

Virus SRAS-CoV: Un potentiel inhibiteur naturel, la lactoferrine

SARS-CoV virus : A potential natural inhibitor, lactoferrin

Résumé

Le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV) a provoqué des maladies respiratoires. En décembre 2019, une nouvelle maladie respiratoire infectieuse est apparue, appelée *coronavirus disease-19* (COVID-19). Provoquée par un nouveau SRAS-coronavirus pathogène-2 (SRAS-CoV-2), sa rapide propagation internationale pose une urgence sanitaire mondiale.

La première étape d'initiation de l'infection virale est l'entrée en contact du virus et de la cellule hôte. Cette liaison se réaliserait entre la glycoprotéine de spicule S du SRAS-CoV-2, et du SRAS-CoV, et deux récepteurs qui agiraient de concert : d'abord avec l'héparane sulfate via des protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPG), puis avec un récepteur bien identifié l'enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (ACE2). Les HSPG, qui sont des sites d'ancrage abondants, permettraient la concentration des virus à la surface des cellules et faciliteraient la liaison avec l'ACE2, récepteur spécifique qui favorise l'entrée dans la cellule hôte.

Afin d'empêcher l'infection et ses conséquences pathologiques, il faut enrayer les liaisons entre le SRAS-CoV-2 et ses récepteurs le plus tôt possible, afin d'inhiber la réplication virale et les conséquences pathologiques d'un blocage des fonctions physiologiques de l'ACE2, via son substrat l'angiotensine II. La lactoferrine, qui est une protéine polyvalente pour la défense de l'hôte, se lie aux HSPG, sans perturber l'ACE2. Elle bloquerait l'interaction entre les SRAS-CoV et les cellules hôtes. Cette inhibition dose-dépendante correspondrait à une saturation des sites HSPG à proximité du récepteur spécifique ACE2. Ainsi, cette glycoprotéine non-toxique pourrait jouer un rôle protecteur dans la défense de l'hôte contre l'infection par le SRAS-CoV-2. Selon l'hypothèse médicale que présentée par cet article de synthèse, la lactoferrine pourrait avoir des applications thérapeutiques potentielles comme médicament candidat pour la prévention dans le cas de personnes à risques et le traitement des maladies provoquées par le SRAS-CoV-2 comme le COVID-19. Il serait tout à fait intéressant de tester cette molécule naturelle non-toxique dans des essais cliniques par administration orale.

Mots Clés

Coronavirus ; SRAS-CoV-2 ; Covid-19 ; Héparane sulfate ; lactoferrine ; antiviral ; inhibition

Coronavirus ; SARS-CoV-2 ; covid-19 ; Heparan sulfate ; lactoferrin ; antiviral ; inhibition

Introduction

Depuis plus de 60 ans, plusieurs pandémies virales ont touché différents continents avec une mortalité élevée. Les deux premières concernent le genre *Alphainfluenzavirus* de la famille des *Orthomyxoviridae*. Fin 1956, le sous-type H2N2 du virus de la grippe A frappa plusieurs provinces chinoises du Yunnan et du Guizhou, puis Singapour et Hong Kong, avant d'atteindre le continent américain et l'Europe en quelques mois. La grippe de Hong Kong avec comme virus A/H3N2, serait d'abord apparue en Chine en 1968 avant de se diffuser à grande échelle à Hong Kong, puis se répandre sur tout le globe, dont l'Europe jusqu'en 1970. Et la grippe A/H1N1, qui dura de 2009 à 2010, fut

Plusieurs membres de la famille des *Coronaviridae* circulent constamment dans la population humaine et provoquent généralement une maladie respiratoire bénigne. En revanche, le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV) et le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) ont provoqué des maladies respiratoires graves chez les individus atteints, le SRAS et le MERS. Le SRAS est apparu fin 2002 dans la province du Guangdong, en Chine (Song Z *et al.*, 2019). En décembre 2019, une nouvelle maladie respiratoire infectieuse est apparue à Wuhan, dans la province du Hubei, en Chine, désor-

mais appelée *coronavirus disease-19* (COVID-19). Provoquée par un nouveau SRAS-coronavirus pathogène-2 (SRAS-CoV-2), sa rapide propagation internationale pose une urgence sanitaire mondiale.

Dans la compréhension des mécanismes de contamination, les interactions virus-récepteur jouent un rôle régulateur clé dans la gamme d'hôtes viraux, le tropisme tissulaire et la pathogenèse virale. Les virus utilisent des stratégies insidieuses pour se fixer à un ou plusieurs récepteurs, surmonter la barrière de la membrane plasmique, entrer et accéder à la machinerie des cellules hôtes pour sa réplication. La protéine de fixation virale peut être considérée comme la « clé » qui déverrouille les cellules hôtes en interagissant avec le « verrou » - le récepteur - à la surface des cellules (Maginnis, 2018). L'inhibition de ces interactions est essentielle pour que les virus n'envahissent pas les cellules hôtes.

Dans cet article de synthèse, nous mettrons en évidence la double conséquence de la fixation du SRAS-CoV-2 sur ses récepteurs, l'ACE2 et l'héparane sulfate, dans la réplication du virus et dans le développement des symptômes, ainsi que l'hypothèse médicale relative au rôle de la lactoferrine pour inhiber ce processus délétère.

Mécanisme d'adhésion : rôle de la glycoprotéine de spicule S

Le SRAS-CoV-2 est un virus enveloppé à ARN à simple brin à polarité positive qui code pour quatre protéines structurales principales : S, la glycoprotéine de spicule ; E, la protéine d'enveloppe ; M, la glycoprotéine membranaire et N, la protéine nucléocapside (Xu J *et al.*, 2003). La glycoprotéine S est le principal antigène présent à la surface du virus. Cette protéine de fusion virale de classe I (Bosch *et al.*, 2003) comporte deux sous-unités, nommées S1 et S2. La sous-unité S1 reconnaît le ou les récepteurs de fusion. Cette association avec le récepteur cellulaire permet l'arrimage, puis l'insertion du peptide de fusion présent sur S2 et conduit à l'entrée du virus dans la cellule, via la fusion entre la membrane et l'enveloppe virale. Cette entrée nécessite un amorçage de la protéine S par une protéase cellulaire, la sérine protéase transmembranaire TMPRSS2, qui entraîne le clivage de la protéine S aux sites S1 / S2 (Hoffmann *et al.*, 2020). Il est à noter que deux cystéines (C822 et C833) dans S2 sont considérées comme formant une liaison disulfure interne, donnant à ce domaine une structure en boucle. Ainsi, l'activité de S2 dépend de la conformation donnée par la formation d'une liaison disulfure interne (Lai *et al.*, 2017), sans doute par un pH acide (Hofmann *et al.*, 2004).

Le récepteur identifié du SRAS-CoV-2 est une métallopeptidase à zinc nommée l'enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (ACE2). Les domaines de liaison aux récepteurs de la glycoprotéine de spicule S du SRAS-CoV-2 et du SRAS-CoV se lient avec des affinités similaires à l'ACE2 humain (Walls *et al.*, 2020). L'ACE2 est abondamment présente chez l'homme sur les cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires et les entérocytes de l'intestin grêle. Et, l'ACE2 est également présente sur les cellules endothéliales artérielles et veineuses et les cellules des muscles lisses de nombreux organes (muqueuse buccale et nasale, nasopharynx, estomac, colon, peau, ganglions lymphatiques, thymus, moelle osseuse, rate, foie, rein et cerveau) (Hamming *et al.*, 2004). Il existe deux formes fonctionnelles et distinctes de l'ACE2 : un domaine extracellulaire, qui agit comme un récepteur pour la spicule du SRAS-CoV-2 et un domaine transmembranaire structurel, qui ancre le domaine extracellulaire à la membrane plasmique (Du *et al.*, 2009). L'enzyme contient une fraction glucidique, constituée de fucose, mannose, galactose, N-acétylglucosamine et acide N-acétylneuraminique, avec des taux différents selon les tissus (Scharpé *et al.*, 1986) (Das & Soffer, 1975). L'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac ou NANA) est le principal acide sialique présent dans les cellules humaines. Les acides sialiques sont des monosaccharides acides présents à l'extrémité des chaînes d'oses présentes sur les protéines transmembranaires cellulaires ; ils sont des composants essentiels de la reconnaissance des ligands. De nombreux virus se fixent sur des glycanes contenant de l'acide sialique comme les virus influenza, réovirus, adénovirus et rotavirus (Stencel-Baerenwald *et al.*, 2014), ainsi que des entérovirus à l'instar des norovirus humains (Han *et al.*, 2014). Les coronavirus reconnaissent les sialosides pour permettre l'infection des cellules sensibles (Tortorici *et al.*, 2019) (Qing *et al.*, 2020).

Si l'ACE2 est un récepteur du SRAS-CoV-2, cette enzyme joue un rôle important dans le système rénine-angiotensine-aldostérone, qui régule l'homéostasie hydrosodée et la pression artérielle. Elle est formée de trois composés principaux: la rénine, l'angiotensine II et l'aldostérone, qui agissent pour élever la pression artérielle en réponse à une diminution de la pression artérielle rénale, une diminution de l'apport de sel dans le tubule alvéolaire distal et/ou un bêta-agoniste. Grâce à ces mécanismes, le corps peut augmenter la pression artérielle de manière prolongée (Sparks *et al.*, 2014).

Le processus de synthèse est le suivant: l'angiotensinogène, synthétisé dans le foie et libéré dans le sang, est clivé par une enzyme, la rénine, et forme un décapeptide appelé angiotensine I qui est physiologiquement inactif. L'angiotensine I est ensuite principalement transformée en angiotensine II (octapeptide) par l'ACE1. L'ACE2 convertit l'angiotensine I (1-10) (décapeptide) en angiotensine (1-9) (nonapeptide) et transforme l'angiotensine II (1-8) (octapeptide) en angiotensine (1-7). L'angiotensine II est le substrat de l'ACE2. L'angiotensine II induit une vasoconstriction et l'angiotensine (1-7) présente des propriétés vasodilatatrices. (Bihl *et al.*, 2015). L'angiotensine II déclenche différentes voies de signalisation aboutissant à une réponse fonctionnelle immédiate (hypertension artérielle), puis à une réponse structurale hypertrophiante et, enfin, à des réponses pro-inflammatoires et procoagulantes. L'effet de l'ACE2 est antagoniste à celui de l'ACE1, en déplaçant l'équilibre de production depuis l'angiotensine I vers angiotensine (1-7), ce qui correspond fonctionnellement à un mécanisme de clairance de l'angiotensine II (Oudit *et al.*, 2006). L'angiotensine (1-7) est un vasodilatateur qui antagonise les effets de l'angiotensine II en interagissant avec le récepteur AT₁ (angiotensin receptor 1) couplé à une protéine G, l'oncogène Mas (Santos *et al.*, 2003). Le système rénine-angiotensine-aldostérone est régulé localement par l'estradiol via une régulation négative de l'ACE1 et une régulation positive du niveau d'expression, notamment de l'ACE2 et de Mas (Proudler *et al.*, 1995) (Bukowska *et al.*, 2017).

La liaison du SRAS-CoV-2 à l'ACE2 inhibe l'activité de l'ACE2 au profit de l'augmentation de concentration de l'angiotensine II (Sun *et al.*, 2020). La régulation négative de l'ACE2 pourrait amplifier le déséquilibre entre l'axe ACE → Angiotensin II → AT₁ (défavorable) et l'axe ACE2 → Angiotensin (1-7) → Mas (protecteur) (Angeli *et al.*, 2020) (Zhang *et al.*, 2020) (Vaduganathan *et al.*, 2020). À cet égard, il a été montré que les taux sériques d'angiotensine II, chez les patients atteints de COVID-19, étaient élevés et associés à une charge virale et à une lésion pulmonaire. Une telle dérégulation faciliterait grandement la progression des processus inflammatoires et d'hyper-coagulation (micro-thrombose) par vasoconstriction, ainsi que la fibrose, la croissance et la migration cellulaires, la rétention d'eau (Liu *et al.*, 2020) (Deshotels *et al.*, 2014) (Kuba *et al.*, 2005), d'où les effets pulmonaires et circulatoires délétères de la contamination pour les patients ayant un système immunitaire insuffisant pour répondre à cette attaque, ainsi qu'à la réplication du virus dans les poumons notamment. À partir d'une certaine concentration d'angiotensine II, celle-ci rétro-inhibe le gène ACE2 et la concentration d'ACE2 mRNA va diminuer (Schunkert *et al.*, 1993). Le virus ne peut plus se lier à l'ACE2 faute d'ACE2 et la contamination virale s'arrêterait, mais pas les effets délétères. Ainsi, l'inhibition de la liaison SRAS-CoV-2 doit être réalisée le plus tôt possible, dès l'apparition des symptômes.

L'un des symptômes précurseurs du COVID-19 est couramment l'altération ou la perte de goût (dysgueusie-agueusie) et d'odorat (dysosmie-anosmie) (ENT UK, 2020). Nous suggérons que l'inhibition de l'ACE2 peut être la cause de cette perte gustative et olfactive. En effet, les individus dont la perception du goût et de l'odorat ont été altérés présentent une augmentation plus importante de la pression artérielle, indépendamment des facteurs de risque connus (Liu *et al.*, 2018). Cette augmentation est le résultat d'une vasoconstriction qui doit être mise en relation avec l'inhibition de l'ACE2 et l'augmentation du taux d'angiotensine II. En effet, le système rénine-angiotensine-aldostérone est aussi localisé dans la bouche et régulé par l'angiotensine II produit localement et circulant (Shigemura *et al.*, 2019) (Xu *et al.*, 2020).

Un autre signe précurseur, chez certains sujets symptomatiques au COVID-19, est la diarrhée. Celle-ci est trouvée chez 30 à 40 % des patients (Leung *et al.*, 2003). Le tractus gastro-intestinal est une cible bien établie du SRAS-CoV, au niveau de l'estomac, de l'iléon et du colon (Ding *et al.*, 2004). De l'ARN viral et des protéines virales, ainsi que des virus « vivants », ont été détectés dans les fèces des sujets infectés (Wang *et al.*, 2020)

(Xiao *et al.*, 2020). En France, il a été montré que les teneurs en SARS-CoV-2 pouvaient se situer entre 10^4 et 10^5 copies de génome par litre d'eaux usées brutes dans les foyers touchés (en cours de publication).

L'ACE2 est localisée également dans les cellules musculaires lisses et l'endothélium des vaisseaux de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon, ainsi que dans les entérocytes de toutes les parties de l'intestin grêle, y compris le duodénum, le jéjunum et l'iléon, et sur les microvillosités apicales des entérocytes du côlon (Hemming *et al.*, 2004). Dans le tractus gastro-intestinal, la co-expression épithéliale de TMPRSS2 et de l'ACE2 a été identifiée dans tous les sites examinés, à savoir l'œsophage, l'estomac, l'iléon et le côlon (Bertram *et al.*, 2012). L'ACE2 régule l'homéostasie des acides aminés intestinaux, l'expression des peptides antimicrobiens et l'écologie du microbiote intestinal. Or, l'altération de l'activité de l'ACE2, par exemple comme dans le cas de la liaison avec le SRAS-CoV, entraîne une sensibilité très accrue à l'inflammation intestinale induite par des dommages épithéliaux (Hashimoto *et al.*, 2012).

La liaison CoV et ACE2 a deux effets : la réplication des virions et la contamination des cellules voisines d'une part et l'hypertension locale et son cortège d'effets délétères d'autre part. Ainsi, il est essentiel de bloquer cette liaison le plus tôt possible afin d'éviter le développement de pathologies. Il est à noter que pour les sujets porteurs du SRAS-CoV-2 réellement asymptomatiques ou faiblement symptomatiques, la liaison et l'inhibition de l'ACE2 seraient faiblement efficaces provenant soit d'un polymorphisme de cet enzyme, soit de sa faible concentration et/ou du corécepteur, l'héparane sulfate, que nous présentons *infra*.

Un corécepteur : l'héparane sulfate

L'héparane sulfate (ou sulfate d'héparane) est un polysaccharide présent dans le milieu extracellulaire des tissus animaux. Son unité de base est un acide glucuronique relié par une liaison 1-4 à une glucosamine. Il est lié de manière covalente à des protéoglycanes et forme des protéoglycanes de sulfate d'héparane (HSPG) non ramifiés. Ils se trouvent à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire, où ils interagissent comme des récepteurs ou des corécepteurs avec de nombreux ligands (Sarrazin, Lamanna, Esko, 2011). En raison des chaînes de glycosaminoglycanes fortement sulfatées, les HSPG présentent une charge globale négative (Vivès, Jacob, Fender, 2006) qui peut agir par attraction électrostatique avec les résidus basiques des glycoprotéines de surface virales ou des protéines de capsides des virus non enveloppés.

De manière générale, les virus utilisent ces liaisons de faible affinité aux HSPG omniprésents comme une première phase d'arrimage viral. Cet accostage initial favorise la concentration de virus à la surface des cellules et, ainsi, accroître leurs opportunités de se lier à un récepteur d'entrée plus spécifique, mais plus espacé. La liaison ultérieure à un récepteur de haute affinité déclenche l'entrée des cellules (Sapp & Haba, 2009.) (Leistner, Bernhard, Glebe, 2008). Le modèle largement accepté actuellement pour le rôle des HSPG suggère le déplacement latéral aléatoire des virus extracellulaires des sites d'ancrage abondants à faible affinité vers les récepteurs d'entrée spécifiques à haute affinité, mais beaucoup moins abondants. Alors, ils interagissent avec les récepteurs spécifiques, puis s'engagent dans l'endocytose ou la fusion avec la membrane plasmique (Burckhardt & Greber, 2009). Ce phénomène, qui ressemblerait à une « piste d'atterrissage », est omniprésent dans l'invasion virale (Burckhardt & Greber, 2009). Nous pourrions le dénommer un « amarrage par concentration virale » grâce aux HSPG pour permettre un arrimage de précision sur le récepteur particulier, l'ACE2 pour les SRAS-CoV, en diminuant l'aléa de liaison virale (Figure 1).

De nombreux virus emploient ce système de contamination ; il s'agit notamment du virus de l'herpès simplex (O'Donnell & Shukla, 2008), du virus de la vaccine, du virus Sindbis, du virus respiratoire syncytial, des norovirus humains (Tamura *et al.* 2004), du virus adéno-associé, des flavivirus tels que virus de la dengue, virus de l'hépatite C et virus de l'encéphalite à tiques, ainsi que des rétrovirus tels que le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH) et le virus de la leucémie à cellules T humaines (Kalia *et al.*, 2009).

Dans le cas des coronavirus humains, le NL63 (HCoV-NL63) utilise le même récepteur pour l'entrée des cellules hôtes, l'ACE2. Cependant, si l'ACE2 est requise pour l'entrée virale, cette protéine n'est pas son site

d'amarrage principal à la surface cellulaire. La liaison de HCoV-NL63 aux protéoglycanes du sulfate d'héparane est nécessaire pour la fixation virale et l'infection des cellules cibles, montrant que ces molécules servent de récepteurs de fixation pour HCoV-NL63. L'entrée efficace de SRAS-CoV dans les cellules hôtes nécessite également la participation des HSPG au début de la phase de fixation de concert avec l'ACE2 (Milewska *et al.*, 2014) (Lang *et al.*, 2011). Et, en ce qui concerne le SRAS-CoV-2, des expériences de liaison de puces à ADN utilisant une vaste bibliothèque d'oligosaccharides de HSPG ont montré que la pointe de SARS-CoV-2 peut se lier aux HSPG d'une manière dépendante de la longueur et de la séquence. Les hexa- et octasaccharides composés d'unités répétitives IdoA2S-GlcNS6S ont été identifiés comme des ligands optimaux (Liu *et al.*, 2020). Par ailleurs, il a été mis en évidence une interaction entre la sous-unité S1 de la protéine de spicule du SRAS-CoV-2 et l'héparine (Mycroft-West *et al.*, 2020).

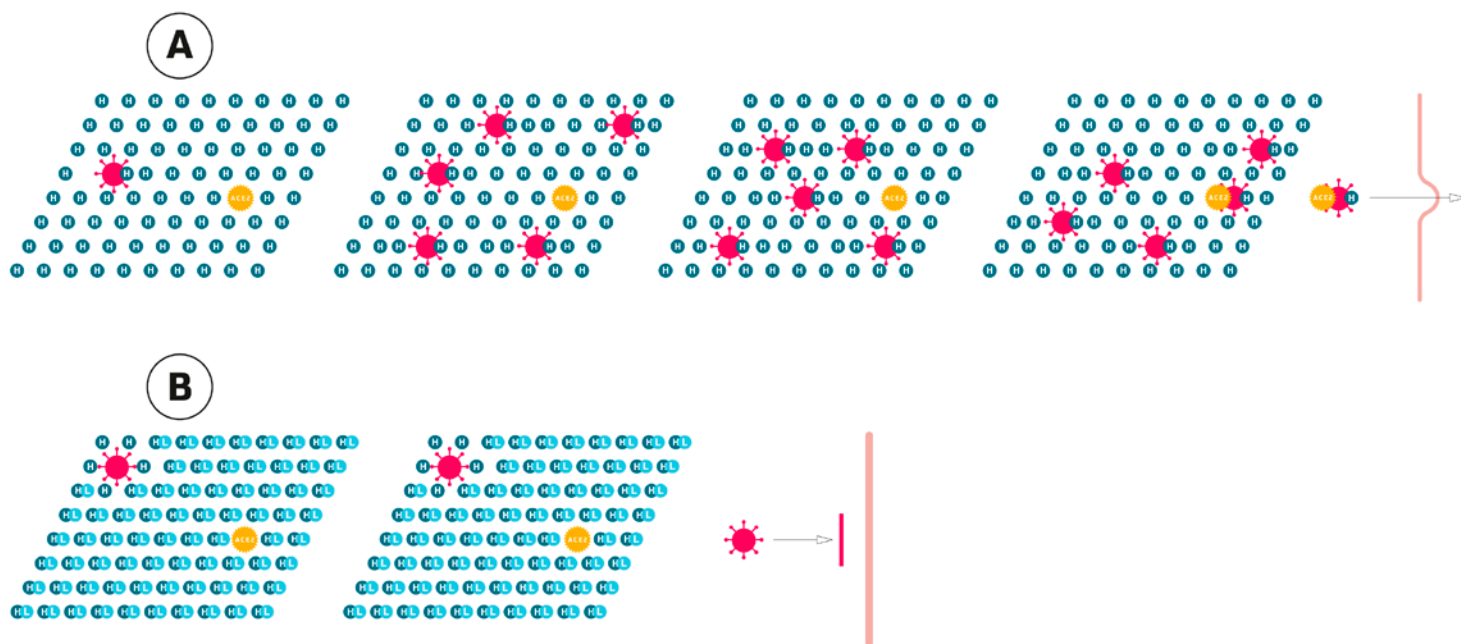


FIGURE 1 : HYPOTHÈSE D'AMARRAGE DU SRAS-COV-2 PAR INTERACTION AVEC LES RÉCEPTEURS HSPG ET ACE2

A Processus d'amarrage par concentration : les héparanes sulfates, qui sont des sites d'ancrage abondants et généralistes, faciliteraient la concentration du SRAS-CoV-2 à la surface des cellules. La faible affinité électrostatique de cette liaison permettrait le déplacement aléatoire des virus jusqu'au récepteur spécifique, à haute affinité mais beaucoup plus clairsemé, l'ACE2, qui permet l'entrée dans la cellule hôte pour l'un d'entre eux.

B La lactoferrine se lie aux héparanes sulfates et les sature sans perturber l'ACE2. Elle pourrait bloquer l'interaction préliminaire entre le SRAS-CoV-2 et la cellule hôte.



LEGENDE

Le corécepteur héparane sulfate permettrait de faire un lien avec la très faible proportion d'enfants atteints sur la cohorte chinoise par rapport aux cas confirmés avec 1 % pour les enfants, dont l'âge est inférieur à 10 ans, et 1 % entre 10-19 ans (Wu & McGoogan, 2020). Les premières données provenant d'Italie ne semblent pas remettre en cause ces chiffres, avec seulement 1,2 % de formes pédiatriques, aucune forme grave, ni aucun décès rapporté au 18 mars 2020 (Livingston & Bucher, 2020). Si le niveau de concentration de l'ACE2 est le même quel que soit l'âge dans le fluide de lavage broncho-alvéolaire chez les patients ventilés présentant le syndrome respiratoire aigu sévère (Schouten *et al.*, 2019), la concentration de l'héparane sulfate dépend de l'âge. En effet, dans l'urine de sujets sains, le taux d'héparane sulfate augmente avec l'âge. Les 10-19 ans ont un taux de 2,2 fois celui des enfants de moins de 10 ans et les plus de 39 ans, 2,7 fois, sans différence significative entre les groupes masculins et féminins (Lee *et al.*, 2003). Ce plus faible taux d'héparane sulfate pourrait être la cause de la protection des enfants. Comme nous le verrons par ailleurs, l'augmentation du taux d'héparane sulfate à la fin de l'adolescence, et son incidence en termes de liaison au virus, pourrait être

contrebalancée par l'augmentation du taux d'œstrogène libre (non lié à sa globuline transporteuse, SHBG) (Stanczyk & Clarke, 2014) (Handelsman, Sikaris, Ly, 2016) qui aurait un rôle protecteur.

Propriétés antivirales de la lactoferrine contre les SRAS-CoV

La lactoferrine est une des protéines la plus polyvalente pour la défense de l'hôte contre les lésions tissulaires et les infections chez les vertébrés. Synthétisée en continu par les cellules épithéliales dans la plupart des sécrétions exocrines, la lactoferrine est présente dans le liquide séminal, les sécrétions exocrines pancréatiques, les larmes, la salive, les sécrétions utérines, les sécrétions des organes reproducteurs et des tractus respiratoire et gastro-intestinal, ainsi que dans le lait où sa concentration chez la femme peut varier entre 1 et 7 g / L (colostrum) (Bennett & Kokocinski, 1978). Elle est également exprimée par les cellules du système immunitaire inné, qui peuvent délivrer localement la molécule sur les sites inflammatoires. Les neutrophiles polynucléaires, qui représentent plus de la moitié des globules blancs, expriment la lactoferrine et stockent la molécule dans des granules secondaires. Lors de leur activation, qui commence aux toutes premières étapes de l'adhésion à l'endothélium activé, la lactoferrine est libérée dans le sang. Sa concentration sérique est faible, mais ce taux est augmenté lors de la dégranulation des neutrophiles qui conduit à une très forte accumulation sur le lieu de de l'infection et / ou de l'inflammation (Legrand, 2012).

La lactoferrine humaine est une glycoprotéine qui a pour caractéristique d'être hautement basique avec une distribution concentrée de ses charges positives dans le domaine amino-terminal et dans la région inter-lobe. La structure tridimensionnelle montre que ce polypeptide est structuré en deux lobes globulaires correspondant aux moitiés amino- et carboxy-terminales liées par une courte hélice . Chaque lobe est structuré en deux domaines qui délimitent une crevasse profonde à l'intérieur de laquelle est situé le site de fixation du fer. La lactoferrine humaine renferme 2 glycanes qui présentent une importante micro-hétérogénéité liée au nombre très variable de résidus de fucose, d'acide N-acétylneuraminique (acide sialique) et de fucosyl-N-acétyllactosamines. Le domaine amino-terminal est le siège de ses interactions avec ses nombreux partenaires: chaînes de glycosaminoglycanes de protéoglycanes, comme les HSPG, lipopolysaccharides, ADN et récepteurs. Ces caractéristiques sont partagées par d'autres lactoferrines, notamment par la lactoferrine bovine, molécule la plus utilisée dans les essais *in vitro* et *in vivo* (Pierce, Legrand, Mazurier, 2009), qui présente environ 70 % d'homologie de séquence avec la forme humaine (Baker & Baker, 2009).

En Europe, la lactoferrine bovine est autorisée dans les compléments alimentaires, ainsi que comme nouvel ingrédient alimentaire (Commission européenne, 2012). En France, l'Afssa a rendu un avis, en 2006, considérant comme sans risque pour le consommateur, l'utilisation de la lactoferrine bovine dans un complément alimentaire à la dose de 100 mg (Afssa, 2005). Elle est autorisée dans de nombreux pays (États-Unis, Canada, Taiwan, Belgique, France, Japon, Australie) sous différentes formes (compléments alimentaires ou alimentation générale). En 2001, la FDA a considéré la lactoferrine issue du lait (*milk-derived lactoferrin*) comme substance GRAS (*Generally Recognized as Safe*) en tant qu'ingrédient pour l'alimentation sportive et fonctionnelle et en tant que spray antibactérien appliqué sur du bœuf cru.

La lactoferrine a longtemps été considérée comme un simple chélateur de fer, protégeant contre les infections bactériennes par sa capacité à priver les bactéries du fer nécessaire à leur croissance. Depuis ces vingt dernières années, de nouvelles fonctions générées par la lactoferrine ont été découvertes: immunomodulation, protection contre le cancer, régulation de la croissance osseuse...

L'activité antivirale des lactoferrines humaine et bovine a été montrée contre les virus enveloppés et nus. Dans la plupart de ces études, lorsque la lactoferrine a été testée à la fois sous forme apo- (non saturée en fer) et sous forme saturée, aucune différence nette dans les effets antiviraux n'a été détectée. Les deux lactoferrines agissent au début de la phase virale de l'infection, empêchant ainsi l'entrée du virus dans la cellule hôte, soit en bloquant les récepteurs cellulaires, soit en liaison directe aux particules virales (Valenti & Antonini, 2005) (Berlutti *et al.*, 2011). De tels mécanismes ont montré leur efficacité par exemple contre

le virus Herpès simplex (Marchetti *et al.*, 1996), les cytomégalovirus (Andersen *et al.*, 2001) et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Harmsen *et al.*, 1995). Également, la consommation de lactoferrine a réduit l'incidence de la gastro-entérite norovirale chez les enfants et un effet similaire a été observé dans un large éventail d'âges dans une enquête préliminaire (Wakabayashi, Oda, Yamauchi, Abe, 2014). Des études ont établi que la lactoferrine inhibe certaines infections virales en interférant avec les interactions de surface virus-cellule après liaison avec des HSPG avec lesquels elle est colocalisée (Yamauchi *et al.*, 2006), par exemple le Coxsackievirus (Zautner *et al.*, 2003) le papillomavirus (Selinka *et al.*, 2007), l'alphavirus (Waarts *et al.*, 2005), le virus herpès simplex (Andersen *et al.*, 2004).

En 2005, il a été montré que l'expression du gène codant pour la lactoferrine, gène *LTF*, était très élevée chez les patients touchés par l'épidémie de SRAS-CoV apparue en 2003, suggérant que celle-ci joue un rôle important dans la réponse immunitaire innée à l'infection (Reghunathan *et al.*, 2005). Des recherches supplémentaires ont mis en évidence que la lactoferrine empêche le pseudovirus du SRAS-CoV de pénétrer dans les cellules hôtes (Lang *et al.*, 2011) en bloquant la liaison entre le virus et la cellule. La lactoferrine ne perturbe pas l'interaction de la protéine de spicule S avec l'ACE2, mais se lie avec les HSPG qui fournissent les sites d'arrimage pour l'invasion du SRAS-CoV au début de la phase de fixation. Cette liaison de la lactoferrine avec les HSPG empêche l'infection de se développer. Cette inhibition dose-dépendante correspond à une saturation des sites à proximité d'un récepteur spécifique ACE2.

Cette liaison est électrostatique. En effet, la lactoferrine présente une charge hautement cationique sur sa surface moléculaire, en particulier dans le domaine N-terminal (Baker & Baker, 2009) qui la caractérise. Leur forte charge négative permet aux HSPG (Vivès, Jacob, Fender, 2006) de se lier au domaine de liaison des glycosaminoglycanes N-terminaux de la lactoferrine par attraction électrostatique (Thorne *et al.*, 2008). Ainsi, la localisation compétitive de la lactoferrine favorise sa liaison avec les HSPG et empêche le contact préliminaire entre le SRAS-CoV et les HSPG, puis l'ACE2 des cellules hôtes (Lang *et al.*, 2011) (figure 1). Cette liaison Lactoferrine-HSPG est spécifique à ces deux molécules et ne dépend pas du virus. Ainsi, si cette inhibition est montrée pour le SRAS-CoV, elle devrait l'être pour le SRAS-CoV-2 puisque celui-ci pourrait se lier aux HSPG.

L'expression du gène *LTF* de la lactoferrine humaine est régulée à la hausse par les œstrogènes avec une ampleur de réponse spécifique au type cellulaire (Teng, 1999) (Kolver *et al.*, 1996) via l'estrogen receptor α (ER α). Il est essentiel de noter que l'étude du polymorphisme du gène *LTF* de la lactoferrine montre l'existence de variants. Plus de 60 SNP ont été identifiés au sein de la région promotrice, des exons ou des introns (Teng & Gladwell, 2006). Certains de ceux-ci procurent des propriétés physicochimiques et biologiques spécifiques qui peuvent engendrer une susceptibilité génétique à certains pathogènes pour certains individus (Wu *et al.*, 2009). Ce polymorphisme existe aussi sur la lactoferrine bovine à l'intérieur et entre les races bovines (Daly, Ross, Giblin, Buckley, 2006).

Conclusion

La première étape d'initiation de l'infection virale est l'entrée en contact du virus et de la cellule hôte. Cela consiste à l'arrimage d'une partie virale à un ou des récepteurs cellulaires. Via la glycoprotéine de spicule S du SRAS-CoV-2 et du SRAS-CoV, la liaison se réaliserait avec deux récepteurs qui agiraient de concert pour diminuer la difficulté et le hasard d'un ciblage précis : d'abord avec l'héparane sulfate des HSPG, puis avec l'ACE2. Les HSPG, qui sont des sites d'ancrage abondants et généralistes, faciliteraient la concentration des SRAS-CoV à la surface des cellules. La faible affinité électrostatique de cette liaison permettrait le déplacement aléatoire des particules jusqu'au récepteur spécifique, à haute affinité, mais beaucoup plus clairsemé, l'ACE2, qui permet l'entrée dans la cellule hôte. Ce processus pourrait être défini comme un « amarrage par concentration virale ».

Afin d'empêcher l'infection et ses conséquences pathologiques, il faut enrayer les liaisons entre le SRAS-CoV-2 et ses récepteurs le plus tôt possible pour bloquer la réplication virale d'une part et les conséquences

pathologiques d'une liaison à l'ACE2 qui inhibe l'enzyme au profit de son substrat, l'angiotensine II, accompagné de ses effets via une réponse fonctionnelle immédiate (hypertension artérielle), puis via une réponse structurale hypertrophiante et, enfin, des réponses pro-inflammatoires et procoagulantes d'autre part. Intervenir après la liaison à l'ACE2 limite la réplication virale et la contamination aux cellules voisines, mais pas les effets de l'angiotensine II puisque l'ACE2 est impactée. Les conséquences dépendent alors de la charge virale infectante au moment du début du traitement.

La lactoferrine, qui est une protéine polyvalente pour la défense de l'hôte, est synthétisée en continu par les cellules épithéliales dans la plupart des sécrétions exocrines, dont le lait. Elle se lie aux HSPG, sans perturber l'ACE2, et bloquerait l'interaction préliminaire entre les SRAS-CoV et les cellules hôtes. Cette inhibition dose-dépendante correspondrait à une saturation des sites HSPG à proximité du récepteur spécifique ACE2. Ainsi, cette protéine pourrait jouer un rôle protecteur dans la défense de l'hôte contre l'infection par les SRAS-CoV-2.

La lactoferrine pourrait avoir des applications thérapeutiques potentielles comme médicament candidat pour la prévention dans le cas de personnes à risques et le traitement des maladies provoquées par les SRAS-CoV comme le COVID-19. Il serait tout à fait intéressant de tester cette molécule naturelle non-toxique pour son effet protecteur *in vivo* dans des essais cliniques par administration orale. Ceux-ci permettraient de déterminer son efficacité et son effet dose-réponse.

Bibliographie

Afssa. 2005. Saisine 2005-SA-0240: *Avis du 21 avril 2006 relatif à l'évaluation de l'emploi de lactoferrine dans un complément alimentaire.*

Andersen JH, Osbakk SA, Vorland LH, Traavik T, Gutteberg TJ. 2001. *Lactoferrin and cyclic lactoferrin inhibit the entry of human fibroblasts.* Antivira Research, 51(2):141-149.

Andersen JH, Jenssen H, Gutteberg TJ. 2003. *Lactoferrin and lactoferricin inhibit herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir.* Antiviral Res, 58(3): 209-215.

Andersen, J H, Jenssen H, Sandvik K, Gutteberg TJ. 2004. *Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface.* J Med Virol, 74(2): 262–271.

Angeli F, Reboldi G, Verdecchia P. 2019. *Hypertensive urgencies and emergencies: Misconceptions and pitfalls.* Eur J Intern Med, 71:15-17.

Baker EN, Baker HM. 2009. *A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin.* Biochimie, 91(&): 3-10.

Bennett RM, Kokocinski T. 1978. *Lactoferrin content of peripheral blood cells.* Br J Haematol, 39(4):509-512.

Berlutti, F; Pantanella, F; Natalizi, T; Frioni, A; Paesano, R; Polimeni, A; Valenti, P. 2011. *Antiviral Properties of Lactoferrin-A Natural Immunity Molecule.* Molecules, 16(8):6992-7018.

Bertram S, Heurich A, Lavender H, Gierer S, Danisch S, Perin P, Lucas JM, Nelson PS, Pöhlmann S, Soilleux EJ. 2012. *Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts.* PLoS One, 7(4):e35876.

Bihl JC, Zhang C, Zhao Y, Xiao X, Ma X, Chen Y, Chen S, Zhao B, Chen Y. 2015. *Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: Role of the NFκB inflammatory pathway.* Vascul Pharmacol, 73:115-123.

- Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. 2003. *The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex*. J Virol, 77(16):8801-8811.
- Bukowska, A, Spiller, L, Wolke, C, Lendeckel, U, Weinert, S, Hoffmann, J, Bornfleth, P, Kutschka, I, Gardemann, A, Isermann, B, & Goette, A. 2017. *Protective regulation of the ACE2/ACE gene expression by estrogen in human atrial tissue from elderly men*. Experimental biology and medicine, 242(14):1412-1423.
- Burckhardt CJ, Greber UF. 2009. *Virus Movements on the Plasma Membrane Support Infection and Transmission between Cells*. PLoS Pathogens 5(11):e1000621.
- Channappanavar R, Fett C, Mack M, Ten Eyck PP, Meyerholz DK, Perlman S. 2017. *Sex-Based Differences in Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection*. J Immunol, 198(10):4046-4053.
- Commission européenne. 2012. 2012 / 725 / UE: *Décision d'exécution de la Commission du 22 novembre 2012 autorisant la mise sur le marché de la lactoferrine bovine en tant que nouvel ingrédient alimentaire en application du règlement (CE) n° 258 / 97 du Parlement européen et du Conseil (Morinaga)*. notifiée sous le numéro C(2012) 8390.
- Daly M, Ross P, Giblin L, Buckley F. 2006. *Polymorphisms Within the Lactoferrin Gene Promoter in Various Cattle Breeds*. Anim Biotechnol, 17(1):33-42.
- Das M, Soffer RL. 1975. *Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme. Structural and Catalytic Properties*. J Biol Chem, 250(17):6762-6768.
- Deshotels MR, Xia H, Sriramula S, Lazartigues E, Filipeanu CM. 2014. *Angiotensin II mediates angiotensin converting enzyme type 2 internalization and degradation through an angiotensin II type I receptor-dependent mechanism*. Hypertension, 2014 ;64(6):1368–1375.
- Ding Y, He L, Zhang Q, Huang Z, Che X, Hou J, Wang H, Shen H, Qiu L, Li Z, Geng J, Cai J, Han H, Li X, Kang W, Weng D, Liang P, Jiang. 2004. *Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways*. J Pathol, 203(2):622-630.
- Du L., He Y., Zhou Y., Liu S., Zheng B.J. and Jiang S. 2009. *The spike protein of Sars-Cov—a target for vaccine and therapeutic development*. Nat. Rev. Microbiol., 7(3):226-236.
- ENT UK. 2020. *Loss of sense of smell as marker of COVID-19 infection*. The Royal College of Surgeons, <https://www.entuk.org/sites/default/files/files/Loss%20of%20sense%20of%20smell%20as%20marker%20of%20COVID.pdf>
- Hamming, I, Timens, W, Bulthuis, M, Lely, A, Navis, G, van Goor, H. 2004. *Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis*. J. Pathol, 203(2): 631-637.
- Han L., Tan M, Xia M, Kitova EN, Jiang, X Klassen JS, 2014. *Gangliosides are Ligands for Human Noroviruses*. Journal of the American Chemical Society, 136(36):12631-12637.
- Handelsman DJ, Sikaris K, Ly LP. 2016. *Estimating age-specific trends in circulating testosterone and sex hormone-binding globulin in males and females across the lifespan*. Ann Clin Biochem, 53(Pt 3):377-384.

Harmsen MC, Swart PJ, De Bethune MP, Pauwels R, De Clercq E, The TH, Meijer DKF. 1995. *Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immuno-deficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro*. The Journal of Infectious Diseases, 172(2):380-388.

Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, et al. 2012. *ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation*. Nature, 487(7408):477-481.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. 2020. *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor*. Cell, 181(2):271-280.

Hofmann H, Hattermann K, Marzi A, Gramberg T, Geier M, Krumbiegel M, Kuate S, Uberla K, Niedrig M, Pöhlmann S. 2004. *S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients*. J Virol, 78(12):6134-6142.

Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. 2009. *Heparan Sulfate Proteoglycans Are Required for Cellular Binding of the Hepatitis E Virus ORF2 Capsid Protein and for Viral Infection*. Journal of Virology, 83(24):12714-12724.

Kelver ME, Kaul A, Nowicki B, Findley WE, Hutchens TW, Nagamani M. 1996. *Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium*. Am J Reprod Immunol, 1996;36(5):243-247.

Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, Penninger JM. 2005. *A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury*. Nat Med, 11(8):875-879.

Lai AL, Millet JK, Daniel S, Freed JH, Whittaker GR. 2017. *The SARS-CoV Fusion Peptide Forms an Extended Bipartite Fusion Platform that Perturbs Membrane Order in a Calcium-Dependent Manner*. J Mol Biol., 429(24):3875-3892.

Lang J, Yang N, Deng J, Liu K, Yang P, Zhang G, Jiang C. 2011. *Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans*. PLoS One, 6(8):e23710.

Lee EY, Kim SH, Whang SK, Hwang KY, Yang JO, Hong SY. 2003. *Isolation, identification, and quantitation of urinary glycosaminoglycans*. Am J Nephrol, 23(3):152-157.

Legrand D. 2012. *Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes*. Biochem Cell Biol, 90(3):252-268.

Leistner CM, Bernhard SG, Glebe D. 2008. *Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus*. Cellular Microbiology, 10(1): 122-133.

Leung WK, To KF, Chan PK, Chan HL, Wu AK, Lee N, Yuen KY, Sung JJ. 2003. *Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection*. Gastroenterology, 125(4):1011-1017.

Liu L, Chopra P, Li X, Wolfert MA, Tompkins SM, Boons GJ. 2020. *SARS-CoV-2 spike protein binds heparan sulfate in a length and sequence-dependent manner*. bioRxiv preprint. doi: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.10.087288v1>

- Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, Wang Z, Li J, Li J, Feng C, Zhang Z, Wang L, Peng L, Chen L, Qin Y, Zhao D, Tan S, Yin L, Xu J, Zhou C, Jiang C, Liu L. 2020. *Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury*. *Sci China Life Sci*, 63(3):364-374.
- Liu YH, Huang Z, Vaidya A, Li J, Curhan GC, Wu S, Gao X. 2018. *A longitudinal study of altered taste and smell perception and change in blood pressure*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 28(9):877-883.
- Livingston E, Bucher K. 2020. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Italy*. *JAMA*, 323(14):1335.
- Maginnis MS. 2018. *Virus-Receptor Interactions: The Key to Cellular Invasion*. *J Mol Biol.*, 430(17):2590-2611.
- Marchetti M, Longhi C, Conte MP, Pisani S, Valenti P, Seganti L. 1996. *Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells*. *Antiviral Research*, 29(2-3):221-231.
- Milewska A, Zarebski M, Nowak P, Stozek K, Potempa J, Pyrc K. 2014. *Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells*. *J Virol*, 88(22):13221-13230.
- Mycroft-West C, Su D, Elli S, Guimond S, Miller G, Turnbull J, Yates E, Guerrini M, Fernig D, Lima M, Skidmore M. 2020. *The 2019 coronavirus (SARS-CoV-2) surface protein (Spike) S1 Receptor Binding Domain undergoes conformational change upon heparin binding*. *bioRxiv* 2020.02.29.971093.
- O'Donnell CD, Shukla D. 2008. *The Importance of Heparan Sulfate in Herpesvirus Infection*. *Virol Sin*, 23(6):383-393.
- Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich D, Khokha R, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM, Scholey JW. 2006. *Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE2)-A New Player in the Genesis of Glomerular Injury?* *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(10):2637-2643.
- Pierce A, Legrand D, Mazurier J. 2009. *La lactoferrine: une protéine multifonctionnelle*. *Med Sci*, 25(4):361-369.
- Proudlar AJ, Ahmed AI, Crook D, Fogelman I, Rymer JM, Stevenson JC. 1995. *Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women*. *Lancet*, 346(8967):89-90.
- Qing E, Hantak M, Perlman S, Gallagher T, Denison MR. 2020. *Distinct Roles for Sialoside and Protein Receptors in Coronavirus Infection*. *mBio*, 11(1) e02764-19.
- Reghunathan R, Jayapal M, Hsu LY, Chng HH, Tai D, Leung BP, Melendez AJ. 2005. *Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome*. *BMC Immunol*, 6:2.
- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. 2003. *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14):2003, 8258-8263.
- Sapp M, Haba MB. 2009. *Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus*. *FEBS Journal*, 276(24):7206-7216.
- Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. 2011. *Heparan sulfate proteoglycans*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*,

3(7):a004952.

Scharpé S, van Sande M, Hendriks D, Kasahara Y. 1986. *Influence of neuraminidase treatment on the electrophoretic behaviour of angiotensin converting enzyme from human tissues*. J Clin Chem Clin Biochem, 24(8):597-600.

Schouten LR, van Kaam AH, Kohse F, Veltkamp F, Bos LD, de Beer FM, van Hooijdonk RT, Horn J, Straat M, Witteveen E, Glas GJ, Wieske L, van Vught LA, Wiewel MA, Ingelse SA, Cortjens B, van Woensel JB, Bos AP, Walther T, Schultz MJ, Wösten-van Asperen RM; MARS consortium. 2019 *Age-dependent differences in pulmonary host responses in ARDS: a prospective observational cohort study*. Ann Intensive Care, 9(1):55.

Schunkert H, Ingelfinger JR, Hirsch AT, Pinto Y, Remme WJ, Jacob H, Dzau VJ. 1993. *Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II*. Circ Res, 72(2):312-318.

Selinka HC, Florin L, Patel HD, Freitag K, Schmidtke M, Makarov VA, Sapp M. 2007. *Inhibition of transfer to secondary receptors by Heparan Sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus*. J Virol, 81(20): 10 970-10 980.

Shigemura N, Takai S, Hirose F, Yoshida R, Sanematsu K, Ninomiya Y. 2019. *Expression of Renin-Angiotensin System Components in the Taste Organ of Mice*. Nutrients, 11(9):2 251.

Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, Zhu H, Zhao W, Han Y, Qin C. 2019. *From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight*. Viruses, 11(1):59.

Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsoy M, Coffman TM. 2014. *Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology*. Compr Physiol, 4(3):1201-1228.

Stanczyk FZ, Clarke NJ. 2014. *Measurement of Estradiol-Challenges Ahead*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 99(1):56-58.

Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS. 2014. *The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions*. Nat. Rev. Microbiol, 12(11):739-749.

Sun ML, Yang JM, Sun YP, Su GH. 2020. *[Inhibitors of RAS Might Be a Good Choice for the Therapy of COVID-19 Pneumonia]*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 43(3):219-222.

Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N. 2004. *Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane*. J Virol, 78(8):3817-3826.

Teng CT. 1999. *Regulation of lactoferrin gene expression by estrogen and epidermal growth factor: Molecular mechanism*. Cell Biochem. Biophys, 31(1):49-64.

Teng CT, Gladwell W. 2006. *Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human lactoferrin gene*. Biochem Cell Biol, 84(3):381-384.

Thorne RG, Lakkaraju A, Boulan ER, Nicholson C. (2008) *In vivo diffusion of lactoferrin in brain extracellular space is regulated by interactions with heparin sulfate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(24): 8416-8421.

Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, Wang C, Li Z, Koerhuis D, Boons GJ, Bosch BJ, Rey FA, de Groot RJ, Veerles D. 2019. *Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors*. Nat Struct Mol Biol, 26(6):481-489.

- Vaduganathan M, Vardeny O, Michel T, McMurray JJV, Pfeffer MA, Solomon SD. 2020. *Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19*. N Engl J Med, 382(17):1653-1659.
- Valenti P, Antonini G. 2005. *Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack*. Cell Mol Life Sci, 62(22):2576-2587.
- Vivès RR, Jacob HL, Fender P. 2006. *Heparan Sulphate Proteoglycans and Viral Vectors: Ally or Foe?* Current Gene Therapy, 6(1): 35-44.
- Waarts BL, Aneke OJ, Smit JM, Kimata K, Bittman R, Meijer DK, Wilschut J. 2005. *Antiviral activity of human lactoferrin: inhibition of alphavirus interaction with heparan sulfate*. Virology, 333(2):284-292.
- Wakabayashi H, Oda H, Yamauchi K, Abe F. 2014. *Lactoferrin for prevention of common viral infections*. J Infect Chemother, 20(11):666-671.
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. 2020. *Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein*. Cell, 181(2):281-292.
- Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. 2020. *Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens*. JAMA, doi:10.1001/jama.2020.3786.
- Wu YM, Juo SH, Ho YP, Ho KY, Tsai CC. 2009. *Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients*. J Periodontal Res, 44(3):418-424.
- Wu Z, McGoogan JM. 2020. *Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention*. JAMA, 323(13):1239-1242.
- Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. 2020. *Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2*. Gastroenterology, pii: S0016-5085(20):30282-30281.
- Xu J, Hu J, Wang J, Han Y, Hu Y, Wen J, Li Y, Ji J, Ye J, Zhang Z, Wei W, Li S, Wang J, Wang J, Yu J, Yang H. 2003. *Genome organization of the SARS-CoV*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 1(3):226-235.
- Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Li T, Chen Q. 2020. *High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa*. Int J Oral Sci, 12(1):8.
- Yamauchi K, Wakabayashi H, Shin K, Takase M. 2006. *Bovine lactoferrin: benefits and mechanism of action against infections*. Biochem Cell Biol, 84(3):291-296.
- Zautner AE, Korner U, Henke A, Badorff C, Schmidtke M. 2003. *Heparan sulfates and Coxsackievirus-Adenovirus receptor: each one mediates Coxsackievirus B3 PD infection*. J Virol, 77(18): 10071-10077.
- Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. 2020. *Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target*. Intensive Care Med, 46:586-590.