viral et permet de diminuer les taux d'infection. En effet, selon une étude, un petit fragment nommé composé 27 peut se lier au site allostérique de la RdRp et inhiber la réplication du DENV2 [170]. Pour le VIH-1, la majorité des molécules antivirales approuvées visent des cibles virales, telle que la RT [171]. La RT permet au virus de transcrire son ARN génomique en ADN double-brin [172]. Quelques molécules permettent son inhibition en se liant à un site allostérique de l'enzyme, telles que la nevirapine [173], la delavirdine [174] et l'efavirenz [175]. Il existe aussi des inhibiteurs nucléosidiques, tels que la zidovudine, qui inhibent la RT en agissant comme des terminateurs de chaîne lors de la rétrotranscription [172, 176].

Les mécanismes d'action contribuant à l'effet antiviral des alcaloïdes de la famille de la norbelladine sont jusqu'à aujourd'hui inconnus. Cependant, quelques études ont démontré que les AAs exercent un effet inhibiteur contre diverses familles de virus en modulant des cibles virales mais aussi des protéines cellulaires de l'hôte. Par exemple, la lycorine, le composé qui a été le plus étudié, inhibe plusieurs virus à ARN, dont les *Flavivirus* (DENV, ZIKV, JEV, WNV et YFV) [16, 22, 92, 135], les coronavirus (SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-OC43, HCoV-NL63 et MHV-A59) [24, 25, 90, 177, 178], les *Alphavirus* (CHIKV, SINV, SFV et VEEV) [26], et les *Alphainfluenzavirus* (H1N1, H3N2 et H5N1) [179]. Quelques cibles virales ont été identifiées, dont la MPro du SARS-CoV-2 [177], la RdRp du MERS-CoV et possiblement du SARS-CoV-2 [90]. Des analyses *in silico* indiquent que celle-ci pourrait effectuer des liaisons hydrogènes avec les résidus Asn142, Gln189 et Glu166 du site actif de la MPro

ainsi qu'avec les résidus Asp623, Asn691, et Ser759 de la RdRp de SARS-CoV-2, et qu'elle pourrait aussi interagir avec le domaine de liaison du récepteur S1 (S1-RBD) [90, 180]. De plus, il a été souligné que la lycorine permet de réduire la charge virale dans le système nerveux central de souris BALB/c lors d'infections causées par le HCoV-OC43 [178]. D'autres AAs, dont la galanthamine, la narciclasine, la lycoricidine, la lycorénine et la pseudolycorine, ont démontré une habileté à interagir avec la MPro de SARS-CoV-2 lors d'analyses computationnelles [181, 182]. La lycorine inhibe aussi la réplication de l'ARN chez les *Flavivirus* [16] et la traduction des protéines virales chez CHIKV [26]. Il est probable qu'elle exerce son effet antiviral en employant plusieurs mécanismes et en ciblant plus d'une protéine, autant virale que cellulaire. En effet, il a été démontré qu'elle peut moduler des voies de signalisation et inhiber l'expression de certaines protéines cellulaires. Par exemple, lors d'infection par le virus H5N1, elle diminue l'expression de Nup93, ce qui inhibe l'exportation des RNP du noyau de la cellule vers le cytoplasme [179, 183]. De plus, elle présente un effet inhibiteur sur la division et l'élongation cellulaire, sur la synthèse des protéines cellulaires [145], et elle exerce un effet antiprolifératif sur une variété de cellules cancéreuses [146-150]. La lycorine permet aussi d'inhiber des virus portant un génome de type ADN, tel que le virus de l'herpès simplex de type 1 [184].

Il semble que plusieurs autres alcaloïdes provenant d'autres familles de végétaux interagissent autant avec des cibles virales que cellulaires. Par exemple, la tomatidine permet en partie de réduire les infections causées par le DENV en inhibant l'expression du facteur ATF4 [185]. D'autre part, il est prouvé qu'elle inhibe l'expression des protéines virales de la capsid, NSP1 et E2 chez CHIKV [186]. L'émétine inhibe la RT du VIH-1, et par le fait même, la réplication de l'ARN [187]. Elle est aussi un inhibiteur de la synthèse protéique qui a été utilisé comme anti-protozoaire pour le traitement de l'amibiase, et elle inhibe également le paludisme en se liant au site E ribosomal de *Plasmodium falciparum* [188, 189]. Il est probable que les alcaloïdes de type norbelladine exercent leur effet antiviral à l'aide de plusieurs mécanismes ciblant autant les protéines virales que cellulaires, et que certains d'entre eux présentent un effet thérapeutique à large spectre sur plusieurs familles de virus.

La majorité des médicaments antiviraux approuvés présentent un mécanisme qui cible une enzyme virale essentielle dans le cycle de vie du virus [190]. Par exemple, les composés ciblant la RdRp présentent un intérêt considérable, puisque celle-ci est présente chez tous les virus à ARN (à l'exception du VIH-1), et absente chez l'humain [191]. Cependant, l'un des principaux obstacles dans le développement de molécules antivirales est l'apparition d'une résistance contre le mécanisme de celles-ci. Le développement d'une résistance à un médicament est particulièrement fréquent dans le cas des virus à ARN, puisque la RdRp présente un taux d'erreurs élevés lors de son activité [191]. La RT du VIH-1 engendre elle aussi de multiples variants en raison de son taux de mutations élevé [192]. Les molécules antivirales qui ciblent des facteurs de l'hôte nécessaires au cycle de vie du virus pourraient présenter une solution [192]. En comparaison aux protéines virales qui subissent fréquemment des mutations, les protéines cellulaires présentent une stabilité plus élevée et ne sont pas sujettes aux problèmes de résistance aux médicaments [169]. Cependant, l'inhibition d'un facteur cellulaire conservé à travers l'évolution peut engendrer des effets secondaires indésirables, puisque le fonctionnement de la cellule en sera affecté. En ce qui concerne les infections virales aiguës, le traitement est de courte durée et ne devrait donc pas engendrer de problèmes de toxicité élevée [192]. Le risque est davantage présent dans le cas de maladies chroniques qui nécessitent une médication de longue durée, tel que le VIH-1.

3.6 Limites et perspectives

Cette étude est la première à aborder le potentiel antiviral des alcaloïdes de type norbelladine de la famille des *Amaryllidaceae*. Peu de données sont disponibles en ce qui concerne leur pouvoir biologique. Nous avons mesuré l'effet cytotoxique des précurseurs et des dérivés de la norbelladine sur des cellules humaines immortalisées. Nous avons ensuite mesuré l'effet antiviral de ces mêmes molécules contre les virus HIV-1_{GFP} et DENV_{GFP}. Nous avons pu constater que la norbelladine, la norcraugsodine et le 3,4-DHBA étaient les plus cytotoxiques. Le 3,4-DHBA, la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine et la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine étaient les plus sélectifs

pour inhiber les infections par DENV_{GFP}, et en ce qui concerne les infections effectuées avec HIV-1_{GFP}, tous les composés ont présenté une faible sélectivité. Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent d'élucider davantage la relation structure-activité des alcaloïdes présentant un squelette de type norbelladine de la famille des *Amaryllidaceae*. Ils fournissent de plus amples indications sur le pouvoir biologique de ces molécules, en fonction de la nature et de l'emplacement des différents groupes chimiques présents sur chaque carbone. Ces nouvelles connaissances permettent de mieux orienter la sélection et l'optimisation des alcaloïdes et leurs dérivés pour la recherche et la production de nouveaux inhibiteurs pour lutter contre les infections causées par les virus DENV et VIH-1.

Cependant, il est important de prendre en compte que cette étude arbore plusieurs limitations au niveau de la méthodologie, et que celles-ci sont importantes à considérer afin d'évaluer les résultats ainsi que les perspectives de ce projet avec un esprit critique. Par exemple, en ce qui concerne les infections effectuées avec le vecteur HIV-1_{GFP}, il n'est pas totalement exclu que certains des alcaloïdes testés puissent avoir une activité contre le virus VIH-1, puisque le pseudovirus employé ne contient pas la protéine d'enveloppe originale du VIH-1, et ne permet donc pas de déterminer si les composés étudiés ont un potentiel d'action lors des étapes d'entrée et de sortie de la cellule. En effet, le plasmide lentiviral employé pour générer le virus, pNL4-3-GFPΔEnvΔNef, présente un décalage du cadre de lecture dans le gène de l'enveloppe et empêche donc l'obtention de cette protéine [193]. Un second plasmide codant pour la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire, pMD2.G, permet d'obtenir un virus pseudotypé capable d'effectuer un seul cycle de réplication [16]. Il serait donc intéressant d'effectuer des infections avec un vecteur du VIH-1 qui permet de vérifier si les alcaloïdes testés ont un effet antiviral sur les étapes d'entrée et de sortie du virus lors de son cycle de vie.

D'autres aspects importants sont à prendre en compte dans l'analyse des résultats. L'effet antiviral des précurseurs et dérivés de la norbelladine n'a été testé que sur deux lignées cellulaires immortalisées, dont les Huh7 et les THP-1. Les lignées cellulaires dérivées de tumeurs et immortalisées en laboratoire présentent des lacunes dans

l'induction des gènes stimulés par l'interféron et autres messagers participant à la défense antivirale [194]. L'un des principaux composants de la défense immunitaire innée est le système d'interférons de type 1, dont les virus doivent prévenir la production afin de pouvoir se répliquer dans des conditions optimales [195]. Or, l'immortalisation des cellules incluent généralement l'inactivation du facteur de transcription p53 et de la protéine pRB [194]. p53 est un important suppresseur de tumeur qui accomplit plusieurs rôles, dont la régulation de la signalisation de l'IFN-I, et en présence d'infections virales, l'arrêt de la croissance et l'apoptose des cellules [196-198]. Il est reconnu que les cellules qui présentent une inhibition de l'expression de p53 sont plus susceptibles aux infections virales [199, 200]. pRB est aussi un suppresseur de tumeur et il présente une fonction de régulation des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et dans l'induction et la réponse aux cytokines [201]. L'invalidation génique de pRB entraîne chez les cellules une réduction de l'expression du récepteur TLR3, une activation altérée du facteur NF- κ B et une permissivité élevée aux infections effectuées avec le VSV [202, 203]. p53 et pRB ne sont que quelques exemples. Il existe de nombreuses autres mutations pouvant être présentes chez les cellules immortalisées qui pourraient modifier leur réponse antivirale [194]. Les Huh7 sont une lignée cellulaire épithéliale composée de cellules tumorigènes prélevées d'un cancer du foie qui sont utilisées comme modèle pour étudier les infections causées par le HCV et aussi par le DENV [204-207]. Elles sont utilisées pour effectuer des transfections en raison de leur réceptivité élevée au génome du HCV, un *Flavivirus* [208]. Il est reconnu qu'elles contiennent plusieurs mutations, dont l'une dans le gène p53, ainsi qu'un nombre de chromosomes anormal [209]. Il est donc possible que la réponse antivirale des Huh7 soit différente, voire moins élevée, de ce que nous observerions chez des cellules primaires. Les THP-1 sont une lignée cellulaire composée de cellules monocytaires provenant du sang d'un patient atteint de leucémie monocyttaire aigue et sont couramment utilisées pour étudier certains cas de cancers *in vitro*, tels que la leucémie monocyttaire, mais aussi les processus de différenciation des monocytes-macrophages ainsi que les infections causées par le VIH-1 [210-214]. Cependant, elles ne présentent pas d'immunoglobulines de surface ou cytoplasmiques, ce qui, comme dans le cas des Huh7, pourrait affecter la réponse antivirale de ces cellules à la baisse [210]. Il a aussi été souligné que lorsque stimulé par des lipopolysaccharides de *Pseudomonas*

aeruginosa ou *Escherichia coli*, les cellules primaires de type PBMC produisent davantage de cytokines inflammatoires, dont le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-10, que les cellules THP-1 [215]. Il serait donc intéressant de tester le pouvoir antiviral des précurseurs et dérivés de la norbelladine contre le VIH-1, mais aussi contre le DENV, dans des cellules primaires telles que les PBMC [16]. En effet, les PBMC comprennent des monocytes et des macrophages, des cibles qui sont considérées comme étant d'importants sites de réplication lors des infections par le VIH-1 et le DENV [216, 217]. Les cellules primaires reflètent davantage le phénotype sain du tissu d'origine, car elles ne portent pas les mutations qu'engendrent les processus de tumorigenèse et de culture cellulaire en continue [194]. Elles seraient donc plus représentatives des infections se produisant *in vivo*. Cependant, leur durée de vie limitée rend les manipulations expérimentales plus difficiles et elles sont plus onéreuses [151, 194]. Elles présentent aussi une efficacité de transfection de l'ADN plasmidique moins élevée que chez les cellules immortalisées en raison des voies intrinsèques et innées activées par l'ADN étranger en question [218, 219]. En somme, puisque nous avons déjà testé l'effet antiviral des composés étudiés sur des cellules immortalisées, il serait cohérent de refaire les mêmes expériences mais sur des cellules primaires puisqu'elles ressemblent davantage à l'environnement naturel des cellules humaines.

La cytotoxicité engendrée par les précurseurs et dérivés de la norbelladine n'a aussi été testée que sur les cellules Huh7 et THP-1. Il serait donc nécessaire d'évaluer la cytotoxicité sur des cellules primaires. Plusieurs types de cellules immortalisées présentent une insensibilité face aux drogues et aux agents toxiques, et nécessitent donc des doses plus élevées qui ne reflètent pas le réel potentiel biologique des composés étudiés [220]. Les cellules primaires, quant à elles, seraient plus sensibles aux effets nocifs des drogues étudiées que les lignées cellulaires [221]. Il serait aussi important de tester la toxicité des molécules étudiées sur une plus grande variété de lignées cellulaires, afin de déterminer si l'effet délétère est spécifique à un seul type de cellules ou généralisé. En effet, selon une étude, deux lignées cellulaires rénales, dont IP15 et LLC-PK₁, présentent une sensibilité différente à l'effet toxique du dioxyde de titane [222].

Un autre point nécessite d'être considéré davantage avant de tirer des conclusions. Les précurseurs et dérivés de la norbelladine n'ont été testés que sur deux virus, dont le DENV et le VIH-1, ce qui donne qu'un très petit aperçu de l'étendue de leur potentiel antiviral. Il est possible que les précurseurs et les alcaloïdes de la famille de la norbelladine présentent une spécificité plus élevée contre d'autres types de virus, puisque ceux-ci arborent des variations dans leur cycle de réplication, impliquant différentes enzymes virales et protéines cellulaires. En effet, quelques AAs ont démontré un potentiel biologique contre d'autres types d'infections virales causées par des virus à ARN. Par exemple, tel que mentionné précédemment, la lycorine inhibe les infections *in cellulo* de plusieurs coronavirus, dont SARS-CoV-2 [25, 90, 177], SARS-CoV [24, 90], MERS-CoV [90], HCoV-OC43, HCoV-NL63 et MHV-A59 [178], d'*Alphavirus*, dont CHIKV, SINV, SFV et VEEV [26], et d'*Alphainfluenzavirus*, dont les souches H1N1, H5N1 et H3N2 [179, 223]. D'autres AAs ont montré un effet antiviral contre les infections *in cellulo* causées par la souche H5N1 des *Alphainfluenzavirus*, dont l'hippeastrine, la 2 α -methoxy-6-*O*-methyloduline, la 2 α -methoxy-6-*O*-ethyloduline, la trispherine, l'haemanthamine et la 11-hydroxyvittatine [179]. L'haemanthamine exerce aussi une inhibition sur les souches H1N1 et H3N2 [223]. Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe aucune cure ni vaccin pour traiter ou prévenir les infections causées par le SARS-CoV et le MERS-CoV [224, 225]. Plusieurs vaccins sont disponibles pour prévenir les formes graves de la Covid-19, causée par le SARS-CoV-2 [226-228], ainsi que des antiviraux et des anticorps monoclonaux [222]. Cependant, le potentiel antiviral des anticorps monoclonaux diminue avec l'émergence de nouveaux variants [229]. En 2013, CHIKV a engendré plus de 1,5 millions de morts dans les Caraïbes et en Amérique [230, 231]. Il n'existe toujours pas de traitement ou de vaccin approuvés pour soigner ou prévenir les infections causées par CHIKV [230]. En ce qui concerne les *Alphainfluenzavirus*, il existe plusieurs vaccins, mais de nouveaux sous-types émergent constamment par déplacements et dérives antigéniques, ce qui diminue leur efficacité et engendre aussi des problèmes de résistance aux médicaments approuvés [179]. Il existe donc un besoin élevé de découvrir et de tester de nouvelles molécules antivirales pour ces virus. Puisque plusieurs alcaloïdes de type isoquinolinique présentent un effet inhibiteur contre d'autres virus que le DENV et le VIH-1, il serait intéressant d'évaluer le potentiel antiviral des précurseurs et dérivés

de la norbelladine contre les coronavirus, les *Alphavirus* et les *Alphainfluenzavirus* afin de vérifier s'ils présentent une meilleure sélectivité que les autres composés déjà testés. Afin d'explorer davantage les propriétés biologiques des précurseurs et dérivés de la norbelladine, nous pourrions évaluer leur activité antivirale contre d'autres familles de virus ainsi que leur activité antibactérienne, antiparasitaire et antifongique. La cytotoxicité démontrée par le 3,4-DHBA, la norbelladine, la norcraugsodine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine et la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine sur les cellules Huh7 et THP-1 souligne que ces composés pourraient aussi présenter une activité anticancéreuse intéressante contre les carcinomes du foie, la leucémie monocytaire aiguë et possiblement d'autres types de cancer.

Puisque les précurseurs et dérivés de norbelladine n'ont pas présenté une sélectivité élevée contre les infections effectuées par les vecteurs DENV_{GFP} et HIV-1_{GFP}, nous n'avons pas réalisé d'expériences permettant d'en apprendre davantage sur les cibles qui pourraient être visées par leur mécanisme d'action. S'il s'avère que l'un des composés montre une activité antivirale intéressante contre d'autres virus suite à de nouvelles études, il serait alors intéressant d'en apprendre davantage sur leur fonctionnement en faisant des analyses *in silico*, tel qu'effectué par Ka S, Merindol N, Sow AA, et al. [16]. En premier lieu, nous pourrions commencer par tenter de cribler des composés analogues aux précurseurs et dérivés de la norbelladine avec un logiciel tel que SwissSimilarity afin d'avoir une idée de l'activité biologique possible des molécules que nous étudions [232]. Nous pourrions ensuite tenter d'établir avec quelle protéine cellulaire ou/et virale ces composés pourraient avoir des interactions favorables en utilisant des plateformes en ligne tels que SwissTargetPrediction [233], ChemMapper [234] et/ou PharmMapper [235]. Finalement, nous pourrions évaluer la pharmacodynamique des précurseurs et dérivés de la norbelladine en utilisant le logiciel SwissADME, ce qui permettrait de prédire des propriétés telles que leur absorption, leur distribution, leur métabolisme et leur excrétion dans le corps humain [236]. En deuxième lieu, nous pourrions réaliser des expériences de type « time-of-drug-addition assay » afin de déterminer *in cellulo* quelle étape du cycle viral est affectée par les composés que nous étudions, tel que décrit par Pauwels R, Andries K, Desmyter J, et al [237]. Cette technique consiste à ajouter le composé étudié

aux cellules infectées par le virus visé à différents temps et à vérifier à quel moment l'inhibiteur perd son activité antivirale [238]. Les virus effectuent leur cycle d'infection en suivant des étapes essentielles selon un ordre chronologique bien établie. Par exemple, le VIH-1 effectue son entrée < 1-3 heures après son exposition avec les cellules [239-243]. Ainsi, si l'effet antiviral de la molécule étudiée se manifeste lorsque le composé est ajouté lors des 3 premières heures, mais qu'il disparaît lorsqu'il est ajouté à > 4 heures postinfection, cela signifie qu'il interagit probablement avec l'une des protéines virales ou cellulaires impliquées dans le processus de fusion ou d'entrée du virus. Afin de consolider nos observations, nous pourrions effectuer des expériences de type « time-of-drug-removal assay », ce qui permet aussi de déterminer quelle étape du cycle viral est visée *in cellulo* par les composés étudiés, tel qu'effectué par Ka S, Merindol N, Sow AA, et al. [16]. Cette technique ressemble beaucoup au « time-of-drug-addition assay », mais avec une légère différence. Dans ce cas-ci, les composés étudiés sont tous ajoutés aux cellules infectées au temps 0 h, et ils sont ensuite retirés à des temps spécifiques, tels que 2 h, 4 h et 7 h postinfection dans le cas du DENV [16]. Il suffit tout simplement d'adapter les temps de retrait des inhibiteurs au cycle de réplication du virus utilisé. L'analyse des résultats obtenus lors des tests de « time-of-drug-addition » et de « time-of-drug-removal » peut être effectuée par la méthode immuno-enzymatique ELISA, par qRT-PCR ou par cytométrie en flux si les pseudovirus utilisés contiennent un gène rapporteur [16, 238]. Les informations obtenues suite aux analyses *in silico* et aux tests de « time-of-drug-addition and -removal » permettraient d'établir avec plus de certitude la cible probable du mécanisme de l'inhibiteur étudié. Si c'est une enzyme virale ou cellulaire, nous pourrions la cloner et l'exprimer afin de mesurer sa capacité d'inhibition lors d'essais enzymatiques en présence d'alcaloïdes pour en déterminer le K_i [244]. Nous pourrions aussi vérifier par western-blot si l'inhibiteur diminue l'expression de l'enzyme visée ou si l'effet antiviral découle directement de l'inhibition de son activité [90]. Finalement, nous pourrions évaluer l'effet combinatoire du composé d'intérêt avec d'autres molécules afin de vérifier s'il est possible d'augmenter son potentiel antiviral [25].

3.7 Conclusion

L'objectif de cette étude était de caractériser le potentiel biologique des précurseurs de la norbelladine, dont le 3,4-DHBA et la tyramine, et d'une série d'alcaloïdes synthétisés en laboratoire, dont la norbelladine, la norcraugsodine, la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 3'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorcraugsodine, la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine et la 3',4'-*O*-diméthylnorcraugsodine, en mesurant leur effet cytotoxique sur deux types de lignées cellulaires, dont les THP-1 et les Huh7, et en mesurant leur capacité d'inhibition des infections causées par les pseudovirus HIV-1_{GFP} et DENV_{GFP}. Les composés étudiés n'ont pas présenté d'activité antivirale lors d'infections avec HIV-1_{GFP}. Cependant, certains de ceux-ci, dont le 3,4-DHBA, la 3'-*O*-méthylnorbelladine, la 4'-*O*-méthylnorbelladine et la 3',4'-*O*-diméthylnorbelladine, ont montré un effet inhibiteur contre les infections effectuées avec DENV_{GFP}.

Jusqu'à aujourd'hui, la norbelladine et ses dérivés étaient davantage connus pour leur effet anti-inflammatoire et inhibiteur de la COX, de l'AChE et de la BuChE [49, 50]. Nous avons démontré que certains dérivés de la norbelladine présentaient une activité antivirale contre le virus DENV_{GFP}. Les résultats obtenus dans cette étude ont augmenté nos connaissances sur la relation structure-activité des alcaloïdes avec un squelette de type norbelladine. Ils permettent de mieux comprendre la puissance biologique de ces composés en fonction de leur structure. Ces nouvelles connaissances pourraient permettre de mieux guider la sélection et l'optimisation des alcaloïdes pour le développement de nouveaux inhibiteurs contre les virus à ARN.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Carrasco-Hernandez, R., et al., *Are RNA Viruses Candidate Agents for the Next Global Pandemic? A Review*. *Ilar J*, 2017. **58**(3): p. 343-358.
2. Koonin, E.V., M. Krupovic, and V.I. Agol, *The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution?* *Microbiol Mol Biol Rev*, 2021. **85**(3): p. e0005321.
3. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*, in *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*, E. MM, Editor. 2020, Academic Press. p. 281-359.
4. Murugesan, A. and M. Manoharan, *Chapter 16 - Dengue Virus*, in *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*, M.M. Ennaji, Editor. 2020, Academic Press. p. 281-359.
5. WHO. *Dengue and severe dengue*. 10 janvier 2022; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
6. Zhao, R., et al., *Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development*. *Life*, 2021. **11**(7): p. 615.
7. Balvay, L., et al., *Translational control of retroviruses*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(2): p. 128-140.
8. WHO. *HIV/AIDS*. 27 juillet 2022; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
9. UNAIDS. *Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet*. 2022; Available from: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
10. Challacombe, S.J., *Global inequalities in HIV infection*. *Oral Dis*, 2020. **26 Suppl 1**: p. 16-21.
11. Kaptein, S.J.F., et al., *A pan-serotype dengue virus inhibitor targeting the NS3-NS4B interaction*. *Nature*, 2021. **598**(7881): p. 504-509.
12. Lee, J.H. and S. Crotty, *HIV vaccinology: 2021 update*. *Semin Immunol*, 2021. **51**: p. 101470.
13. Gibert, C.L., *Treatment Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents: An Update*. *Fed Pract*, 2016. **33**(Suppl 3): p. 31s-36s.

14. Yuan, N.Y. and M. Kaul, *Beneficial and Adverse Effects of cART Affect Neurocognitive Function in HIV-1 Infection: Balancing Viral Suppression against Neuronal Stress and Injury*. J Neuroimmune Pharmacol, 2021. **16**(1): p. 90-112.
15. Cuevas, J.M., et al., *Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo*. PLoS Biol, 2015. **13**(9): p. e1002251.
16. Ka, S., et al., *Amaryllidaceae Alkaloid Cherylline Inhibits the Replication of Dengue and Zika Viruses*. Antimicrob Agents Chemother, 2021. **65**(9): p. e0039821.
17. Verpoorte, R., *Alkaloids*, in *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, P. Worsfold, A. Townshend, and C. Poole, Editors. 2005, Elsevier: Oxford. p. 56-61.
18. Cordell, G.A., M.L. Quinn-Beattie, and N.R. Farnsworth, *The potential of alkaloids in drug discovery*. Phytother Res, 2001. **15**(3): p. 183-205.
19. Heinrich, M., J. Mah, and V. Amirkia, *Alkaloids Used as Medicines: Structural Phytochemistry Meets Biodiversity-An Update and Forward Look*. Molecules, 2021. **26**(7): p. 1836.
20. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
21. Wang, P., et al., *Anti-dengue-virus activity and structure-activity relationship studies of lycorine derivatives*. ChemMedChem, 2014. **9**(7): p. 1522-33.
22. Gabrielsen, B., et al., *Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances*. J Nat Prod, 1992. **55**(11): p. 1569-81.
23. Chen, H., et al., *Antiviral activity of lycorine against Zika virus in vivo and in vitro*. Virology, 2020. **546**: p. 88-97.
24. Li, S.Y., et al., *Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus*. Antiviral Res, 2005. **67**(1): p. 18-23.
25. Zhang, Y.N., et al., *Gemcitabine, lycorine and oxysophoridine inhibit novel coronavirus (SARS-CoV-2) in cell culture*. Emerg Microbes Infect, 2020. **9**(1): p. 1170-1173.
26. Li, N., et al., *In Vitro Inhibition of Alphaviruses by Lycorine*. Virol Sin, 2021. **36**(6): p. 1465-1474.
27. Ka, S., et al., *Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids*. Molecules, 2020. **25**(21): p. 4901.

28. Desgagné-Penix, I., *Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review*. *Phytochem Rev*, 2021. **20**(2): p. 409-431.
29. Hartwell, J.L., *Plants used against cancer. A survey*. *Lloydia*, 1971. **34**(4): p. 386-425.
30. Robinson, T., *Metabolism and Function of Alkaloids in Plants*. *Science*, 1974. **184**(4135): p. 430-435.
31. Gerrard, A.W., *The proximate principles of the Narcissus pseudonarcissus*. *Pharm J.*, 1877. **8**: p. 214.
32. Wang, Y.-H., et al., *Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase*. *Chem Cent J.*, 2012. **6**(1): p. 96.
33. Szlavik, L., et al., *Alkaloids from Leucojum vernum and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids*. *Planta Med*, 2004. **70**(9): p. 871-3.
34. Tan, C.X., et al., *Activity of lycorine analogues against the fish bacterial pathogen Flavobacterium columnare*. *J Agric Food Chem*, 2011. **59**(11): p. 5977-85.
35. Cedrón, J.C., et al., *Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives*. *Bioorg Med Chem*, 2010. **18**(13): p. 4694-701.
36. Lamoral-Theys, D., et al., *Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight*. *J Med Chem*, 2009. **52**(20): p. 6244-56.
37. Shen, J.W., et al., *Lycorine: a potential broad-spectrum agent against crop pathogenic fungi*. *J Microbiol Biotechnol*, 2014. **24**(3): p. 354-8.
38. Jin, Z. and G. Yao, *Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids*. *Nat Prod Rep*, 2019. **36**(10): p. 1462-1488.
39. Ding, Y., et al., *Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review*. *J Asian Nat Prod Res*, 2017. **19**(1): p. 53-100.
40. Singh, A., et al., *Cloning and characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis*. *BMC Plant Biol*, 2018. **18**(1): p. 338.
41. Tousignant, L., et al., *Transcriptome analysis of Leucojum aestivum and identification of genes involved in norbelladine biosynthesis*. *Planta*, 2022. **255**(2): p. 30.

42. Kilgore, M.B., et al., *Identification of a Noroxomaritidine Reductase with Amaryllidaceae Alkaloid Biosynthesis Related Activities*. J Biol Chem, 2016. **291**(32): p. 16740-16752.
43. Kilgore, M.B., et al., *Cloning and characterization of a norbelladine 4'-O-methyltransferase involved in the biosynthesis of the Alzheimer's drug galanthamine in Narcissus sp. aff. pseudonarcissus*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103223.
44. El Tahchy, A., et al., *New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures*. Acta Biochim Pol, 2010. **57**(1): p. 75-82.
45. Kilgore, M.B., et al., *CYP96T1 of Narcissus sp. aff. pseudonarcissus Catalyzes Formation of the Para-Para' C-C Phenol Couple in the Amaryllidaceae Alkaloids*. Front Plant Sci, 2016. **7**: p. 225.
46. Kang, N., et al., *In Silico Virtual Screening of Marine Aldehyde Derivatives from Seaweeds against SARS-CoV-2*. Mar Drugs, 2022. **20**(6).
47. Ban, J.Y., et al., *3,4-dihydroxybenzoic acid from Smilacis chinae rhizome protects amyloid beta protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons*. Neurosci Lett, 2007. **420**(2): p. 184-8.
48. Yen, G.C. and C.L. Hsieh, *Antioxidant effects of dopamine and related compounds*. Biosci Biotechnol Biochem, 1997. **61**(10): p. 1646-9.
49. Park, J.B., *Synthesis and characterization of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound*. Bioorg Med Chem Lett, 2014. **24**(23): p. 5381-5384.
50. Mamun, A.A., et al., *Amaryllidaceae Alkaloids of Norbelladine-Type as Inspiration for Development of Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Biological Activity Evaluation, and Docking Studies*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(15): p. 8308.
51. Gelderblom, H.R., *Structure and Classification of Viruses*, in *Medical Microbiology*, S. Baron, Editor. 1996, University of Texas Medical Branch at Galveston Copyright © 1996, The University of Texas Medical Branch at Galveston.: Galveston (TX).
52. Wang, D. and A. Farhana, *Biochemistry, RNA Structure*, in *StatPearls*. 2022, StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
53. Patton, J.T., R. Vasquez-Del Carpio, and E. Spencer, *Replication and transcription of the rotavirus genome*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(30): p. 3769-77.

54. Pierson, T.C. and M.S. Diamond, *The continued threat of emerging flaviviruses*. Nat Microbiol, 2020. **5**(6): p. 796-812.
55. Berthoux, L., *The Restrictome of Flaviviruses*. Virol Sin, 2020. **35**(4): p. 363-377.
56. Bollati, M., et al., *Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design*. Antiviral Res, 2010. **87**(2): p. 125-48.
57. Furuichi, Y., *Discovery of m(7)G-cap in eukaryotic mRNAs*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2015. **91**(8): p. 394-409.
58. De Falco, L., et al., *The Pseudo-Circular Genomes of Flaviviruses: Structures, Mechanisms, and Functions of Circularization*. Cells, 2021. **10**(3): p. 642.
59. Shahid, I., *RNA Association, RNA Interference, and microRNA Pathways in Dengue Fever Virus-Host Interaction*, in *Current Topics in Tropical Emerging Diseases and Travel Medicine*, A.J. Rodriguez-Morales, Editor. 2018, IntechOpen. p. 80334.
60. Tan, B.H., et al., *Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in Escherichia coli exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity*. Virology, 1996. **216**(2): p. 317-25.
61. Koonin, E.V., *Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 4): p. 733-40.
62. Wengler, G., et al., *In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 4): p. 851-8.
63. Warrenner, P., J.K. Tamura, and M.S. Collett, *RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria*. J Virol, 1993. **67**(2): p. 989-996.
64. Oliveira, L.G. and J.P.S. Peron, *Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers*. J Leukoc Biol, 2019. **106**(3): p. 695-701.
65. Chen, Y., et al., *Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 866-871.
66. Germi, R., et al., *Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus*. Virology, 2002. **292**(1): p. 162-8.
67. Lee, J.W.-M., J.J.-H. Chu, and M.-L. Ng, *Quantifying the specific binding between West Nile virus envelope domain III protein and the cellular receptor alphaVbeta3 integrin*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1352-1360.

68. Kroschewski, H., et al., *Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus*. *Virology*, 2003. **308**(1): p. 92-100.
69. Chu, J.J.H. and M.L. Ng, *Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway*. *J Virol*, 2004. **78**(19): p. 10543-55.
70. Paul, D. and R. Bartenschlager, *Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories*. *World J Virol*, 2013. **2**(2): p. 32-48.
71. Freppel, W., M. Roy, and L. Chatel-Chaix, *Flaviviridae and mitochondria: Everything you always wanted to know about their relationship but were afraid to ask*. *Virologie (Montrouge)*, 2022. **25**(5): p. 245-262.
72. Welsch, S., et al., *Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites*. *Cell Host Microbe*, 2009. **5**(4): p. 365-375.
73. Gillespie, L.K., et al., *The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex*. *J Virol*, 2010. **84**(20): p. 10438-47.
74. Cortese, M., et al., *Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories*. *Cell Rep*, 2017. **18**(9): p. 2113-2123.
75. You, S. and R. Padmanabhan, *A novel in vitro replication system for Dengue virus: initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'-and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(47): p. 33714-33722.
76. Mazeaud, C., W. Freppel, and L. Chatel-Chaix, *The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis*. *Front Genet*, 2018. **9**: p. 595.
77. Khromykh, A.A., A.N. Varnavski, and E.G. Westaway, *Encapsidation of the flavivirus kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans*. *J Virol*, 1998. **72**(7): p. 5967-77.
78. Kuhn, R.J., et al., *Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion*. *Cell*, 2002. **108**(5): p. 717-725.
79. Lorenz, I.C., et al., *Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum*. *J Virol*, 2002. **76**(11): p. 5480-5491.
80. Yu, I.M., et al., *Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation*. *Science*, 2008. **319**(5871): p. 1834-1837.
81. Li, L., et al., *The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation*. *Science*, 2008. **319**(5871): p. 1830-1834.

82. Stadler, K., et al., *Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8475-81.
83. Duri, Z.J., J.P. Scovill, and J.W. Huggins, *Activity of a methanolic extract of Zimbabwean *Crinum macowanii* against exotic RNA viruses in vitro*. Phytother Res, 1994. **8**(2): p. 121-122.
84. Ka, S., et al., *Biological Investigation of Amaryllidaceae Alkaloid Extracts from the Bulbs of *Pancreatium trianthum* Collected in the Senegalese Flora*. Molecules, 2021. **26**: p. 7382.
85. Nair, J.J., et al., *Alkaloids from *Crinum macowanii**. Phytochemistry, 2000. **54**(8): p. 945-50.
86. Elgorashi, E.E., S.E. Drewes, and J. Van Staden, *Organ-to-organ and seasonal variation in alkaloids from *Crinum macowanii**. Fitoterapia, 2002. **73**(6): p. 490-5.
87. Revu, O., et al., *Total Synthesis of the Natural Product (+)-trans-Dihydronarciclasine via an Asymmetric Organocatalytic [3+3]-Cycloaddition and discovery of its potent anti-Zika Virus (ZIKV) Activity*. ChemistrySelect, 2016. **1**(18): p. 5895-5899.
88. Sheahan, T.P., et al., *An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice*. Sci Transl Med, 2020. **12**(541).
89. Robinson, B.S., et al., *BMS-232632, a highly potent human immunodeficiency virus protease inhibitor that can be used in combination with other available antiretroviral agents*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(8): p. 2093-9.
90. Jin, Y.-H., et al., *Lycorine, a non-nucleoside RNA dependent RNA polymerase inhibitor, as potential treatment for emerging coronavirus infections*. Phytomedicine, 2021. **86**: p. 153440.
91. D'Aiuto, L., et al., *R430: A potent inhibitor of DNA and RNA viruses*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 16662.
92. Zou, G., et al., *A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor*. Virology, 2009. **384**(1): p. 242-52.
93. Flint, M., et al., *Inhibitors of the tick-borne, hemorrhagic fever-associated flaviviruses*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(6): p. 3206-16.
94. Lv, X., et al., *Antiviral and virucidal activities of lycorine on duck tembusu virus in vitro by blocking viral internalization and entry*. Poult Sci, 2021. **100**(10): p. 101404.

95. Chatel-Chaix, L., et al., *A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication*. J Virol, 2015. **89**(14): p. 7170-86.
96. Nagy, P.D. and J. Pogany, *The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(2): p. 137-149.
97. Chatel-Chaix, L. and R. Bartenschlager, *Dengue Virus- and Hepatitis C Virus-Induced Replication and Assembly Compartments: the Enemy Inside*; Caught in the Web. J Virol, 2014. **88**(11): p. 5907-5911.
98. Neufeldt, C.J., et al., *Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family*. Nat Rev Microbiol, 2018. **16**(3): p. 125-142.
99. Masi, M., et al., *Cytotoxicity and Antiviral Properties of Alkaloids Isolated from *Pancreatium maritimum**. Toxins, 2022. **14**(4): p. 262.
100. *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(3): p. 203-222.
101. Chiu, I.M., et al., *Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses*. Nature, 1985. **317**(6035): p. 366-8.
102. Naif, H.M., *Pathogenesis of HIV Infection*. Infect Dis Rep, 2013. **5**(Suppl 1): p. e6.
103. Wain-Hobson, S., et al., *Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV*. Cell, 1985. **40**(1): p. 9-17.
104. Böhnlein, E., et al., *The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV*. Cell, 1988. **53**(5): p. 827-36.
105. Brasseur, R., et al., *Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1988. **4**(2): p. 83-90.
106. Rice, A.P. and M.B. Mathews, *Transcriptional but not translational regulation of HIV-1 by the tat gene product*. Nature, 1988. **332**(6164): p. 551-3.
107. Cohen, M.S., et al., *The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1244-1254.
108. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-877.
109. Sumner, R.P., et al., *Disrupting HIV-1 capsid formation causes cGAS sensing of viral DNA*. EMBO J, 2020. **39**(20): p. e103958.

110. Burdick, R.C., et al., *HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(10): p. 5486-5493.
111. Li, C., et al., *HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(10): p. e2019467118.
112. Zila, V., et al., *Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores*. Cell, 2021. **184**(4): p. 1032-1046 e18.
113. Müller, T.G., et al., *HIV-1 uncoating by release of viral cDNA from capsid-like structures in the nucleus of infected cells*. Elife, 2021. **10**: p. e64776.
114. Jacks, T., et al., *Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region*. Cell, 1988. **55**(3): p. 447-58.
115. Mardon, G. and H.E. Varmus, *Frameshift and intragenic suppressor mutations in a Rous sarcoma provirus suggest src encodes two proteins*. Cell, 1983. **32**(3): p. 871-9.
116. Shehu-Xhilaga, M., S.M. Crowe, and J. Mak, *Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity*. J Virol, 2001. **75**(4): p. 1834-41.
117. Sundquist, W.I. and H.G. Krausslich, *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8): p. a006924.
118. Rein, A., *RNA Packaging in HIV*. Trends Microbiol, 2019. **27**(8): p. 715-723.
119. Freed, E.O., *HIV-1 assembly, release and maturation*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(8): p. 484-96.
120. Pornillos, O., B.K. Ganser-Pornillos, and M. Yeager, *Atomic-level modelling of the HIV capsid*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 424-7.
121. Ramdas, P., et al., *From Entry to Egress: Strategic Exploitation of the Cellular Processes by HIV-1*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 559792.
122. Min, B.S., et al., *Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities*. Phytother Res, 2001. **15**(6): p. 481-6.
123. Ali, H., et al., *Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity*. J Ethnopharmacol, 2002. **83**(3): p. 219-28.
124. Shawky, E., *In-silico profiling of the biological activities of Amaryllidaceae alkaloids*. J Pharm Pharmacol, 2017. **69**(11): p. 1592-1605.
125. Lin, L.-Z., et al., *Lycorine alkaloids from Hymenocallis littoralis*. Phytochemistry, 1995. **40**(4): p. 1295-1298.

126. Painsil, E. and Y.-C. Cheng, *Antiviral Agents*, in *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, M. Schaechter, Editor. 2009, Academic Press: Oxford. p. 223-257.
127. Peng, X., et al., *Deep sequencing of HIV-infected cells: insights into nascent transcription and host-directed therapy*. J Virol, 2014. **88**(16): p. 8768-82.
128. Tan, S., et al., *Front Cover: The Inhibition of RNA Viruses by Amaryllidaceae Alkaloids: Opportunities for the Development of Broad-Spectrum Anti-Coronavirus Drugs (Chem. Asian J. 4/2022)*. Chem Asian J, 2022. **17**(4): p. e202200011.
129. Cao, H., et al., *Methylation of genistein and kaempferol improves their affinities for proteins*. Int J Food Sci Nutr, 2013. **64**(4): p. 437-43.
130. Kodama, O., et al., *Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves*. Phytochemistry, 1992. **31**(11): p. 3807-3809.
131. Han, S.-Y., et al., *Synthesis and biological activity of galanthamine derivatives as acetylcholinesterase (AChE) inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 1991. **1**(11): p. 579-580.
132. Heinrich, M. and H. Lee Teoh, *Galanthamine from snowdrop--the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge*. J Ethnopharmacol, 2004. **92**(2-3): p. 147-62.
133. Hussain, T., et al., *Dengue: pathogenesis, prevention and treatment – A mini review*. Adv Life Sci, 2015. **2**: p. 110-114.
134. Bäck, A.T. and A. Lundkvist, *Dengue viruses - an overview*. Infect Ecol Epidemiol, 2013. **3**(1): p. iee.v3i0.19839.
135. de Castro Barbosa, E., et al., *Searching for plant-derived antivirals against dengue virus and Zika virus*. Virol J, 2022. **19**(1): p. 31.
136. Watt, J.M. and M.G. Breyer-Brandwijk, *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern Africa: Being an Account of their Medicinal Uses, Chemical Composition, Pharmacological Effects and Toxicology in Man and Animal*. Nature, 1933. **2**.
137. Anne Hutchings, A.C., *Zulu medicinal plants: An inventory*. 1996, Pietermaritzburg, South Africa: University of Natal press.
138. Nair, J.J., et al., *Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: a review*. Nat Prod Commun, 2013. **8**(9): p. 1335-1350.
139. Bisset, N.G., *Arrow and dart poisons*. Ethnopharmacol, 1989. **25**(1): p. 1-41.

140. De Smet, P.A., *Some ethnopharmacological notes on African hallucinogens*. J Ethnopharmacol, 1996. **50**(3): p. 141-146.
141. Botha, E., et al., *Effect of Boophone disticha on human neutrophils*. J Ethnopharmacol, 2005. **96**(3): p. 385-388.
142. Gadaga, L.L., et al., *Acute oral toxicity and neurobehavioural toxicological effects of hydroethanolic extract of Boophone disticha in rats*. Hum Exp Toxicol, 2011. **30**(8): p. 972-980.
143. Omoruyi, S.I., et al., *Cytotoxic activities of selected plants of the family Amaryllidaceae on brain tumour cell lines*. S Afr J Bot, 2021. **136**: p. 118-125.
144. Bastida, J., R. Lavilla, and F. Viladomat, *Chemical and biological aspects of Narcissus alkaloids*. Alkaloids Chem Biol, 2006. **63**: p. 87-179.
145. De Leo, P., et al., *Inhibitory effect of lycorine on cell division and cell elongation*. Plant and Cell Physiology, 1973. **14**(3): p. 481-486.
146. Likhitwitayawuid, K., et al., *Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of Crinum amabile*. J Nat Prod, 1993. **56**(8): p. 1331-1338.
147. Liu, J., et al., *Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis*. FEBS Lett, 2004. **578**(3): p. 245-250.
148. Liu, J., et al., *Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells*. Biomed Pharmacother, 2007. **61**(4): p. 229-234.
149. Li, Y., et al., *Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest*. Oncol Rep, 2007. **17**(2): p. 377-384.
150. McNulty, J., et al., *Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells*. Phytochemistry, 2009. **70**(7): p. 913-919.
151. Chanput, W., J.J. Mes, and H.J. Wichers, *THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach*. Int Immunopharmacol, 2014. **23**(1): p. 37-45.
152. ACCEGEN. *Huh-7: Origins and Research Value*. 13 avril 2021; Available from: <https://www.accegen.com/recent-posts/huh-7-origins-and-research-value/>
153. Liu, J., et al., *Lycorine Inhibits the Proliferation of HL-60 Cell Line through Up-Regulation of p21*. Blood, 2007. **110**(11): p. 4178-4178.
154. Liu, X.S., et al., *Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells*. Cancer Lett, 2009. **274**(1): p. 16-24.
155. Nguyen, B.Y., et al., *Raltegravir: the first HIV-1 integrase strand transfer inhibitor in the HIV armamentarium*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1222**: p. 83-9.

156. Han, E.J., et al., *5-Bromo-3,4-dihydroxybenzaldehyde from Polysiphonia morrowii attenuate IgE/BSA-stimulated mast cell activation and passive cutaneous anaphylaxis in mice*. *Biochem Pharmacol*, 2020. **178**: p. 114087.
157. Kim, E.A., et al., *Anti-Allergic Effect of 3,4-Dihydroxybenzaldehyde Isolated from Polysiphonia morrowii in IgE/BSA-Stimulated Mast Cells and a Passive Cutaneous Anaphylaxis Mouse Model*. *Mar Drugs*, 2022. **20**(2).
158. Xiaohe, Z., et al., *Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of N-aryl-2-arylthioacetamides as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors*. *Chem Biol Drug Des*, 2010. **76**(4): p. 330-9.
159. Arhel, N. and F. Kirchhoff, *Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1802**(3): p. 313-21.
160. Mazzucco, M.B., et al., *Antiviral activity of an N-allyl acridone against dengue virus*. *J Biomed Sci*, 2015. **22**(1): p. 29.
161. Fraser, J.E., et al., *A nuclear transport inhibitor that modulates the unfolded protein response and provides in vivo protection against lethal dengue virus infection*. *J Infect Dis*, 2014. **210**(11): p. 1780-91.
162. Yu, J.S., et al., *Celastrol inhibits dengue virus replication via up-regulating type I interferon and downstream interferon-stimulated responses*. *Antiviral Res*, 2017. **137**: p. 49-57.
163. Carocci, M. and P.L. Yang, *Lactimidomycin is a broad-spectrum inhibitor of dengue and other RNA viruses*. *Antiviral Research*, 2016. **128**: p. 57-62.
164. Kouretova, J., et al., *Effects of NS2B-NS3 protease and furin inhibition on West Nile and Dengue virus replication*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017. **32**(1): p. 712-721.
165. Pryor, M.J., et al., *Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection*. *Traffic*, 2007. **8**(7): p. 795-807.
166. Miao, M., E. De Clercq, and G. Li, *Clinical significance of chemokine receptor antagonists*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2020. **16**(1): p. 11-30.
167. Li, P.C., et al., *Small Molecules Targeting the Flavivirus E Protein with Broad-Spectrum Activity and Antiviral Efficacy in Vivo*. *ACS Infect Dis*, 2019. **5**(3): p. 460-472.
168. Yang, C.C., et al., *Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(1): p. 229-38.

169. Tian, Y.S., et al., *Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2018. **66**(3): p. 191-206.
170. Lim, S.P., et al., *Potent Allosteric Dengue Virus NS5 Polymerase Inhibitors: Mechanism of Action and Resistance Profiling*. PLoS Pathog, 2016. **12**(8): p. e1005737.
171. HIVinfo.NIH.gov. *FDA-Approved HIV Medicines*. 27 avril 2022; Available from: <https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/fda-approved-hiv-medicines>
172. El Safadi, Y., V. Vivet-Boudou, and R. Marquet, *HIV-1 reverse transcriptase inhibitors*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **75**(4): p. 723-37.
173. Ren, J., et al., *High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(4): p. 293-302.
174. Esnouf, R.M., et al., *Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3984-9.
175. Ren, J., et al., *Structural basis for the resilience of efavirenz (DMP-266) to drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase*. Structure, 2000. **8**(10): p. 1089-94.
176. Mitsuya, H., et al., *3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(20): p. 7096-100.
177. Narayanan, A., et al., *Identification of SARS-CoV-2 inhibitors targeting Mpro and PLpro using in-cell-protease assay*. Commun Biol, 2022. **5**(1): p. 169.
178. Shen, L., et al., *High-Throughput Screening and Identification of Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Coronaviruses*. J Virol, 2019. **93**(12): p. e00023-19.
179. He, J., et al., *Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1*. Influenza Other Respir Viruses, 2013. **7**(6): p. 922-31.
180. Fielding, B.C., et al., *Alkaloids: Therapeutic Potential against Human Coronaviruses*. Molecules, 2020. **25**(23).
181. Alrasheid, A.A., M.Y. Babiker, and T.A. Awad, *Evaluation of certain medicinal plants compounds as new potential inhibitors of novel corona virus (COVID-19) using molecular docking analysis*. In Silico Pharmacol, 2021. **9**(1): p. 10.

182. Kumar, N., et al., *Phytoconstituents from ten natural herbs as potent inhibitors of main protease enzyme of SARS-COV-2: In silico study*. Phytomed Plus, 2021. **1**(4): p. 100083.
183. Yang, L., et al., *Tandem mass tag-based quantitative proteomic analysis of lycorine treatment in highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection*. PeerJ, 2019. **7**: p. e7697.
184. Ieven, M., D.A. van den Berghe, and A.J. Vlietinck, *Plant antiviral agents. IV. Influence of lycorine on growth pattern of three animal viruses*. Planta Med, 1983. **49**(2): p. 109-14.
185. Dioso-Toro, M., et al., *Tomatidine, a novel antiviral compound towards dengue virus*. Antiviral Res, 2019. **161**: p. 90-99.
186. Troost-Kind, B., et al., *Tomatidine reduces Chikungunya virus progeny release by controlling viral protein expression*. PLoS Negl Trop Dis, 2021. **15**(11): p. e0009916.
187. Chaves Valadão, A.L., et al., *Natural Plant Alkaloid (Emetine) Inhibits HIV-1 Replication by Interfering with Reverse Transcriptase Activity*. Molecules 2015. **20**(6): p. 11474-11489.
188. Grollman, A.P., *Structural basis for inhibition of protein synthesis by emetine and cycloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **56**(6): p. 1867-1874.
189. Wong, W., et al., *Cryo-EM structure of the Plasmodium falciparum 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine*. Elife, 2014. **3**: p. e03080.
190. De Clercq, E. and G. Li, *Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years*. Clin Microbiol Rev, 2016. **29**(3): p. 695-747.
191. Adamson, C.S., et al., *Antiviral drug discovery: preparing for the next pandemic*. Chem Soc Rev, 2021. **50**(6): p. 3647-3655.
192. Lingappa, J.R., V.R. Lingappa, and J.C. Reed, *Addressing Antiretroviral Drug Resistance with Host-Targeting Drugs-First Steps towards Developing a Host-Targeting HIV-1 Assembly Inhibitor*. Viruses, 2021. **13**(3).
193. He, J., et al., *CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 645-9.
194. Hare, D., et al., *The Importance of Physiologically Relevant Cell Lines for Studying Virus-Host Interactions*. Viruses, 2016. **8**(11).
195. McFadden, G., et al., *Cytokine determinants of viral tropism*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(9): p. 645-55.

196. Takaoka, A., et al., *Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 516-23.
197. Fridman, A.L., et al., *Expression profiling identifies three pathways altered in cellular immortalization: interferon, cell cycle, and cytoskeleton*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. **61**(9): p. 879-89.
198. Kulaeva, O.I., et al., *Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization*. Oncogene, 2003. **22**(26): p. 4118-27.
199. Munoz-Fontela, C., et al., *Resistance to viral infection of super p53 mice*. Oncogene, 2005. **24**(18): p. 3059-62.
200. Ma-Lauer, Y., et al., *p53 down-regulates SARS coronavirus replication and is targeted by the SARS-unique domain and PLpro via E3 ubiquitin ligase RCHY1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(35): p. E5192-201.
201. Hutcheson, J., A.K. Witkiewicz, and E.S. Knudsen, *The RB tumor suppressor at the intersection of proliferation and immunity: relevance to disease immune evasion and immunotherapy*. Cell Cycle, 2015. **14**(24): p. 3812-9.
202. Taura, M., et al., *Rb/E2F1 regulates the innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(8): p. 1581-90.
203. Garcia, M.A., et al., *Activation of NF-kB pathway by virus infection requires Rb expression*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6422.
204. Lin, Y.L., et al., *Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus*. J Med Virol, 2000. **60**(4): p. 425-31.
205. Zeisel, M.B. and T.F. Baumert, *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture: a breakthrough for basic and applied research*. J Hepatol, 2006. **44**(2): p. 436-9.
206. Zhong, J., et al., *Robust hepatitis C virus infection in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9294-9.
207. Lindenbach, B.D., et al., *Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture*. Science, 2005. **309**(5734): p. 623-626.
208. Yoo, B.J., et al., *Transfection of a differentiated human hepatoma cell line (Huh7) with in vitro-transcribed hepatitis C virus (HCV) RNA and establishment of a long-term culture persistently infected with HCV*. J Virol, 1995. **69**(1): p. 32-8.
209. Bressac, B., et al., *Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(5): p. 1973-7.

210. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. International Journal of Cancer, 1980. **26**(2): p. 171-176.
211. Chao, T.L., et al., *Anti-Cancerous Effect of Inonotus taiwanensis Polysaccharide Extract on Human Acute Monocytic Leukemia Cells through ROS-Independent Intrinsic Mitochondrial Pathway*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(2).
212. Auwerx, J., *The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation*. Experientia, 1991. **47**(1): p. 22-31.
213. Shattock, R.J., J.S. Friedland, and G.E. Griffin, *Release of human immunodeficiency virus by THP-1 cells and human macrophages is regulated by cellular adherence and activation*. J Virol, 1993. **67**(6): p. 3569-75.
214. Ikeda, T., et al., *HIV-1 restriction by endogenous APOBEC3G in the myeloid cell line THP-1*. J Gen Virol, 2019. **100**(7): p. 1140-1152.
215. Schildberger, A., et al., *Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 697972.
216. Chen, Y.-L., et al., *Activation of peripheral blood mononuclear cells by dengue virus infection depotentiates balapiravir*. Journal of virology, 2014. **88**(3): p. 1740-1747.
217. Dispinseri, S., et al., *HIV-1 isolation from infected peripheral blood mononuclear cells*. Methods Mol Biol, 2014. **1087**: p. 187-96.
218. Knipe, D.M., *Nuclear sensing of viral DNA, epigenetic regulation of herpes simplex virus infection, and innate immunity*. Virology, 2015. **479-480**: p. 153-9.
219. Gu, H. and Y. Zheng, *Role of ND10 nuclear bodies in the chromatin repression of HSV-1*. Virol J, 2016. **13**: p. 62.
220. Dusinska, M., et al., *Chapter 3 - Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo*, in *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials (Second Edition)*, B. Fadeel, A. Pietroiusti, and A.A. Shvedova, Editors. 2017, Academic Press. p. 51-82.
221. Parboosing, R., et al., *Cell-based Assays for Assessing Toxicity: A Basic Guide*. Med Chem, 2016. **13**(1): p. 13-21.
222. L'Azou, B., et al., *In vitro effects of nanoparticles on renal cells*. Part Fibre Toxicol, 2008. **5**: p. 22.
223. He, J., et al., *Amaryllidaceae Alkaloids Exhibit Anti-Influenza Activity in MDCK Cells, an Investigation of Amaryllidaceae Alkaloids and MDCK Cells Insight*. J Anim Vet Adv, 2012. **11**: p. 2485-2492.

224. WHO. *Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)*. Available from: https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome#tab=tab_1
225. WHO. *Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)*. 5 août 2022; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov))
226. Baden, L.R., et al., *Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine*. N Engl J Med, 2021. **384**(5): p. 403-416.
227. Sadoff, J., et al., *Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19*. N Engl J Med, 2021. **384**(23): p. 2187-2201.
228. Polack, F.P., et al., *Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine*. N Engl J Med, 2020. **383**(27): p. 2603-2615.
229. Takashita, E., et al., *Efficacy of Antibodies and Antiviral Drugs against Covid-19 Omicron Variant*. N Engl J Med, 2022. **386**(10): p. 995-998.
230. WHO. *Chikungunya*. 15 septembre 2020; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
231. Vairo, F., et al., *Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention*. Infect Dis Clin North Am, 2019. **33**(4): p. 1003-1025.
232. Bragina, M.E., et al., *The SwissSimilarity 2021 Web Tool: Novel Chemical Libraries and Additional Methods for an Enhanced Ligand-Based Virtual Screening Experience*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(2).
233. Gfeller, D., et al., *SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Web Server issue): p. W32-8.
234. Gong, J., et al., *ChemMapper: a versatile web server for exploring pharmacology and chemical structure association based on molecular 3D similarity method*. Bioinformatics, 2013. **29**(14): p. 1827-9.
235. Wang, X., et al., *PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(W1): p. W356-w360.
236. Daina, A., O. Michielin, and V. Zoete, *SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42717.
237. Pauwels, R., et al., *Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives*. Nature, 1990. **343**(6257): p. 470-4.

238. Daelemans, D., et al., *A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds*. Nat Protoc, 2011. **6**(6): p. 925-33.
239. Fernandez-Larsson, R., et al., *Replication of patient isolates of human immunodeficiency virus type 1 in T cells: a spectrum of rates and efficiencies of entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2223-6.
240. Srivastava, K.K., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 NL4-3 replication in four T-cell lines: rate and efficiency of entry, a major determinant of permissiveness*. J Virol, 1991. **65**(7): p. 3900-2.
241. Platt, E.J., J.P. Durnin, and D. Kabat, *Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4347-56.
242. Reeves, J.D., et al., *Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16249-54.
243. Perez-Caballero, D., et al., *Restriction of human immunodeficiency virus type 1 by TRIM-CypA occurs with rapid kinetics and independently of cytoplasmic bodies, ubiquitin, and proteasome activity*. J Virol, 2005. **79**(24): p. 15567-72.
244. Goc, A., et al., *Linoleic acid binds to SARS-CoV-2 RdRp and represses replication of seasonal human coronavirus OC43*. Scientific Reports, 2022. **12**(1): p. 19114.
245. Begum, F., et al., *Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans*. Viruses, 2019. **11**(12): p. 1136.
246. Limonta, D., et al., *Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome*. J Clin Virol, 2007. **40**(1): p. 50-54.
247. Hoffmann, C., *The epidemiology of HIV coreceptor tropism*. Eur J Med Res, 2007. **12**(9): p. 385-90.
248. Nair, J.J. and J. van Staden, *Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae*. Nat Prod Commun, 2014. **9**(8): p. 1193-210.
249. Nguyen, B.Y., et al., *Raltegravir: the first HIV-1 integrase strand transfer inhibitor in the HIV armamentarium*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1222**: p. 83-89.

ANNEXE A

MÉTHODOLOGIE

Lignées cellulaires

Différents types de cellules ont été choisis pour chaque expérience, en fonction de leurs caractéristiques uniques. Afin de mesurer le potentiel antiviral des alcaloïdes contre le DENV, nous avons utilisé des cellules hépatocytaires de type épithélial dérivées d'un carcinome du foie, nommées Huh7, puisque le DENV s'attaque principalement aux cellules de types hépatocytaires en causant l'apoptose de celles-ci [245, 246]. Les cellules Huh7 ont gentiment été partagées par Hugo Soudeyns (Université de Montréal, Canada). Ensuite, pour mesurer le potentiel antiviral des alcaloïdes contre le virus VIH-1, nous avons utilisé des cellules monocytaires dérivées de leucémie aiguë, nommées THP-1, puisque celles-ci peuvent se différencier en macrophages, et que les macrophages font partie des principales cellules ciblées par le virus [247]. Nous avons donc effectué les tests de cytotoxicité sur ces deux types de lignées cellulaires, les Huh7 et les THP-1. Les cellules monocytiques humaines THP-1 ont été obtenues par l'entremise du Dr Lionel Berthoux (Université du Québec à Trois-Rivières, Canada). Les cellules Huh7 ont été maintenues dans du milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) supplémenté avec 10 % de FBS et 1 % de solution pénicilline/streptomycine (all from Wisent, Inc., Canada). Les cellules THP-1 ont été maintenues dans du milieu RPMI supplémenté avec 10 % de FBS et 1 % de solution pénicilline-streptomycine (all from Wisent, Inc., Canada). Toutes les lignées cellulaires ont été conservées dans un incubateur à 37 °C et 5 % CO₂.

Évaluation de la cytotoxicité de la norbelladine et ses dérivés

Des tests de cytotoxicité de la norbelladine et ses dérivés ont été effectués sur les cellules Huh7 et THP-1 par dosage de l'ATP en utilisant le « Cell-Titer GLO assay kit » (Promega, Madison, WI, USA). Brièvement, $7,5 \times 10^3$ cellules de type Huh7/puits ou 2×10^4 cellules de type THP-1/puits ont été déposées dans des plaques noires de 96 puits et incubées à 37°C pour 24 heures (Figure 1.8). Le lendemain, la norbelladine et ses dérivés, du DMSO et de la lycorine ont été dilués en série par un facteur de 2 dans du milieu DMEM (pour les Huh7) ou du milieu RPMI (pour les THP-1) à température pièce. Chaque dilution a été ajoutée aux plaques de cellules afin d'obtenir des concentrations finales de $1.56 \mu\text{M}$ à $200 \mu\text{M}$ pour les alcaloïdes et le DMSO, et de $0.39 \mu\text{M}$ à $50 \mu\text{M}$ pour la lycorine. Le DMSO sert ici de contrôle négatif, et puisque les alcaloïdes y sont dissouts, permet aussi de démontrer qu'il n'est pas cytotoxique aux concentrations utilisées. La lycorine sert ici de contrôle positif puisque son effet cytotoxique aux concentrations utilisées a déjà été démontré [248]. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C et 5 % CO_2 pendant 72 heures (Figure 1.8). 72 heures plus tard, le « Cell-Titer GLO reagent » a été ajouté aux plaques préalablement équilibrées à température pièce. Les plaques ont ensuite été mixées sur un « orbital shaker » pour 2 minutes et incubées 10 minutes à température pièce. Le signal de luminescence a été mesuré avec un spectrophotomètre à microplaque. Les pourcentages de viabilité ont été obtenus en calculant le ratio du signal de chaque concentration d'alcaloïdes par rapport au signal de concentrations équivalentes de DMSO. Toutes les expériences ont été effectuées deux fois et les données ont été compilées sous forme de moyennes. Les CC_{50} ont été calculées en utilisant le logiciel QuestGraph IC50 calculator (MLA Quest Graph™ IC50 Calculator, AAT Bioquest, Inc).

Vecteurs viraux

Afin d'investiguer l'effet antiviral de la norbelladine et ses dérivés, nous avons utilisé un vecteur propagatif du virus de la dengue (DENV_{GFP}) et un vecteur non-propagatif du virus de l'immunodéficience humaine (VIH)-1 pseudotypés avec

VSV-G (HIV-1_{GFP}), tous deux codant pour la GFP. Le plasmide utilisé pour obtenir le vecteur DENV_{GFP} (pFK-DV_S-G2A) a été fourni par Ralf Bartenschlager (Heidelberg University, Germany). Les 2 plasmides utilisés pour obtenir le vecteur HIV-1_{GFP} (PMD2.G et pNL4-3-GFP Δ Env Δ Nef) ont été fournis par Lionel Berthoux (Université du Québec à Trois-Rivières, Canada). Pour DENV_{GFP}, le titre viral a été mesuré par plaque de lyse dans des cellules Vero, comme décrit par [16]. Pour HIV-1_{GFP}, le titre viral a été obtenu en mesurant l'infectivité du vecteur dilué en série dans des cellules CRFK, comme décrit par [16].

Évaluation de l'activité antivirale de la norbelladine et ses dérivés contre les virus DENV et VIH-1

Succinctement, 7.5×10^3 cellules de type Huh7/puits ou 2×10^4 cellules de type THP-1/puits ont été déposées dans des plaques de 96 puits à 37 °C pour 24 heures. Le lendemain, la norbelladine et ses dérivés, du DMSO et de la lycorine (Huh7) ou du raltegravir (THP-1) ont été dilués en série par un facteur de 2 dans du milieu DMEM ou RPMI. Chaque dilution a été ajoutée aux plaques de cellules afin d'obtenir des concentrations finales de 1.56 μ M à 200 μ M pour les alcaloïdes et le DMSO, et de 0.05 μ M à 6.4 μ M pour la lycorine ou 0.078 μ M à 10 μ M pour le raltegravir. Le DMSO a été utilisé en tant que contrôle négatif, et puisqu'il sert de solvant pour les alcaloïdes étudiés, nous avons aussi vérifié que celui-ci n'avait pas d'effet sur les virus. La lycorine a été utilisée en tant que contrôle positif pour les infections par DENV, et le raltegravir pour les infections par VIH-1, car il est démontré que ces composés inhibent ces virus [248, 249]. DENV_{GFP} et HIV-1_{GFP} ont ensuite été ajoutés, respectivement, à une MOI de 0,025 et 0,1. Les plaques ont été déposées dans un incubateur à 37 °C et 5 % CO₂ pendant 72 heures. Ensuite, les cellules ont été fixées au formaldéhyde et le pourcentage d'infection a été mesuré par cytométrie en flux avec un cytomètre FC500 MPL (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). L'analyse des données a été effectuée avec le logiciel Flowjow (BD, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). Toutes les expériences ont été effectuées deux fois. Les EC₅₀ ont été calculés en utilisant le logiciel QuestGraph IC50 calculator (MLA Quest Graph™ IC50 Calculator. AAT Bioquest, Inc).

ANNEXE B

REVUE DE LITTÉRATURE

Le pouvoir antiviral des alcaloïdes de végétaux contre les virus à ARN

Antiviral properties of plant alkaloids against RNA viruses

Marie-Pierre Girard¹, Natacha Merindol¹, Lionel Berthoux^{2,*}, Isabel Desgagné-Penix^{1,*}

¹ Département de Chimie, Biochimie et Physique, Université du Québec à Trois-Rivières

² Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières

* Auteurs de correspondance : Lionel.Berthoux@uqtr.ca; Isabel.Desgagne-Penix@uqtr.ca

Le contenu de cette revue de littérature est écrit sous la forme d'un article scientifique qui a été publié en français dans la revue « Virologie », Vol.6-n°6 Novembre-Décembre 2022.

Contribution des auteurs

Marie-Pierre Girard a effectué la recherche et le tri d'articles scientifiques, la conception et la rédaction de la revue, ainsi que la création des tableaux et des figures. Natacha Mérindol, associée de recherche, a participé à la recherche d'articles ainsi qu'à la rédaction du manuscrit. L'élaboration de la revue, dont la problématique et le choix des sujets abordés ont été déterminés par Isabel Desgagné-Penix (Directrice de maîtrise) et Lionel Berthoux (Codirecteur de maîtrise). La révision du manuscrit a été effectuée par tous les auteurs.

Résumé

Les virus à ARN sont la classe d'agents pathogènes la plus souvent responsable de l'apparition de nouvelles maladies humaines, avec un taux de deux à trois virus nouvellement identifiés annuellement. La récente pandémie de maladie à coronavirus 2019 (Covid-19) souligne l'importance de la découverte de nouveaux agents antiviraux efficaces. Les alcaloïdes sont une classe de molécules organiques hétérocycliques portant un ou plusieurs atomes d'azote et présentant une très grande variété de structure. Plusieurs alcaloïdes de végétaux sont reconnus pour leurs propriétés thérapeutiques étendues. L'objectif de cette revue est de mettre en évidence le potentiel antiviral des alcaloïdes d'*Amaryllidaceae* et autres types de plantes contre plusieurs familles de virus à ARN, tels que les *Flavivirus*, les coronavirus, les *Alphavirus*, les *Alphainfluenzavirus* et aussi contre le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Les différents mécanismes antiviraux de ces composés, prouvés ou proposés, sont abordés. Les alcaloïdes agissent contre les virus en utilisant plusieurs stratégies et ciblent autant les protéines virales que cellulaires. De plus, il est possible d'améliorer leur rendement en modifiant leur structure par synthèse chimique. En somme, ces molécules sont des agents bioactifs offrant une perspective attrayante pour la recherche de nouveaux médicaments antiviraux.

Mots-clés : *Flavivirus*; alcaloïdes; lycorine; *Amaryllidaceae*; VIH-1; coronavirus; *Alphavirus*

Abstract

RNA viruses are the most common class of pathogens responsible for the emergence of new human diseases, with two to three newly identified viruses annually. The recent 2019 coronavirus disease pandemic (Covid-19) underscores the importance of discovering new and effective antiviral agents. Alkaloids are a class of heterocyclic organic molecules bearing one or more nitrogen atoms and exhibiting a wide variety of structures. Several plant alkaloids are known for their extensive therapeutic properties. The objective

of this review is to highlight the antiviral potential of alkaloids from *Amaryllidaceae* and from other types of plants against several families of RNA viruses, such as *Flaviviruses*, coronaviruses, *Alphaviruses*, *Alphainfluenzaviruses* and also against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Alkaloids act against viruses using several strategies and target both viral and cellular proteins. These molecules are bioactive agents that offer attractive prospects in the search for new antiviral drugs.

keywords: *Flavivirus*; *Amaryllidaceae*; alkaloids; lycorine; HIV-1; coronavirus; *Alphavirus*

Introduction

La maladie à coronavirus 2019 (Covid-19) qui sévit actuellement a engendré plus de 612 millions de cas d'infections et 6,5 millions de décès jusqu'à aujourd'hui. Elle est causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2), un *Betacoronavirus* [1]. Bien que plusieurs médicaments aient été approuvés pour contrer les formes sévères de la Covid-19, ils ne permettent pas de freiner la propagation du virus [2]. En plus de paralyser le système hospitalier et de causer d'importants coûts économiques, le SARS-CoV-2 a aussi des répercussions néfastes sur la prise en charge et la prévention d'autres maladies virales [3]. De leur côté, les *Flavivirus* peuvent causer des maladies de degrés de gravité variés, allant d'asymptomatique, de symptômes de type grippaux, à des symptômes sévères voire létaux [4]. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 3,9 milliards de personnes dans 129 pays différents seraient à risque de contracter la dengue, avec 390 millions de cas par année, dont 96 millions sont symptomatiques [5]. L'épidémie due au virus Zika (ZIKV), qui a débuté au Brésil en 2015 causant jusqu'à 1,5 million de cas, s'est répandue dans 34 pays en 2016 [6]. Jusqu'à maintenant, il n'existe aucun traitement contre le ZIKV [7]. Plusieurs vaccins sont à l'étude, mais aucun n'a encore été approuvé [8]. Dans le cas du virus de la dengue (DENV), un puissant inhibiteur viral a récemment été testé chez la souris (JNJ-A07) [9], mais aucun n'est approuvé chez l'humain, et le vaccin tétravalent Dengvaxia n'est recommandé que pour les personnes âgées de 9 à 45 ans ayant déjà contracté la dengue une fois et vivant dans les régions endémiques [5]. En ce qui concerne le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), les estimations indiquent que 38,4 millions de personnes étaient infectées à la fin de l'année 2021 [10]. Les personnes affectées peuvent recevoir un traitement combinant deux médicaments antirétroviraux ou plus (ART), ce qui réduit la charge virale de sorte que le virus est pratiquement indétectable et non transmissible, mais le traitement ne supprime pas l'infection [11]. De plus, seuls 61 % des personnes touchées par cette maladie sont actuellement sous traitement en raison notamment du coût élevé [12]. Il existe donc un besoin évident de découvrir de nouvelles molécules présentant un pouvoir antiviral contre le VIH et plus largement contre les virus à ARN.

Plusieurs molécules d'origine végétale, dont les alcaloïdes, possèdent des propriétés antivirales intéressantes *in vitro*. Les alcaloïdes sont des métabolites spécialisés pouvant être extraits de plusieurs familles de plantes, telles que les *Amaryllidaceae*. Plusieurs études ont mis de l'avant les propriétés antivirales exceptionnelles des alcaloïdes extraits d'*Amaryllidaceae* en particulier, à l'image de la lycorine, qui inhibe un large éventail de virus tel que des *Alphavirus*, des *Flavivirus*, des coronavirus et des rétrovirus [13-18].

L'objectif de cette revue est de présenter les découvertes récentes sur les propriétés antivirales des alcaloïdes d'*Amaryllidaceae* et d'autres familles de plantes. Elle est particulièrement centrée sur les alcaloïdes possédant des propriétés d'inhibition des *Flavivirus*, des *Lentivirus* (le VIH-1) et des *Coronavirus*. Certains d'entre eux ciblent plusieurs familles de virus, alors que d'autres présentent un spectre moins étendu. Les différents mécanismes prouvés ou hypothétiques sont abordés, même si la plupart d'entre eux n'a toujours pas été élucidé.

Les alcaloïdes des *Amaryllidaceae*

Les *Amaryllidaceae* sont une famille de plantes monocotylédones appartenant à l'ordre des *Asparagales* et se retrouvant dans les régions tropicales, subtropicales et chaudes du monde, dont l'Amérique du Sud, le bassin méditerranéen et l'Afrique australe [19]. Elles sont composées de 1100 espèces et 75 genres. Les *Amaryllidaceae* sont utilisées en médecine traditionnelle, mais aussi en tant que plantes ornementales (p. ex. : narcisses, jonquilles) [20]. Depuis des siècles, elles sont reconnues à travers le monde pour leurs propriétés thérapeutiques [19]. L'une des premières preuves de l'utilisation médicinale des *Amaryllidaceae* remonte à 400 ans avant notre ère, lorsque Hippocrate de Kos proposait l'utilisation d'huile de *Narcissus poeticus L.* pour soigner les symptômes de tumeurs utérines [21]. Leur pouvoir médicinal est aujourd'hui reconnu comme étant attribué à la présence de métabolites spécialisés, spécifiquement des alcaloïdes isoquinoliniques, une classe de molécules aux propriétés basiques présentant différentes structures et possédant au moins un atome d'azote présentant un état oxydatif

négatif dans un noyau généralement hétérocyclique [20]. Les *Amaryllidaceae* font partie des quelques 20 % d'espèces végétales pouvant produire des alcaloïdes [22]. Les alcaloïdes ne contribuent pas directement à la croissance de la plante, mais plutôt à sa défense contre les agents pathogènes, les insectes nuisibles et les herbivores [23]. La première publication sur les alcaloïdes d'*Amaryllidaceae* remonte à 1877, décrivant la découverte de la lycorine [24], et depuis, des études ont montré qu'elle présentait un large spectre d'activités biologiques, dont un pouvoir antitumoral, antibactérien, antifongique, antipaludique, antiviral, analgésique ainsi qu'une activité anti-cholinestérase [16, 25-30]. Les *Rubiaceae*, *Fabaceae* et *Lauraceae* sont également parmi les familles de plantes qui produisent des alcaloïdes d'intérêt antiviral dont nous résumerons l'effet dans cette revue.

Biosynthèse des alcaloïdes des *Amaryllidaceae*

Jusqu'à aujourd'hui, plus de 650 alcaloïdes de structures différentes ont été isolés des *Amaryllidaceae* et classifiés en plusieurs groupes basés sur la structure des cycles et leur squelette de carbone [31]. Bien que la classification des alcaloïdes soit différente d'un auteur à l'autre, nous les présentons ici sous la forme de neuf groupes distincts, dont la norbelladine, la cherylline, la galanthamine, la lycorine, la lycorenine, la crinine, la narciclasine, la tazettine, et la montanine en fonction de leur origine biosynthétique (Figure 1) [19, 20]. Malgré leur grande diversité de structure, les alcaloïdes d'*Amaryllidaceae* découlent tous d'un précurseur commun, la norbelladine formée grâce à la condensation de la tyramine et du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (3,4-DHBA) par la norbelladine synthase suivie d'une réduction par la norgrausodine/noroxomariditine réductase (NR) (Figures 1 et 2) [32-34]. La norbelladine peut ensuite subir différents types de réactions biochimiques, menant à la formation des autres alcaloïdes (Figure 2). L'ordre des réactions et les enzymes nécessaires pour obtenir les alcaloïdes de type cherylline ne sont pas encore élucidés, mais impliquent la méthylation, l'hydroxylation, la déshydratation, la cyclisation et la tautomérisation [20]. Les enzymes permettant d'obtenir les autres formes d'alcaloïdes de type norbelladine n'ont pas été découvertes non plus, mais il est probable qu'une *N*-méthyltransférase soit responsable de la formation de la belladine [20]. La norbelladine peut aussi être méthyliée par la norbelladine 4'-*O*-

méthyltransférase (N4OMT) afin d'obtenir la 4'-*O*-méthylnorbelladine (Figure 2) [35]. À partir de la 4'-*O*-méthylnorbelladine, il peut y avoir cyclisation selon trois différents couplages phénol-phénol', menant à la formation des autres types d'alcaloïdes (Figure 2) [20, 36]. Le couplage para-ortho' est associé aux alcaloïdes de type galanthamine, ortho-para' aux alcaloïdes de type lycorine et lycorenine, et para-para' aux alcaloïdes de type crinine, narciclasine, tazettine et montanine (Figure 2). Ces couplages phénol-phénol' sont potentiellement catalysés par les enzymes du cytochrome P450 (p. ex. : CYP96T1), les laccases ou des peroxydases [37].

Flavivirus

Les *Flavivirus* sont des arbovirus enveloppés transmis par l'intermédiaire de moustiques ou de tiques, selon le virus [4]. Ils font partie de la famille des *Flaviviridae* et comprennent plus de 70 virus, dont près de la moitié sont capables d'infecter l'humain tels que le DENV, le ZIKV, le virus de la fièvre jaune (*yellow fever virus*, YFV), le virus du Nil occidental (*west Nile virus*, WNV), le virus de l'encéphalite japonaise (*Japanese encephalitis virus*, JEV) et le virus de la méningoencéphalite à tiques (*tick-borne encephalitis virus*, TBEV), qui sont les plus connus [4]. Dans le cas du DENV, quatre sérotypes différents, DENV 1-4, peuvent infecter et réinfecter les hôtes et mener à la dengue sévère [38].

Les *Flavivirus* présentent un génome ARN de polarité positive de 10 à 11 kilobases. Les virions ont une taille d'environ 50 nanomètres et ne contiennent qu'une seule copie d'ARN [4]. Le génome ne contient qu'un seul cadre de lecture ouvert (ORF – *open reading frame*) [39], qui code pour dix protéines, incluant trois protéines structurales, soit la protéine d'enveloppe (E), la protéine pré-membranaire (prM) et la protéine de capsid (C), et sept protéines non-structurales (NS), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 [38]. D'intérêt particulier en tant que cibles thérapeutiques, NS5 porte un domaine de polymérase de l'ARN dépendante de l'ARN (RdRp) et un domaine méthyltransférase essentiel à la répllication et la traduction de l'ARN viral [40-42], alors que NS3 porte des domaines sérine protéase (en complexe avec NS2B), hélicase d'ARN et nucléoside-

triphosphatase (NTPase) essentiels pour cliver la polyprotéine virale précurseur, mais aussi pour la réplication de l'ARN et la formation de la coiffe [40, 43, 44]. Les *Flavivirus* pénètrent dans différents types de cellules par endocytose activée après liaison de leurs protéines E à des facteurs d'attachement de carbohydrates liés à l'asparagine sur des récepteurs de type intégrine, phosphatidyl-sérine, ou tyrosine kinase [45]. La protéine E permet la fusion de la membrane virale avec la membrane endosomale, libérant ainsi la nucléocapside dans le cytoplasme [46], où a lieu le processus de décapsidation et la traduction, la réplication subséquente et l'assemblage du virion [47]. L'ARN viral est traduit en une seule grande polyprotéine précurseur, qui est clivée pendant et après la traduction par des protéases virales et cellulaires, produisant les protéines virales [48]. Ce même ARN sert de matrice pour la réplication de l'ARN génomique dans des organites de réplication spécifiques formés de protéines virales et cellulaires, regroupées en un complexe de réplication (RC) [49]. Tous les facteurs cellulaires et viraux le constituant représentent des cibles d'intérêt thérapeutique pour bloquer la réplication des *Flavivirus* [50]. Au sein du RC, l'ARN est répliqué par la RdRp [51]. L'ARN viral nouvellement synthétisé est utilisé pour la traduction de nouvelles protéines virales [52]. Il est aussi complexé avec les protéines C pour former la nucléocapside, qui est enveloppée par une bicouche lipidique portant les protéines E et prM [53, 54]. Les virions immatures sont ensuite transportés à travers l'appareil de Golgi, dans lequel la conformation des protéines E et prM est modifiée, dû à la présence d'un pH légèrement acide [55-57] et à la protéase furine qui clive le peptide pr de la protéine prM [58]. Les virions matures sont sécrétés hors de la cellule par exocytose [56].

Alcaloïdes ayant un effet antiviral contre les *Flavivirus*

Des études effectuées sur des extraits de *Crinum macawonii*, *Crinum jagus* et *Pancreatium trianthum* soulignent le potentiel antinflaviviral des *Amaryllidaceae* [59-61]. Par exemple, des extraits méthanoliques de *C. macawonii* inhibent les infections causées par YFV et JEV, avec respectivement, des concentrations effectrices médianes (EC₅₀) de 4,3 µg/mL et 5,1 µg/mL [59]. De même, des extraits de *C. jagus* et de *P. trianthum* bloquent l'infection par le DENV *in cellulo* avec des EC₅₀ de 0,25 µg/mL et de

$2,9 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement (Tableau 1) [60, 61]. Le potentiel antinflaviviral des *Amaryllidaceae* semble reposer en bonne partie sur la présence d'alcaloïdes. Ainsi, plusieurs alcaloïdes d'*Amaryllidaceae*, dont la narciclasine, la lycoricidine, la lycorine, la pancratistatine, et la trans-dihydronarciclasine présentent un effet antiviral contre DENV *in cellulo* (Tableau 1), et la pancratistatine exerce un fort effet sur la survie de souris infectées avec JEV [14]. La narciclasine, la pancratistatine et la trans-dihydroxynarciclasine inhibent l'infectivité du ZIKV *in cellulo* avec des index de sélectivité (SI; ratio entre CC_{50} et EC_{50} ou IC_{50}) de 4,0, 3,7 et 7,0 respectivement [62]. De plus, la trans-dihydrolycoricine bloque la réplication des deux souches de ZIKV sur des cellules progénitrices neurales (NPC), dont PE-243 et FSS-13025, avec des SI > 500, démontrant une bonne sélectivité [63]. L'effet antiviral de la lycorine a quant à lui été confirmé dans de nombreuses études [13, 15, 64], dont l'une récente rapporte des SI de 90,6 (DENV) et 35,4 (ZIKV) (Tableau 1) [60]. *In vivo*, la lycorine protège les souris AG6 contre la létalité induite par ZIKV en diminuant la charge virale dans le sang [15]. De plus, la lycorine inhibe les infections par WNV *in cellulo* avec un SI de 104 et diminue fortement l'infection par YFV [64].

Plusieurs analogues de la lycorine ont été synthétisés afin d'augmenter son potentiel antiviral contre WNV et de réduire sa cytotoxicité [64]. La modification des groupes hydroxyles en position C1 et C2 réduit la cytotoxicité des composés, et une oxydation du groupement hydroxyle en position C2 augmente son potentiel antiviral [64]. Cependant, une ouverture du cycle E et/ou une oxydation en position C7 diminuent l'activité des composés [64]. L'un des nouveaux dérivés, la 1-*O*-acetyl-2-oxolycorine, a permis une inhibition plus élevée de WNV avec moins de cytotoxicité, soit avec un SI de 1578 [64]. La 1-acetyllycorine, la 1-*O*-acetyl-2-oxolycorine et la 2-oxolycorine, présentent une activité antinflavivirale contre DENV2 sur des cellules adénocarcinomiques A549 avec des SI de > 750,0, > 166,7 et 113,2, démontrant une grande sélectivité [13].

La lycorine exerce aussi un effet inhibiteur *in cellulo* contre le virus de la fièvre hémorragique d'Alkhurma (*Alkhurma hemorrhagic fever virus*, AHFV) [65] et contre le virus de Tembusu du canard (*duck Tembusu virus*, DTMUV), avec respectivement, des SI

de 9 et $\approx 9,5$. Elle cible l'internalisation et l'entrée du DTMUV dans les cellules hôtes [66], tandis que pour d'autres *Flavivirus*, son mécanisme d'inhibition est spécifique de l'étape de réplication de l'ARN [60]. Des analyses *in silico* suggèrent que la lycorine agit en ciblant la RdRp NS5 de ZIKV [15] ou encore le peptide 2K de NS5 de WNV qui joue un rôle essentiel dans la maturation de la polyprotéine et le réarrangement des membranes du RE servant d'échafaudage pour la formation du complexe de réplication des *Flavivirus* [64]. La cherylline, isolée de *C. jagus*, présente également un potentiel antiviral intéressant contre DENV et ZIKV avec respectivement des SI > 28 et $> 12,3$ (Tableau 1) [60]. Elle cible elle aussi l'étape de réplication de l'ARN mais sa cible moléculaire n'est pas connue. Des expériences *in silico* indiquent que la cherylline n'est similaire à aucun inhibiteur de protéines virales connus dans les bases de données examinées [60]. Ces analyses prédisent que plusieurs protéines humaines, telles que les récepteurs de la dopamine et des œstrogènes, ainsi que les transporteurs de neurotransmetteurs et la protéine kinase 5 de la division cellulaire, interagissent avec celle-ci, suggérant ainsi qu'elle agit en ciblant des protéines cellulaires de l'hôte impliquées dans le cycle viral [60]. Le complexe de réplication de DENV est composé de ses protéines non structurales en interaction avec plusieurs protéines cellulaires [67-70]. Il est possible que la cherylline agisse sur l'une des protéines cellulaires ayant un rôle dans ce complexe. Récemment, nous avons également découvert que l'haemanthamine, la pancracine et l'haemanthidine, isolés de *Panocratium maritimum*, inhibaient les infections causées par DENV, avec des SI de 65,8, 72,4 et 35,3 respectivement (Tableau 1) [71]. Une autre étude effectuée en 2022 a permis d'observer l'effet antiviral de la lycorine, de la narciclasine, de la narciclasine-4-O- β -D-xylopyranoside et de la pretazettine contre DENV, avec respectivement des SI de 8,6, 4,5, 4,9 et 6,8 [72]. Ces mêmes molécules présentent aussi un effet antiviral contre ZIKV, avec respectivement, des SI de 3,8, 6,0, 6,5 et 3,8 [72]. Le mode d'action de ces alcaloïdes contre DENV et ZIKV n'est toujours pas élucidé.

D'autres familles de plantes produisent des alcaloïdes à effet antinflaviviral. Par exemple, la castanospermine, obtenue à partir d'haricots noirs ou de châtaigniers de Morton de l'espèce *Castanospermum australae*, entrave la sécrétion et l'infectiosité des

virions DENV1-4 [73]. Elle aurait peu ou pas d'effet sur la réplication et la traduction de l'ARN viral. Dans des modèles murins, des doses croissantes de castanospermine augmentent la survie des souris infectées jusqu'à 90 %. L'émétine, un alcaloïde provenant notamment de *Psychotria ipecacuanha*, est un inhibiteur de l' α -glucosidase du réticulum endoplasmique et bloque les infections par DENV-1 en affectant le repliement des glycoprotéines structurales virales, ce qui interférerait avec l'assemblage du virus [74]. Dans une autre étude, l'émétine inhibe l'infection par DENV avec une EC₅₀ entre 0,1 et 0,5 μ M, et ce, avec une faible cytotoxicité sur les cellules à des concentrations allant jusqu'à 10 μ M (Tableau 1) [75]. Elle inhibe la réplication de l'ARN viral et la traduction des protéines [75], mais la cible exacte n'a pas encore été identifiée. L'hirsutine, un alcaloïde extrait de *Uncaria rhynchophylla* de la famille des *Rubiaceae*, exerce une activité antivirale contre DENV1-4 avec un SI de > 5,3 (Tableau 1) [76]. Son mode d'action impliquerait l'inhibition de l'assemblage, du bourgeonnement ou de la sécrétion des virions [76]. La tomatidine, obtenue à partir de tomates vertes, permet d'inhiber les infections causées par le virus DENV avec un SI de 97,7, démontrant ainsi une bonne sélectivité [77]. La tomatidine diminue l'expression du facteur de transcription activateur 4 (*activating transcription factor 4*, ATF4) [77], alors que le virus DENV induit l'expression de ce facteur [77, 78] pour une raison encore inconnue. ATF4 pourrait réduire le stress cellulaire, ce qui permettrait une meilleure efficacité de la synthèse des protéines [79]. La déplétion d'ATF4 diminue de 50 % la production de particules virales de DENV [77]. Cependant, les cellules traitées avec la tomatidine présentent une réduction de 99 % de la production de particules virales, indiquant qu'ATF4 ne serait pas la seule cible de la tomatidine [77]. Peu ou pas d'activité antivirale n'a été observée pour la tomatidine sur ZIKV et WNV, révélant une spécificité d'action intéressante [77].

VII-1

Les rétrovirus sont des virus à ARN utilisant leur propre transcriptase inverse (*reverse transcriptase*, RT) pour rétrotranscrire leur ARN en ADN [80]. Le VIH appartient au genre des *Lentivirus* de cette famille [81]. Il en existe deux types, dont le VIH-1 qui est responsable de la pandémie de syndrome d'immunodéficience acquise

(SIDA) mondiale actuelle, et le VIH-2 qui est moins pathogène et principalement présent en Afrique de l'Ouest [82]. La maladie progresse généralement assez lentement en affaiblissant le système immunitaire au moyen de l'infection de lymphocytes T CD4⁺, de macrophages et de cellules dendritiques. En absence de traitement, le stade SIDA est atteint lorsque la charge plasmatique virale est élevée et que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 200 cellules/mm³ [83].

Le VIH-1 est un rétrovirus enveloppé qui contient deux copies identiques d'ARN simple brin formant un génome d'environ 10 000 nucléotides [84]. Le gène *Gag* code pour les protéines de la matrice (MA), de la capsidie (CA), et de la nucléocapsidie (NC), la protéine p6 et les peptides SP1 et SP2. Le gène *pol* code pour les trois enzymes nécessaires au cycle viral, soit la protéase (PR), la RT contenant un domaine ribonucléase H, et l'intégrase (IN). *Env* code pour une glycoprotéine, gp160, qui est ensuite clivée en gp120, la protéine de surface, et gp41, une protéine de fusion transmembranaire [85]. La première étape du cycle de réplication du VIH-1 consiste en l'attachement à une cellule et la fusion membranaire entre celle-ci et l'enveloppe du virus. D'abord, la liaison de gp120 avec son récepteur CD4 (*cluster of differentiation 4*) induit un changement de conformation qui augmente son affinité avec le corécepteur CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) ou CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*). Cette deuxième interaction induit à son tour un changement de conformation de gp41 qui s'insère alors dans la membrane cellulaire, conduisant à la fusion avec l'enveloppe virale [86]. Le noyau capsidique viral entre alors dans le cytoplasme et interagit avec de multiples protéines cellulaires, protégeant ainsi le génome viral, la RT et l'IN, contre la détection ou l'attaque par des facteurs antiviraux cellulaires [87]. L'initiation de la transcription inverse se fait à l'intérieur de ce noyau viral dans le cytoplasme de la cellule et celui-ci est transporté au noyau à travers les microtubules, y pénétrant par les pores nucléaires [88, 89]. La rétrotranscription et la décapsidation y sont alors complétées près des sites d'intégration [90, 91]. L'ADN viral est ensuite intégré dans le génome cellulaire par l'IN virale, et le provirus utilise la machinerie cellulaire en plus de ses propres enzymes pour produire ses protéines virales et se répliquer [92]. Gag et Gag-Pol sont traduites et ensuite ancrées à la membrane cellulaire du côté cytoplasmique. Le précurseur Env (gp160) est à

son tour dirigé vers la membrane plasmique où il est clivé par des protéases hôtes de type furine en gp120 et gp41. Le processus d'assemblage des virions se poursuit à la membrane cellulaire, encapsidant les dimères d'ARN viral génomique, et les virions immatures bourgeonnent par fission membranaire [93, 94].

Alcaloïdes ayant un effet antiviral contre le VIH-1

Quelques extraits provenant des *Amaryllidaceae* présentent une activité contre le VIH-1. Par exemple, un extrait méthanolique de *Crinum asiaticum var. japonicum* diminue les infections causées par le VIH-1 dans des cellules MT-4 avec un SI de 16, et inhibe directement l'activité de la RT de 70,8 % [95]. L'extrait méthanolique de *Pamianthe peruviana Stapf*, réduit l'activité de la RT du VIH-1 de 72 %, à une concentration de 66 µg/mL [96]. Selon des analyses *in silico* incluant 313 molécules, la 6-hydroxypowelline, un alcaloïde de type crinine, présente le score de liaison le plus élevé au site actif de la RT (G-score = 12,7 kcal/mol), et la pseudolycorine-1, un alcaloïde de type lycorine, affiche le meilleur score (13.6 kcal/mol) en ce qui concerne l'interaction avec la protéase du VIH-1 [97]. La littoraline, un alcaloïde provenant de *Hymenocallis littoralis*, exerce un faible effet inhibiteur sur la RT du VIH-1 avec une IC₅₀ de 142,0 µg/mL [98]. Dans une autre étude, la lycorine conduit à une réduction de la quantité d'ARN viral du VIH-1 dans des cellules de type SUP-T1 [99]. Selon des analyses *in silico*, la lycorine pourrait cibler de nombreux gènes de l'hôte, tel que Smad3, un régulateur négatif de la prolifération cellulaire [99]. Les recherches sur l'effet antiviral de la lycorine contre le VIH-1 sont controversées, car certaines études démontrent une inhibition de l'infection tandis que d'autres n'ont pas confirmé ces observations [14, 98]. Ces différences pourraient s'expliquer par le caractère cytotoxique de celle-ci, augmentant la mort cellulaire des cellules infectées plutôt que de directement diminuer l'infection. D'autres analyses indiquent que la diminution de la quantité de virus n'est pas le résultat de la destruction directe des cellules hôtes par la lycorine, mais plutôt d'un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire [99].

Des alcaloïdes extraits d'autres familles de plantes ont montré un effet antirétroviral. L'émétine inhibe les infections par le VIH-1 avec un SI $> 3,3$ dans des cellules mononucléées de sang humain périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) (Tableau 2) [100]. Elle inhiberait la réplication du virus en interférant avec la RT. De plus, l'émétine cause une inhibition de 90 % de l'activité intravirion de la RT, ce qui suggère qu'elle serait capable de pénétrer la particule intacte du VIH et désactiver son mécanisme de transcription inverse avant même l'infection [100]. Sur la base de ces résultats, les auteurs proposent que l'émétine pourrait être utilisée comme microbicide anti-VIH-1 [100]. L'alopérine, un alcaloïde de type quinolizidine extrait de la plante *Sophora alopecuroides* L. de la famille des *Fabaceae*, inhibe la réplication du VIH-1 en empêchant la fusion membranaire lors de l'entrée du virus, avec une EC_{50} de 1,8 μ M et une haute sélectivité (Tableau 2) [101]. Trente dérivés de l'alopérine ont été synthétisés avec une variété de substitutions en N12 afin d'optimiser son pouvoir antiviral contre le VIH-1. Parmi ceux-ci, le 4-trifluorométhyl-N-[4-(N12-aloperine-yl)butyl]benzamide a montré une sélectivité plus élevée que l'alopérine, avec un SI de $> 51,3$ [101]. La présence d'un groupe trifluorométhyle sur le cycle benzamide semble être l'élément permettant l'amélioration de l'activité antivirale [101]. La laurolitsine, l'hernandonine, la lindechunine A et la 7-oxohernangerine sont tous des alcaloïdes de type aporphine du genre des isoquinolines extraits de la plante *Lindera chunii* de la famille des Lauraceae [102]. Elles inhibent l'intégrase virale du VIH-1 avec des IC_{50} allant de 7,7 μ M à 21,1 μ M (Tableau 2) [102]. Cependant, elles n'ont pas encore été testées contre le virus et leur cytotoxicité n'a pas été évaluée. La buchapine est un alcaloïde de type quinolone pouvant être extrait de la plante *Euodia roxburghiana* de la famille des Rutaceae [103, 104]. Elle permet d'inhiber les infections causées par le VIH-1 avec un SI de 18,7. Un composé similaire, le 3-(3-méthyl-2-butenyl)-4-[(3-méthyl-2-butenyl)oxy]-2(1H)-quinolinone (2), permet aussi d'inhiber l'infection par le VIH-1 avec un SI de même ordre [103, 104]. Quarante-cinq analogues alkylés de la quinoléine 2,4-diol à base de la buchapine et du 3-(3-méthyl-2-butenyl)-4-[(3-méthyl-2-butenyl)oxy]-2(1H)-quinolinone (2) ont été synthétisés afin d'augmenter le pouvoir antiviral des composés [103, 104]. Trois dérivés exercent un effet antiviral contre le VIH-1 avec des SI allant de 20,9 à 29,5 (Tableau 2) [104]. Selon les résultats obtenus, il semble que le cycle B non-substitué et le groupe 2-OH

libre sont essentiels pour conserver une activité antivirale contre le VIH-1. De plus, une longueur de chaîne allant jusqu'à quatre carbones et un groupe prényle en C-3 et/ou O-4 sont aussi requis pour l'activité inhibitrice du VIH-1 [104].

Coronavirus

Les coronavirus sont des virus enveloppés faisant partie de la famille des *Coronaviridae* dont le génome est constitué d'une seule copie d'ARN de polarité positive [1]. Les *Coronaviridae*, de la sous-famille des *Orthocoronavirinae*, sont divisés en quatre genres, dont les *Alphacoronavirus* constitués des coronavirus infectants les humains HCoV-229E et HCoV-NL63, les *Betacoronavirus* constitués d'HCoV-OC43, d'HCoV-HKU1, des coronavirus causant le syndrome respiratoire aigu sévère SARS-CoV et SARS-CoV-2 et le syndrome respiratoire du Moyen-Orient MERS-CoV, les *Gammacoronavirus* et les *Deltacoronavirus* [1]. HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 et HCoV-HKU1 sont connus pour causer des infections relativement bénignes des voies respiratoires, alors que SARS-CoV, SARS-CoV-2 et MERS-CoV peuvent causer des symptômes respiratoires beaucoup plus sévères [1, 105]. En comparaison avec le SARS-CoV et le MERS-CoV, le SARS-CoV-2 s'est avéré beaucoup plus contagieux. Plusieurs vaccins sont disponibles et permettent de prévenir le développement de formes graves de la Covid-19 [106-108]. Plusieurs antiviraux et anticorps monoclonaux ont été approuvés, mais le potentiel antiviral des anticorps monoclonaux diminue avec l'émergence de nouveaux variants [109].

Le génome coronaviral est constitué d'un long génome d'ARN monocaténaire de sens positif d'environ 30 kilobases (kb) [110]. Deux grands cadres de lecture ouverts, ORF1a et ORF1b, qui composent les deux tiers du génome, produisent deux polyprotéines, pp1a et pp1ab, qui codent pour les 15-16 protéines non structurales (nsp) [111]. Les nsp incluent les cystéines protéases de type papaïne (nsp3) et de type chymotrypsine ou 3CL (nsp5), une RdRp (nsp12), une hélicase et plusieurs enzymes de modification de l'ARN, toutes d'importantes cibles thérapeutiques potentielles [112]. Les protéines structurales dont la spicule (S), l'enveloppe (E), la membrane (M) et la

nucléocapside (N) sont essentielles pour l'assemblage des virions [113]. Les protéines S forment des homo-trimères à la surface des virions et sont responsables de la liaison aux récepteurs des cellules hôtes [114-116]. La protéine N est impliquée dans l'organisation structurale de la nucléocapside et participe à l'encapsulation de l'ARN viral, à l'assemblage des virions et améliore l'efficacité de la transcription de l'ARN viral [117, 118]. D'autres cadres de lecture, dont ORF3a, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 et ORF9b codent pour des protéines accessoires qui ont pour fonction de moduler les réponses de l'hôte et sont des déterminants de la pathogénicité virale [1]. La première étape du cycle viral correspond à la liaison spécifique du domaine de liaison au récepteur (RBD) de la sous-unité 1 (S1) de la protéine S d'un virion avec un récepteur à la surface de la cellule hôte, tels que l'aminopeptidase N humaine (APN) pour HCoV-229E et l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) pour HCoV-NL63, SARS-CoV et SARS-CoV-2 [1, 119-122]. Le clivage de la protéine S à la jonction S1-S2 par des protéases de l'hôte, par exemple la protéase transmembranaire à sérine 2 (TMPRSS2) pour SARS-CoV et SARS-CoV-2, produit des changements de conformation de la sous-unité S2 et permet d'exposer un peptide de fusion qui s'insère dans la membrane cytoplasmique ou endosomale et engendre sa fusion avec l'enveloppe virale [123, 124]. Une fois le noyau viral libéré dans le cytoplasme de la cellule, l'ARN viral est décapsidé et est soumis à une traduction immédiate de ORF1a et ORF1b, codant pour pp1a et pp1ab [1], qui seront clivées par des protéases virales [125]. Nsp2-16 s'assemblent alors pour former le complexe réplicase-transcriptase (RTC) dans des organites de réplication formés à partir du RE [1, 126, 127], dans lesquels il y a réplication de l'ARN et transcription des ARN sous-génomiques codant pour les protéines de structure et accessoires [126]. Les protéines structurales transitent ensuite le long de la voie sécrétoire par l'intermédiaire d'un compartiment « ER-to-Golgi » (ERGIC) où elles interagissent avec l'ARN viral nouvellement produit et complexé avec N pour former les virions matures [128, 129]. Après l'assemblage moléculaire, les virions sont transportés dans des vésicules golgiennes jusqu'à la membrane plasmique et sortent de la cellule par exocytose [117, 130].

Alcaloïdes ayant un effet antiviral sur les coronavirus

En 2005, des chercheurs ont établi que les extraits éthanoliques de *Lycoris radiata* ont un pouvoir anti-SARS-CoV. Suite à l'isolation des alcaloïdes, la lycorine fut identifiée comme responsable de cette activité anticoronavirale avec une EC_{50} de $2 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ et une sélectivité très élevée (Tableau 3) [16]. Elle possède aussi la capacité d'inhiber les infections d'autres coronavirus *in cellulo*, dont HCoV-OC43, HCoV-NL63 et MHV-A59 (Tableau 3), et permet de protéger des souris BALB/c contre les infections causées par HCoV-OC43 en réduisant la charge virale dans le système nerveux central [131]. Elle a aussi la capacité d'inhiber la réplication du SARS-CoV-2 dans des cellules Vero E6 avec une EC_{50} de $0,3 \mu\text{M}$ et une $CC_{50} > 40 \mu\text{M}$, ce qui indique un effet antiviral élevé avec une faible cytotoxicité [17]. Une autre étude rapporte le potentiel anticoronaviral de la lycorine contre les infections causées par SARS-CoV, MERS-CoV et SARS-CoV-2, avec respectivement, des SI de $> 49,0$, $> 23,6$ et $> 57,0$, ce qui est plus élevé que la sélectivité du remdesivir, un analogue de nucléoside approuvé pour le traitement de la Covid-19 [132]. L'inhibition du SARS-CoV-2 par la lycorine en cultures cellulaires a été confirmée par d'autres auteurs, qui ont obtenu une EC_{50} de $0,01 \mu\text{M}$ et une cytotoxicité très faible [133]. Bien que le potentiel anticoronaviral de la lycorine soit très largement démontré, sa cible moléculaire reste controversée. Si certains ont déterminé qu'elle inhibait l'activité de la RdRp de MERS-CoV avec une IC_{50} de $1,4 \mu\text{M}$ [132], d'autres ont plutôt mesuré une activité spécifique à la protéase principale MPro [133]. Selon des analyses *in silico*, elle pourrait se lier au site actif MPro de SARS-CoV-2 par des liaisons hydrogènes avec les résidus Asn142, Gln189, and Glu166 [133], mais elle pourrait aussi se lier à la RdRp de SARS-CoV-2 par des interactions hydrogènes avec les acides aminés Asp623, Asn691, et Ser759 [132]. Dans une autre étude, la sous-unité S1 du SARS-CoV-2 a été ciblée par une approche *in silico* afin d'identifier les molécules qui pourraient s'y lier et bloquer son interaction avec le récepteur ACE2 [134]. La lycorine a présenté un score favorable (score Libdock: 86,92 Kcal/mol) pour son interaction avec le domaine de liaison du récepteur S1 (S1-RBD) [134]. Ainsi, il est probable que la lycorine inhibe les infections causées par le SARS-CoV-2 en ciblant plus d'une protéine virale. D'autres molécules, dont la galanthamine, la narciclasine, la lycoricidine, la lycorénine et la pseudolycorine ont présenté des scores favorables *in silico* en ce qui concerne leur habilité à interagir avec

la protéase principale de SARS-CoV-2 [135, 136]. L'activité anti-coronavirale des > 650 autres alcaloïdes d'*Amaryllidaceae* n'a pas encore été caractérisée.

D'autres alcaloïdes provenant de différentes familles de plantes permettent aussi d'inhiber des coronavirus. Par exemple, l'émétine peut empêcher la réplication de MERS-CoV en interférant avec l'entrée du virus dans les cellules [131, 137]. Elle inhibe aussi les infections par HCoV-OC43, HCoV-NL63, MHV-A59, MERS-CoV et SARS-CoV-2 (Tableau 3) [131, 138]. L'homoharringtonine, isolé de *Cephalotoxus fortunei* de la famille des Taxaceae [138], possède la capacité d'inhiber les infections causées par SARS-CoV-2 avec une EC₅₀ de 2,6 µM et une CC₅₀ de 59,8 µM, démontrant un potentiel antiviral et une faible cytotoxicité [138]. L'homoharringtonine est connue pour se lier au site A des ribosomes et inhiber la traduction des protéines [139], mais le rôle de cette activité dans l'effet antiviral n'est pas clair. Selon des analyses *in silico*, elle pourrait aussi se lier au domaine de liaison du récepteur S1 (S1-RBD) de SARS-CoV-2 [134]. Parmi les molécules testées dans cette étude, l'homoharringtonine affiche le meilleur score (score de Libdock: 109,11 Kcal/mol) [134]. L'oxysophoridine, pouvant être extrait de la plante *Sophora alopecuroides* Linn de la famille des Fabaceae [17] exerce une activité antivirale contre le SARS-CoV-2 (EC₅₀ de 0,2 µM), et l'effet antiviral est augmenté en présence de gemcitabine [17]. La tétrandrine, la fangchinoline et la cépharantine sont des alcaloïdes extraits de *Stephania tetandra* de la famille des Menispermaceae [140, 141]. Ces molécules inhibent l'infection de fibroblastes pulmonaires par HCoV-OC43 avec une sélectivité intéressante (Tableau 3), en ciblant la réplication de l'ARN viral et l'expression des protéines S et N [140]. Selon des analyses *in silico*, la cépharantine, la fangchinoline et la tétrandrine présentent des scores de Libdock favorables (respectivement de 106,74 Kcal/mol, 92,66 Kcal/mol et 72,96 Kcal/mol) en ce qui concerne les interactions avec le domaine de liaison du récepteur S1 (S1-RBD) de SARS-CoV-2 [134]. La fangchinoline et la tétrandrine inhibent aussi les infections causées par MERS-CoV, avec des SI de $\approx 6,2$ et $\approx 4,3$, respectivement [141]. L'indigo, provenant d'*Isatis indigotica* de la famille des Crucifères [142], inhibe l'activité de la protéase principale de SARS-CoV avec un SI de 9,8 [142]. Selon des études *in silico*, il pourrait se lier au domaine S1-RBD de SARS-CoV-2 avec un score de

Libdock de 64,26 Kcal/mol [134]. La tryptanthrine, issue de *Strobilanthes cusia* de la famille des *Acanthaceae* [143], inhibe l'infection par HCoV-NL63 avec une EC_{50} de 1,5 μ M et une sélectivité élevée (Tableau 3) [143]. Plusieurs des mécanismes d'inhibition de ce virus par la tryptanthrine ont été identifiés, dont l'inhibition de l'activité enzymatique de la RdRp, conduisant à une diminution de la synthèse de l'ARN viral [143]. De plus, la tryptanthrine modifie spécifiquement la structure antigénique des protéines virales S et inhibe l'activité de clivage de la protéase de type papaïne 2 (PLP2) [143]. Selon des analyses *in silico*, elle pourrait aussi se lier au domaine S1-RBD de SARS-CoV-2 avec un score de Libdock de 76,46 Kcal/mol [134].

Les alcaloïdes ont également un impact sur les réponses cellulaires antivirales. Une étude a montré que les niveaux d'expression de certains ARNm cellulaires liés à l'immunité innée, dont l'interféron (IFN) $-\alpha 1$, IFN- $\beta 1$, IFN- $\lambda 1$, et MxA, étaient augmentés lors d'infection par HCoV-OC43, mais que cet effet était atténué en présence de la cépharantine, de la fangchinoline et de la tétrandrine [140]. De façon cohérente avec ces observations, les niveaux d'expression de plusieurs cytokines inflammatoires, dont l'interleukine (IL)- 1β , l'IL-6 et l'IL-8, augmentaient également en présence de HCoV-OC43, et cette augmentation était contrecarrée par ces trois mêmes alcaloïdes [140]. Par ailleurs, la tétrandrine permet l'activation de la voie de signalisation p38 *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) dans ces mêmes cellules. Il semble donc que ces alcaloïdes permettent de moduler la transcription de gènes cellulaires spécifiques, et en particulier les réponses cellulaires pro-inflammatoires antivirales. Le rôle de cette modulation dans l'activité anticoronavirale d'alcaloïdes n'est pas encore connu.

Alcaloïdes ayant un effet antiviral sur d'autres virus à ARN

D'autres virus à ARN sont responsables de l'émergence de nouvelles maladies humaines, dont le virus chikungunya (CHIKV) et les *Alphainfluenzavirus*. CHIKV est un arbovirus faisant partie du genre des *Alphavirus* de la famille des *Togaviridae*, transmis par les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Jusqu'en 2004, CHIKV était surtout présent dans les régions tropicales d'Afrique, du sous-continent indien et de l'Asie du

Sud-Est, mais en 2013, il s'est répandu dans l'hémisphère occidental et a causé plus de 1,5 millions d'infections dans les Caraïbes et en Amérique [144, 145]. À ce jour, il n'existe aucun traitement ni vaccin permettant de soigner ou de prévenir les infections causées par CHIKV [144]. Le virus de l'influenza de type A, du genre des *Alphainfluenzavirus*, est divisé en plusieurs sous-types en fonction de la nature des glycoprotéines de surface hémagglutinine et neuraminidase [146]. Actuellement, les virus de la grippe A H1N1 et H3N2 circulent mondialement [146]. La souche H5N1 présente un taux de mortalité élevé et peut causer une maladie respiratoire sévère, dont les symptômes sont de la fièvre, de la toux, des essoufflements, voire une pneumonie [147, 148]. De nouveaux sous-types émergent constamment par accumulation de mutations et par dérive antigénique, ce qui diminue l'efficacité des vaccins et engendre des problèmes de résistance aux médicaments.

Plusieurs études rapportent que certains alcaloïdes provenant de la famille des *Amaryllidaceae* présentent une activité antivirale contre les *Alphavirus* [18] et les *Alphainfluenzavirus*, dont les sous-types H5N1, H1N1 et H3N2 de l'influenza de type A [149, 150]. Quatre alcaloïdes extraits de la plante *L. radiata*, dont la lycorine, l'haemanthamine, l'hippeastrine et la 11-hydroxyvittatine, exercent une activité antivirale contre les infections causées par le virus de la grippe aviaire H5N1 sur des cellules MDCK (Tableau 4) [150]. Le virus H5N1 induit une augmentation de l'expression des protéines de l'enveloppe nucléaire Nup93, alors qu'en présence de lycorine, il y a diminution de cette expression [151]. La lycorine et l'haemanthamine causent une inhibition de l'exportation des complexes ribonucléoprotéiques viraux (RNP) du noyau de la cellule vers le cytoplasme, ce qui est lié à la diminution de l'expression de Nup93, et explique en partie l'effet antiviral contre le virus de la grippe aviaire H5N1 de ces alcaloïdes [150, 151]. La lycorine et l'haemanthamine inhibent aussi les infections causées par les souches H1N1 et H3N2 (Tableau 4) [149]. Quelques analogues de l'homolycorine, dont la 2 α -methoxy-6-*O*-ethyloduline, la 2 α -methoxy-6-*O*-methyloduline et la trispherine, ont également montré un potentiel antiviral contre les infections par H5N1 sur des cellules MDCK, avec respectivement, des SI de 7,0, 6,9 et 29,6 [152, 153]. La lycorine présente aussi un pouvoir antiviral contre les infections causées par CHIKV dans plusieurs types

de cellules, telles que les Vero, les BHK-21, les Huh7 et les A549, avec une bonne sélectivité (Tableau 4) [18]. De plus, elle inhibe les infections virales causées par d'autres types d'*Alphavirus*, tels que le virus Sindbis (SINV), le virus de la forêt de Semliki (SFV) et le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV) (Tableau 4) [18]. La lycorine semble diminuer les infections causées par CHIKV en entravant la traduction des protéines virales [18]. Cependant, il est possible qu'elle ait aussi pour cible des protéines de l'hôte [150, 151, 154].

D'autres alcaloïdes provenant d'autres familles ont aussi présenté un potentiel antiviral contre les virus à ARN. La berbérine est un alcaloïde de type isoquinoline pouvant être extrait de l'espèce végétale *Coptis chinensis* de la famille des Ranunculaceae [155]. Elle inhibe les infections causées par CHIKV dans les cellules Huh7.5 et BHK-21 avec une sélectivité élevée [156] (Tableau 4). Le mécanisme d'action s'explique par une réduction de la synthèse de l'ARN viral et de l'expression des protéines virales [156]. Une autre étude rapporte le pouvoir antiviral de la berbérine contre CHIKV dans d'autres cellules humaines, précisément les HEK293T et les HOS [155]. Dans cette même étude, la berbérine a réduit la signalisation par la voie MAPK induite par CHIKV, ce qui suggère que l'effet antiviral s'expliquerait en partie par l'inhibition des cascades de signalisation activées par le virus [155]. De plus, la berbérine réduit l'inflammation causée par le virus CHIKV dans des modèles murins, ce qui pourrait refléter un effet antiviral *in vivo* autant qu'un effet direct sur les mécanismes d'inflammation [155]. La tomatidine, quant à elle, permet d'inhiber les infections causées par CHIKV dans plusieurs types de cellules, dont les Huh7, les HFF-1 et les U2OS, avec une sélectivité élevée (Tableau 4) [157]. Cette inhibition de l'infectivité est corrélée à une diminution de l'expression des protéines virales, dont NSP1, la capsid (C) et la glycoprotéine E1 [158]. Par ailleurs, la tomatidine présente une activité anti-inflammatoire, ce qui pourrait indirectement contribuer à son effet antiviral contre CHIKV [159, 160].

Discussion

Les virus à ARN sont la principale classe d'agents pathogènes ayant causé l'apparition de nouvelles maladies humaines. De plus, l'arsenal pharmaceutique est très réduit voire inexistant pour certains d'entre eux. En raison de leur taux de mutation élevé, il est nécessaire de découvrir de nouvelles molécules antivirales, y compris pour ceux pour lesquels nous disposons de traitements. Les *Amaryllidaceae* sont une famille de plantes reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques engendrées par les métabolites qu'elles contiennent, plus précisément, les alcaloïdes [20]. Les alcaloïdes sont des molécules à bases azotées et le plus souvent hétérocycliques. Plusieurs raisons expliquent l'intérêt particulier qui leur est accordé en tant que molécules thérapeutiques. Notamment, ils présentent une plus grande diversité de structure que plusieurs autres types de composés, tels que les acétogénines, les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes, et possèdent des caractéristiques uniques en fonction de la présence de différents groupes fonctionnels [22, 161]. Selon les critères de Lipinski, les alcaloïdes respectent les standards nécessaires pour être envisagés en tant que molécules thérapeutiques (log P, masse moléculaire, groupes NH et OH et nombre d'atomes N et O par alcaloïde) [22, 161]. En raison de leurs propriétés basiques, ils sont solubles dans des milieux polaires et apolaires en présence de conditions acides/neutres ou basiques, augmentant ainsi leur biodisponibilité [22, 161].

Plusieurs études ont démontré que les alcaloïdes d'*Amaryllidaceae* exercent un effet inhibiteur contre diverses familles de virus en modulant des cibles virales mais aussi des protéines cellulaires de l'hôte. Plusieurs auraient aussi un effet à large spectre sur d'autres types de virus ou pathogènes. Cependant, le mode d'action de la majorité de ces molécules demeure hypothétique. Il est donc nécessaire d'approfondir les recherches sur ces molécules et leurs activités. La lycorine, le composé qui a été le plus étudié, inhibe plusieurs virus à ARN, dont les *Flavivirus* (DENV, ZIKV, JEV, WNV et YFV) [14, 60, 64, 72], les coronavirus (SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-OC43, HCoV-NL63 et MHV-A59) [16, 17, 131-133], les *Alphavirus* (CHIKV, SINV, SFV et VEEV) [18], et les *Alphainfluenzavirus* (H1N1, H3N2 et H5N1) [150]. Quelques cibles virales ont été identifiées, dont la protéase principale MPro du SARS-CoV-2 [133],

la RdRp du MERS-CoV et possiblement du SARS-CoV-2 [132]. La lycorine inhibe la réplication de l'ARN chez les *Flavivirus* [60] et la traduction des protéines virales chez CHIKV [18]. Cependant, il est probable qu'elle exerce son effet antiviral en employant plusieurs mécanismes et en ciblant plus d'une protéine. En effet, elle peut moduler des voies de signalisation et inhiber l'expression de certaines protéines cellulaires. Par exemple, lors d'infection par le virus H5N1, elle diminue l'expression de Nup93, ce qui inhibe l'exportation des complexes RNP du noyau de la cellule vers le cytoplasme [150, 151]. De plus, elle présente un effet inhibiteur sur la division et l'élongation cellulaire ainsi que sur la synthèse des protéines cellulaires [162]. Enfin, elle exerce un effet antiprolifératif sur une variété de cellules cancéreuses, en partie engendré par un mécanisme d'apoptose [163-167]. La lycorine permet aussi d'inhiber des virus portant un génome de type ADN, tel que le virus de l'herpès simplex de type 1 [168].

Il semble que plusieurs autres alcaloïdes interagissent autant avec des cibles virales que cellulaires. Par exemple, la tomatidine permet en partie de réduire les infections causées par DENV en inhibant l'expression du facteur ATF4 [77]. D'autre part, il est prouvé qu'elle inhibe l'expression des protéines virales de la capsid (C), NSP1 et E2 chez CHIKV [158]. L'émétine inhibe la RT du VIH-1, et par le fait même, la réplication de l'ARN [100]. Elle est aussi un inhibiteur de la synthèse protéique qui a été utilisé comme anti-protozoaire pour le traitement de l'amibiase, et elle inhibe également le paludisme en se liant au site E ribosomal de *Plasmodium falciparum* [169, 170]. En somme, cette revue permet de constater que les alcaloïdes d'*Amaryllidaceae*, ainsi que ceux provenant d'autres types de plantes, exercent leur effet antiviral à l'aide de plusieurs mécanismes ciblant autant les protéines virales que cellulaires, et que certains d'entre eux présentent un effet thérapeutique à large spectre sur plusieurs familles de virus. Le développement de thérapies antivirales basées sur les alcaloïdes pourrait apporter des solutions médicales vis-à-vis des virus émergents. De plus, étant donné que beaucoup de ces molécules semblent exercer leur action antivirale en ciblant des facteurs de l'hôte, elles offrent la possibilité de développer des traitements à large spectre qui sont moins susceptibles d'évoluer vers une résistance aux médicaments [171].

Plusieurs alcaloïdes présentent un potentiel antiviral intéressant et pourraient servir d'inhibiteur antiviral ou de squelette pour l'optimisation de molécules thérapeutiques, tel que démontré avec les dérivés de lycorine, d'alopérine et de buchapine. Plusieurs obstacles compliquent l'obtention de ces molécules à partir des plantes : une majorité ne sont présents qu'en quantité de traces, ce qui génère un faible apport de matériel lors des extractions et la synthèse organique requiert des méthodes compliquées et onéreuses [20]. Une alternative intéressante serait d'optimiser leur synthèse par ingénierie métabolique dans des organismes hétérologues [20, 172]. Afin que cette idée soit réalisable, il serait important d'approfondir notre connaissance des voies métaboliques et des enzymes impliquées dans leur synthèse chez les plantes qui les produisent.

Tableaux

Tableau 1. Alcaloïdes et extraits de plantes ayant montré un potentiel antiviral contre les *Flavivirus*

Alcaloïdes	Virus	EC ₅₀	CC ₅₀	SI	Référence
Extraits d'<i>Amaryllidaceae</i>					
Extrait d'alcaloïdes de <i>Crinum jagus</i>	DENV	0,25 µg/mL	n.i.	n.i.	[60]
Extrait d'alcaloïdes de <i>Pancreatum trianthum</i>	DENV	2,9x10 ⁻² µg/mL	0,45 µg/mL	15,5	[61]
Extrait méthanolique de <i>Crinum macawonii</i>	YFV	4,3 µg/mL	29,3 µg/mL	6,8	[59]
	JEV	5,1 µg/mL	29,6 µg/mL	5,8	
Alcaloïdes d'<i>Amaryllidaceae</i>					
1-Acetyllycorine	DENV	0,4 µM	> 300 µM	> 7 50	[13]
1- <i>O</i> -acetyl-2-oxolycorine	WNV	0,19 µM	> 300 µM	> 1578,9	[64]
	DENV	1,8 µM	> 300 µM	> 166,7	
Cherylline	DENV	8,8µM	> 250 µM	> 28	[60]
	ZIKV	20,3 µM		> 12,3	
Cis-dihydronarciclasine	DENV	2,5 µg/mL	> 5,0 µg/mL	> 2,0	[14]
	JEV	0,96 µg/mL	4,9 µg/mL	5,1	
	YFV	1,3 µg/mL	5,2 µg/mL	3,9	

Alcaloïdes	Virus	EC ₅₀	CC ₅₀	SI	Référence
7-Deoxypancratistatine	DENV	0,67 µg/mL	2,5 µg/mL	3,7	[14]
	JEV	0,48 µg/mL	2,8 µg/mL	5,9	
	YFV	0,40 µg/mL	2,6 µg/mL	6,6	
Haemanthamine	DENV	0,34 µM	22,2 µM	65,8	[71]
Haemanthidine	DENV	0,48 µM	16,8 µM	35,3	[71]
Isonarciclasine	DENV	0,27 µg/mL	5,0 µg/mL	18,5	[14]
	JEV	0,72 µg/mL	1,5 µg/mL	2,1	
	YFV	0,22 µg/mL	0,9 µg/mL	4,1	
Lycoricidine	DENV	5,9x10 ⁻² µg/mL	0,25 µg/mL	4,2	[14]
	JEV	5,6x10 ⁻² µg/mL	0,27 µg/mL	4,9	
	YFV	5,3x10 ⁻² µg/mL	0,29 µg/mL	5,6	
Lycoricidine monoacetate	DENV	1,5 µg/mL	50,0 µg/mL	33,3	[14]
	JEV	3,3 µg/mL	10,8 µg/mL	3,3	
	YFV	4,8 µg/mL	21,0 µg/mL	4,3	
Lycoricidine triacetate	DENV	< 5,0 µg/mL	1,5 µg/mL	> 20,0	[14]
	JEV	4,5 µg/mL	3,3 µg/mL	3,6	
	YFV	2,2 µg/mL	4,8 µg/mL	3,8	
Lycorine	DENV	0,16 µM	14,5 µM	90,6	[60]
	ZIKV	0,41 µM		35,4	
	DENV	0,5 µM	4,3 µM	8,6	[72]
	ZIKV	0,9 µM	3,4 µM	3,8	
	ZIKV	0,22-0,39 µM	4,3-21 µM	19,5-54	[15]
	DENV	0,24 µg/mL	2,5 µg/mL	10,4	[14]
	JEV	0,33 µg/mL	2,7 µg/mL	8,2	
	YFV	0,28 µg/mL	2,0 µg/mL	7,3	
	WNV	0,23 µM	24 µM	104	[64]
	AHFV	1,7 µM	16,2 µM	9	[65]
DTMUV	≈ 2 µM	19,0 µM	≈ 9,5	[66]	
Pseudolycorine	DENV	0,39 µg/mL	1,0 µg/mL	2,6	[14]
	JEV	0,28 µg/mL	1,4 µg/mL	5,0	
	YFV	0,35 µg/mL	1,3 µg/mL	3,7	
Narciclasine	DENV	1,5x10 ⁻² µg/mL	0,06 µg/mL	4,0	[14]
	JEV	8x10 ⁻³ µg/mL	3,1x10 ⁻² µg/mL	4,1	
	YFV	6x10 ⁻³ µg/mL	3,7x10 ⁻² µg/mL	6,1	
	DENV	0,02 µM	0,09 µM	4,5	[72]
	ZIKV	0,02 µM	0,12 µM	6	
	ZIKV	0,1 µM	0,4 µM	4	[62]

Alcaloïdes	Virus	EC ₅₀	CC ₅₀	SI	Référence
Narciclasine-4-O-β-D-xylopyranoside	DENV	7,9 µM	39,3 µM	4,9	[72]
	ZIKV	7,9 µM	51,8 µM	6,5	
2-Oxolycorine	DENV	0,5 µM	56,6 µM	113,2	[13]
Pancracine	DENV	0,36 µM	25,9 µM	72,4	[71]
Pancratistatine	DENV	6,3x10 ⁻² µg/mL	0,5 µg/mL	8,0	[14]
	JEV	2,2x10 ⁻² µg/mL	9,2x10 ⁻² µg/mL	4,2	
	YFV	1,6x10 ⁻² µg/mL	7,9x10 ⁻² µg/mL	4,9	
	ZIKV	0,3 µM	1,1 µM	4	[62]
Pretazettine	JEV	0,60 µg/mL	2,3 µg/mL	3,8	[14]
	YFV	0,50 µg/mL	2,8 µg/mL	5,6	
	DENV	0,8 µM	5,4 µM	6,8	[72]
ZIKV	1,9 µM	7,2 µM	3,8		
Trans-dihydrolycoricidine	ZIKV	0,07-0,1 µM	> 50 µM	> 500	[63]
Trans-dihydronarciclasine	DENV	1,5x10 ⁻² µg/mL	6,3x10 ⁻² µg/mL	4,2	[14]
	JEV	4x10 ⁻³ µg/mL	2,5x10 ⁻² µg/mL	5,6	
	YFV	< 3x10 ⁻³ µg/mL	2,7x10 ⁻² µg/mL	> 8,5	
	ZIKV	0,1 µM	0,7 µM	7	[62]
7-Deoxyisonarciclasine	DENV	8,5 µg/mL	50,0 µg/mL	5,9	[14]
	YFV	5,7 µg/mL	23,8 µg/mL	4,2	
7-Deoxy-cis-dihydronarciclasine	DENV	4,4 µg/mL	25,0 µg/mL	5,7	[14]
	JEV	12,7 µg/mL	62,5 µg/mL	4,9	
	YFV	9,6 µg/mL	64,0 µg/mL	6,6	
7-Deoxy-trans-dihydronarciclasine	DENV	0,5 µg/mL	2,5 µg/mL	5,0	[14]
	JEV	3,9x10 ⁻² µg/mL	0,22 µg/mL	5,6	
	YFV	3,7x10 ⁻² µg/mL	0,28 µg/mL	7,5	
Autres alcaloïdes					
Castanospermine	DENV	1-85,7 µM	n.i.	n.i.	[73]
Éméatine	DENV	n.i.	n.i.	n.i.	[75]
Hirsutine	DENV	1,9 µM	> 10 µM	> 5,3	[76]
Tomatidine	DENV	0,82 µM	80,2 µM	97,7	[77]

EC₅₀, concentration effectrice médiane inhibant 50 % de l'infection. CC₅₀, concentration à laquelle on observe 50 % de cytotoxicité. SI, Indice de sélectivité correspondant au ratio CC₅₀/EC₅₀. n.i., non identifié. DENV, virus de la dengue; JEV, virus de l'encéphalite japonaise; YFV, virus de la fièvre jaune; WNV, virus du Nil occidental; AHFV, Virus de la fièvre hémorragique d'Alkhurma; DTMUV, virus de Tembusu du canard.

Tableau 2. Alcaloïdes ayant montré un potentiel antiviral contre le VIH-1

Alcaloïdes	EC ₅₀ /IC ₅₀ *	CC ₅₀	SI	Références
Extraits d'<i>Amaryllidaceae</i>				
Extrait méthanolique de <i>Crinum asiaticum</i> var. <i>japonicum</i>	12,5 µg/mL	200 µg/mL	16	[95]
Autres Alcaloïdes				
Alopérine	1,8 µM	> 86,2 µM	> 36,8	[101]
Alopérine N-(1-butyl)-4- trifluorométhoxy- benzamide (12d)	0,69 µM	> 42,1 µM	> 51,3	[101]
Buchapine	3,0 µM	55,9 µM	18,7	[104]
3-(3-méthyl-2-butenyl)-4- [(3-méthyl-2-butenyl)oxy]- 2(1H)-quinolinone	3,8 µM	71,2 µM	18,7	[104]
Buchapine dérivé #6	2,4 µM	62,6 µM	26,6	[104]
Buchapine dérivé #9	3,2 µM	67,4 µM	20,9	[104]
4-(Isopentyloxy)quinolin-2- ol	3,9 µM	114,7 µM	29,5	[104]
Émétine	≈(1,2-3)×10 ⁻² µM	≈ 0,1 µM	≈ 3,3	[100]
Hernandonine	16,3 µM* IN	n.i.	n.i.	[102]
Laurolitsine	7,7 µM* IN	n.i.	n.i.	[102]
Lindechunine A	21,1 µM* IN	n.i.	n.i.	[102]
Littoraline	142,0 µM* IN	n.i.	n.i.	[98]
7-Oxohernangerine	18,2 µM* IN	n.i.	n.i.	[102]

IC₅₀*, concentration inhibitrice médiane inhibant 50 % d'une activité enzymatique. VIH-1, virus de l'immunodéficience humaine-1; IN, intégrase du VIH-1.

Tableau 3. Alcaloïdes ayant montré un potentiel antiviral contre les coronavirus

Alcaloïdes	Virus	EC ₅₀ /IC ₅₀ * (µM)	CC ₅₀ (µM)	SI	Références
Alcaloïdes d'<i>Amaryllidaceae</i>					
Lycorine	SARS-CoV	1,6x10 ⁻²	15,0	954	[16]
	SARS-CoV-2	0,31	> 40	> 129	[17]
	SARS-CoV-2	0,01	18,8	1878	[133]
	SARS-CoV	1,0	> 50	> 49,0	[132]
	MERS-CoV	2,1	> 50	> 23,6	
	SARS-CoV-2	0,88	> 50	> 57,0	
	HCoV-OC43	0,15	4,4	29,1	[131]
	HCoV-NL63	0,47	3,8	8,1	
	MHV-A59	0,31	3,5	11,3	
Autres alcaloïdes					
Cépharanthine	HCoV-OC43	0,83	11,3	13,6	[140]
Émétine	HCoV-OC43	0,30	2,7	9,0	[131]
	HCoV-NL63	1,4	3,6	2,5	
	MHV-A59	0,1	3,5	29,3	
	MERS-CoV	0,34	3,1	9,1	
	SARS-CoV-2	0,46	56,5	122,7	[138]
Homoharringtonine	SARS-CoV-2	2,6	59,8	23,4	[138]
Indigo	SARS-CoV	752* 3CL ^{pro}	7375	9,8	[142]
Oxysophoridine	SARS-CoV-2	0,18	> 40	> 222	[17]
Tétrandrine	MERS-CoV	7,0	≈ 29,8	≈ 4,3	[141]
	HCoV-OC43	0,33	13,4	40,2	[140]
Tryptanthrine	HCoV-NL63	1,5	> 400	> 242	[143]

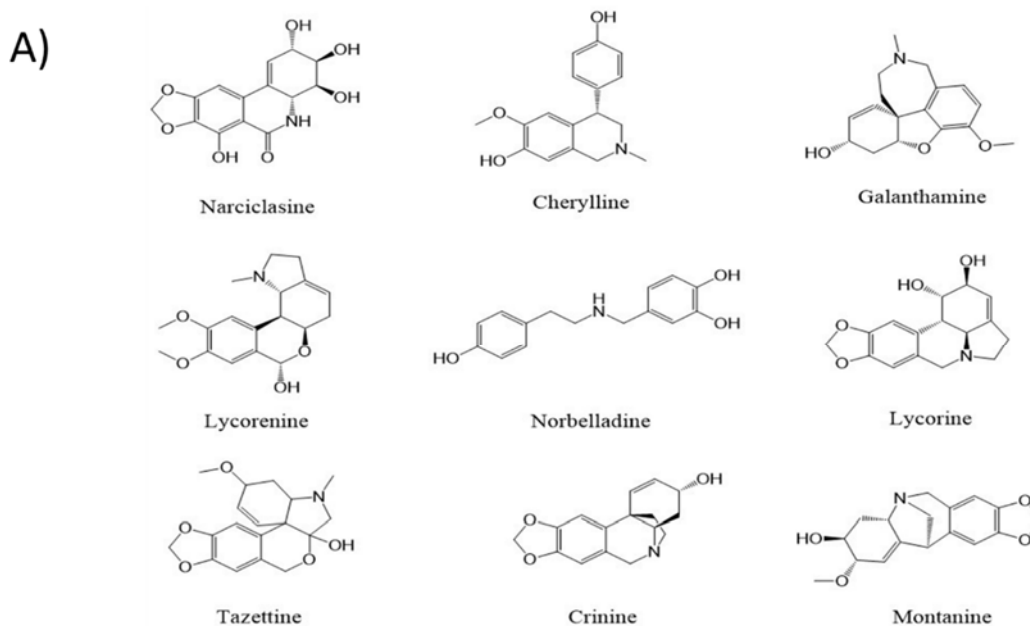
HCoV-OC43, coronavirus humain OC43; MHV-A59, virus de l'hépatite murine; SARS-CoV, coronavirus du syndrome respiratoire aiguë sévère; SARS-CoV-2, coronavirus 2 du syndrome respiratoire aiguë sévère; MERS-CoV, coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient; 3CL^{pro}, protéase de type 3C.

Tableau 4. Alcaloïdes ayant montré un potentiel antiviral contre d'autres virus à ARN

Alcaloïdes	Virus	EC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	SI	Références
Alcaloïdes d'<i>Amaryllidaceae</i>					
Haemanthamine	H5N1	1,5 µM	50 µM	34	[150]
	H1N1	2,1 µM	50 µM	25,0	[149]
	H3N2	3,4 µM	50 µM	14,6	
Hippeastrine	H5N1	47,5 µM	> 317 µM	> 6,7	[150]
11-hydroxyvittatine	H5N1	6,7 µM	> 278 µM	> 41	[150]
Lycorine	CHIKV	0,38-0,75 µM	> 10 µM	> 13,3-26,3	[18]
	SINV	1,1 µM	> 10 µM	9,5	
	SFV	0,8µM	> 10 µM	12,0	
	VEEV	0,31 µM	> 10 µM	32,3	
	H5N1	<0,46 µM	20,9 µM	>45	[150]
	H1N1	2,1 µM	20,9 µM	11	[149]
H3N2	3,4 µM	20,9 µM	6,2		
2α-Methoxy-6-O-ethyloduline	H5N1	2,1 µg/mL	14,4 µg/mL	7,0	[152]
2α-Methoxy-6-O-methyloduline	H5N1	0,69 µg/mL	4,8 µg/mL	6,9	[152]
Trispherine	H5N1	2,7 µg/mL	80,1 µg/mL	29,6	[152]
Autres alcaloïdes					
Berbérine	CHIKV	1,8-1,9 µM	> 100 µM	> 52,6-55,6	[156]
	CHIKV	4,5-12,2 µM	202,6-429,5 µM	35-45	[155]
Tomatidine	CHIKV	1,3-3,9 µM	156-255 µM	65-120	[158]

CHIKV, virus chikungunya; SINV, virus Sindbis; SFV, virus de la forêt de Semliki; VEEV, virus de l'encéphalite équine vénézuélienne.

Figures



B)

Type d'alcaloïdes d'Amaryllidaceae	Structure des cycles (IUPAC)	Couplage phénol	Alcaloïdes représentatifs
Norbelladine	4-((2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)amino).methyl)benzene-1,2-diol	n.a.	Norbelladine, Rystilline
Cherylline	(4S)-4-(4-Hydroxyphenyl)-6-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-7-isoquinolinol	n.a.	Cherylline, Gigantelline
Galanthamine	(4aS,6R,8aS)-5,6,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-4aH-[1]benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol	para-ortho'	Narwedine, Galanthamine
Lycorine	(1S,2S,12bS,12cS)-2,4,5,7,12b,12c-Hexahydro-1H-[1,3]dioxolo[4,5-j]pyrrolo[3,2,1-de]phenanthridine-1,2-diol	ortho-para'	Lycorine, Galanthine
Lycorenine	(7 α)-9,10-Dimethoxy-1-methyllycorenan-7-ol	ortho-para'	Homolycorine, Hippeastrine
Crinine	(3 α)-1,2-Didehydrocrinan-3-ol	para-para'	Crinine, Haemanthamine
Narciclasine	(2S,3R,4S,4aR)-2,3,4,7-Tetrahydroxy-3,4,4a,5-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-6(2H)-on	para-para'	Narciclasine, Pancreatistatine
Tazettine	(3S,4aS,6aS,13bS)-3-Methoxy-5-methyl-3,4,4a,5,6,6a-hexahydro-8H-[1,3]dioxolo[6,7]isochromeno[3,4-c]indole	para-para'	6a-Deoxytazettine, Pretazettine
Montanine	(6R,6aS,8S,9S,11S)-5,6a,7,8,9,11-Hexahydro-9-methoxy-6,11-methano-6H-benzo[b]-1,3-benzodioxolo[5,6-e]azepin-8-ol	para-para'	Pancracine, Montanine

Figure 1. Les différents groupes et structures des alcaloïdes d'Amaryllidaceae.

A) Les neuf groupes d'alcaloïdes d'Amaryllidaceae sont représentés par un alcaloïde type. La norbelladine est le précurseur de la biosynthèse de chaque type d'alcaloïde d'Amaryllidaceae. B) Le tableau présente les neuf familles d'alcaloïdes des Amaryllidaceae en fonction de leur structure chimique (IUPAC) ainsi que quelques alcaloïdes représentatifs de chaque groupe. Les couplages de type phénol sont aussi affichés. N.A., non-applicable; IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*.

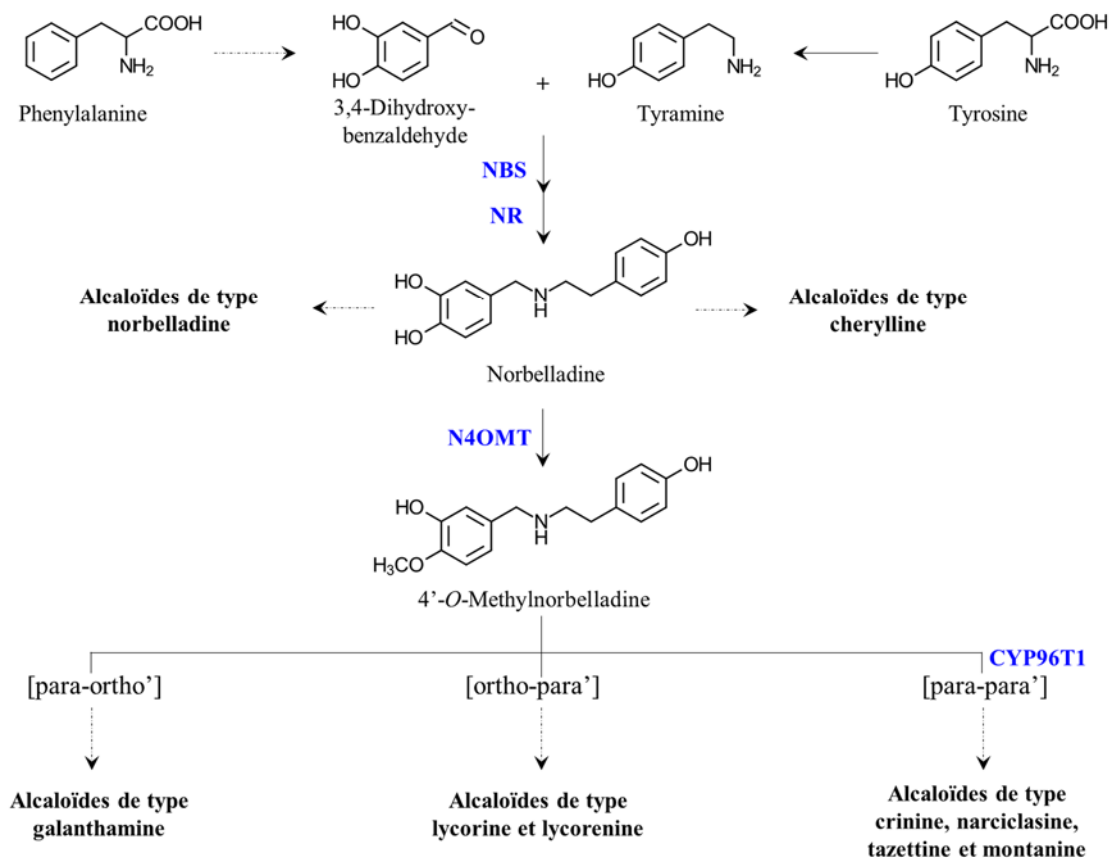


Figure 2. Voie de biosynthèse des principaux types d'alcaloïdes d'*Amaryllidaceae*.

La flèche pleine représente une réaction biochimique tandis que la flèche brisée représente plus d'une réaction biochimique. La condensation de la tyramine et du 3,4-DHBA par la norbelladine synthase (NBS) puis réduction par la norraugsodine/noroxomaritidine réductase (NR) permet la formation de la norbelladine, qui est le précurseur de tous les autres types d'alcaloïdes d'*Amaryllidaceae*. La norbelladine peut ensuite subir divers types de réactions (p. ex. : méthylation, hydroxylation, cyclisation) afin d'obtenir les alcaloïdes de type cherylline et norbelladine. La méthylation par la norbelladine 4'-O-méthyltransférase (N4OMT) permet d'obtenir la 4'-O-méthylnorbelladine, qui peut ensuite subir une cyclisation par couplage oxydatif phénol-phénol' régiosélectif, ce qui permet d'obtenir les formes couplées C-C en para-ortho' (p. ex. : précurseur des alcaloïdes de type galanthamine), ortho-para' (p. ex. : alcaloïdes de type lycorine et lycorénine), et para-para' par la (CYP96T1) (p. ex. : alcaloïdes de type crinine, narciclasine, tazettine et montanine).

Bibliographie

1. 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.
2. Batista C, Shoham S, Ergonul O, Hotez P, Bottazzi ME, Figueroa JP *et al.* Urgent needs to accelerate the race for COVID-19 therapeutics. *EClinicalMedicine.* 2021;36.
3. Hogan AB, Jewell BL, Sherrard-Smith E, Vesga JF, Watson OJ, Whittaker C *et al.* Potential impact of the COVID-19 pandemic on HIV, tuberculosis, and malaria in low-income and middle-income countries: a modelling study. *Lancet Glob Health.* 2020;8(9):e1132-e41.
4. Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol.* 2020;5(6):796-812.
5. WHO. Dengue and severe dengue. 19 mai 2021; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
6. Troncoso A. Zika threatens to become a huge worldwide pandemic. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2016;6(6):520-27.
7. WHO. Zika (maladie à virus). 20 juillet 2018; <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
8. Pattnaik A, Sahoo BR, Pattnaik AK. Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. *Vaccines (Basel).* 2020;8(2):266.
9. Kaptein SJF, Goethals O, Kiemel D, Marchand A, Kesteleyn B, Bonfanti JF *et al.* A pan-serotype dengue virus inhibitor targeting the NS3-NS4B interaction. *Nature.* 2021;598(7881):504-09.
10. WHO. HIV/AIDS. 31 octobre 2021; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
11. Gibert CL. Treatment Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents: An Update. *Fed Pract.* 2016;33(Suppl 3):31S-36S.
12. Challacombe SJ. Global inequalities in HIV infection. *Oral Dis.* 2020;26(S1):16-21.
13. Wang P, Li LF, Wang QY, Shang LQ, Shi PY, Yin Z. Anti-dengue-virus activity and structure-activity relationship studies of lycorine derivatives. *ChemMedChem.* 2014;9(7):1522-33.

14. Gabrielsen B, Monath TP, Huggins JW, Kefauver DF, Pettit GR, Groszek G *et al.* Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. *J Nat Prod.* 1992;55(11):1569-81.
15. Chen H, Lao Z, Xu J, Li Z, Long H, Li D *et al.* Antiviral activity of lycorine against Zika virus in vivo and in vitro. *Virology.* 2020;546:88-97.
16. Li SY, Chen C, Zhang HQ, Guo HY, Wang H, Wang L *et al.* Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Res.* 2005;67(1):18-23.
17. Zhang YN, Zhang QY, Li XD, Xiong J, Xiao SQ, Wang Z *et al.* Gemcitabine, lycorine and oxysophoridine inhibit novel coronavirus (SARS-CoV-2) in cell culture. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1170-73.
18. Li N, Wang Z, Wang R, Zhang ZR, Zhang YN, Deng CL *et al.* In Vitro Inhibition of Alphaviruses by Lycorine. *Virol Sin.* 2021;36(6):1465-74.
19. Ka S, Koirala M, Mérindol N, Desgagné-Penix I. Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules.* 2020;25(21):4901.
20. Desgagné-Penix I. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochem Rev.* 2021;20(2):409-31.
21. Hartwell JL. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia.* 1971;34(4):386-425.
22. Heinrich M, Mah J, Amirkia V. Alkaloids Used as Medicines: Structural Phytochemistry Meets Biodiversity-An Update and Forward Look. *Molecules.* 2021;26(7).
23. Robinson T. Metabolism and Function of Alkaloids in Plants. *Science.* 1974;184(4135):430-35.
24. Gerrard AW. The proximate principles of the *Narcissus pseudonarcissus*. *Pharm J.* 1877;8:214.
25. Wang Y-H, Wan Q-L, Gu C-D, Luo H-R, Long C-L. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chem Cent J.* 2012;6(1):96-96.
26. Szlávik L, Gyuris A, Minárovits J, Forgo P, Molnár J, Hohmann J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* 2004;70(9):871-3.
27. Tan CX, Schrader KK, Mizuno CS, Rimando AM. Activity of lycorine analogues against the fish bacterial pathogen *Flavobacterium columnare*. *J Agric Food Chem.* 2011;59(11):5977-85.

28. Cedrón JC, Gutiérrez D, Flores N, Ravelo AG, Estévez-Braun A. Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(13):4694-701.
29. Lamoral-Theys D, Andolfi A, Van Goietsenoven G, Cimmino A, Le Calvé B, Wauthoz N *et al.* Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *J Med Chem.* 2009;52(20):6244-56.
30. Shen JW, Ruan Y, Ren W, Ma BJ, Wang XL, Zheng CF. Lycorine: a potential broad-spectrum agent against crop pathogenic fungi. *J Microbiol Biotechnol.* 2014;24(3):354-8.
31. Jin Z, Yao G. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2019;36(10):1462-88.
32. Singh A, Massicotte MA, Garand A, Tousignant L, Ouellette V, Berube G *et al.* Cloning and characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis. *BMC Plant Biol.* 2018;18(1):338.
33. Tousignant L, Diaz-Garza AM, Majhi BB, Gélinas S-E, Singh A, Desgagne-Penix I. Transcriptome analysis of *Leucojum aestivum* and identification of genes involved in norbelladine biosynthesis. *Planta.* 2022;255(2):30.
34. Kilgore M, Holland C, Jez JM, Crow JA, Kutchan TM. Identification of a Noroxomaritidine Reductase with Amaryllidaceae Alkaloid Biosynthesis Related Activities. *J Biol Chem.* 2016;291(32):16740-52.
35. Kilgore MB, Augustin MM, Starks CM, O'Neil-Johnson M, May GD, Crow JA *et al.* Cloning and characterization of a norbelladine 4'-O-methyltransferase involved in the biosynthesis of the Alzheimer's drug galanthamine in *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus*. *PLoS One.* 2014;9(7):e103223.
36. El Tahchy A, Boisbrun M, Ptak A, Dupire F, Chretien F, Henry M *et al.* New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures. *Acta biochimica Polonica.* 2010;57(1):75-82.
37. Kilgore MB, Augustin MM, May GD, Crow JA, Kutchan TM. CYP96T1 of *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus* Catalyzes Formation of the Para-Para' C-C Phenol Couple in the Amaryllidaceae Alkaloids. *Front Plant Sci.* 2016;7:225.
38. Zhao R, Wang M, Cao J, Shen J, Zhou X, Wang D *et al.* Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development. *Life.* 2021;11(7):615.
39. Berthoux L. The Restrictome of Flaviviruses. *Virol Sin.* 2020;35(4):363-77.

40. Shahid I. RNA Association, RNA Interference, and microRNA Pathways in Dengue Fever Virus-Host Interaction. *Current Topics in Tropical Emerging Diseases and Travel Medicine*. 2018;6:93-114.
41. Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology*. 1996;216(2):317-25.
42. Koonin EV. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol*. 1993;74 (Pt 4):733-40.
43. Wengler G, Czaya G, Färber PM, Hegemann JH. In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *J Gen Virol*. 1991;72 (Pt 4):851-8.
44. Warrener P, Tamura JK, Collett MS. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J Virol*. 1993;67(2):989-96.
45. Oliveira LG, Peron JPS. Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers. *J Leukoc Biol*. 2019;106(3):695-701.
46. Chu JJH, Ng ML. Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway. *J Virol*. 2004;78(19):10543-55.
47. Ramanathan HN, Zhang S, Douam F, Mar KB, Chang J, Yang PL *et al*. A Sensitive Yellow Fever Virus Entry Reporter Identifies Valosin-Containing Protein (VCP/p97) as an Essential Host Factor for Flavivirus Uncoating. *mBio*. 2020;11(2).
48. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S *et al*. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res*. 2010;87(2):125-48.
49. Paul D, Bartenschlager R. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol*. 2013;2(2):32-48.
50. Freppel W, Roy M, Chatel-Chaix L. [Flaviviridae and mitochondria: Everything you always wanted to know about their relationship but were afraid to ask]. *Virologie (Montrouge)*. 2021;25(5):245-62.
51. You S, Padmanabhan R. A novel in vitro replication system for Dengue virus: initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'-and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *J Biol Chem*. 1999;274(47):33714-22.

52. Mazeaud C, Freppel W, Chatel-Chaix L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Front Genet.* 2018;9:595-95.
53. Khromykh AA, Varnavski AN, Westaway EG. Encapsidation of the flavivirus kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans. *J Virol.* 1998;72(7):5967-77.
54. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002;108(5):717-25.
55. Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum. *J Virol.* 2002;76(11):5480-91.
56. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR *et al.* Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science.* 2008;319(5871):1834-37.
57. Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J *et al.* The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science.* 2008;319(5871):1830-34.
58. Stadler K, Allison SL, Schlich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol.* 1997;71(11):8475-81.
59. Duri ZJ, Scovill JP, Huggins JW. Activity of a methanolic extract of Zimbabwean *Crinum macowanii* against exotic RNA viruses in vitro. *Phytother Res.* 1994;8(2):121-22.
60. Ka S, Merindol N, Sow AA, Singh A, Landelouci K, Plourde MB *et al.* Amaryllidaceae Alkaloid Cherylline Inhibits the Replication of Dengue and Zika Viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(9):e0039821.
61. Ka S, Merindol N, Seck I, Ricard S, Diop A, Saad C *et al.* Biological Investigation of Amaryllidaceae Alkaloid Extracts from the Bulbs of *Pancreatium trianthum* Collected in the Senegalese Flora. *Molecules.* 2021;26:7382.
62. Revu O, Zepeda-Velázquez C, Nielsen AJ, McNulty J, Yolken RH, Jones-Brando L. Total Synthesis of the Natural Product (+)-trans-Dihydronarciclasine via an Asymmetric Organocatalytic [3+3]-Cycloaddition and discovery of its potent anti-Zika Virus (ZIKV) Activity. *ChemistrySelect.* 2016;1(18):5895-99.
63. D'Aiuto L, McNulty J, Hartline C, Demers M, Kalkeri R, Wood J *et al.* R430: A potent inhibitor of DNA and RNA viruses. *Sci Rep.* 2018;8(1):16662.

64. Zou G, Puig-Basagoiti F, Zhang B, Qing M, Chen L, Pankiewicz KW *et al.* A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology*. 2009;384(1):242-52.
65. Flint M, McMullan LK, Dodd KA, Bird BH, Khristova ML, Nichol ST *et al.* Inhibitors of the tick-borne, hemorrhagic fever-associated flaviviruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3206-16.
66. Lv X, Zhang M, Yu S, Zhang C, Fang T, Liu D *et al.* Antiviral and virucidal activities of lycorine on duck tembusu virus in vitro by blocking viral internalization and entry. *Poult Sci*. 2021;100(10):101404.
67. Chatel-Chaix L, Fischl W, Scaturro P, Cortese M, Kallis S, Bartenschlager M *et al.* A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication. *J Virol*. 2015;89(14):7170-86.
68. Nagy PD, Pogany J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(2):137-49.
69. Chatel-Chaix C, Bartenschlager R. Dengue Virus- and Hepatitis C Virus-Induced Replication and Assembly Compartments: the Enemy Inside - Caught in the Web. *J Virol*. 2014;88(11):5907-11.
70. Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(3):125-42.
71. Masi M, Di Lecce R, Mérindol N, Girard M-P, Berthoux L, Desgagné-Penix I *et al.* Cytotoxicity and Antiviral Properties of Alkaloids Isolated from *Pancreatium maritimum*. *Toxins*. 2022;14(4):262.
72. de Castro Barbosa E, Alves TMA, Kohlhoff M, Jangola STG, Pires DEV, Figueiredo ACC *et al.* Searching for plant-derived antivirals against dengue virus and Zika virus. *Virol J*. 2022;19(1):31.
73. Whitby K, Pierson TC, Geiss B, Lane K, Engle M, Zhou Y *et al.* Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo. *J Virol*. 2005;79(14):8698-706.
74. Courageot MP, Frenkiel MP, Duarte Dos Santos C, Deubel V, Desprès P. Alpha-Glucosidase Inhibitors Reduce Dengue Virus Production by Affecting the Initial Steps of Virion Morphogenesis in the Endoplasmic Reticulum. *J Virol*. 2000;74(1):564-72.
75. Low J, Chen K, Wu K, Ng M, Chu JH. Antiviral Activity of Emetine Dihydrochloride Against Dengue Virus Infection. *J Antivir Antiretrovir*. 2009;1:62-71.

76. Hishiki T, Kato F, Tajima S, Toume K, Umezaki M, Takasaki T *et al.* Hirsutine, an Indole Alkaloid of *Uncaria rhynchophylla*, Inhibits Late Step in Dengue Virus Lifecycle. *Front Microbiol.* 2017;8(1674).
77. Diossa-Toro M, Troost B, van de Pol D, Heberle AM, Urcuqui-Inchima S, Thedieck K *et al.* Tomatidine, a novel antiviral compound towards dengue virus. *Antiviral Res.* 2019;161:90-99.
78. Fraser J, Wang C, Chan K, Vasudevan S, Jans D. Novel dengue virus inhibitor 4-HPR activates ATF4 independent of protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase and elevates levels of eIF2 α phosphorylation in virus infected cells. *Antiviral Research.* 2016;130:1-6.
79. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljubic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO Rep* 2016;17(10):1374-95.
80. Levy JA. HIV and the pathogenesis of AIDS. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2007.
81. Chiu IM, Yaniv A, Dahlberg JE, Gazit A, Skuntz SF, Tronick SR *et al.* Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature.* 1985;317(6035):366-8.
82. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1(1):a006841.
83. Naif HM. Pathogenesis of HIV Infection. *Infect Dis Rep.* 2013;5(Suppl 1):e6-e6.
84. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell.* 1985;40(1):9-17.
85. Brasseur R, Cornet B, Burny A, Vandenbranden M, Ruyschaert JM. Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1988;4(2):83-90.
86. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 1996;272(5263):872-77.
87. Sumner RP, Harrison L, Touizer E, Peacock TP, Spencer M, Zuliani-Alvarez L *et al.* Disrupting HIV-1 capsid formation causes cGAS sensing of viral DNA. *EMBO J.* 2020;39(20):e103958.
88. Berry F, Khalfi P, Maillot F, Seignerès P, Sid Ahmed S, Di Nunzio F. [Host nuclear pore factors: team players of HIV-1 nuclear translocation and integration]. *Med Sci (Paris).* 2018;34(6-7):512-15.

89. Khalfi S, Merindol N, Berthoux L. [Cellular and antiviral functions of TRIM5alpha]. *Virologie (Montrouge)*. 2020;24(6):369-80.
90. Burdick RC, Li C, Munshi M, Rawson JMO, Nagashima K, Hu WS *et al*. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(10):5486-93.
91. Li C, Burdick RC, Nagashima K, Hu WS, Pathak VK. HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(10).
92. Balvay L, Lastra ML, Sargueil B, Darlix J-L, Ohlmann T. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(2):128-40.
93. Sundquist WI, Krausslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(7):a006924.
94. Rein A. RNA Packaging in HIV. *Trends Microbiol*. 2019;27(8):715-23.
95. Min BS, Kim YH, Tomiyama M, Nakamura N, Miyashiro H, Otake T *et al*. Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. *Phytother Res*. 2001;15(6):481-6.
96. Ali H, König GM, Khalid SA, Wright AD, Kaminsky R. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. *J Ethnopharmacol*. 2002;83(3):219-28.
97. Shawky E. In-silico profiling of the biological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *J Pharm Pharmacol*. 2017;69(11):1592-605.
98. Lin L-Z, Hu S-F, Chai H-B, Pengsuparp T, Pezzuto JM, Cordell GA *et al*. Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. *Phytochemistry*. 1995;40(4):1295-98.
99. Peng X, Sova P, Green RR, Thomas MJ, Korth MJ, Proll S *et al*. Deep sequencing of HIV-infected cells: insights into nascent transcription and host-directed therapy. *J Virol*. 2014;88(16):8768-82.
100. Chaves Valadão AL, Abreu CM, Dias JZ, Arantes P, Verli H, Tanuri A *et al*. Natural Plant Alkaloid (Emetine) Inhibits HIV-1 Replication by Interfering with Reverse Transcriptase Activity. *Molecules*. 2015;20(6):11474-89.
101. Dang Z, Zhu L, Lai W, Bogerd H, Lee KH, Huang L *et al*. Aloperine and Its Derivatives as a New Class of HIV-1 Entry Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2016;7(3):240-4.

102. Zhang C-f, Nakamura N, Tewtrakul S, Hattori M, Sun Q-s, Wang Z-t *et al.* Sesquiterpenes and Alkaloids from *Lindera chunii* and Their Inhibitory Activities against HIV-1 Integrase. *Chem Pharm Bull.* 2002;50(9):1195-200.
103. McCormick JL, McKee TC, Cardellina JH, 2nd, Boyd MR. HIV inhibitory natural products. 26. Quinoline alkaloids from *Euodia roxburghiana*. *J Nat Prod.* 1996;59(5):469-71.
104. Ahmed N, Brahmabhatt KG, Sabde S, Mitra D, Singh IP, Bhutani KK. Synthesis and anti-HIV activity of alkylated quinoline 2,4-diols. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(8):2872-9.
105. Talbot PJ, Desforges M. From common colds to COVID-19: potential neurological consequences of a coronavirus infection. *Virologie (Montrouge).* 2022;26(4):283-302.
106. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021;384(5):403-16.
107. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cardenas V, Shukarev G, Grinsztejn B *et al.* Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(23):2187-201.
108. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2603-15.
109. Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Fujisaki S, Ito M *et al.* Efficacy of Antibodies and Antiviral Drugs against Covid-19 Omicron Variant. *N Engl J Med.* 2022;386(10):995-98.
110. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS *et al.* The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science.* 2003;300(5624):1399-404.
111. Grotzinger C, Heusipp G, Ziebuhr J, Harms U, Suss J, Siddell SG. Characterization of a 105-kDa polypeptide encoded in gene 1 of the human coronavirus HCV 229E. *Virology.* 1996;222(1):227-35.
112. Prentice E, McAuliffe J, Lu X, Subbarao K, Denison MR. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *J Virol.* 2004;78(18):9977-86.
113. Siu YL, Teoh KT, Lo J, Chan CM, Kien F, Escriou N *et al.* The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *J Virol.* 2008;82(22):11318-30.

114. Broer R, Boson B, Spaan W, Cosset FL, Corver J. Important role for the transmembrane domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein during entry. *J Virol*. 2006;80(3):1302-10.
115. Beniac DR, Andonov A, Grudeski E, Booth TF. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(8):751-52.
116. Delmas B, Laude H. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol*. 1990;64(11):5367-75.
117. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P *et al*. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*. 2021;10(4):821.
118. Chang C-k, Sue S-C, Yu T-h, Hsieh C-M, Tsai C-K, Chiang Y-C *et al*. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J Biomed Sci*. 2006;13(1):59-72.
119. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281-92.e6.
120. Yuan Y, Cao D, Zhang Y, Ma J, Qi J, Wang Q *et al*. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun*. 2017;8:15092.
121. Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellicchio CB, Shapiro LH, Look AT *et al*. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*. 1992;357(6377):420-2.
122. Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pöhlmann S. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7988-93.
123. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2015;1282:1-23.
124. Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S *et al*. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol*. 2011;85(9):4122-34.
125. Poonam B, Gill KP. Coronavirus: History, Genome Structure and Pathogenesis. *Coronaviruses*. 2021;2(3):325-38.
126. Sethna PB, Hung SL, Brian DA. Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(14):5626-30.

127. Knoops K, Kikkert M, Worm SHEvd, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ *et al.* SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* 2008;6(9):e226-e26.
128. Stertz S, Reichelt M, Spiegel M, Kuri T, Martínez-Sobrido L, García-Sastre A *et al.* The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology.* 2007;361(2):304-15.
129. Bost AG, Prentice E, Denison MR. Mouse hepatitis virus replicase protein complexes are translocated to sites of M protein accumulation in the ERGIC at late times of infection. *Virology.* 2001;285(1):21-9.
130. Tooze J, Tooze SA, Fuller SD. Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. *J Cell Biol.* 1987;105(3):1215-26.
131. Shen L, Niu J, Wang C, Huang B, Wang W, Zhu N *et al.* High-Throughput Screening and Identification of Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Coronaviruses. *J Virol.* 2019;93(12):e00023-19.
132. Jin Y-H, Min JS, Jeon S, Lee J, Kim S, Park T *et al.* Lycorine, a non-nucleoside RNA dependent RNA polymerase inhibitor, as potential treatment for emerging coronavirus infections. *Phytomedicine.* 2021;86:153440.
133. Narayanan A, Narwal M, Majowicz SA, Varricchio C, Toner SA, Ballatore C *et al.* Identification of SARS-CoV-2 inhibitors targeting Mpro and PLpro using in-cell-protease assay. *Commun Biol.* 2022;5(1):169.
134. Fielding BC, da Silva Maia Bezerra Filho C, Ismail NSM, Sousa DP. Alkaloids: Therapeutic Potential against Human Coronaviruses. *Molecules.* 2020;25(23).
135. Alrasheid AA, Babiker MY, Awad TA. Evaluation of certain medicinal plants compounds as new potential inhibitors of novel corona virus (COVID-19) using molecular docking analysis. *In Silico Pharmacol.* 2021;9(1):10.
136. Kumar N, Singh A, Gulati HK, Bhagat K, Kaur K, Kaur J *et al.* Phytoconstituents from ten natural herbs as potent inhibitors of main protease enzyme of SARS-COV-2: In silico study. *Phytomed Plus.* 2021;1(4):100083.
137. Khandelwal N, Chander Y, Rawat KD, Riyesh T, Nishanth C, Sharma S *et al.* Emetine inhibits replication of RNA and DNA viruses without generating drug-resistant virus variants. *Antiviral Res.* 2017;144:196-204.
138. Choy K-T, Wong AY-L, Kaewpreedee P, Sia SF, Chen D, Hui KPY *et al.* Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antiviral Res.* 2020;178:104786-86.

139. Dong H-J, Wang Z-H, Meng W, Li C-C, Hu Y-X, Zhou L *et al.* The natural compound homoharringtonine presents broad antiviral activity in vitro and in vivo. *Viruses*. 2018;10(11):601.
140. Kim DE, Min JS, Jang MS, Lee JY, Shin YS, Song JH *et al.* Natural Bis-Benzylisoquinoline Alkaloids-Tetrandrine, Fangchinoline, and Cepharanthine, Inhibit Human Coronavirus OC43 Infection of MRC-5 Human Lung Cells. *Biomolecules*. 2019;9(11).
141. Gunaratne GS, Yang Y, Li F, Walseth TF, Marchant JS. NAADP-dependent Ca(2+) signaling regulates Middle East respiratory syndrome-coronavirus pseudovirus translocation through the endolysosomal system. *Cell Calcium*. 2018;75:30-41.
142. Lin CW, Tsai FJ, Tsai CH, Lai CC, Wan L, Ho TY *et al.* Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds. *Antiviral Res*. 2005;68(1):36-42.
143. Tsai YC, Lee CL, Yen HR, Chang YS, Lin YP, Huang SH *et al.* Antiviral Action of Tryptanthrin Isolated from *Strobilanthes cusia* Leaf against Human Coronavirus NL63. *Biomolecules*. 2020;10(3).
144. WHO. Chikungunya. 15 septembre 2020; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
145. Vairo F, Haider N, Kock R, Ntoumi F, Ippolito G, Zumla A. Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(4):1003-25.
146. Uyeki TM, Hui DS, Zambon M, Wentworth DE, Monto AS. Influenza. *Lancet*. 2022;400(10353):693-706.
147. Hien TT, Liem NT, Dung NT, San LT, Mai PP, Chau NvV *et al.* Avian Influenza A (H5N1) in 10 Patients in Vietnam. *N Engl J Med*. 2004;350(12):1179-88.
148. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJD, Chau TNB *et al.* Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*. 2006;12(10):1203-07.
149. Jun H, Wen-Bao Q, Jin T, Pei-Rong J, Guo-Qian L, Chang-Hui Z *et al.* Amaryllidaceae Alkaloids Exhibit Anti-Influenza Activity in MDCK Cells, an Investigation of Amaryllidaceae Alkaloids and MDCK Cells Insight. *J Anim Vet Adv*. 2012;11(14):2485-92.
150. He J, Qi WB, Wang L, Tian J, Jiao PR, Liu GQ *et al.* Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(6):922-31.

151. Yang L, Zhang JH, Zhang XL, Lao GJ, Su GM, Wang L *et al.* Tandem mass tag-based quantitative proteomic analysis of lycorine treatment in highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection. *PeerJ*. 2019;7:e7697.
152. Huang S-D, Zhang Y, He H-P, Li S-F, Tang G-H, Chen D-Z *et al.* A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Chin J Nat Med*. 2013;11(4):406-10.
153. Nair JJ, van Staden J. Antiviral alkaloid principles of the plant family Amaryllidaceae. *Phytomedicine*. 2023;108:154480.
154. Liu X-s, Jiang J, Jiao X-y, Wu Y-e, Lin J-h, Cai Y-m. Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells. *Cancer Lett*. 2009;274(1):16-24.
155. Varghese FS, Thaa B, Amrun SN, Simarmata D, Rausalu K, Nyman TA *et al.* The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *J Virol*. 2016;90(21):9743-57.
156. Varghese FS, Kaukinen P, Gläsker S, Bepalov M, Hanski L, Wennerberg K *et al.* Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. *Antiviral Res*. 2016;126:117-24.
157. Troost B, Mulder LM, Diosa-Toro M, van de Pol D, Rodenhuis-Zybert IA, Smit JM. Tomatidine, a natural steroidal alkaloid shows antiviral activity towards chikungunya virus in vitro. *Sci Rep*. 2020;10(1):6364-64.
158. Troost-Kind B, van Hemert MJ, van de Pol D, van der Ende-Metselaar H, Merits A, Borggrewe M *et al.* Tomatidine reduces Chikungunya virus progeny release by controlling viral protein expression. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(11):e0009916.
159. Chiu F-L, Lin J-K. Tomatidine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF- κ B and JNK pathways in LPS-stimulated mouse macrophages. *FEBS Lett*. 2008;582(16):2407-12.
160. Kuo C-Y, Huang W-C, Liou C-J, Chen L-C, Shen J-J, Kuo M-L. Tomatidine Attenuates Airway Hyperresponsiveness and Inflammation by Suppressing Th2 Cytokines in a Mouse Model of Asthma. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:5261803.
161. Cordell GA, Quinn-Beattie ML, Farnsworth NR. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother Res*. 2001;15(3):183-205.
162. De Leo P, Dalessandro G, De Santis A, Arrigoni O. Inhibitory effect of lycorine on cell division and cell elongation. *Plant Cell Physiol*. 1973;14(3):481-86.
163. Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA, Ruangrunsi N. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *J Nat Prod*. 1993;56(8):1331-38.

164. Liu J, Hu W-X, He L-F, Ye M, Li Y. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS Lett.* 2004;578(3):245-50.
165. Liu J, Li Y, Tang L, Zhang G, Hu W. Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells. *Biomed Pharmacother.* 2007;61(4):229-34.
166. Li Y, Liu J, Tang L-J, Shi Y-W, Ren W, Hu W-X. Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncol Rep.* 2007;17(2):377-84.
167. McNulty J, Nair JJ, Bastida J, Pandey S, Griffin C. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry.* 2009;70(7):913-19.
168. Ieven M, van den Berghe DA, Vlietinck AJ. Plant antiviral agents. IV. Influence of lycorine on growth pattern of three animal viruses. *Planta Med.* 1983;49(2):109-14.
169. Grollman AP. Structural basis for inhibition of protein synthesis by emetine and cycloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1966;56(6):1867-74.
170. Wong W, Bai X-c, Brown A, Fernandez IS, Hanssen E, Condrón M *et al.* Cryo-EM structure of the Plasmodium falciparum 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine. *Elife.* 2014;3:e03080.
171. Tan S, Banwell MG, Ye W-C, Lan P, White LV. The Inhibition of RNA Viruses by Amaryllidaceae Alkaloids: Opportunities for the Development of Broad-Spectrum Anti-Coronavirus Drugs. *Chem Asian J.* 2022;17(4):e202200011.
172. Diamond A, Desgagné-Penix I. Metabolic engineering for the production of plant isoquinoline alkaloids. *Plant Biotechnol J.* 2016;14(6):1319-28.