PRESENTATION DE LA PLAINTE DEPOSEE PAR M. L... suite au décès de son épouse : vaccinée contre le Covid 19, elle fut atteinte d'un "Turbo cancer" qui l'emporta en 2 mois.

I- LES FAITS :

L'épouse de Monsieur L..., est décédée le 16 septembre 2023 suite à des événements l'ayant amené à déposer la présente plainte :

Depuis 1995, Madame L... exerçait au CMP d'une ville de l'Ouest de la France en qualité d'infirmière en psychiatrie.

Elle avait toujours veillé à avoir une bonne hygiène de vie, une alimentation saine et équilibrée.

Le 5 août 2021, une loi vient rendre obligatoire la vaccination anti covid 19 pour les professionnels de santé.

C'est ainsi que le 24 août 2021, elle a reçu une 1ère injection du vaccin contre le covid 19. Malgré le fait qu'elle ait été fiévreuse pendant quelques heures, elle ne s'est pas inquiétée outre mesure, compte tenu de l'ambiance rassurante à l'égard de cette vaccination, développée à l'époque par la quasi-totalité des médias.

(pièce n°1)

Cinq mois plus tard, elle reçoit la 2ème injection le 13 janvier 2022.

(pièce n°2)

Malgré ces 2 doses, et malgré le fait que les malades du Covid étaient devenus très rares au printemps 2022, elle contracte le Covid courant mai 2022. (Cf. certificat du docteur B..., pneumologue).

(pièce n°3)

Courant juin 2023, se sentant mal et atteinte de vomissements, elle consulte son médecin, puis l'hôpital de sa ville.

Le 11 juillet 2023, l'hôpital, son employeur diagnostique un cancer : adénocarcinome du pancréas oligométastatique hépatique et surrénalien gauche.

(pièce n°4)

M. L... s'est alors rendue compte que son épouse était atteinte d'un cancer grave, et cette pathologie va évoluer d'une manière anormalement rapide, puisqu'elle est décédée 2 mois après le diagnostic.

(pièce n°5)

Etonné par :
-Cette pathologie survenant chez son épouse qui était en bonne santé, sans antécédent, mis à part un asthme qui était stabilisé,

-La rapidité foudroyante de cette pathologie, emportant son épouse en 3 mois, Monsieur L... s'est interrogé sur les causes possibles de ces anomalies.

C'est alors qu'il a appris par son entourage, que des cancers dits "**turbo-cancers**" **(cancer à développement anormalement rapide)** étaient apparus en France en grand nombre, quelques mois après le début de la vaccination anti covid 19.

Le recul, et les informations dont il a pris connaissance, lui ont donné la conviction que son épouse a fait l'objet d'un empoisonnement, ainsi que de l'expérimentation d'une technologie sans consentement éclairé **(II),** et surtout, que la commission de ces infractions avait été soigneusement préparée, par des actes, des déclarations contradictoires, et des mensonges **(III).**

II- L'EXPERIMENTATION D'UNE TECHNOLOGIE DONT LES DANGERS ÉTAIENT CONNUS SANS CONSENTEMENT LIBRE ET ECLAIRÉ :

Outre l'aspect vicié du *Consentement libre et éclairé* **(1)** obtenu par le médecin injecteur de son épouse, M. L... a appris récemment les faits suivants parfaitement connus avant la vaccination de Mme L... :

- *Le « vaccin » anti-COVID ARNm neutralise la protéine P53, protection anti-**cancer** naturelle **(2)** ;*
- *Le « vaccin » anti-COVID ARNm cause un dérèglement du Système Rénine Angiotensine favorisant les **cancers (3)** ;*
- *Le « vaccin » anti-COVID ARNm contient des milliards de particules lipidiques toxiques **cancérigènes (4)** ;*
- *Le « vaccin » anti-COVID ARNm a fait l'objet de manipulations de son Codage Génétique causant la production de protéines « fantômes » **aux buts inconnus (5)**.*

1. VICE DU CONSENTEMENT LIBRE ET ECLAIRE

L'article 5 de la Convention d'OVIEDO stipule :

« Chapitre II – Consentement

Article 5 – Règle générale

Une intervention dans le domaine de la santé ne peut être effectuée qu'après que la personne concernée y a donné son consentement libre et éclairé.

Cette personne reçoit préalablement une information adéquate quant au but et à la nature de l'intervention ainsi que quant à ses conséquences et ses risques.

La personne concernée peut, à tout moment, librement retirer son consentement. »

Cet article pose deux conditions :

a) ***Cette personne reçoit préalablement une information adéquate quant au but et à la nature de l'intervention ainsi que quant à ses conséquences et ses risques.***

b) ***Une intervention dans le domaine de la santé ne peut être effectuée qu'après que la personne concernée y a donné son consentement libre et éclairé.***

Afin de ne pas vicier le recueillement du consentement libre et éclairé, la personne doit notamment recevoir ***« une information adéquate [..] quant à ses conséquences et ses risques. »***

Les effets secondaires connus au moment de l'injection devaient être annoncé à Mme L… afin qu'elle puisse donner au médecin injecteur un consentement réellement libre et éclairé.

Or, le consentement libre et éclairé signé par Mme L… en date du 13 janvier 2022 à 14h10 ne déclare au paragraphe « EFFET INDESIRABLE POSSIBLES » que :

« Réaction douloureuse au point d'injection, fatigue, maux de tête, fièvre modérée, fatigue, douleur musculaire, frissons, douleur articulaire et fièvre. Exceptionnellement : réaction allergique »

Demande du document « Consentement éclairé par Monsieur L… au médecin injecteur. (Pièce n°16)

Consentement libre et éclairé de Mme L… (Pièce n°17)

c) Aucune autre allusion aux multiples risques exposés ci-dessous et dans les attestations des Dr JM SABATIER et C ESCARGUEL, parfaitement connus avant l'injection de Mme L… le 13 janvier 2022 à 14h10 n'a été faite !

d) Aucune allusion non plus n'a été faite aux risques de myocardite et de péricardite communiqués par Pfizer et Moderna à la date du 18 aout 2021 !

Constat d'huissier sur la lettre de Pfizer et Moderna du 18 aout 2021

(Pièce n°18)

Dès lors, il apparait évident au regard de ces pièces, que le consentement libre et éclairé de Mme L… a donc été vicié.

2. LE « VACCIN » ANTI-COVID à ARN messager NEUTRALISE LA PROTEINE P53, PROTECTION ANTI-CANCER NATURELLE

Comme le précise Claude ESCARGUEL, *chercheur en biologie humaine, Président du Syndicat National des Praticiens des Hôpitaux Généraux (SNPHG), Ex-Directeur du laboratoire de l'institut de pédiatrie de Marseille, Secrétaire général de la fondation du prix NOBEL de médecine : Luc Montagnier, Co-président de l'association de malades Covid-Longs UPGCS,* **les risques élevés de cancers et de reprises de cancers étaient connus avant l'injection** :

*« ...**Il était connu que de nombreuses interactions existaient entre la protéine spike et des molécules d'origine humaines et jouaient un rôle tant dans l'inflammation (co-facteur des cancérisations) que dans la neutralisation des facteurs anti-tumoraux type protéine P53.***

En ce qui concerne l'amplification des mécanismes inflammatoires, dès décembre 2020, l'équipe du Pr Petruk publie ce mécanisme amplificateur, mécanisme d'autant plus risqué que la synthèse des protéines spike synthétisées par l'injection d'ARNm n'est pas du tout contrôlée et peut varier dans de très larges intervalles pouvant aboutir à l'éclosion d'une tumeur qui pouvait être contrôlée jusqu'à présent.

Ce mécanisme est d'autant plus dangereux que la recherche avait aussi identifié, dès 2021, le rôle suppresseur de la protéine spike sur les inhibiteurs de la cancérogénèse du type P 53, en interagissant sur les gènes de la P53 - mécanisme pouvant entrainer des syndromes de SIDI (Syndrome d'Immunologie Déficience Induit) d'origine iatrogène.

Ce mécanisme d'immunodéficience est aussi entretenu par l'action des nanoparticules lipidiques (PJ 4) qui sont utilisées pour protéger les ARNm injectés de leur dégradation immédiate. »

Attestation de Claude ESCARGUEL et documentation scientifique : **(Pièce n°19)**

(Traduction)

« Les protéines P53 et BRCA1 sont des protéines suppressives de tumeurs bien connues qui régulent les gènes en aval en réponse à de nombreux stress cellulaires et sont fréquemment mutées dans le cancer humain (p53 Silver Daniel P. et David M. Livingston)

On observe qu'il est inhibé par le SARSCoV2 (Stingi Aureliano et Lu..)

La sous-unité S2 de la protéine Spike S2 du SarsCoV2 a des interactions connues avec P53 mais aussi avec les protéines BRCA12 (Singh Nishant et Anuradha Bharara Singh)..

Cela pourrait également signifier que les protéines générées par les vaccins à ARNm interagiraient également avec le gène P53 et inhiberaient ce suppresseur de tumeur. »

Vaccin ARNm spike P53 cancer **(Pièce n°20)**

3. LE « VACCIN » ANTI-COVID à ARN messager CAUSE UN DEREGLEMENT DU SYSTEME RENINE ANGIOTENSINE, FAVORISANT LES CANCERS

L'attestation du Dr Jean-Marc SABATIER, *Docteur en Biologie Cellulaire et Microbiologie, HDR en Biochimie, Directeur de recherche au CNRS* ***s'exprimant en son nom propre,*** nous informe :

Qu' «*…Avant 2021, les vaccins à ARNm étaient une technologie émergente, étudiée principalement pour des maladies spécifiques (i.e. cancer, le Zika, la grippe), mais aucun vaccin à ARNm n'avait encore été approuvé pour un usage généralisé avant les vaccins contre le SARS-CoV-2 et la COVID-19 (« Comirnaty » de Pfizer-BioNTech et « Spikevax » de Moderna, autorisés à la fin 2020). Ces vaccins fonctionnent en injectant dans les organismes des ARNm (protégés par des nanoparticules lipidiques) codant pour une protéine spécifique (la protéine spike -légèrement modifiée- du SARS-CoV-2) qui déclenche une réponse immunitaire.*
Les préoccupations théoriques avant 2021 portaient sur :
(i) la stabilité de l'ARNm et son potentiel à provoquer des réactions inflammatoires excessives (un ARNm est hyper-inflammatoire), (ii) les effets à long terme, encore peu documentés en raison de l'absence de suivi prolongé, et (iii) les interactions potentielles avec des systèmes physiologiques, comme le système rénine-angiotensine (SRA), en raison de la production de la protéine spike.

2. Le système rénine-angiotensine (SRA) et la protéine spike (virale ou vaccinale)
Le SRA est un système physiologique hormonal et enzymatique « clé » initialement décrit pour réguler la pression artérielle, l'équilibre hydrosodé et les fonctions autonomes rénale, pulmonaire et cardiovasculaire. Il s'agit en fait du système « Maître » du corps humain, permettant à l'organisme de fonctionner. Il implique plusieurs hormones ainsi que divers récepteurs enzymatiques, dont l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (ECA) et le récepteur ECA2, qui est également la cible du virus SARS-CoV-2 dans les cellules. Avant 2021, des études de Sabatier et collaborateurs sur le SARS-CoV-2 (et non sur les vaccins) ont montré que la protéine spike pouvait interagir avec le récepteur ECA2, et conduire à un dérèglement du SRA, avec une suractivation d'un récepteur « délétère » appelé AT1R
*(« The renin-angiotensin system: a key role in SARS-CoV-2-induced COVID-19. » El-Arif, G., Farhat, A., Khazaal, S., Annweiler, C., Kovacic, H., Wu, Y., Cao, Z., Fajloun, Z., Abi Khattar, Z., Sabatier, J.M., Molecules, 26, 6945 (**2021**). Doi: 10.3390/molecules26226945).*

Le récepteur AT1R suractivé est pro-hypertenseur, pro-inflammatoire, pro-oxydant, pro-thrombotique, pro-angiogénique, pro-hypoxémique, pro-hypoxique, pro-fibrosant, pro-hypertrophiant et il fait chuter le monoxyde d'azote NO.

Sabatier et ses collaborateurs ont ultérieurement décrit que les vaccins à ARNm anti-Covid-19 induisent la production d'une protéine spike (par les cellules humaines) modifiée capable de se fixer sur le récepteur ECA2, perturbant ainsi l'équilibre du SRA (excès de l'hormone angiotensine-2 conduisant à une suractivation du récepteur AT1R). La dérégulation du SRA se traduit finalement par l'apparition potentielle de ***nombreuses pathologies****, dont les troubles neuro-dégénératifs, cardiovasculaires, gastrointestinaux, de l'auto-immunité* ***et des cancers (ou turbo-cancers).***

Le terme « turbo cancer » (cancer à progression rapide) est utilisé en lien avec les vaccins à ARNm qui contiennent une énorme quantité de molécules d'ARNm (14000 milliards pour le « Comirnaty » et 47000 milliards pour le « Spikevax » pour les injections vaccinales adultes, correspondant à 30 et 100 microgrammes d'ARNm, respectivement) capables de produire une multitude de protéines Spike « vaccinales », ainsi que de multiples protéines « fantômes » dues à la présence du dérivé nucléosidique N^1-méthyl-pseudouridine *(Mulroney, T.E., Pöyry, T., Yam-Puc, J.C. et al. N^1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting. Nature* ***625****, 189–194 (2024). https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3) qui décale le cadre de lecture (de +1) des ribosomes cellulaires. Comme la protéine Spike, ces protéines « fantômes » inconnues stimulent également le système immunitaire et leurs effets ne peuvent être que délétères. Ainsi, il existe plusieurs liens entre les vaccins à ARNm et les cancers ou turbo-cancers : (i) le SRA dérégulé -donc défaillant- contrôle la différenciation et la multiplication cellulaire (à l'origine d'une multiplication anarchique des cellules), (ii) les vaccins à ARNm peuvent interférer avec les mécanismes de réparation de l'ADN ou de régulation cellulaire, et (iii)* ***les vaccins à ARNm peuvent induire une inflammation chronique via une réponse immunitaire exacerbée, ce qui constitue un environnement propice au développement de cancers.*** »

Attestation du Dr Jean-Marc SABATIER, paragraphe II (Pièce n°21)

4. LE « VACCIN » ANTI-COVID à ARN messager CONTIENT DES MILLIARDS DE PARTICULES LIPIDIQUES TOXIQUES CANCERIGENES

Les 14 000 milliards d'ARNm pour le Comirnaty et 47 000 milliards pour le Spikevax **sont encapsulés dans des milliards de nanoparticules lipides.**

La dangereuse toxicité des particules lipidiques est connue depuis très longtemps et pourtant cette technologie a été utilisée dans la fabrication des injections anti-COVID. L'étude évoquée par le journal lepointcritique.fr, **rédigé sur la base de données scientifiques,** date de **2010** :

« Toxicité des nanoparticules lipidiques : 80% DES SOURIS N'ONT PAS SURVECU SELON UNE ETUDE PUBLIEE EN DECEMBRE 2021 »

« Dans une étude conduite in vitro par des chercheurs de l'Université de Tel-Aviv (Kedmi et al.) [3], ***publiée en 2010****, les auteurs ont trouvé en effet que les LNP « augmentaient considérablement les marqueurs inflammatoires chez la souris tels que les interleukines, les interférons, le TNF alpha et les récepteurs Toll-Like. De plus, les cytokines inflammatoires étaient jusqu'à 75 fois plus élevées dans le groupe de traitement lipidique que dans les témoins » [1]. »*

« Une étude conduite par des chercheurs de l'université Thomas Jefferson (Philadelphie, USA) [2] sur les LNP utilisées dans les études précliniques sur les vaccins (dont les auteurs soulignent qu'elles sont « similaires à celles utilisées pour les vaccins humains ») s'est penchée sur cette question. »

Toxicité des nanoparticules lipidiques :   **(Pièce n°22)**

5. LES INSERTION CANCÉRIGÈNES DU VIH (SIDA) DANS LES ARN messagers anti-COVID :

Les « gains de fonction » réalisés par MODERNA et Pfizer sur l'ARN messager de la protéine SPIKE (insertion de molécules communes au VIH –SIDA-) ont pu également déclencher une réaction d'immunosuppression observée avec le SIDA, c'est-à-dire un blocage des défenses immunitaires naturelles contre les cancers (inhibition de la protéine P53 etc.)

Attestation de Claude ESCARGUEL et documentation scientifique [paragraphe 6] : **(Pièce n°19)**

Publication de JM SABATIER sur X : « Gains de fonction » VIH –SIDA- effectués sur le virus du SARS-Cov-2 (COVID-19) et sur les ARN messagers des vaccins Pfizer (ajout de l'adhésiotope RGD et d'un site FURINE qui a commencé à être breveté par MODERNA à partir de 2012 (Provisional Application for Patent). Le **brevet n° US** 9.587.003 B2 a été délivré le **7 mars 2017, avant la pandémie COVID-19.**

Brevet MODERNA sur un « Gain de fonction » du site FURINE.
(Pièce n°26)

Attestation du Dr Jean-Marc SABATIER, paragraphe III   **(Pièce n°21)**

6. LE « VACCIN » ANTI-COVID ARNM A FAIT L'OBJET DE MANIPULATIONS DE SON CODAGE GENETIQUE CAUSANT LA PRODUCTION DE PROTEINES « FANTOMES » AUX BUTS INCONNUS (majuscules)

"...Eyler et al. (article publié dans PNAS en 2019, avant la vaccination de masse anti-Covid-19) : impact de la pseudo uridylation sur la traduction de l'ARNm.

Dans leur article publié dans PNAS (doi : 10.1073/pnas.1821754116), Eyler et collaborateurs explorent comment la pseudo uridylation d'un ARNm affecte la traduction en protéine. Leurs principales conclusions sont : (i) la pseudo uridine (Ψ) modifie les interactions entre l'ARNm et le ribosome, ce qui perturbe la reconnaissance correcte des codons (entraînant des erreurs de traduction), (ii) une augmentation des erreurs de lecture de l'ARNm avec la pseudo uridylation, ce qui provoque des décalages du cadre de lecture (frame shifting) ou des incorporations erronées de résidus d'acides aminés. En fait, il existe une modification de la conformation de l'ARNm qui affecte la précision avec laquelle le ribosome lit les codons, et (iii) un effet contextuel (les erreurs de traduction dépendent de la position des pseudo uridines dans la séquence de l'ARNm : les pseudo uridines présentes dans des régions riches en uridines ou dans des codons spécifiques augmentent la probabilité d'erreurs).
Cet article montre que les nucléosides modifiés peuvent perturber la fidélité de la traduction entraînant la production de protéines « fantômes ».

Attestation du Dr Jean-Marc SABATIER, paragraphe I : **(Pièce n° 21 précitée)**

Une étude parue dans ***Nature en 2023*** a confirmé les erreurs de traduction de l'ARN messager modifié des vaccins anti-Covid. Ce dysfonctionnement a pour effet de produire un nombre indéterminé de protéines connues ou inconnues dans le corps, dont les effets pourraient être délétères.

L'étude parue dans PNAS le 31 octobre 2019 démontre que **les conséquences de cette manipulation du codage génétique des ARN messagers vaccinaux (production de protéines « fantômes ») étaient parfaitement connues avant l'injection de Mme L….**

Étude du 31 octobre 2019 : La pseudouridinylation des séquences codantes de l'ARNm modifie la traduction **(Pièce n° 27)**

Le vaccin à ARN messager anti-Covid-19 n'est pas un vaccin traditionnel, car il contient un codage génétique qui va être lu par les cellules de toute personne vaccinée afin de leur ordonner de produire de la protéine de pointe, spécifique au SARS-CoV-2et destinée à stimuler en ce sens le système immunitaire de la personne vaccinée.

Toutefois, aux termes de l'étude scientifique jointe à la présente plainte, intitulée *N^1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting* et parue dans la revue *Nature* en date du 6 décembre 2023, deux faits cumulatifs nouveaux sont désormais établis : **(pièce n°15)**

a) Des manipulations (consistant à remplacer l'Uridine 5 triphosphate par la Méthyl-1-pseudo-Uridin-5'triphosphate) ont été opérées sur le codage génétique qui était à l'origine destiné à produire « strictement » de la protéine de pointe « pure » ;

b) Ces modifications génétiques entrainent, au-delà de la stricte protéine de pointe du SARS-CoV-2, la production de protéines inconnues, différentes de la protéine de pointe originellement annoncée par les autorités.

c) Ces deux constats factuels soulèvent la question de l'utilisation de la technologie « ARN messager » dans ces vaccins anti-Covid-19 **dans l'objectif d'une programmation génétique *a priori* des ARN messagers, avant les injections vaccinales**.

D'autre part, Le codage génétique des ARN messagers utilise les lettres « A » « U » « G » « C »
L'étude citée supra démontre incontestablement que la lettre « U » a été modifiée dans substances géniques injectées anti-COVID conduisant à la production de protéines autres que la protéine du virus SARS-CoV-2, protéine pouvant produire

des effets délétères graves sur le court, moyen et/ou long terme, directs ou, indirects (via le système immunitaire).

A la question « Quelle sont les conséquences de cette manipulation du codage génétique ?

Le Dr JM SABATIER répond dans son attestation page 3 :

« Les protéines « fantômes » sont reconnues par le système immunitaire, entraînant potentiellement divers troubles, dont des réponses inflammatoires, auto-immunes, tumorales, etc. Ainsi, les travaux d'Eyler et al. (2019) et de Mulroney et al. (2023) montrent que la N1méthyl pseudo uridylation introduit de multiples erreurs de traduction de l'ARNm. Ces erreurs conduisent à la production de protéines « fantômes » inconnues ou hors-cible, qui ne peuvent que présenter un caractère délétère sur l'organisme humain. »

Les manipulations sur chaque lettre du codage génétique d'un ARN messager est une technique parfaitement maîtrisée

(voir notamment https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34960236/)

Les molécules utilisées pour modifier les autres lettres du codage génétique des ARN messagers sont notamment :

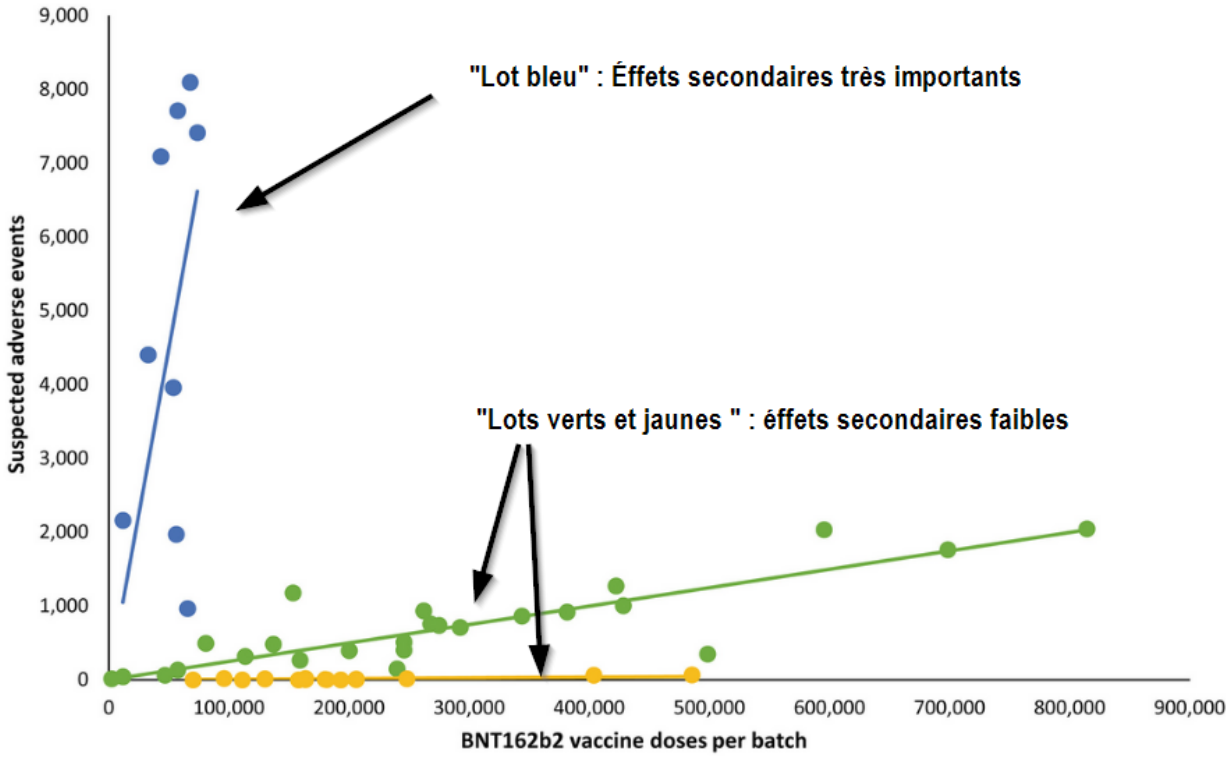
7-methylguanosine triphosphate ;
5 – methylcytosine- triphosphate ;
N1 – methyladenosine- triphosphate ;
N6 – methyladenosine-triphosphate ;
Pseudouridine ;
Methyl-1- Pseudouridine-triphosphate.

TROIS ÉTUDES démontrent, qu'à l'insu de la population injectée - donc de Mme L… - diverses manipulations du codage génétique ont été réalisées lors de la vaccination de masse anti COVID-19:

ÉTUDE 1 : 30 MARS 2023

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eci.13998

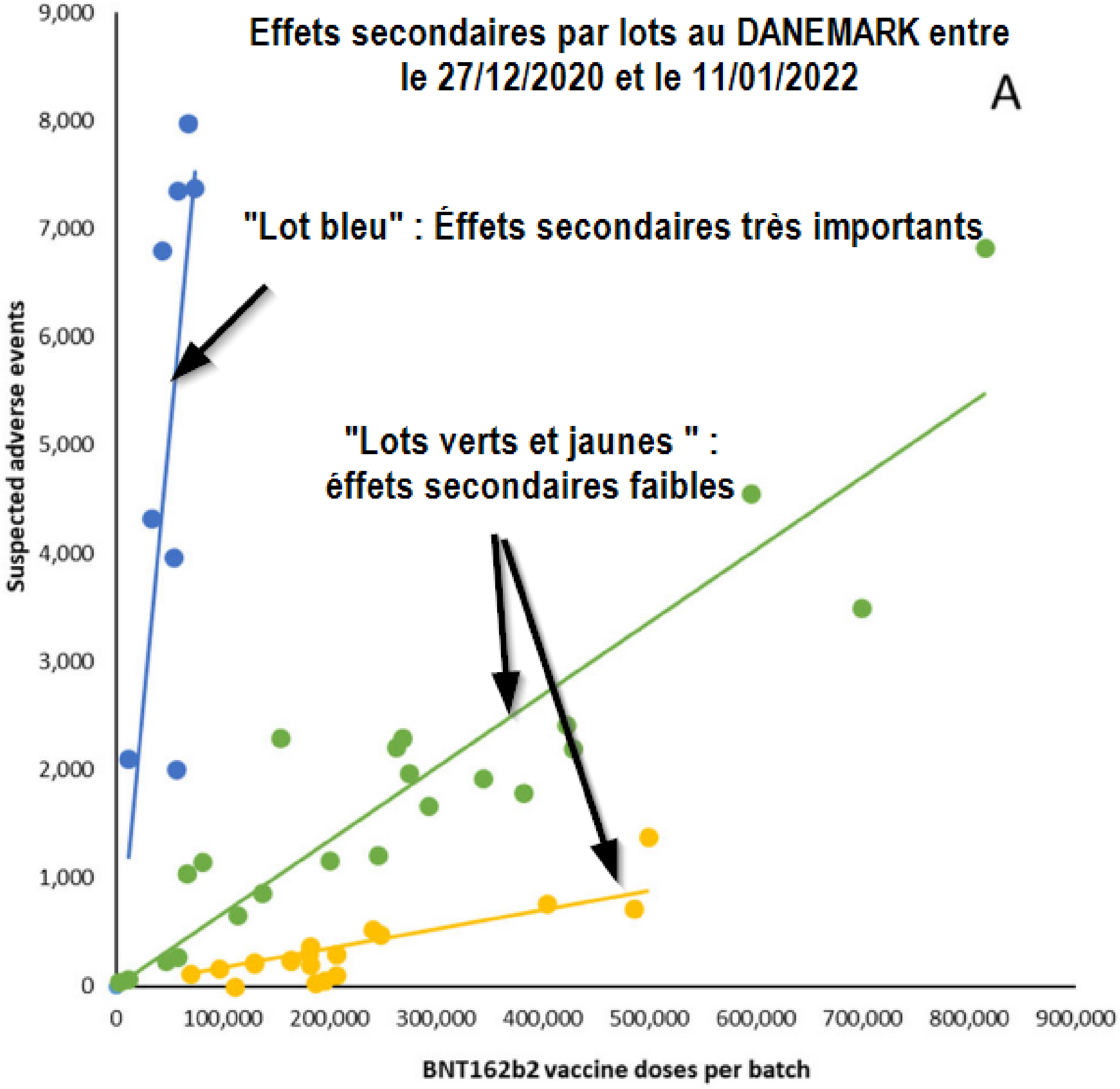
"Sécurité du vaccin à ARNm BNT162b2 contre la COVID-19 en fonction du lot "



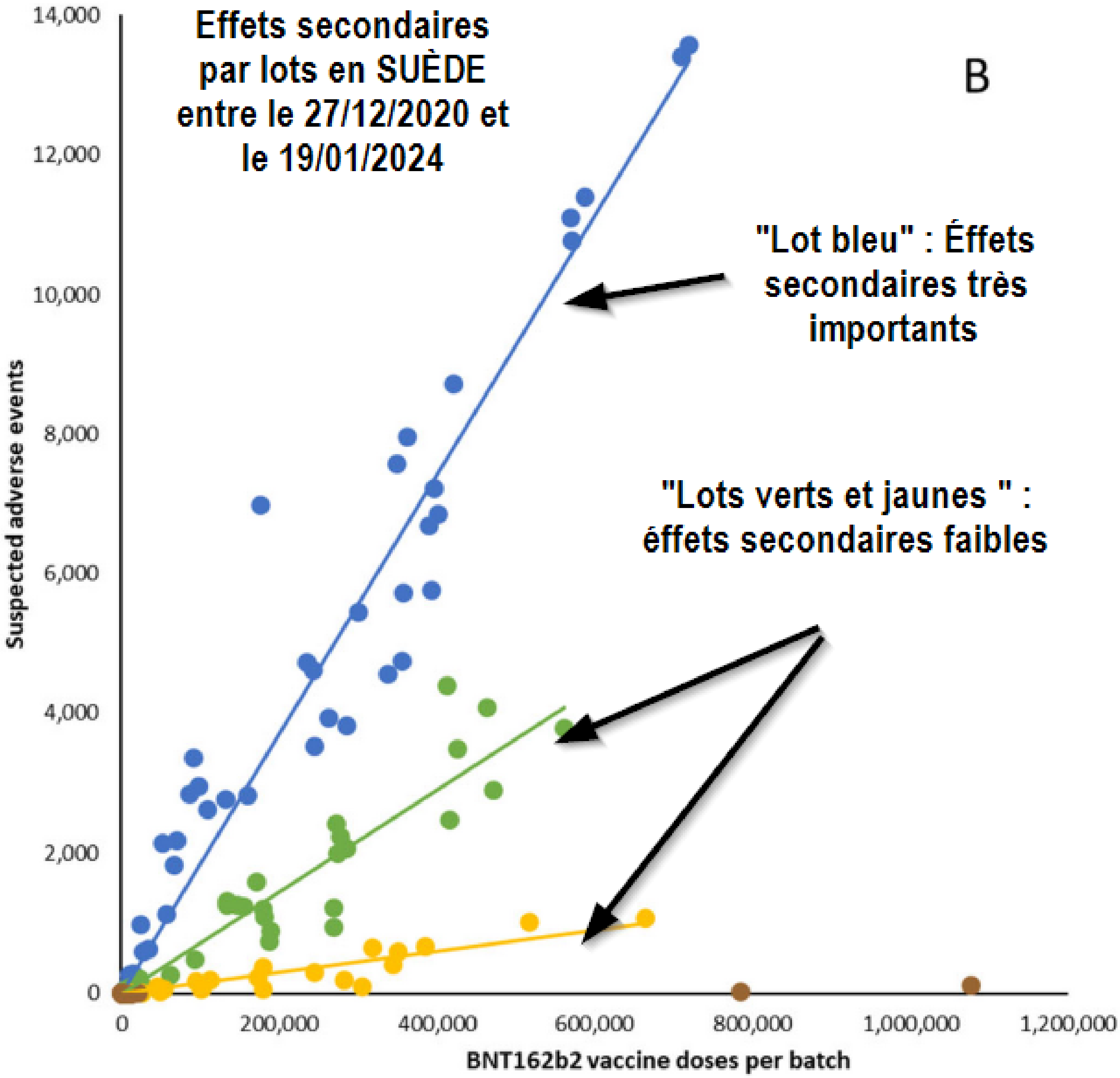
ÉTUDE 2 : **19 août 2024**
https://www.mdpi.com/1648-9144/60/8/1343

« Rapports d'effets indésirables suspectés liés au lot de vaccins contre la COVID-19 à ARNm BNT162b2 : comparaison des résultats du Danemark et de la Suède » :

DANEMARK


Effets secondaires par lots au DANEMARK entre le 27/12/2020 et le 11/01/2022
A
"Lot bleu" : Éffets secondaires très importants
"Lots verts et jaunes " : éffets secondaires faibles
Suspected adverse events
9,000
8,000
7,000
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
0
100,000
200,000
300,000
400,000
500,000
600,000
700,000
800,000
900,000
BNT162b2 vaccine doses per batch

SUÈDE


Effets secondaires par lots en SUÈDE entre le 27/12/2020 et le 19/01/2024
B
"Lot bleu" : Éffets secondaires très importants
"Lots verts et jaunes " : éffets secondaires faibles
Suspected adverse events
14,000
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0
200,000
400,000
600,000
800,000
1,000,000
1,200,000
BNT162b2 vaccine doses per batch

Étude 3 : 26 septembre 2024 (USA)
https://publichealthpolicyjournal.com/batch-dependent-safety-of-the-bnt162b2-mrna-covid-19-vaccine-in-the-united-states/

« Sécurité du vaccin à ARNm BNT162b2 contre la COVID-19 aux États-Unis, en fonction du lot »

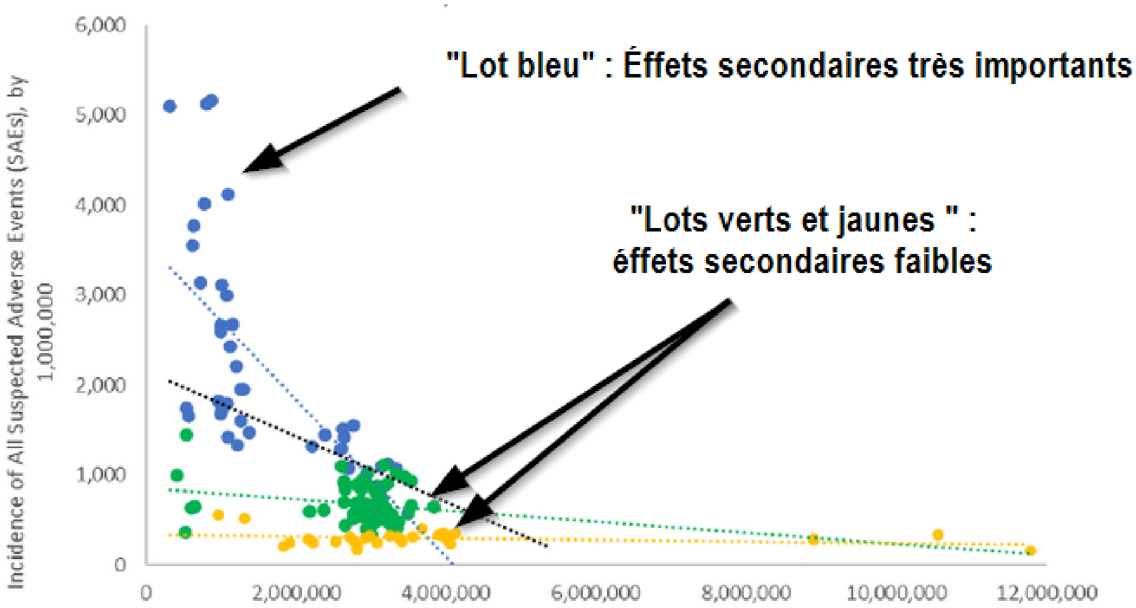


Figure 4. Relation entre les doses de vaccin Pfizer-BioNTech et les événements indésirables suspectés (EIG)

(a. Tous les EIG ; b. Incidence des EIG (pour 1 000 000 de doses)

Commentaire des auteurs de l'étude :

« Cette étude, comme celle du Danemark, conclut à des variations évidentes dans les lots de vaccins Pfizer-BioNTech et à l'observation du ***même schéma d'effets indésirables graves****.*

Les données d'attribution des vaccins utilisées dans cette étude n'ont été divulguées qu'à la suite d'une action en justice forcée et ne fournissent pas de données postérieures à avril 2022. À l'heure actuelle, les données publiques du VAERS ne sont disponibles qu'au niveau des États, ce qui est insuffisant pour saisir les variations régionales au sein d'un même État. La mise à disposition automatique de données actualisées et démocratisées améliorerait la transparence et la confiance envers les pouvoirs publics. »

Ces trois études démontrent incontestablement que d'autres modifications du codage génétique ont été opérées sur d'autres lettres « A » « G » « C » de l'ARN messager anti-COVID à l'insu des vaccinés.

La parfaite maitrise du codage génétique de ces injections par leurs concepteurs et la parfaite similitude des droites de régression du graphique ci-dessus sur la relation lot / effets secondaires, démontrent clairement **la volonté homicide liée à ces injections de produits génétiques.**

Mais surtout, que les autorités citées dans la présente plainte ainsi que leurs dirigeants ont, en l'état des connaissances et de leur niveau d'information et de compétence scientifique, d'une part, opéré consciemment et volontairement une manipulation génétique, et d'autre part, ne pouvaient ignorer les conséquences potentielles de cette manipulation sur les populations. Plus encore, cet acte peut être regardé comme une véritable prise de contrôle de la production des cellules humaines des personnes inoculées/vaccinées sans leur consentement express et à leur insu par un organisme, entreprise ou autorité étrangère, afin de produire des protéines inconnues et non déclarées. La validation de la technologie « ARN messager » génétiquement codée *a priori* pour produire une protéine inconnue lors de son usage en population générale pourrait alors révéler ou masquer la validation de l'équivalent d'une arme biologique.

Toutes les autorités européennes, internationales et de l'Etat, visées dans la présente plainte, sont intervenues pour valider le choix et l'utilisation de cette technologie à tous les stades du processus d'expérimentation puis de vaccination générale contre la Covid-19.

Cette sorte de transhumanisme forcé est contraire au Code moral et éthique figurant en filigrane dans ce nombreuses conventions internationales, dit "Code de Nuremberg".

Qui plus est, les vaccins *Pfizer-BioNtech (Comirnaty)*, *Moderna (Spikevax)* et *Curevac (CVnCoV)*, utilisant la technologie ARN Messager, ont bénéficié en France d'un monopole de fait : une fois exclu le recours aux vaccins *AstraZeneca* (*Vaxzevria*) à partir du 15 mars 2021 pour les nouvelles injections ; la restriction du Vaccin *Janssen/Jcovden* de *Johnson&Johnson* par un avis de la Haute Autorité de Santé en février 2022 ; l'échec commercial du vaccin classique à virus inactivé *Valneva* (*VLA 2001*) par un avis défavorable de la Haute Autorité de Santé le 8 novembre 2022 ; et le très faible nombre d'injections des vaccins *Novavax* (*Nuvaxovid* – 40 800 injections, soit 0, 2%) et *Sanofi-Pasteur* (*Vidprevtyn* – 6900 injections, soit 0, 0044%) sur un total de 156 788 000 injections tous vaccins confondus.

Ainsi, aujourd'hui, l'on assiste à des phénomènes qui étaient autrefois très rares:

-De jeunes sportifs de haut niveau tombent, victimes de problèmes cardiaques,
par dizaines,
-des musiciens, chanteurs, gens du show business, qui, pour pouvoir continuer à jouer ou à chanter, ont eu recours au pass vaccinal, sont victimes, soit de problèmes cardiaques, soit de "turbo-cancers" dont la particularité est que la chimiothérapie, n'a pratiquement aucun effet,
-De nombreuse jeunes filles n'ont plus de menstruations,
-Des femmes âgées, ont de nouveau des menstruations,
-Le nombre de fausses couches a augmenté de manière inquiétante.

Hypocritement, les médias ont parlé de baisse de la natalité, sans évoquer la cause.
Cet ensemble de faits est totalement occulté, malgré les cris d'alarme de médecins internationalement connus.

Bien plus, dans son ouvrage "Les Apprentis sorciers" Madame HENRION-CAUDE, une des meilleures généticiennes françaises, indique :

"*...En 3 mois d'essais cliniques, environ* ***14 morts par jour ont été enregistrés par Pfizer, avec exactement 1.223 décès et 158.893 effets indésirables*** *enregistrés entre le 1er décembre 2020 et le 28 février 2021...*"

Il suffit de se reporter au rapport établi par le laboratoire Pfizer le 28 fév. 2021 :

https://phmpt.org/wp-content/uploads/2021/11/5.3.6-postmarketing-experience.pdf

Sur le rapport concernant les effets secondaires présenté par l'Agence Nationale de « Sécurité » du Médicament (ANSM) le 11 novembre 2021

Le **Rapport 19** de l'ANSM du 11 novembre 2021 précisait :

« ***Description générale des cas graves et non graves***

Au total, sur les 67 999 cas rapportés, 50 251 (73,9 %) correspondaient à des cas non graves et ***17 748 (26,1 %) à des cas graves*** *au regard des définitions réglementaires internationales de pharmacovigilance.*
Depuis le précédent rapport*, 20 714 nouveaux cas ont été transmis, dont 4 652 graves (22,5 %).* »

NB : Le rapport « précédent » évoqué par l'ANSM est le rapport 18 couvrant la période du 2 juillet 2021 au 26 aout 2021 : 4.652 nouveaux cas graves entre les deux rapports ...

Malgré le fait que ces chiffres soient largement sous-estimés étant donné la méthodologie utilisée par la pharmacovigilance française, l'ANSM n'a toujours pas retiré du marché ces injections à ARN messagers alors qu'en d'autres temps elle avait retiré le MÉDIATOR qui « n'a provoqué » qu'entre 500 et 1500 décès !

Au regard de ces 17 748 cas graves « officiels » depuis le début des injections d'ARN messagers, de sérieuses questions se posent sur les raisons de l'inaction des différents directeurs qui se sont succédés à la tête de l'ANSM depuis le début des injections d'ARN messagers : Mme Christelle Ratignier-Carbonneil (décembre 2020 à juin 2024), Mr Alexandre de la Volpilière (juin 2024 à novembre 2024) et Mme Catherine Paugam-Burtz (de novembre 2024 à aujourd'hui).

La diversité des **cas graves énoncés par l'ANSM elle-même** est la parfaite illustration de l'exposé, des études et rapports contenus dans les présentes écritures : neutralisation de la protection anti-cancer naturelle – Protéine P53 etc -, dérèglement du SRA, toxicité des particules lipidiques, l'insertion de molécules inspirées du VIH (SIDA), CHOIX par les deux concurrents Pfizer et MODERNA de l'antigène SPIKE (protéine avec codage génétique manipulé / augmenté – gain de fonction) au lieu de la protéine N (voir Rapport Dr JM SABATIER), production de protéines « fantômes » dont les effets ne pourront probablement n'être identifiés que par des statistiques dans quelques années – stérilisation, cancer etc ?- -

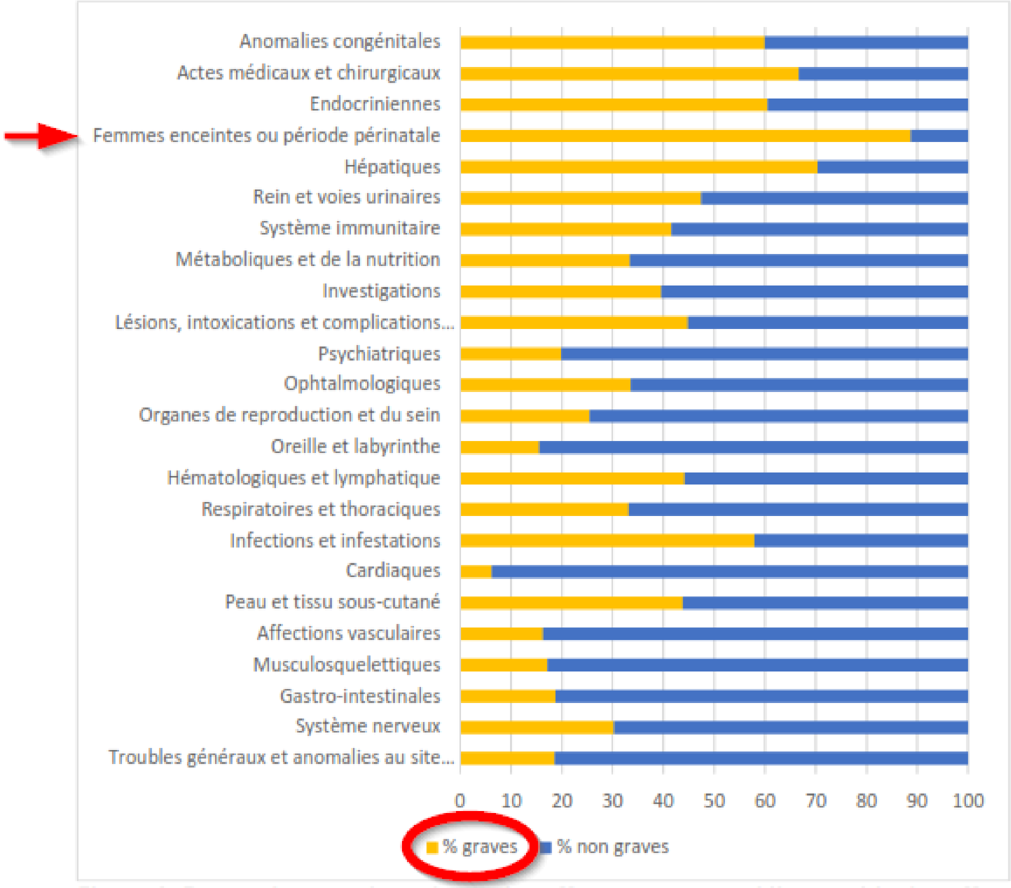


Figure 1. Proportion représentée par les effets graves parmi l'ensemble des effets rapportés en France au 11/11/2021, par *System Organ Class* (avec au moins 5 cas).

La Figure 1 détaille, par *System Organ Class*, la proportion des effets graves parmi l'ensemble des effets rapportés.

NB :
Bien entendu, il est probable que l'ANSM n'aborde pas, par soucis d'opportunité, les « Turbo-Cancers » dans sa liste. Cela peut s'expliquer par un lien de causalité quasiment impossible à prouver pour les victimes ou leurs familles sans les études et rapports présentés dans ce document.

On pourra remarquer également que malgré les très nombreux cas graves concernant les « Femmes enceintes ou prénatales », ni Mme Christelle Ratignier-Carbonneil, ni Mr Alexandre de la Volpilière, ni Mme Catherine Paugam-Burtz n'ont interdit les injections d'ARN messagers pour cette population (article L5311-1 du code de la santé publique). Cette inaction constitue à l'évidence une carence manifeste dans l'exercice de leur fonction pouvant à d'autres titres, engager leur responsabilité.

Ainsi, dès le début de la campagne de vaccination, de nombreuses personnes savaient que ces injections étaient potentiellement mortelles !

III- LES INFRACTIONS PENALES :

1- L'EMPOISONNEMENT (art 221-5 du Code pénal)

La qualification de « Crime par empoisonnement » liée au **« TURBO CANCER » qui a entrainé la mort de Mme L...** est établie par la **connaissance acquise** de tout ce qui précède **antérieurement à l'injection** par :

- Les industriels du vaccin anti-COVID ;
- **L'ANSM** ;
- Les autorités de santé en général ;
- Le médecin injecteur.

Le décés de Madame L... a été causé par :

- **La neutralisation de la protection naturelle anti-cancer P53 (2) ;**
- **Le dérèglement du Système Rénine Angiotensine (SRA) (3) ;**
- **L'empoisonnement aux particules lipidiques (4);**
- **L'insertion de parties du VIH (SIDA) dans le codage génétique de milliers de milliards d'ARN messagers injectés (5);**
- **La modification du codage génétique entraînant notamment la production de protéines « fantômes » délétères (6).**

Cette qualification est renforcée par la jurisprudence déterminant le lien de causalité entre l'injection d'ARN messagers et le « TURBO CANCER » de Mme L....

En effet, les études scientifiques précitées, **datant d'avant l'injection de Mme L...**, combinées à la jurisprudence invoquée ci-dessous contribuent incontestablement à démontrer le lien de causalité entre l'injection de Mme L... et son « turbo cancer ».

Jurisprudence sur le lien de causalité :

a) Arrêt CJUE 2017.06.21 Affaire C-621/15

§ 43 indices graves et concordants suffisent comme régime probatoire sur saisine cour de cassation en 2015 par le biais d'une question préjudicielle :

#43 « *Eu égard à l'ensemble des considérations qui précèdent il y a lieu de répondre à la première question que l'article 4 de la directive 85/374 doit être interprété en ce sens qu'il ne s'oppose pas à un régime probatoire national tel que* *celui en cause au principal en vertu duquel, lorsque le juge du fond est saisi d'une action visant à mettre en cause la responsabilité du producteur d'un vaccin du fait d'un défaut allégué de ce dernier, il peut considérer, dans l'exercice du pouvoir d'appréciation dont il se trouve investi à cet égard, que, nonobstant la constatation que la recherche médicale n'établit ni n'infirme l'existence d'un lien entre l'administration du vaccin et la survenance de la maladie dont est atteinte la victime,* ***certains éléments de fait invoqués par le demandeur constituent des indices graves, précis et concordants permettant de conclure à l'existence d'un défaut du vaccin et à celle d'un lien de causalité entre ce défaut et ladite maladie.*** »

https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A62015CJ0621

b) COUR DE CASSATION 18.10.2017 :

« La cour de cassation applique la méthode du « faisceau d'indices graves et concordants » » :

https://actu.dalloz-etudiant.fr/a-la-une/article/vaccin-contre-lhepatite-b-et-sclerose-en-plaques-preuve-du-lien-causal/h/e23da140e65c1cdedf3bd03652f94a61.html

c) CEDH 13.02 2020 valide la procédure et rejette le recours de SANOFI

https://hudoc.echr.coe.int/app/conversion/pdf?library=ECHR&id=003-6638280-8815915&filename=Arr%EAt%20Sanofi%20Pasteur%20c.%20France%20-%20action%20en%20r%E9paration%20contre%20la%20soci%E9t%E9%20Sanofi%20Pasteur%20.pdf
https://www.la-croix.com/Economie/Sclerose-plaques-vaccin-contre-hepatite-B-Sanofi-droit-proces-equitable-CEDH-2020-02-13-1301078087

« Dans son arrêt de chambre , rendu ce jour dans l'affaire Sanofi Pasteur c. France (requête n° 25137/16), la Cour européenne des droits de l'homme dit, à l'unanimité, qu'il y a eu :
- non-violation de l'article 6 § 1 (droit à un procès équitable) de la Convention européenne des droits de l'homme, à raison des modalités de fixation du point de départ de la prescription de l'action en réparation dirigée contre la société requérante [..] »
« L'affaire concerne la responsabilité de la société Sanofi Pasteur à l'égard d'une personne, alors élève infirmière, vaccinée contre l'hépatite B, qui a souffert ensuite de diverses pathologies dont une sclérose en plaques, et la condamnation de la société requérante au paiement de réparations. »

Les études scientifiques (datant d'avant le lancement de la campagne d'injection anti-COVID 19) visées dans les attestations de C. ESCARGUEL et de JM. SABATIER démontrent incontestablement les critères retenus par les magistrats afin de prouver le lien de causalité entre l'injection anti-COVID 19 et le « turbo-

cancer » de Mme L.... : « *indices graves, précis et concordants » et le* « faisceau d'indices graves et concordants ».

En effet, la neutralisation (immunosuppression) de la protection anti-cancer (P53, entre autre), le dérèglement du Système Rénine Angiotensine tous deux causés par les milliards de protéines SPIKE produites dans l'organisme de Mme L... ainsi que les milliards de protéines fantômes et la cancérogénicité des particules lipidique constituent donc incontestablement le « faisceau d'indices graves, précis et concordants » exigé par les Magistrat afin de prouver le lien de causalité entre l'injection anti-COVID 19 et le « turbo-cancer » de Mme L....

2- LA MORT DE MME L... PAR « TURBO CANCER » PAR MANQUEMENT A UNE OBLIGATION (art 221-6 du Code pénal)

L'article 5 de la convention d'OVIEDO ratifiée par la France le 13 décembre 2011, **de valeur supra légilative**, et sa mise en œuvre par l'article R.4127-36 du Code de la santé publique : obligation d'information et de recueillir le consentement libre et éclairé du patient.

En cas de litige, l'alinéa 7 de l'article L1111-2 du Code de la santé publique impose au professionnel d'apporter la preuve que ces obligations ont bien été respectées.

La délivrance d'information et l'obtention du consentement libre et éclairé du patient est donc une obligation particulière de prudence et de sécurité prévue par la loi (OVIEDO, **supra législative** et l'article R.4127-36 du Code de la santé publique).

Demander le consentement du patient est donc une obligation particulière de prudence et de sécurité prévue par la loi (OVIEDO, supra législative et l'article R.4127-36 du Code de la santé publique).

Deux fondements pénaux sont directement rattachés à ces manquements graves au droit à l'information préalable du patient et au manquement de prudence : article 221-6 et article 223-1 du Code pénal.

Toutes les données scientifiques précitées concernant les effets secondaires graves de ces produits ARNm ne pouvaient en aucun cas être ignorées des médecins injecteurs, comme ils l'ont fait en l'espèce.

Dès lors, l'omission du médecin injecteur établie par les pièces du dossier, d'une part, d'informer Mme L... de l'intégralité des risques encourus, d'autre part, de recueillir son consentement libre et éclairé fort de ces informations -conformément à l'article 5 de la Convention d'OVIEDO ratifiée par la France- engage alors la responsabilité pénale du médecin qui a injecté Madame L..., avec toutes les conséquences de droit.

3- LA VOLONTÉ DE TROMPER (art 223-1 du Code pénal)

L'instruction donnée par le ministre au Président de l'Ordre des médecins dans sa lettre du 23 décembre 2020 démontre incontestablement la volonté de tromper afin de cacher les possibles effets secondaires.

Monsieur Véran écrivait notamment :

« La responsabilité des médecins ne pourra pas être engagée au motif qu'ils auraient délivré une information insuffisante aux patients sur les effets indésirables méconnus à la date de vaccination »

« En outre, pour qualifier une éventuelle faute caractérisée, le juge tiendrait compte de l'urgence qui préside au déploiement des vaccins ainsi que des circonstances (complexité, charge de travail ..) »

Ce courrier est donc constitutif d'une incitation encourageant l'injecteur à ne pas respecter ses obligations déontologiques (annoncer au patient, avant l'injection, tous les effets secondaires connus et recueillir un consentement libre, éclairé, non vicié) alors que ces obligations sont pourtant issues d'une Convention internationale de valeur supra législative.

Dans son courrier, Monsieur Véran, Ministre, s'est autorisé à neutraliser un article d'une convention internationale ratifiée par la France le 13 décembre 2011 ainsi que de sous-entendre, avec insolence, que les « Juges » seraient à ses ordres !

Lettre d'Olivier Véran au Président de l'Ordre des médecins Patrick Bouet) :

(Pièce n°23)

IV- LES ACTES PREPARATOIRES: (actes, contradictions, et mensonges)

En effet, un certain nombre de faits démontre qu'à l'évidence, une action préméditée, a contraint des millions de personnes à recevoir des produits toxiques.

A- Les actes :

1- **Toutes les thérapeutiques avaient été interdites** avant même que le virus ne soit arrivé en France (Ex : Arrêté du 13 janvier 2020 *portant classement sur les listes des substances vénéneuses*, de l'hydroxychloroquine).

L'hydroxychloroquine n'était pas la seule thérapeutique, puisqu'en plus de celle-ci, on peut citer parmi les thérapeutiques mondialement connues :
-La vitamine C en perfusion et à haute dose,
-L'Artemisia annua
-L'Ivermectine.

Le Conseil d'Etat a d'ailleurs rejeté la requête d'un médecin demandant que l'on enjoigne au Ministère de la Santé de faire savoir aux hôpitaux que la Vitamine C en perfusion et à haute dose, avait guéri de nombreux malades Covid en Chine, au Japon et aux U.S.A. **(pièce n°6)**

L'article de Claude ESCARGUEL paru dans le Quotidien du médecin le 7 mai 2020 proposant un traitement qui fonctionnait est resté « lettre morte ».

(Pièce n°24)

La lettre du Professeur Luc MONTAGNIER au Président de la République du 6 mai 2021 dans laquelle étaient proposées des solutions thérapeutiques n'a eu aucun impact non plus.

(Pièce n°25)

Les médias ont matraqué l'opinion avec la phrase "*Restez chez vous, prenez du Doliprane*", ce qui a empêché de nombreuses personnes de se faire soigner en temps utile, et les a contraintes de se faire hospitaliser, alors que la plupart d'entre elles auraient guéri normalement chez elles, s'ils avaient pu être soignées à temps.

De nombreux médecins qui n'avaient pas respecté cette interdiction, ont fait l'objet de poursuites disciplinaires pour avoir prescrit des médicaments (bien qu'ils aient obtenu la guérison de leurs patients !)

2- Sélection de certains hôpitaux : Après avoir progressivement, supprimé 15.000 lits d'hôpitaux au cours des années antérieures, il a été décidé que **seuls 37 hôpitaux** sur 1.200, seraient habilités à recevoir des malades du Covid. Tous les autres n'en avaient pas, et les cliniques privées non plus, alors que, dans l'ignorance de cette manoeuvre, de nombreuses cliniques avaient fait savoir (en vain) qu'il y avait de la place. Les 37 hôpitaux étaient donc surchargés, et les médias ne montraient que ceux-là... Il s'agissait donc d'une saturation provoquée.

3- Gonflement des chiffres : Les chiffres des décès relatifs à la Covid-19 ont été largement surreprésentés grâce à une ingéniosité statistique (source : Pierre Chaillot, *COVID 19 - Ce que révèlent les chiffres officiels,* L'Artilleur, 2022, *480 pages)*, et grâce à d'autres astuces : Ainsi, par exemple, ligne budgétaire gonflée pour chaque malade qualifié "Covid". De ce fait, lorsqu'un accidenté de la route était hospitalisé dans un état grave, et qu'il décédait des suites de ses blessures, s'il avait été testé positif entre temps, il était indiqué "*décès des suites du Covid*".

Selon le site officiel A.T.I.H. *Les patients COVID représentent 2% de l'ensemble des patients hospitalisés au cours de l'année 2020... Parmi l'ensemble des décès hospitaliers survenus au cours de l'année 2020, 11% ont concerné des patients Covid...*"

(pièce n°7)

4- Diffusion de la terreur par la théorie des "cas" : Le déclenchement de la terreur s'est opéré par 2 techniques n'ayant rien à envier aux gourous de sectes :

a) introduction d'un vocabulaire ciblé : Au lieu de parler de "porteurs sains", l'on a inventé la notion de "malade asymptomatique", alors que qu'une personne n'ayant pas de symptômes peut difficilement être considérée comme malade, et que dès le début l'on savait que les porteurs sains n'étaient pas contagieux.

b) pour alimenter cette supercherie, l'on s'est basé sur des tests PCR qui, compte tenu du nombre de cycles, identifiaient n'importe quel virus ou fragment ancien de virus, ce qui a permis de déclarer positifs des sujets qui ne l'étaient pas. Ainsi, une étude a été réalisée et publiée fin septembre 2020, au cours de laquelle des cultures de prélèvements positifs aux tests PCR ont été réalisés, afin de savoir s'il y avait réellement des virus vivants dans ces prélèvements.

(pièces n°8 et 9)

Les résultats ont été fort intéressants :

-Avec un CT = 25, pour 32% des prélèvements PCR positifs, on ne peut pas cultiver de virus, car ils sont morts.

-Avec un CT = 30, dans 79% des prélèvements, il n'y a aucun virus vivant.

-Avec un CT = 35, dans 97% des prélèvements, il n'y a aucun virus vivant.

En France, la majorité des tests PCR ont été réalisés avec un CT variant **entre 30 et 50.** La conclusions est évidente...

Cette diffusion de la terreur a tellement bien fonctionné que, bien que les décès du Covid n'aient touché que 0,035 % des personnes officiellement contaminées, soit le taux le plus bas de toutes les épidémies que la France a connu et qu'ainsi, 99,96 % des malades aient survécu, tant les grands médias, que les autorités, ont continué cette "terrorisation" infantile de la population

5- Actes préparatoires concernant les vaccins anti covid 19 :

a) Contrats aux étranges dispositions :

Ainsi par exemple, le contrat signé entre la commission européenne et le laboratoires Pfizer, contenait d’étranges dispositions par lesquelles :

-Les parties reconnaissent ne rien savoir sur l’efficacité des produits,
-les parties reconnaissent ignorer les effets indésirables à long terme,
-En cas d’effets indésirables, les laboratoires bénéficient d'une exonération de responsabilité.

(pièce n°10)

b) **Contrôles limités :** La question s'est posée immédiatement : Les produits pharmaceutiques utilisant la nouvelle formule à ARN messager, étaient normalement qualifiés de "médicaments" et soumis à certains contrôles avant d'obtenir l'A.M.M.

Or, dans le système français, les produits appelés "vaccins" ne nécessitaient pas autant de contrôles. C'est la raison pour laquelle, les produits Astrazeneca, Janssen, Moderna et Pfizer ont tout de suite été étiquetés "vaccins". Si leur véritable appellation avait été gardée, c'est à dire "médicament génique", ils n'auraient pas pu obtenir l'A.M.M. aussi facilement.

Alors qu'il faut normalement une dizaine d'années pour lancer un nouveau vaccin, ces 4 nouveaux produits, seuls validés du point de vue de l'obligation pour les soignants, ont pu ainsi être préparés et lancés sur le marché en seulement quelques mois ! Ils ont ainsi obtenu une A.M.M. conditionnelle.

Ainsi, les français ont reçu des injections de produits en période d'essai clinique, pour lesquels même les médecins vaccinateurs ignoraient la composition, et n'avaient même pas la curiosité de consulter la pharmacovigilance pour connaître les éventuels effets indésirables.

Les français ont donc été des cobayes ! En outre, le fait de parler de consentement libre et éclairé est une plaisanterie de mauvais goût...

D'ailleurs M. DUPONT-MORETTI, Garde des Sceaux, déclarait courant 2021: *"On ne vas pas obliger les détenus à se faire vacciner. Les détenus ne sont quand même pas des cobayes !!"*

c) **La tarification à l'acte a été largement majorée** : C'est ainsi que les médecins vaccinateurs des vaccinodromes, ont été rémunérés environ 1.000€ par jour ! On comprend pourquoi l'ensemble du corps médical ne s'est pas opposé à ce système, et pourquoi même des médecins retraités étaient venus reprendre du service pour vacciner.

B- les contradictions dans les propos des autorités de Santé.

a) Au cours de l'hiver 2019/2020, M. Olivier VERAN, déclarait sur les grandes chaines de télévision : "*...Le confinement, c'est ce qui va faire flamber l'épidémie...*"

15 jours plus tard, l'on va confiner

b) Edouard Philippe, sur l'avis “des médecins et des scientifiques : « *...Le port du masque en population générale dans la rue, ça ne sert à rien Ceux qui doivent porter un masque, ce sont les soignants, les malades, et ceux qui ont eu un contact avéré avec un malade.* »

c) Sibeth Ndiaye, porte-parole du gouvernement :
« *Les Français ne pourront pas acheter de masques dans les pharmacies parce que ce n'est* ***pas nécessaire quand on n'est pas malade.*** » .

d) Anthony Fauci, directeur du NIH.

> Dans un document intitulé “ Conseils sur l'utilisation des masques dans le cadre du COVID-19". :
> *«Il n'y a aucune raison de se promener avec un masque. Lorsque vous êtes au milieu d'une épidémie, le port d'un masque peut aider les gens à se sentir un peu mieux et peut même bloquer une gouttelette, mais cela ne fournit pas la protection parfaite que les gens pensent que c'est. Et, souvent, il y a des conséquences inattendues, les gens continuent de jouer avec le masque et ils continuent de se toucher le visage. »*

Malgré toutes ces déclarations, l'on va obliger toute la population à se masquer, de manière d'autant plus étrange que l'on savait dès le départ que les masques grand public, protégeaient des bactéries, mais pas du virus, (trop petit et passant au travers des masques dans les 2 sens). Cette évidence était d'ailleurs écrite sur les 1ères boites, mais a été retirée par la suite...

(pièce n°11)

Ainsi, mis à part terroriser la population, l'on voit mal à quoi a servi cette mesure ayant entrainé d'énormes dégâts psychologiques chez des milliers d'enfants, lesquels d'ailleurs, échappaient à l'épidémie.

C- Les mensonges :

Par la suite, les autorités de santé ont été contraintes de reconnaître :

-Que le « vaccin » contre la Covid-19 n'empêchait pas de contracter la maladie.

-Qu'il n'empêchait pas de la transmettre.

En effet, courant mars 2021, un particulier saisit le Conseil d'Etat, demandant, dans le cadre d'une procédure d'urgence, l'annulation du Décret qui prévoyait les mesures de port du masque, et de couvre-feu "*en tant qu'il s'applique aux personnes vaccinées."* Dans son mémoire en défense, le Ministère de la Santé indique notamment "...*Même lorsqu'il a une efficacité sur les personnes concernées, en l'état des connaissances scientifiques,* ***le vaccin ne les empêche pas de transmettre le virus aux tiers...***"

Par Ordonnance du 1er avril 2021, le Conseil d'Etat rejette la requête du particulier, en indiquant "...*les personnes vaccinées peuvent cependant demeurer porteuses du virus et ainsi contribuer à la diffusion de l'épidémie...*"

Ainsi, il est démontré qu'en avril 2021, **M. le Ministre de la Santé savait** que le vaccin n'empêchait pas de transmettre le virus.

(Pièce n°12)

Le slogan *"Vaccinez-vous pour protéger les autres"* était donc intentionnellement mensonger !

Tout candidat au vaccin, devant cette réalité, risquait alors de refuser de se faire vacciner. C'est alors qu'une véritable pirouette a été trouvée : "*Oui, mais cela protège des formes graves...*"

Cette affirmation était d'autant plus fausse, que les chiffres alarmants publiés par l'A.N.S.M. concernant la gravité des effets indésirables, ne pouvaient échapper à ceux qui organisaient ou participaient à la propagande vaccinale.

En effet, les chiffres l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (A.N.S.M.) dès le début de la campagne de vaccination, étaient alarmants :

Alors que la campagne de vaccination a commencé dans les derniers jours de décembre 2020, le rapport de l'A.N.S.M. de la mi-mai 2021, fait état de 37.018 déclarations d'effets indésirables, dont 26% (9.624) graves !

(pièce n°13)

En 5 mois seulement, jamais l'on avait vu de tels chiffres ! Dès que le nombre de décès a atteint les 1.200, les rapports réguliers de l'A.N.S.M. ont comptabilisé les formes graves, mais en ne précisant plus le nombre de décès.

En outre, le 18 février 2021, dans une conférence de presse, M. le Ministre de la Santé reconnait qu'aucun pays Européen n'a pu apporter la preuve que ces vaccins permettaient de prévenir les formes graves de la maladie...

D'autre part, un arrêt n°450413 du Conseil d'Etat du 11 mars 2021 admet: "*... l'incertitude qui demeure sur l'efficacité réelle du vaccin quant à la propagation du virus...*" Malgré cela, les discours officiels relayés par les grands médias ont continué de mentir, en cachant cette réalité !

Aujourd'hui, il est possible d'affirmer, avec uniquement les chiffres officiels de la pharmacovigilance, que le nombre d'effets indésirables est 1.200 fois supérieur en proportion à celui des autres vaccins : 1 déclaration sur 809 injections (le vaccin contre la grippe fait l'objet d'une déclaration sur 1.000.000 d'injections). Le site de l'A.N.S.M. indique en mai 2023 **193.571 déclarations d'effets indésirables, dont 25% (plus de 48.000) graves !**

L'A.N.S.M. précise que sur 156.711.100 injections, il y a eu 193.571 déclarations, ce qui fait bien 1 déclaration pour 809 injections.

(pièce n°14)

Ce **chiffre** est **colossal ! jamais vu en matière de vaccination !**

N.B. L'A.N.S.M. indique régulièrement que les déclarations en matière de vaccinations, concernent à peine 10% de la réalité, puisque le système est un système de déclarations passives :

-Les victimes ne savent pas qu'elles peuvent faire elles même la déclaration,

-Les médecins, qui sont souvent ceux qui ont vacciné, hésitent également à faire ce type de déclarations, d'autant plus que les formulaires sont compliqués à remplir.

Il est donc possible d'affirmer qu'il y aurait un effet indésirable pour 80 injections, et un effet grave pour 320 injections !
Par contre, de manière honteuse, les autorités de santé, comme les grands médias nient totalement l'existence d'effets secondaires, cachant cela à la population, et continuant de les inciter à se faire vacciner !

V-_ LA PREMEDITATION : ASSASSINAT : (art. 221-3 al. 1 code pénal)

Le Dr SABATIER est très clair dans son attestation (paragraphe IV) : **le choix de la protéine SPIKE comme protéine antigène a été « inapproprié ».**

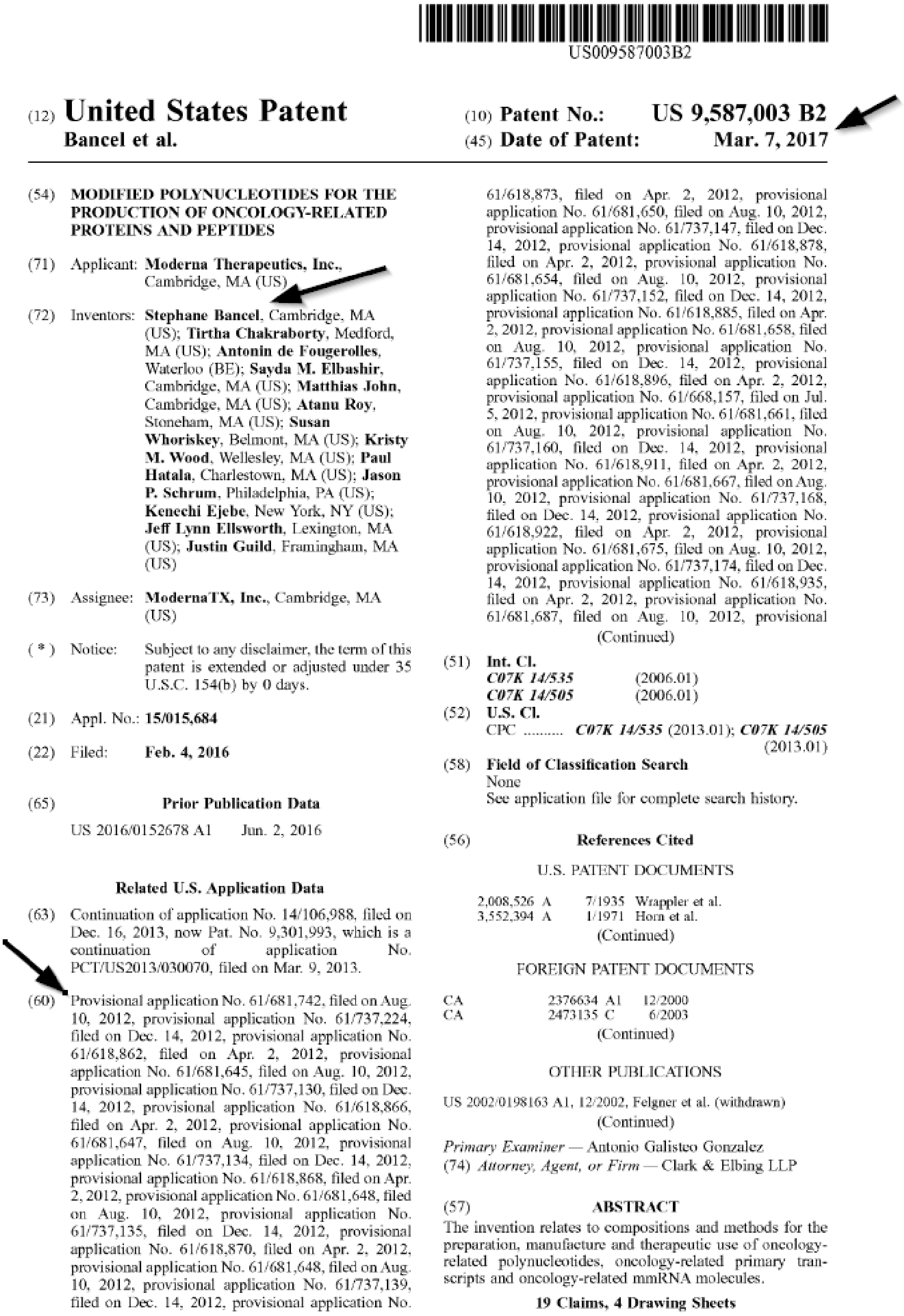
Il précise : « ***la protéine N (nucléocapside) du SARS-CoV-2 comme cible pour une approche vaccinale anti-Covid présente plusieurs avantages par rapport à la protéine Spike :***
(i) il existe une forte conservation de la protéine N entre les variants viraux (la protéine N mute beaucoup moins que la protéine Spike). Ainsi, la protéine N est hautement conservée entre les différents variants du SARS-CoV-2, ce qui signifie qu'un vaccin basé sur la protéine N pourrait offrir une protection plus large et durable contre de futurs variants ;

(ii) la réponse immunitaire cellulaire est robuste, car la protéine N induit une forte réponse des lymphocytes T (CD4+ auxiliaires et CD8+ cytotoxiques) essentielle pour l'élimination des cellules infectées. La protéine N devrait contribuer à une immunité de longue durée ;

(iii) l'expression de la protéine N est précoce et abondante, ce qui indique que la protéine N est produite en grande quantité dès le début de l'infection virale. Cela la rend facilement détectable par le système immunitaire, augmentant les chances d'une réponse immunitaire protectrice rapide ;

(iv) la pression de sélection de la protéine N est beaucoup plus faible que celle de la protéine Spike. En effet, la protéine Spike est soumise à une forte pression de sélection car elle est la principale cible des anticorps neutralisants, tandis que la protéine N est une protéine interne moins exposée à cette pression évolutive, donc moins sujette à des *mutations d'échappement.* »

Attestation du Dr Jean-Marc SABATIER, paragraphe IV : **(Pièce n° 21 précitée)**
Curieusement, il apparait que les deux sociétés concurrentes MODERNA et PFIZER ont toutes les deux préféré choisir la protéine SPIKE comme antigène tout en sachant parfaitement qu'elle présentait de grands risques pour la santé humaine avec notamment des insertions VIH (SIDA) et la manipulation de son codage.
En analysant le schéma de l'historique de la conception de cette protéine SPIKE manipulée / augmentée : **(Pièce n°26),**
l'on s'aperçoit qu'une démarche criminelle s'est établie depuis les premiers dépôts de « provisional application » **en 2012** qui ont abouti par la délivrance d'un brevet de **309 pages** à MODERNA le 7 mars 2017 **dont Mr Stéphane BANCEL est désigné comme le principal inventeur :**



US009587003B2

(12) **United States Patent**
Bancel et al.

(10) **Patent No.:** **US 9,587,003 B2**
(45) **Date of Patent:** **Mar. 7, 2017**

(54) **MODIFIED POLYNUCLEOTIDES FOR THE PRODUCTION OF ONCOLOGY-RELATED PROTEINS AND PEPTIDES**

(71) Applicant: **Moderna Therapeutics, Inc.**, Cambridge, MA (US)

(72) Inventors: **Stephane Bancel**, Cambridge, MA (US); **Tirtha Chakraborty**, Medford, MA (US); **Antonin de Fougerolles**, Waterloo (BE); **Sayda M. Elbashir**, Cambridge, MA (US); **Matthias John**, Cambridge, MA (US); **Atanu Roy**, Stoneham, MA (US); **Susan Whoriskey**, Belmont, MA (US); **Kristy M. Wood**, Wellesley, MA (US); **Paul Hatala**, Charlestown, MA (US); **Jason P. Schrum**, Philadelphia, PA (US); **Kenechi Ejebe**, New York, NY (US); **Jeff Lynn Ellsworth**, Lexington, MA (US); **Justin Guild**, Framingham, MA (US)

(73) Assignee: **ModernaTX, Inc.**, Cambridge, MA (US)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **15/015,684**

(22) Filed: **Feb. 4, 2016**

(65) **Prior Publication Data**

US 2016/0152678 A1 Jun. 2, 2016

Related U.S. Application Data

(63) Continuation of application No. 14/106,988, filed on Dec. 16, 2013, now Pat. No. 9,301,993, which is a continuation of application No. PCT/US2013/030070, filed on Mar. 9, 2013.

(60) Provisional application No. 61/681,742, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,224, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,862, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,645, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,130, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,866, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,647, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,134, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,868, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,648, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,135, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,870, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,648, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,139, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,873, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,650, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,147, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,878, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,654, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,152, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,885, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,658, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,155, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,896, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/668,157, filed on Jul. 5, 2012, provisional application No. 61/681,661, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,160, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,911, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,667, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,168, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,922, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,675, filed on Aug. 10, 2012, provisional application No. 61/737,174, filed on Dec. 14, 2012, provisional application No. 61/618,935, filed on Apr. 2, 2012, provisional application No. 61/681,687, filed on Aug. 10, 2012, provisional

(Continued)

(51) **Int. Cl.**
C07K 14/535 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)

(52) **U.S. Cl.**
CPC ***C07K 14/535*** (2013.01); ***C07K 14/505*** (2013.01)

(58) **Field of Classification Search**
None
See application file for complete search history.

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

2,008,526 A 7/1935 Wrappler et al.
3,552,394 A 1/1971 Horn et al.

(Continued)

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

CA 2376634 A1 12/2000
CA 2473135 C 6/2003

(Continued)

OTHER PUBLICATIONS

US 2002/0198163 A1, 12/2002, Felgner et al. (withdrawn)

(Continued)

Primary Examiner — Antonio Galisteo Gonzalez
(74) *Attorney, Agent, or Firm* — Clark & Elbing LLP

(57) **ABSTRACT**

The invention relates to compositions and methods for the preparation, manufacture and therapeutic use of oncology-related polynucleotides, oncology-related primary transcripts and oncology-related mmRNA molecules.

19 Claims, 4 Drawing Sheets

Mr Stéphane BANCEL, de nationalité française, membre du « Young Global Leaders » du WEF (World Economique Forum) depuis 2009, a travaillé sept ans pour la société pharmaceutique BIOMÉRIEUX, de 1995 à 1998 (directeur marketing et vente) puis **de 2007 à 2011 comme Directeur Général délégué.**

Curieusement, il a ensuite intégré pour une durée de 6 mois le fond d'investissement « Flagship Ventures » (devenu « Flagship Pioneering » en 2011 pour investir dans la création développement de la société MODERNA.

https://investors.modernatx.com/governance/Leadership-Team/default.aspx
https://fr.wikipedia.org/wiki/St%C3%A9phane_Bancel

Mr Stéphane BANCEL a ensuite été désigné comme premier « inventeur » du brevet de MODERNA sur le site FURINE (VIH – SIDA) inséré dans la protéine SPIKE qui a notamment permis au SARS-Cov-2 (COVID) de s'accrocher aux cellules humaines afin de permettre au virus sans laquelle la **Pandémie « COVID-19 »** n'aurait pas été rendue possible**.**

https://lepointcritique.fr/2022/02/26/de-paris-a-wuhan-letonnant-parcours-du-pdg-de-moderna-stephane-bancel/

« De Paris à Wuhan, l'étonnant parcours du directeur général de Moderna, Stéphane Bancel

Il a fait fortune grâce à un virus. On apprend aujourd'hui que celui-ci contient une séquence génétique dont il a déposé le brevet en 2016, mais dont il semble peu enclin à revendiquer la paternité cinq ans plus tard. Qui est Stéphane Bancel, l'actuel PDG de Moderna, élu Young Leader en 2019 et dont le parcours semble avoir pour centre de gravité le labo P4 de Wuhan ? »

Nota :
Cette protéine SPIKE modifiée / augmentée (Gain de fonction) a été « greffée » sur le virus (Gain de fonction) par Mr Peter DASZAK, Président de l'organisme *Ecohealth Alliance* financé par les fonds du NIAID (NIH) par son directeur MrAntony FAUCI (fonds transférés par l'USAID).

Tout cela est officiellement attesté par un rapport de Chambre des Représentants États-Unis :
https://oversight.house.gov/release/final-report-covid-select-concludes-2-year-investigation-issues-500-page-final-report-on-lessons-learned-and-the-path-forward/

Mr Stéphane BANCEL, a donc été Directeur Général (CEO) de la société MODERNA DE 2011 à aujourd'hui.

Le 2 octobre 2013, après les premiers dépots de Provisional Application du Brevet du Site FURINE du VIH en 2012, la DARPA (Agence des projets de recherche avancée de la Défense américaine) a accordé à la socité MODERNA une subvention d'une valeur de 24,6 millions de dollars ;

https://fr.wikipedia.org/wiki/St%C3%A9phane_Bancel

Subvention DARPA sur le site internet MODERNA (Pièce n°28)

Le 8 octobre 2020, la DARPA a renforcé son aide par la somme de 56 millions de dollars ;

Subvention DARPA sur le site internet MODERNA (Pièce n°29)

En 2024, il aurait restreint ses fonctions de Directeur Général pour ne garder que celle de Directeur des ventes.

Une question importante se pose au sujet d'une éventuelle concertation entre BIOMÉRIEUX / Flagship Ventures / MODERNA / DARPA :

Comment Mr Stéphane BANCEL, qui était alors Directeur Général délégué de BIOMÉRIEUX - donc certainement sous contrat de confidentialité à ce niveau de responsabilité - a-t-il pu déposer un brevet et participer à la création et développement de MODERNA, en collaboration avec la DARPA, et ce, sans aucune réaction juridique de BIOMÉRIEUX ?

Sur la préméditation :

D'abord, le brevet obtenu par la société MODERNA dirigée Mr Stéphane BANCEL (principal inventeur) insérant un site FURINE dans une protéine affiche explicitement le CHOIX délibéré de concevoir une protéine permettant à un virus de s'accrocher aux cellules humaines ;

Ensuite, le CHOIX de la protéine SPIKE manipulée /augmentée comme antigène du « vaccin » au lieu de la protéine N (nucléocapside) dont les vertus comparatives sont parfaitement démontrées par le Dr JM SABATIER dans son attestation, démontre incontestablement l'intention homicide ;

Enfin, le fait que les deux fabricants de ces injections ARN messagers, les sociétés MODERNA et PFIZER, aient choisi de sélectionner la protéine dangereuse issue du brevet de MODERNA de 2012 avec des insertions du VIH (SIDA), renforce la démonstration de la préméditation ainsi que des actes préparatoires.

Un tableau joint au présent mémoire, permet de mieux visualiser et comprendre les infections provenant soit de la protéine SPIKE "naturelle" manipulée, soit de la protéine SPIKE vaccinale, également manipulée. **(pièce n°30)**

L'intention criminelle et la préméditation apparaissent dès lors, clairement.

VI- LES PERSONNES IMPLIQUEES :

Un certain nombre de personnes et d'organismes semblent plus ou moins impliquées dans ce processus ayant déjà conduit à la mort des milliers de personnes en France :

-Le médecin injecteur de Mme L… ;

-L'Agence européenne des médicaments (AEM), responsable des AMM conditionnelles, et son directeur général M. Guido Rasi puis Mme Emer Cooke (depuis nov. 2020) ;

-L'ANSM ainsi que ses présidentes successives Catherine de Salins et Valérie Delahaye-Guillocheau, depuis le 24 décembre 2021, Présidentes du CA) et Mme Christelle Ratignier-Carbonneil (directrice générale)

-La Haute Autorité de Santé (HAS) ainsi que ses présidents successifs durant la période : Mme Dominique Le Guludec, présidente (2017-2023) et Lionel Collet, président depuis 2023 ; ainsi que M. Thomas Wanecq, directeur jusque 2022 ; Mme Fabienne Bartoli (directrice depuis 2022) ;

-Santé publique France, son président et ses deux directeurs généraux durant la période : Mmes Marie-Caroline Bonnet-Galzy, présidente et Geneviève Chêne (DG jusque 2023) ; Caroline Semailles (DG) depuis 2023 ;

-L'Académie Nationale de Médecine et son président Patrice Tran Ba Buy, puis Jean-Pierre Goullé (depuis 2023) ;

-La société *Pfizer*, et son Directeur Général M. Albert Bourla (co-production du vaccin *Comirnaty)* ;

-La société *BioNTech*, et son Directeur Général M.Uğur Şahin (co-production du vaccin *Comirnaty)*;

-La société *Moderna, Inc.* et son Directeur Général M. Stéphane Bancel (production du vaccin *Spikevax)* ;

-La société *Curevac* (*Aktiengesellschaft*) et son Président du CA (CEO) Franz-Werner Haas ainsique M. Jean Stephenne, président du Conseil de Surveillance (production du vaccin *CVnCoV)*

-M. Tedros Adhanom Ghebreyesus, Directeur Général de l'OMS

-MmeYukiko Nakatani, Sous-Directrice générale, Accès aux médicaments et aux produits de santé, OMS ;

-**M. Jérôme Salomon,** alors Directeur général de la santé au Ministère français de la santé, devenu membre du Conseil exécutif de l'OMS.

Pour l'ensemble de ces raisons, M. Pierre L... estime qu'un certain nombre de personnes se sont rendues coupables des infraction suivantes :

-Empoisonnement ayant entrainé la mort, commis avec préméditation, faits prévus par les articles 221-5 et 221-3 du Code pénal,

-Expérimentation en population générale d’une technologie sans consentement totalement éclairé, faits prévus par l'article 223-8 du Code pénal.

- Négligence et manquement à une obligation découlant des fonctions, faits prévus par l'article 221-6 du Code pénal,

- Violation manifestement délibérée d’une obligation particulière de prudence ou de sécurité imposée par la loi ou le règlement, faits prévus par l'article 223-1 du Code pénal.

Fait à, le

ANNEXES PARTIELLES

Pièce n° 18 :
Lettre de Pfizer et MODERNA du 18 aout 2021.

Pièce n°19 :
Attestation de Claude ESCARGUEL, Chercheur en biologie humaine.

Pièce n°20 :
Vaccin ARNm spike P53 cancer.

Pièce n°21 :
Attestation du Docteur Jean-Marc SABATIER.

Pièce n°23 :
Lettre d'Olivier VÉRAN au Président de l'Ordre des médecins Patrick BOUET

Pièce n°26 :
Schéma de l'historique de la conception la protéine SPIKE manipulée / augmentée sur le Coronavirus (SARS-Cov-2 / COVID-19) et programmée dans les ARN messagers injectés.

Pièce n°27 :
Étude du 31 octobre 2019 *« LA PSEUDOURIDINYLATION DES SEQUENCES CODANTES DE L'ARNM MODIFIE LA TRADUCTION »*.

Pièce n°28 :
Subvention DARPA sur le site internet MODERNA (25 millions de dollars).

Pièce n°29 :
Subvention DARPA sur le site internet MODERNA (56 millions de dollars).

Pièce n°18

Bâle/Zurich, le 12.08.2021

Informations importantes relatives à la sécurité des vaccins à ARNm contre la COVID-19 (COVID-19 Vaccine Moderna et Comirnaty): risque de myocardite et de péricardite

Madame, Monsieur,

Moderna Switzerland GmbH et Pfizer AG, en accord avec Swissmedic, souhaitent vous informer de ce qui suit:

Résumé et recommandations à l'attention des professionnels de la santé

- **Des cas très rares de myocardite et de péricardite ont été signalés après la vaccination contre la COVID-19 avec les vaccins à ARNm COVID-19 Vaccine Moderna et Comirnaty.**

- **Ces cas sont pour la plupart survenus dans les 14 jours suivant la vaccination, plus souvent après la deuxième dose et chez des hommes jeunes.**

- **Les données disponibles suggèrent que l'évolution de la myocardite ou de la péricardite après la vaccination est similaire à l'évolution habituelle de la myocardite ou de la péricardite.**

- **Les professionnels de santé doivent être attentifs aux signes et symptômes de la myocardite et de la péricardite.**

- **Les professionnels de santé doivent conseiller aux personnes vaccinées de consulter immédiatement un médecin et d'obtenir une assistance médicale en cas de douleurs thoraciques, d'un essoufflement ou de palpitations.**

Informations contextuelles

Les vaccins à ARNm contre la COVID-19, COVID-19 Vaccine Moderna et Comirnaty, ont été autorisés en Suisse dans le cadre d'une autorisation à durée limitée pour l'immunisation active visant à prévenir l'infection par la COVID-19 provoquée par le virus SARS-CoV-2, chez les personnes âgées de 12 ans et plus.

Des myocardites et des péricardites ont été signalées en association avec les vaccins à ARNm contre la COVID-19.

Swissmedic a évalué toutes les données disponibles et a conclu qu'une association causale entre les vaccins à ARNm contre la COVID-19 et les myocardites et péricardites est au moins une possibilité raisonnable. En conséquence, les rubriques «Mises en garde et précautions» et «Effets indésirables» des informations professionnelles sont mises à jour. Les informations sur les médicaments actualisées sont publiées sur www.swissmedicinfo.ch.

Les avantages de la vaccination continuent de l'emporter sur tous les risques éventuels.

Au 20 juillet 2021, Swissmedic avait reçu et évalué 40 déclarations de cas de myocardite et/ou de péricardite en lien avec les vaccins contre la Covid-19 en Suisse. Les déclarations concernaient 7 femmes, 31 hommes et deux cas où le sexe n'était pas indiqué. L'âge moyen était de 45.5 ans (intervalle: 18-88 ans). Neuf déclarations concernaient Comirnaty, 30 déclarations le vaccin contre la Covid-19 de Moderna et une annonce ne mentionnait pas cette information.

Au 19 juillet 2021, environ 5.7 millions de doses de COVID-19 Vaccine Moderna et 2.9 millions de doses de Comirnaty avaient été administrées en Suisse.

Annonce d'effets indésirables

Pour le signalement de tout effet indésirable d'un médicament (EI), Swissmedic recommande aux personnes concernées d'utiliser le système électronique ElViS, qui est l'outil de déclaration d'effets indésirables. Toutes les informations nécessaires sont disponibles sur www.swissmedic.ch.

Ces médicaments font l'objet d'une surveillance supplémentaire qui permettra l'identification rapide de nouvelles informations relatives à la sécurité. Les professionnels de santé sont tenus de déclarer toute suspicion d'effet secondaire nouveau ou grave.

Coordonnées des titulaires des autorisations

Si vous avez d'autres questions ou si vous souhaitez obtenir des informations supplémentaires, veuillez contacter:

Moderna Switzerland GmbH
Moderna Medical information
Tél.: 0800110340
EMEAMedinfo@modernatx.com

Pfizer AG
Pfizer Medical Information
Tél.: +41 43 495 71 11
medical.information@pfizer.com

Annexes

Pour de plus amples informations, veuillez également consulter les informations professionnelles de COVID-19 Vaccine Moderna et Comirnaty sur www.swissmedicinfo.ch.

Meilleures salutations,

Dr Martina Bock
Medical Director
Moderna Switzerland GmbH

Dr méd. Rahel Troxler Saxer
Medical Director
Pfizer AG

Pièce n° 19

ATTESTATION DE CLAUDE ESCARGUEL

Chercheur en biologie humaine
Président du Syndicat National des Praticiens des Hôpitaux Généraux (SNPHG).
Ex-Directeur du laboratoire de l'institut de pédiatrie de Marseille
Secrétaire général de la fondation du prix NOBEL de médecine : Luc Montagnier
Co-président de l'association de malades Covid-Longs UPGCS.
Créateur de deux sociétés de biotechnologie
(International Mycoplasma et Bio Véto Test (les premiers au monde a mettre au point un vaccin contre la Leischmaniose canine) : aujourd'hui Virbac

Madame, Monsieur,

Je tiens à témoigner en tant que secrétaire général de la Fondation du prix Nobel de médecine, Luc Montagnier du danger que représentait la généralisation de l'injection des ARNm comme en témoigne la lettre adressée au Président de la République, Mr Emmanuel Macron dès le mois de mai 2021 (PJ 1).

En effet il était connu que de nombreuses interactions existaient entre la protéine spike et des molécules d'origine humaines et jouaient un rôle tant dans l'inflammation (co-facteur des cancérisations) que dans la neutralisation des facteurs anti-tumoraux type protéine P53.

En ce qui concerne l'amplification des mécanismes inflammatoires, dès décembre 2020, l'équipe du Pr Petruk publie ce mécanisme amplificateur, mécanisme d'autant plus risqué que la synthèse des protéines spike synthétisées par l'injection d'ARNm n'est pas du tout contrôlée et peut varier dans de très larges intervalles pouvant aboutir à l'éclosion d'une tumeur qui pouvait être contrôlée jusqu'à présent.

Ce mécanisme est d'autant plus dangereux que la recherche avait aussi identifié, dès 2021, le rôle suppresseur de la protéine spike sur les inhibiteurs de la cancérogénèse du type P 53, en interagissant sur les gènes de la P53 - mécanisme pouvant entrainer des syndromes de SIDI (Syndrome d'Immunologie Déficience Induit) d'origine iatrogène.

Ce mécanisme d'immunodéficience est aussi entretenu par l'action des nanoparticules lipidiques (PJ 4) qui sont utilisées pour protéger les ARNm injectés de leur dégradation immédiate.

D'autre part, les insertions (gains de fonction) réalisées dans la protéine SPIKE modifiée / augmentée avec des éléments communs au VIH n'engendreraient-elles pas également une réaction d'immunosuppression observée avec le SIDA, c'est-à-dire un blocage des défenses immunitaires contre les cancers (P53 etc.) ?

Ces mécanismes auraient dû être signalés par les fournisseurs de ces adjuvants de l'immunité adaptative (la formation d'anticorps anti-spike) et l'autorisation en urgence n'aurait jamais due être autorisée car dès mars 2020, nous signalions aux autorités sanitaires l'existence de traitements efficaces (PJ 7-8) basés sur la neutralisation des complices bactériens du virus PAR DES ANTIBIOTIQUES VIROSTATIQUES : coopérations bactéries / virus que le Pr Luc Montagnier avait déjà cité lors de sa découverte du SIDA (PJ 9)

Aujourd'hui le traitement ambulatoire précoce virostatique évitant l'amplification de la charge virale et l'infectiosité (capacité d'adhérer à nos cellules par des gains de fonctions physiopathologiques) de tous les virus ARN, est une voie d'avenir pour de nombreux spécialistes (Pr Nicolson USA, Dr C. Brogna Italie, etc..)(PJ10) voie complémentaire aux vaccins traditionnels à virus atténués ou inactivés: virus peu immunogènes nécessitant un complément thérapeutique chez les cas à risque et vaccins éprouvés évitant de sauter brutalement dans l'inconnu des injections ARNm – pour lesquels un moratoire est demandé dans de nombreux pays.

Espérant apporter des éléments indispensables à l'établissement d'un jugement :

le 25/5/2025

Signature :

Claude ESCARGUEL
Chercheur en biologie humaine

NCBI Resources How To Sign in to NCBI
PMC US National Library of Medicine National Institutes of Health
PMC Search
Advanced Journal list Help

Pièce n°20
(2 documents)

COVID-19 Information
Public health information (CDC) | Research information (NIH) | SARS-CoV-2 data (NCBI) | Prevention and treatment information (HHS) | Español

The PMC website is updating on 03/21/2022. Try out this update now on PMC Labs or Learn more.

Journal List > J Mol Cell Biol > v.12(12); 2020 Dec > PMC7799037

Formats:
Article | PubReader | ePub (beta) | PDF (1.1M) | Cite
Share
Facebook Twitter Google+
Save items
Add to Favorites
Similar articles in PubMed
A promiscuous interaction of SARS-CoV-2 with bacterial products. [J Mol Cell Biol. 2020]
SARS-CoV-2/ACE2 Interaction Suppresses IRAK-M Expression and Promotes Pro-Inflammatory Cytokine P [Front Immunol. 2021]
Induction of Exaggerated Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by a Rec [Inflammation. 2021]
Severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 spike (S) protein based vaccine candidates: State of t [Rev Med Virol. 2021]
A Cytokine Circus with a Viral Ringleader: SARS-CoV-2-Associated Cytokine Storm Syndromes. [Trends Mol Med. 2020]
See reviews...
See all...
Links
Compound
Gene
PubMed
Recent Activity
Turn Off Clear
SARS-CoV-2 spike protein binds to bacterial lipopolysaccharide and boosts proinf...
Modifications pharmacocinétiques liées à une infection aiguë. Exemples issus de ...
SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fus...
COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages
Thyroïdite et Covid 19 : relation de cause à effet ou simple association
See more...

OXFORD JOURNALS Journal of Molecular Cell Biology

J Mol Cell Biol. 2020 Dec; 12(12): 916–932.
Published online 2020 Dec 9. doi: 10.1093/jmcb/mjaa067
PMCID: PMC7799037
PMID: 33295606

SARS-CoV-2 spike protein binds to bacterial lipopolysaccharide and boosts proinflammatory activity

Ganna Petruk,[1] Manoj Puthia,[1] Jitka Petrlova,[1] Firdaus Samsudin,[2] Ann-Charlotte Strömdahl,[1] Samuel Cerps,[3] Lena Uller,[3] Sven Kjellström,[4] Peter J Bond,[2,5] and and Artur Schmidtchen[1,6,7]

Bing Su, Editor

Author information Article notes Copyright and License information Disclaimer

This article has been cited by other articles in PMC.

Associated Data

Supplementary Materials

Abstract

There is a link between high lipopolysaccharide (LPS) levels in the blood and the metabolic syndrome, and metabolic syndrome predisposes patients to severe COVID-19. Here, we define an interaction between SARS-CoV-2 spike (S) protein and LPS, leading to aggravated inflammation *in vitro* and *in vivo*. Native gel electrophoresis demonstrated that SARS-CoV-2 S protein binds to LPS. Microscale thermophoresis yielded a K_D of ∼47 nM for the interaction. Computational modeling and all-atom molecular dynamics simulations further substantiated the experimental results, identifying a main LPS-binding site in SARS-CoV-2 S protein. S protein, when combined with low levels of LPS, boosted nuclear factor-kappa B (NF-κB) activation in monocytic THP-1 cells and cytokine responses in human blood and peripheral blood mononuclear cells, respectively. The *in vitro* inflammatory response was further validated by employing NF-κB reporter mice and *in vivo* bioimaging. Dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and LPS-FITC analyses demonstrated that S protein modulated the aggregation state of LPS, providing a molecular explanation for the observed boosting effect. Taken together, our results provide an interesting molecular link between excessive inflammation during infection with SARS-CoV-2 and comorbidities involving increased levels of bacterial endotoxins.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, spike protein, lipopolysaccharide, inflammation, aggregation, metabolic syndrome

Introduction

Coronaviruses are a group of enveloped positive-stranded RNA viruses that consist of four structural proteins including spike (S) glycoprotein (here denoted S protein), envelope (E) protein, membrane (M) protein, and nucleocapsid (N) protein (Felsenstein et al., 2020). S protein is the most important surface protein of coronavirus including SARS-CoV-2, which can mediate the entrance to human respiratory epithelial cells by interacting with the cell surface receptor angiotensin-converting enzyme 2 (Wan et al., 2020). COVID-19 disease is associated with a major inflammatory component. Increased cytokine and chemokine production in response to virus infection has been the focus of several recent investigations, and patient morbidity and mortality are mainly caused by the severe systemic inflammation and acute respiratory distress syndrome (ARDS) affecting these patients (Hariri and Hardin, 2020; Whyte et al., 2020), although differences in ARDS disease phenotypes are noticed (Li and Ma, 2020).

Review COVID-19: Immunology and treatment options. [Clin Immunol. 2020]
Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Stu [J Virol. 2020]
Covid-19, Angiogenesis, and ARDS Endotypes. [N Engl J Med. 2020]
Review Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of t [J Thromb Haemost. 2020]
Review Acute respiratory failure in COVID-19: is it "typical" ARDS? [Crit Care. 2020]

ARDS is a general systemic inflammatory reaction common for many disease states, such as pneumonia, severe infection, sepsis, burns, and severe trauma. During ARDS, activation of toll-like receptors (TLR), such as TLR4 via lipopolysaccharide (LPS) stimulation, induces an initial systemic proinflammatory phase characterized by a massive release of cytokines, acute phase proteins, and reactive oxygen species (Rittirsch et al., 2008; van der Poll and Opal, 2008). Additionally, activation of proteolytic cascades, like the coagulation and complement system, takes place in combination with impaired fibrinolysis and consumption of coagulation factors and other mediators (Rittirsch et al., 2008; van der Poll and Opal, 2008). Clinical symptoms of patients with ARDS therefore in many ways correspond to the pathophysiology seen during severe COVID-19 disease. There is a well-known and established link between high LPS levels in the blood and metabolic syndrome (Awoyemi et al., 2018) as well as obesity (Vors et al., 2015). Moreover, recent evidence shows that patients with metabolic syndrome are at risk of developing severe COVID-19 disease and ARDS. However, whether LPS plays a role in the pathogenesis of COVID-19 *per se* is at present unknown.

Review Harmful molecular mechanisms in sepsis. [Nat Rev Immunol. 2008]
Review Host-pathogen interactions in sepsis. [Lancet Infect Dis. 2008]
Markers of metabolic endotoxemia as related to metabolic syndrome in an elderly male popul [Diabetol Metab Syndr. 2018]
Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in [J Clin Endocrinol Metab. 2015]

The above clinical and pathogenetic clues prompted us to investigate possible connections between LPS and SARS-CoV-2 S protein from a structural as well as functional perspective. Using electrophoresis under native conditions and microscale thermophoresis (MST) combined with computational modeling and all-atom MD simulations, we indeed found that SARS-CoV-2 S protein binds to LPS. The protein also boosted inflammatory responses when combined with low levels of LPS in monocytic THP-1 cells, human blood, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from human blood. In nuclear factor-kappa B (NF-κB) reporter mice, SARS-CoV-2 S protein significantly increased the inflammatory response in conjunction with ultra-low, threshold levels of LPS. Finally, biophysical analyses combined with electron microscopy studies showed that SARS-CoV-2 S protein affects the aggregation state of LPS.

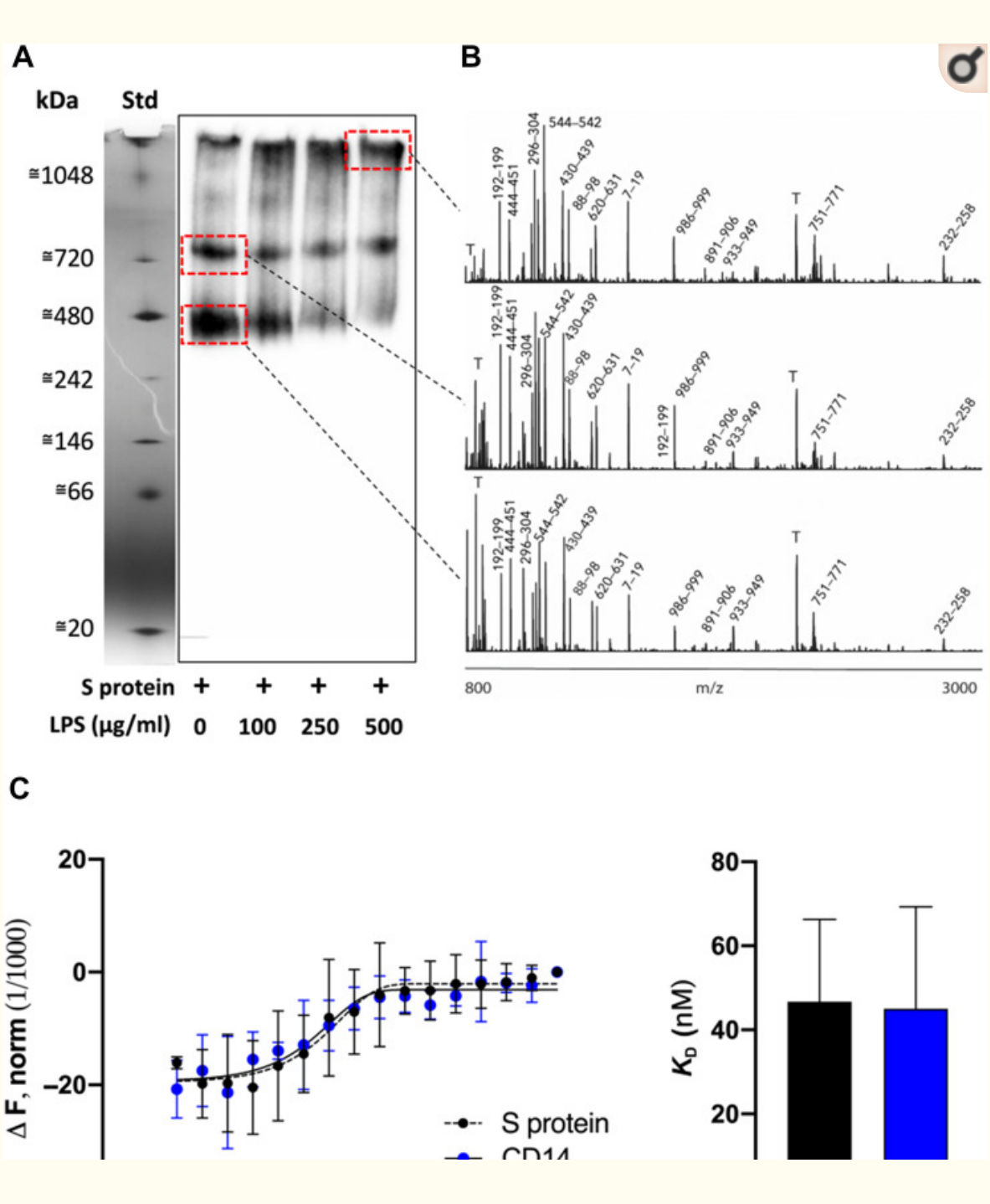
Results

SARS-CoV-2 S protein sequence and endotoxin content

2019-nCoV full-length His-tagged S protein (R683A, R685A), composed of the S sequence Val 16–Pro 1213, was produced in HEK293 cells and 1 µg was analyzed on SDS–PAGE followed by staining with Coomassie brilliant blue (Supplementary Figure S1A). The results identified a major band of ∼180–200 kDa. Although the protein has a predicted molecular weight of 134.6 kDa, the result is compatible with the expected mass due to glycosylation. Next, the band was cut off from the gel and analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) (Supplementary Figure S1B). A total of 110 peptides covered 56% of the SARS-CoV-2 S protein sequence, confirming identity. Using a limulus amebocyte lysate (LAL) assay, the LPS content in the recombinant S protein was determined to 30 fg/µg protein.

Studies on the interaction between SARS-CoV-2 S protein and LPS

Native gel electrophoresis is used as a tool to assess structural differences in proteins, but alterations were also induced by binding to external ligands. We therefore decided to study the migration of S protein alone or in presence of increasing doses of *Escherichia coli* LPS (Figure 1A). Under the conditions used, S protein migrated at the molecular mass range of 400–500 kDa. A second higher molecular 700–800 kDa band of less intensity was, however, observed. Addition of increasing doses of LPS indeed yielded a shift in the migration of S protein, with a reduction of particularly the 400–500 kDa band and an increase of high-molecular weight material not entering the gel. MS of the excised protein bands was then performed. The results verified that the bands of 400–500 and 700–800 kDa were composed of S protein. S protein was also identified in the high-molecular weight fraction found in the samples incubated with LPS (Figure 1B). Analogously, MST, a highly sensitive technique probing interactions between components in solution, demonstrated interactions of fluorescence-labelled S protein with *E. coli* LPS, with a K_D of 46.7 ± 19.7 nM (Figure 1C). For control in these experiments, we used the well-known human LPS receptor CD14, which exhibited a K_D of 45.0 ± 24.3 nM to LPS. In order to gain more information on the interaction specificity, we evaluated binding of S protein to the lipid part of LPS, Lipid A (Supplementary Figure S2A), as well as other microbial agonists (Supplementary Figure S2B). S protein was found to interact with Lipid A (Supplementary Figure S2A) and also LPS from *Pseudomonas aeruginosa*, whereas no shift in the migration was observed after addition of lipoteichoic acid (LTA), peptidoglycan (PGN), or zymosan (Supplementary Figure S2B). Having shown a ligand specificity for SARS-CoV-2 S protein, we next explored whether LPS could bind to the related SARS-CoV S protein. The results indeed showed that addition of LPS yielded an apparent migration shift also for this protein ($P < 0.05$). For control, we used the human protein prothrombin, which showed no shift in migration ($P = 0.98$). Taken together, using two independent methods probing molecular interactions, a specific binding of LPS to SARS-CoV-2 S protein was identified. Notably, the affinity of LPS to SARS-CoV-2 S protein was in the range of the one observed for LPS binding to the human receptor CD14. Moreover, the related SARS-CoV S protein also bound to LPS.



Open in a separate window

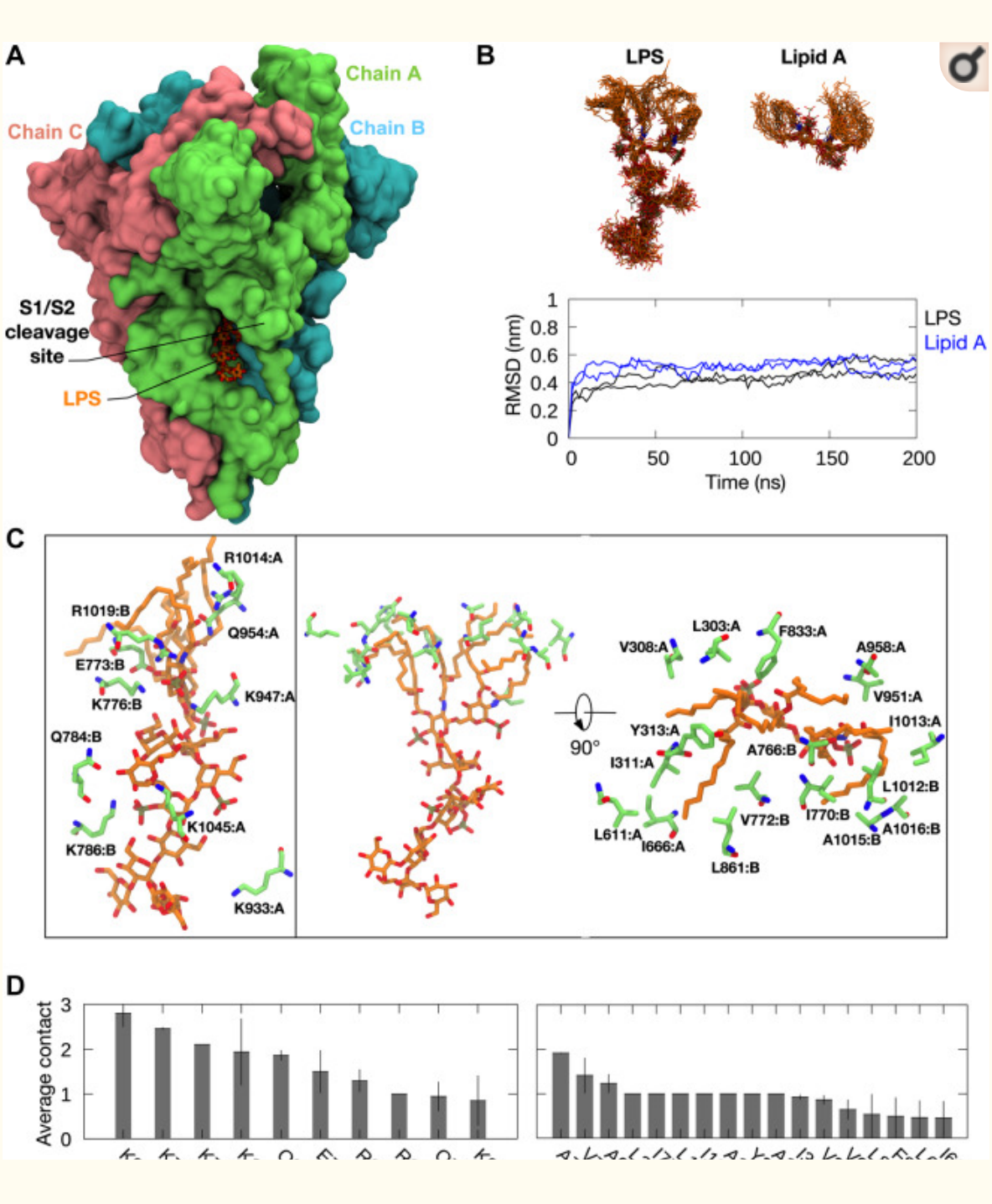
Figure 1

Analysis of the interaction between SARS-CoV-2 S protein and LPS *in vitro*. (**A**) SARS-CoV-2 S protein was incubated with LPS (0–500 µg/ml), separated using BN-PAGE and detected by western blotting. One representative image of three independent experiments is shown ($n = 3$). The marker lane is from the same gel but not transferred to the membrane. It is aligned and included for clarity. (**B**) Gel pieces corresponding to the area denoted by the dotted red squares on the western blot were cut out, in-gel digestion was performed, and the material was subjected to MALDI MS analysis. Representative high resolution MALDI mass spectra are presented. The most intense tryptic fragments obtained from S protein are denoted with the sequence numbers, and tryptic peptides from the autodigestion of trypsin are denoted with T. (**C**) MST assay quantifying SARS-CoV-2 S protein interaction with LPS. CD14 was used as positive control. K_D constant for S protein = 46.7 ± 19.7 nM vs. CD14 = 45 ± 24.3 nM was determined from MST analysis. Mean ± SD values of six measurements are shown ($n = 6$).

Computational modeling and simulations of SARS-CoV-2 S protein and LPS

To predict the binding site of LPS on the SARS-CoV-2 S protein, we performed flexible docking using *E. coli* rough LPS and Lipid A. These two ligands were docked onto the structures of S ectodomain (ECD) in the open and close conformational states (Cai et al., 2020; Wrapp et al., 2020) using the Vina-Carb docking program, a variation of AutoDock Vina that incorporates the flexibility of glycosidic linkages in oligosaccharide into its scoring function (Nivedha et al., 2016). A total of 40 docking poses were generated (Supplementary Figure S3) and each pose was assessed by the presence of basic residues stabilizing the phosphate groups and hydrophobic residues around the lipid tails of LPS and Lipid A. Interestingly, the most frequently sampled binding site (21 out of 40 poses) was found within the proximity of the S1/S2 furin cleavage site (Hoffmann et al., 2020). The binding of LPS and Lipid A was predicted at a groove between two protomers (Figure 2A), whereby a ladder of basic residues surrounded the phosphate and sugar moieties, while a hydrophobic pocket at the top of the grove accommodated the lipid tails. To determine the binding stability of LPS and Lipid A at this site, we performed all-atom MD simulations of S ECD with bound LPS and Lipid A. In all simulations, both LPS and Lipid A bound stably to the proposed binding site, with associated lipid root mean square deviation (RMSD) values reaching a plateau at ∼0.4 nm after 50 ns or less (Figure 2B). In simulations with LPS, the Lipid A residue and adjacent core sugars displayed little movement, while the terminal core sugars showed some degree of flexibility as they were less buried within the binding site. Contact analysis indicated that the interactions stabilizing LPS and Lipid A binding were contributed from two chains of the S ECD trimer, with most of the residues located in the S2 subunit of the protein. The phospho-GlcNac moieties of the Lipid A residue formed ionic interactions with K776, K947, and R1019, while the phosphorylated core sugars were stabilized by salt bridge interactions with K786 and K1045 (Figure 2C and D). Sodium ions made intermittent contacts with some of the phosphate groups, suggesting a potential role of cations in LPS binding. All of the six lipid tails occupied a pocket made up of hydrophobic residues including V772, I666, L611, A647, and Y313. Overall, the coordination of LPS with S protein at this proposed binding site is similar to that with LPS receptors or coreceptors including CD14 and MD-2, whereby the lipid tails are buried deep within a hydrophobic pocket, while the phosphorylated sugar moieties are more exposed to the solvent area and form hydrophilic interactions with basic and polar residues located at the opening area (Park et al., 2009; Huber et al., 2018; Saravanan et al., 2018). The flexible loop housing the S1/S2 furin cleavage site made intermittent interactions with LPS, specifically with the terminal core sugars. Structural alignment to the S protein from SARS-CoV (Yuan et al., 2017) revealed that, indeed, most of the residues forming the proposed binding site are conserved (Supplementary Figure S4), in agreement with the interaction observed between SARS-CoV S protein and LPS during native gel electrophoresis (Supplementary Figure S2C) and further validating this location as the likely site of a high-affinity LPS interaction.

Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. [Science. 2020]
Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. [Science. 2020]
Vina-Carb: Improving Glycosidic Angles during Carbohydrate Docking. [J Chem Theory Comput. 2016]
A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. [Mol Cell. 2020]
The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. [Nature. 2009]
A Thermodynamic Funnel Drives Bacterial Lipopolysaccharide Transfer in the TLR4 Pathway. [Structure. 2018]
Structural basis for endotoxin neutralisation and anti-inflammatory activity of thrombin-derived C [Nat Commun. 2018]
Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor [Nat Commun. 2017]



Open in a separate window

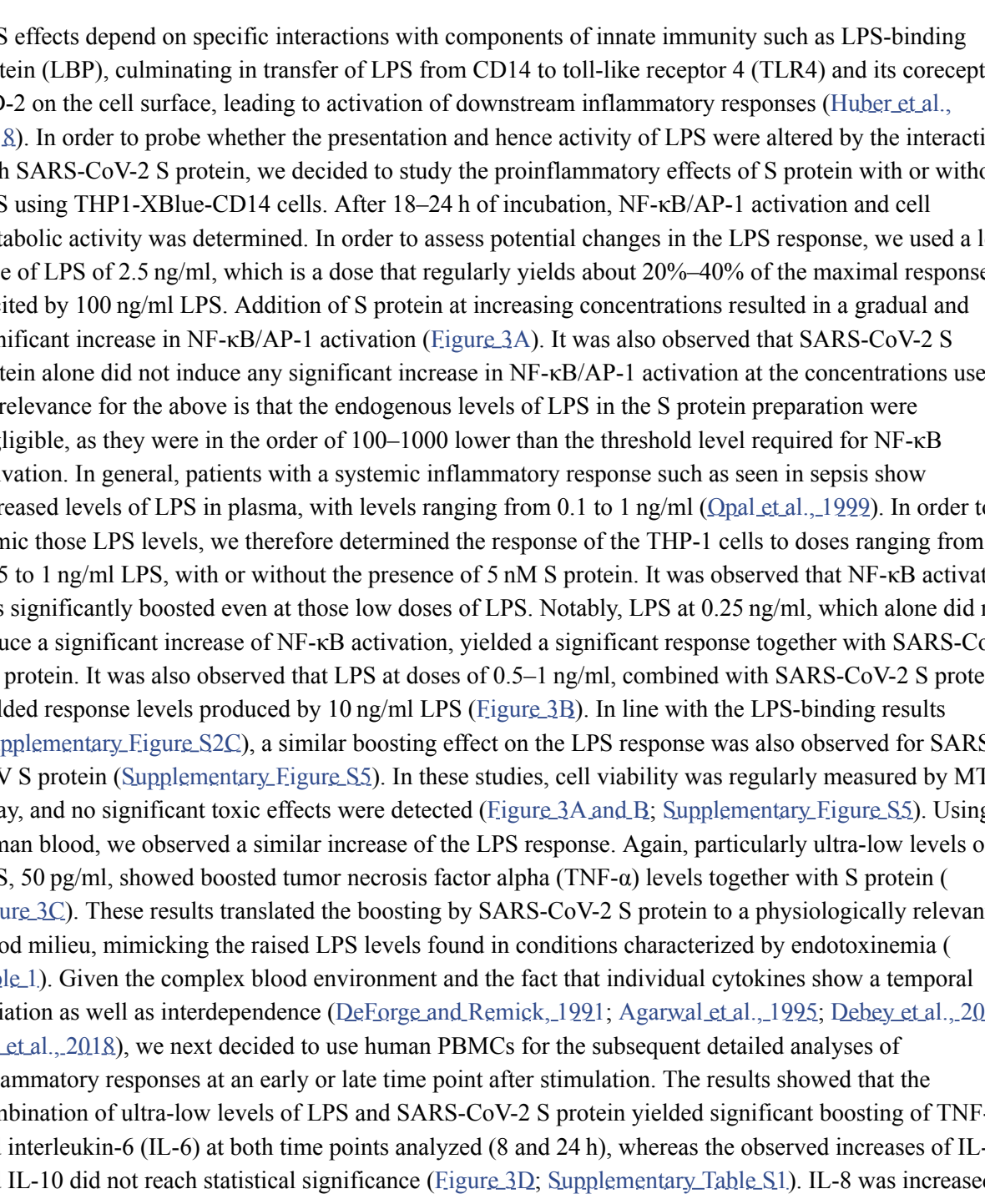
Figure 2

Predicted LPS-binding site on SARS-CoV-2 S protein. (**A**) The proposed binding site of LPS (orange; stick representation) on S ECD (green, pink, cyan; surface representation). The S1/S2 furin cleavage site is labelled. (**B**) Top: snapshots of LPS and Lipid A overlaid on to one another, each taken every 10 ns from two independent 200 ns simulations of S ECD with LPS and Lipid A bound to the predicted binding site. Bottom: RMSD of LPS and Lipid A throughout the simulations. (**C**) S protein residues interacting with the LPS headgroup (left) and lipid tails (right) during these simulations. (**D**) The average number of contacts made by these residues with LPS headgroup (left) and lipid tails (right). Error bars show standard deviations between two repeat simulations.

Effects of SARS-CoV-2 S protein on LPS-induced responses in vitro

LPS effects depend on specific interactions with components of innate immunity such as LPS-binding protein (LBP), culminating in transfer of LPS from CD14 to toll-like receptor 4 (TLR4) and its coreceptor MD-2 on the cell surface, leading to activation of downstream inflammatory responses (Huber et al., 2018). In order to probe whether the presentation and hence activity of LPS were altered by the interaction with SARS-CoV-2 S protein, we decided to study the proinflammatory effects of S protein with or without LPS using THP1-XBlue-CD14 cells. After 18–24 h of incubation, NF-κB/AP-1 activation and cell metabolic activity was determined. In order to assess potential changes in the LPS response, we used a low dose of LPS of 2.5 ng/ml, which is a dose that regularly yields about 20%–40% of the maximal response elicited by 100 ng/ml LPS. Addition of S protein at increasing concentrations resulted in a gradual and significant increase in NF-κB/AP-1 activation (Figure 3A). It was also observed that SARS-CoV-2 S protein alone did not induce any significant increase in NF-κB/AP-1 activation at the concentrations used. Of relevance for the above is that the endogenous levels of LPS in the S protein preparation were negligible, as they were in the order of 100–1000 lower than the threshold level required for NF-κB activation. In general, patients with a systemic inflammatory response such as seen in sepsis show increased levels of LPS in plasma, with levels ranging from 0.1 to 1 ng/ml (Opal et al., 1999). In order to mimic those LPS levels, we therefore determined the response of the THP-1 cells to doses ranging from 0.25 to 1 ng/ml LPS, with or without the presence of 5 nM S protein. It was observed that NF-κB activation was significantly boosted even at those low doses of LPS. Notably, LPS at 0.25 ng/ml, which alone did not induce a significant increase of NF-κB activation, yielded a significant response together with SARS-CoV-2 S protein. It was also observed that LPS at doses of 0.5–1 ng/ml, combined with SARS-CoV-2 S protein, yielded response levels produced by 10 ng/ml LPS (Figure 3B). In line with the LPS-binding results (Supplementary Figure S2C), a similar boosting effect on the LPS response was also observed for SARS-CoV S protein (Supplementary Figure S5). In these studies, cell viability was regularly measured by MTT assay, and no significant toxic effects were detected (Figure 3A and B; Supplementary Figure S5). Using human blood, we observed a similar increase of the LPS response. Again, particularly ultra-low levels of LPS, 50 pg/ml, showed boosted tumor necrosis factor alpha (TNF-α) levels together with S protein (Figure 3C). These results translated the boosting by SARS-CoV-2 S protein to a physiologically relevant blood milieu, mimicking the raised LPS levels found in conditions characterized by endotoxinemia (Table 1). Given the complex blood environment and the fact that individual cytokines show a temporal variation as well as interdependence (DeForge and Remick, 1991; Agarwal et al., 1995; Debey et al., 2004; Liu et al., 2018), we next decided to use human PBMCs for the subsequent detailed analyses of inflammatory responses at an early or late time point after stimulation. The results showed that the combination of ultra-low levels of LPS and SARS-CoV-2 S protein yielded significant boosting of TNF-α and interleukin-6 (IL-6) at both time points analyzed (8 and 24 h), whereas the observed increases of IL-1β and IL-10 did not reach statistical significance (Figure 3D; Supplementary Table S1). IL-8 was increased relative to controls, yielding similar levels at both time points, after stimulation with 50 or 100 pg LPS alone. SARS-CoV-2 S protein at 5 nM did neither induce IL-8 alone nor boost the LPS response. Notable was that IFN-β was significantly increased by SARS-CoV-2 S protein alone at both time points, irrespective of the addition of LPS (Figure 3D; Supplementary Table S1). Taken together, these results demonstrate that SARS-CoV-2 S protein increases LPS responses *in vitro* in monocytic cells, human blood, and PBMCs and, in particular, the activation by low/threshold levels of LPS is boosted several-fold by the addition of SARS-CoV-2 S protein. Moreover, the boosting was particularly observed for cytokines directly dependent on NF-κB activation, thus representing the proximal LPS-dependent cytokine response (DeForge and Remick, 1991; Liu et al., 2018).

A Thermodynamic Funnel Drives Bacterial Lipopolysaccharide Transfer in the TLR4 Pathway. [Structure. 2018]
Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with seve [J Infect Dis. 1999]
Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole [Biochem Biophys Res Commun. 1991]
Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysac [J Dent Res. 1995]
Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derive [Pharmacogenomics J. 2004]
LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages vi [Mol Med Rep. 2018]



Open in a separate window

Figure 3

Effects of SARS-CoV-2 S protein on LPS-induced responses in THP-1 cells. (**A** and **B**) THP-1-XBlue-CD14 cells were treated with increasing concentrations of SARS-CoV-2 S protein (0–10 nM) and a constant dose of LPS (2.5 ng/ml) (**A**) or with increasing doses of LPS (0.25–1 ng/ml) and constant amount of S protein (5 nM) (**B**). MTT viability assay for analysis of toxic effects of S protein and LPS on THP-1 cells is shown in lower panels. (**C**) Cytokine analysis of the blood collected from healthy donors at 24 h after treatment with S protein with or without 0.05 and 0.1 ng/ml LPS. Untreated blood was used as a control. The mean ± SEM (NF-κB and blood assays) or mean ± SD (MTT assay) values of four independent experiments performed in duplicate are shown ($n = 4$). *$P \le 0.05$, ***$P \le 0.001$, ****$P \le 0.0001$, determined using two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test (NF-κB and blood assays) or one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test (MTT assay). na, not analyzed; w/o, without. (**D**) Heatmap showing cytokines released from PBMCs, isolated from three different donors and treated with SARS-CoV-2 S protein (5 nM) and increasing doses of LPS (0.05–0.1 ng/ml) for 8 and 24 h. The cytokines were detected by Luminex multiplex bead assay. Color and values in each box represent mean values of fold increase over untreated cells ($n = 3$).

Table 1

Diseases involving endotoxins and links to COVID-19.

Disease/indication	LPS levels in plasma or serum	References	Bacterial influence	References	COVID-19 and risk for severe disease	References
Metabolic syndrome	47–96 EU/ml	Cani et al. (2007), Lassenius et al. (2011), Awoyemi et al. (2018)	Dysbiosis	Dabke et al. (2019)	12%	Costa et al. (2020), Marhl et al. (2020)
COPD	Unknown	de Oliveira et al. (2019)	Microbial colonization	Nys et al. (2000)	1%–3%	Alqahtani et al. (2020)
Inflammatory bowel syndrome (IBD)	44.41 ± 89.44 pg/ml	Pastor Rojo et al. (2007), Guo et al. (2015)	Dysbiosis	Tamboli et al. (2004), Zuo and Ng (2018)	Unknown	Bezzio et al. (2020)
Kawasaki disease	Unknown	Tsujimoto et al. (2001)	Unknown	—	Unknown	Alizargar (2020)
Periodontitis	0.89 ± 2.90 ng/ml	Paju et al. (2006)	Microbial colonization	Bui et al. (2019)	Unknown	Sahni and Gupta (2020)

Open in a separate window

Effects of SARS-CoV-2 S protein on endotoxin responses in an experimental mouse model

In an experimental animal model, we wanted to simulate a situation of localized endotoxin-induced inflammation. In previous models, we utilized 25 µg LPS injected subcutaneously, a dose level that yielded a robust and significant LPS response (Puthia et al., 2020). In this modified model, similar to the strategy described above on the THP-1 cells, we employed a low threshold level comprising 2 µg LPS, which was injected subcutaneously with or without 5 µg S protein. Using mice reporting NF-κB activation, we indeed found that the addition of S protein significantly increased the inflammatory response (Figure 4). SARS-CoV-2 S protein alone at the dose of 5 µg did not yield any significant inflammatory response. Apart from a strongly increased response by the LPS and SARS-CoV-2 S protein combination, we also observed that the LPS–S protein mix resulted in a prolonged NF-κB response during the time period studied. Taken together, the results demonstrated that SARS-CoV-2 S protein also retains its boosting effect in conjunction with LPS in a subcutaneous model of endotoxin-driven inflammation.

A dual-action peptide-containing hydrogel targets wound infection and inflammation. [Sci Transl Med. 2020]

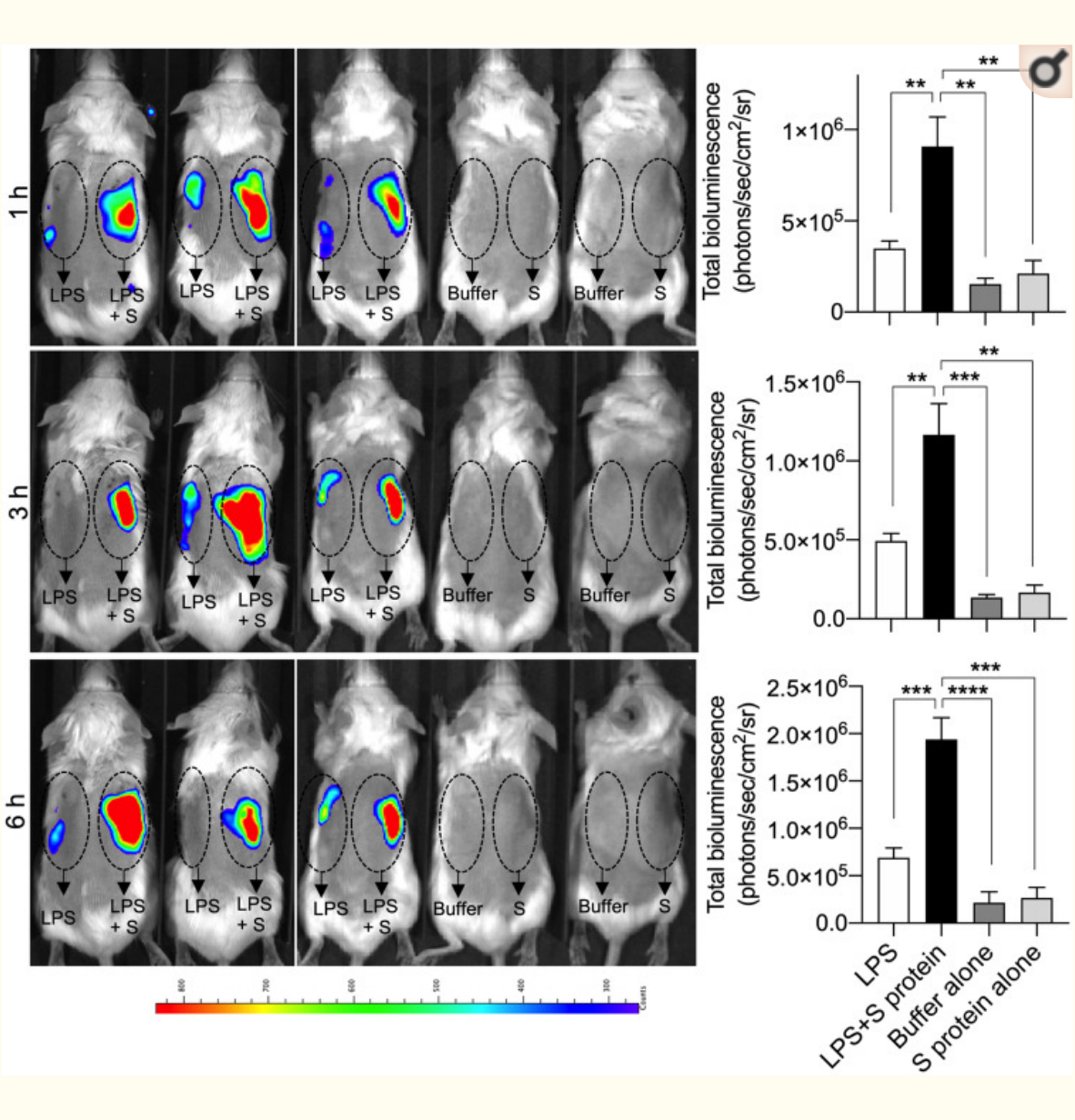


Figure 4

SARS-CoV-2 S protein combined with LPS boosts inflammation in NF-κB reporter mice. For *in vivo* inflammation imaging in NF-κB reporter mice, LPS alone or in combination with SARS-CoV-2 S protein (S) was subcutaneously deposited on the left or right side, respectively, on the back of transgenic BALB/c Tg(NF-κB-RE-luc)-Xen reporter mice. Noninvasive *in vivo* bioimaging of NF-κB reporter gene expression was performed using the IVIS Spectrum system. Representative images show bioluminescence at 1, 3, and 6 h after subcutaneous deposition. A bar chart shows measured bioluminescence intensity emitted from these reporter mice. Dotted circles represent area of subcutaneous deposition and region of interest for data analysis. Data are presented as mean ± SEM ($n = 5$ mice for LPS group, 5 mice for LPS and S protein group, 3 mice for buffer control, and 3 mice for S protein control). *P*-values were determined using a one-way ANOVA with Holm-Sidak posttest. **$P \le 0.01$, ***$P \le 0.001$, ****$P \le 0.0001$.

Effects of SARS-CoV-2 S protein on LPS aggregation

The finding that SARS-CoV-2 S protein both binds to and boosts LPS responses prompted us to further investigate the interaction and its consequences on the organization of LPS micelles. Increasing doses of LPS alone or with a constant amount of S protein were incubated and the hydrodynamic radii of the particles in the solution were measured by dynamic light scattering (DLS). The size of LPS particles was found to be ∼60 nm, in agreement with previous data (Petrlova et al., 2017), and moreover, they were not affected by the concentration of LPS in the dose range studied (Figure 5A). Incubation of 100 µg/ml of LPS with SARS-CoV-2 S protein, yielded a significant reduction of the hydrodynamic radii of the particles in solution. Notably, the aggregate size was similar to the one observed in the sample with SARS-CoV-2 S protein alone, suggesting a complete dispersion of LPS aggregates by S protein. A less pronounced, albeit significant, disaggregation was observed when the LPS concentration was increased to 250 and 500 µg/ml, respectively (Figure 5A). Next, transmission electron microscopy (TEM) was employed in order to further characterize the LPS micelles. Corresponding to the DLS data, a marked disaggregating effect on the LPS micelles was detected using 100 µg/ml LPS (Figure 5B). In the samples with 250 and 500 µg/ml LPS, the appearance of larger aggregates was noted, suggestive of the LPS–SARS-CoV-2 S protein complexes identified by blue native (BN)-PAGE (Figure 1A). In order to further study the dose-dependence of the disaggregation and aggregation processes, we incubated 500 µg/ml LPS with increasing doses of S protein (5–250 nM) and analyzed the resulting particles hydrodynamic radii by DLS (Figure 5C). The results showed that 5 nM of SARS-CoV-2 S protein disaggregated LPS, whereas addition of S protein at higher levels induced aggregation. The data obtained with DLS was further confirmed by studying complexes of fluorescein-labelled LPS (LPS-FITC) in the presence of increasing concentrations of SARS-CoV-2 S protein (Figure 5D and E). A gradual increase in fluorescence was observed by adding subnanomolar amounts of S protein, indicating a reduction in fluorescein self-quenching due to S protein-induced disaggregation of LPS (Figure 5D, left panel). With increasing S protein concentrations, the fluorescence level was increased up to a maximum level, indicating a complete dispersion of LPS aggregates. Using higher levels of S protein, however, a decrease in fluorescence intensity of LPS-FITC was noticed, indicating subsequent aggregation (Figure 5D, right panel). Plotting the fluorescence intensity at 515 nm as function of different concentrations of S protein demonstrated the dose-dependence of the disaggregation and aggregation processes (Figure 5E). In summary, these data show the dynamic and dose-dependent interactions within SARS-CoV-2 S protein–LPS complexes. Notably, SARS-CoV-2 S protein induced a marked disaggregation of LPS at subnanomolar to nanomolar levels.

Aggregation of thrombin-derived C-terminal fragments as a previously undisclosed host de [Proc Natl Acad Sci U S A. 2017]

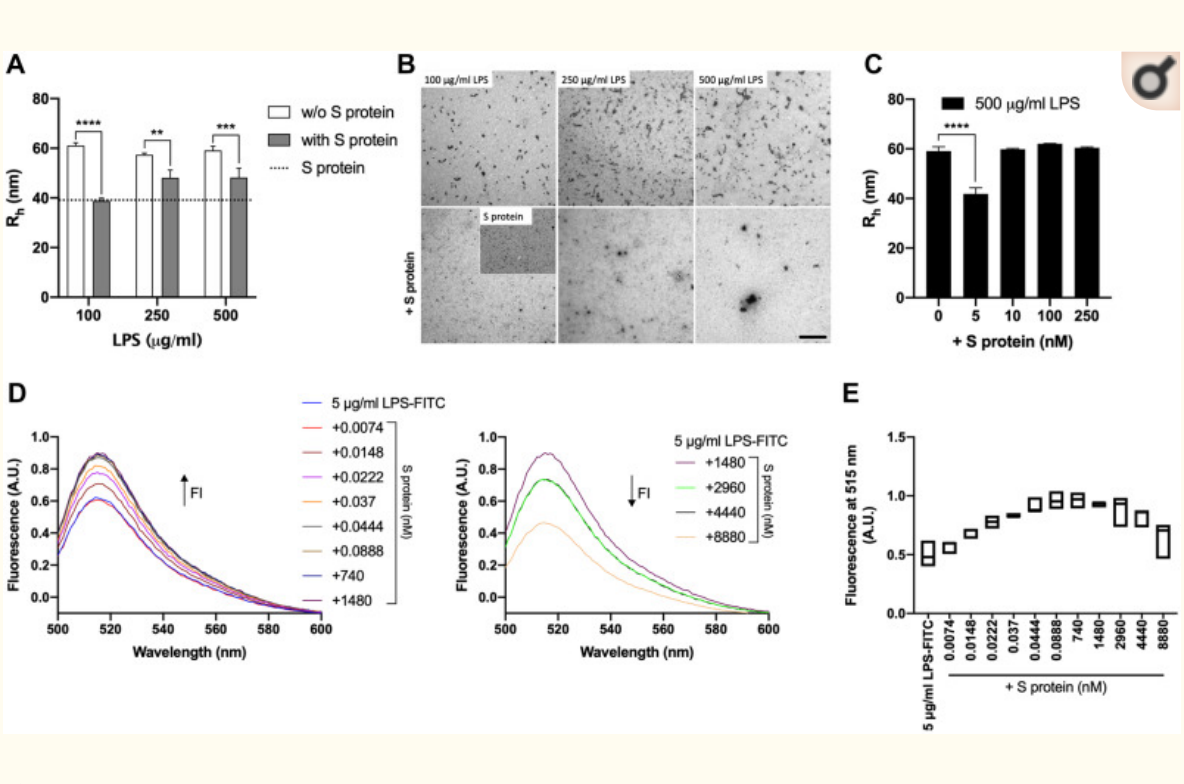


Figure 5

Effects of different doses of SARS-CoV-2 S protein on biophysical properties of LPS. (**A** and **B**) Increasing concentrations of LPS (100–500 µg/ml) alone or with S protein (1.48 µM) were incubated for 30 min at 37°C and then analyzed by DLS (**A**) and TEM (**B**). (**C**) LPS (500 µg/ml) alone or with S protein (5–250 nM) was incubated for 30 min at 37°C and hydrodynamic radii of the particles in solution were measured by DLS. For DLS, the data are presented as mean ± SEM ($n = 3$). *P*-values were determined using a one-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. **$P \le 0.01$, ***$P \le 0.001$, ****$P \le 0.0001$. For TEM, one representative picture per each condition is shown ($n = 3$). (**D** and **E**) The fluorescence intensity of LPS-FITC (5 µg/ml) alone or with different concentrations of S protein (0.0074–8880 nM) was measured by recording the emission fluorescence spectra between 500 and 600 nm, following excitation at 488 nm. Graphs with spectra are a representative result of three independent experiments ($n = 3$). The change in fluorescence is indicated by an arrow. (**E**) The fluorescence at 515 nm of FITC-LPS plotted with respect to the concentrations of the protein is presented as floating bars (min to max) with line at median ($n = 3$). A.U., arbitrary units.

Discussion

Here, we demonstrate a previously unknown interaction between SARS-CoV-2 S protein and LPS, leading to a boosting of proinflammatory actions *in vitro* as well as *in vivo*. These results on the synergism between LPS and S protein have clinical and therapeutic importance, as this could give new insights in the comorbidities that may increase the risk for severe COVID-19 disease and ARDS, its pathogenetic steps, as well as provide new therapeutic targets.

The molecular mechanism underlying the observed boosting of inflammation by SARS-CoV-2 S protein was shown to be dependent on specific and distinct interactions between S protein and LPS, leading to changes in the biophysical state of LPS. Thus, MST analysis measuring the interaction between S protein and LPS yielded a K_D in the nM range, which indicates a high-affinity binding in the same range as observed for the interaction between LPS and CD14 (Figure 1C) and, interestingly, also LBP (Ryu et al., 2017). Moreover, electrophoresis under native conditions confirmed the SARS-CoV-2 S protein–LPS binding. It is of note that the binding was also observed for Lipid A, the core of the LPS molecule, whereas the TLR agonists LTA, PGN, and zymosan did not interact with SARS-CoV-2 S protein. As Lipid A is a common structure in all endotoxin-producing Gram-negative bacteria, the results therefore imply that the findings with *E. coli* can be generalized to endotoxins from other Gram-negative bacteria. In support of this assumption was the finding that LPS from the pathogen *P. aeruginosa* also bound to SARS-CoV-2 S protein (Supplementary Figure S2B). Computational modeling and simulations of SARS-CoV-2 S protein and LPS and Lipid A elegantly substantiated the experimental results, and the interaction site for LPS and Lipid A was predicted at a groove between two protomers (Figure 2A). Importantly, all-atom MD simulations of the extracellular domain of SARS-CoV-2 S protein with bound LPS and Lipid A demonstrated that both LPS and Lipid A bound stably to the proposed binding site, well in agreement with the observed high-affinity binding to LPS demonstrated by MST. Interestingly, the coordination of LPS at this binding site is similar to that demonstrated for other LPS receptors including CD14 and MD-2 (Park et al., 2009; Saravanan et al., 2018). Also notable was that this groove is conserved in the related SARS-CoV S protein, which also was found to bind to LPS. Complex and sequential interactions between LPS and LBP aid in LPS transfer to CD14 and subsequent downstream NF-κB activation (Ryu et al., 2017; Huber et al., 2018), and disaggregation of LPS by LPB as well as other proteins has been reported to boost LPS proinflammatory effects in various settings (Tobias et al., 1997; Kitchens and Thompson, 2005; Bodet et al., 2007; Komatsu et al., 2016). These molecular and functional links to other LPS-binding proteins and their effects on the aggregation state of LPS prompted a series of investigations involving DLS, TEM, and LPS-FITC analyses. Together, these experiments conclusively demonstrated that SARS-CoV-2 S protein modulates the aggregation state of LPS, analogously to the effects reported for other LPS-binding proteins such as LBP (Kitchens and Thompson, 2005; Ryu et al., 2017). Further, previous reports indicate that LPS and protein aggregates can be proinflammatory (Mueller et al., 2004; Dalgediene et al., 2018). Moreover, LBP can form aggregates with LPS, particularly at a high LPS/LBP ratio (Kitchens and Thompson, 2005), providing additional links to the present findings with SARS-CoV-2 S protein. Additionally, recent cryo-EM structures of SARS-CoV-2 S protein from an advanced vaccine candidate show that S protein can form higher order oligomers, such as dimer of trimers and trimer of trimers (Bangaru et al., 2020), further supporting the observations on the formation of large S–LPS aggregates in this study. Figure 6 summarizes the experimental and *in silico* data and depicts the proposed mode of action for the SARS-CoV-2 S protein-mediated LPS boosting effect.

Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD [Immunity. 2017]
The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. [Nature. 2009]
Structural basis for endotoxin neutralisation and anti-inflammatory activity of thrombin-derived C [Nat Commun. 2018]
A Thermodynamic Funnel Drives Bacterial Lipopolysaccharide Transfer in the TLR4 Pathway. [Structure. 2018]
Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. [J Biol Chem. 1997]
Review Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. [J Endotoxin Res. 2005]
Hemoglobin and LPS act in synergy to amplify the inflammatory response. [J Dent Res. 2007]
Disaggregation of lipopolysaccharide by albumin, hemoglobin or high-density lipoprotein, forming complexes t [Pathog Dis. 2016]
Aggregates are the biologically active units of endotoxin. [J Biol Chem. 2004]
Activation of Macrophages by Oligomeric Proteins of Different Size and Origin. [Mediators Inflamm. 2018]
Structural analysis of full-length SARS-CoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate. [Science. 2020]

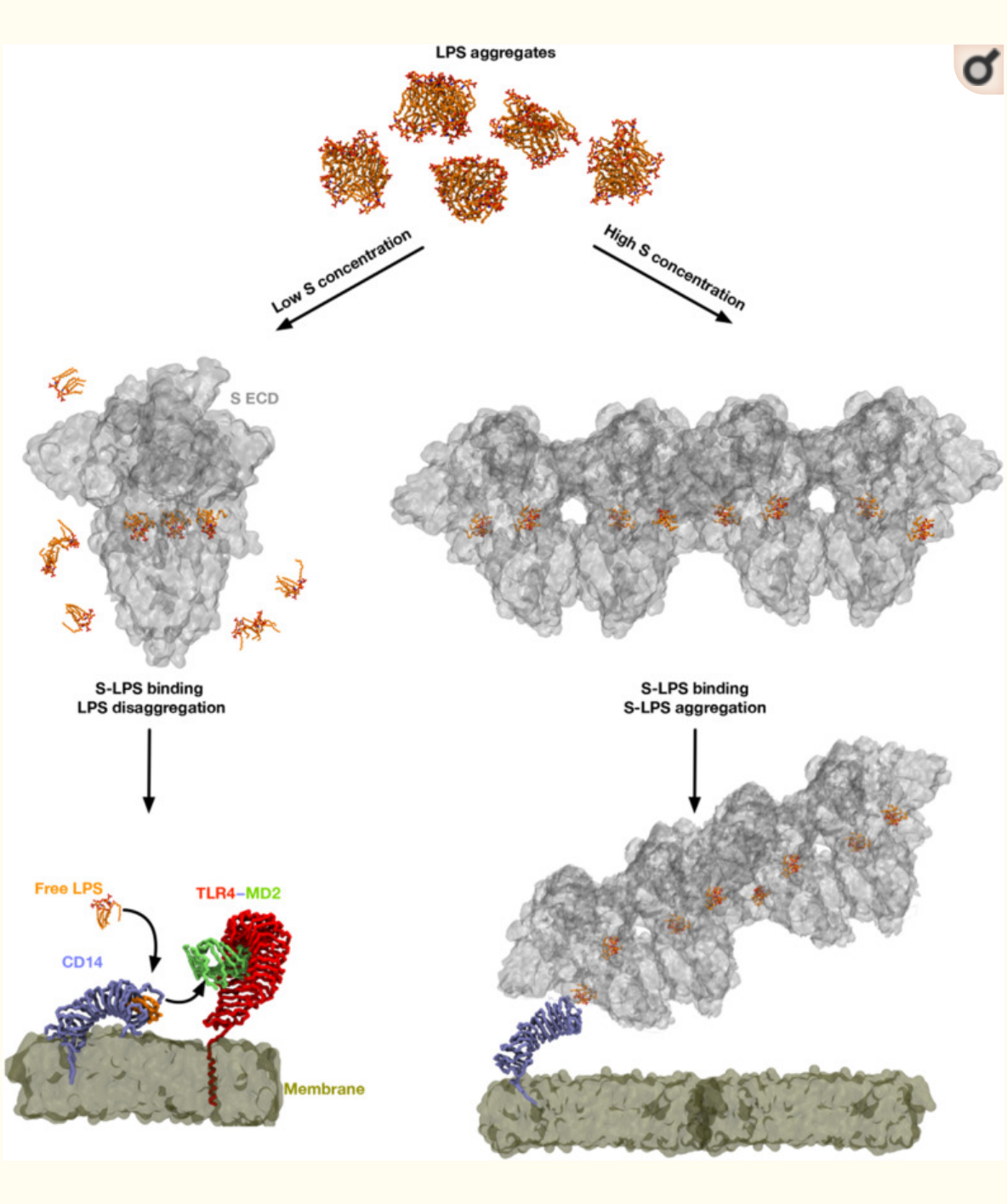


Figure 6

Proposed proinflammatory mechanism of SARS-CoV-2 S protein. In the absence of S protein, LPS micelles are present. At low S protein concentrations, some LPS molecules bind to S protein resulting in disaggregation of the LPS aggregates. Free LPS molecules are then able to bind to the LPS receptor, CD14, before being transferred to the TLR4/MD2 complex, which activates downstream signaling. At high S protein concentrations, most LPS molecules are bound to the S protein, and the S protein–LPS complex then forms large aggregates [modelled based on S protein dimer of trimers (Bangaru et al., 2020)], which may promote inflammatory responses.

Structural analysis of full-length SARS-CoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate. [Science. 2020]

As aforementioned, the observed clinically relevant link between high LPS levels in the blood and the metabolic syndrome (Awoyemi et al., 2018) and the fact that metabolic syndrome is a risk factor for developing severe COVID-19 originally prompted this study (Felsenstein et al., 2020). However, as summarized in Table 1, the clinical implications may be broader and go beyond metabolic syndrome. Notably, in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), COVID-19 infection is associated with substantial severity and mortality rates (Alqahtani et al., 2020). Therefore, a causative link between LPS derived from bacterial colonization and infection of the lungs in COPD patients and COVID-19 severity could also be proposed here. Related to this is the finding that there is a correlation between LPS levels and bacterial loads during pneumonia (Nys et al., 2000). Moreover, compared to former and never smokers with COPD, current smokers are at greater risk of severe COVID-19 complications and higher mortality rate (Alqahtani et al., 2020), and intriguingly, bacterial LPS is an active component of cigarette smoke (Hasday et al., 1999). Increased endotoxin levels are also observed in patients with inflammatory bowel disease (IBD) (Pastor Rojo et al., 2007). The observations that all these comorbidities are risk factors for severe COVID-19 lend further support for a pathogenetic link to SARS-CoV-2 infection and endotoxinemia, Moreover, intriguingly, Kawasaki disease in children, which has been reported in young COVID-19 patients (Toubiana et al., 2020) as well as in patients with SARS HCoV-NH (Esper et al., 2005), has been linked to LPS as a trigger (Tsujimoto et al., 2001). Other possible comorbidities that should be considered include periodontitis, where LPS from *Porphyromonas gingivalis* and other bacteria can reach the systemic circulation (Bui et al., 2019). Indeed, a recent hypothesis on this matter has been raised (Sahni and Gupta, 2020). All these observations on links between LPS levels and several diseases and conditions (Table 1), along with the risk for developing severe COVID-19 (Felsenstein et al., 2020), imply that measurement of endotoxin levels in COVID-19 patients could have significant diagnostic implications and be of relevance for patient management and treatment decisions. Clearly, clinical prospective studies are mandated in order to assess whether the findings from the present study can be translated to the clinical setting.

Markers of metabolic endotoxemia as related to metabolic syndrome in an elderly male popul [Diabetol Metab Syndr. 2018]
Review COVID-19: Immunology and treatment options. [Clin Immunol. 2020]
Prevalence, Severity and Mortality associated with COPD and Smoking in patients with COVID-19: A Rapid : [PLoS One. 2020]
Correlation between endotoxin level and bacterial count in bronchoalveolar lavage fluid of ventilated [Crit Care Med. 2000]
Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. [Chest. 1999]
Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel dise [Inflamm Bowel Dis. 2007]
Kawasaki-like multisystem inflammatory syndrome in children during the covid-19 pandemic in Paris, France: pros [BMJ. 2020]
Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. [J Infect Dis. 2005]
Delayed apoptosis of circulating neutrophils in Kawasaki disease. [Clin Exp Immunol. 2001]
Review Association between periodontal pathogens and systemic disease. [Biomed J. 2019]
COVID-19 &amp; Periodontitis: The cytokine connection. [Med Hypotheses. 2020]

Although here disclosed binding of LPS to SARS-CoV-2 S protein is novel, the interaction between S proteins and endotoxins is not necessarily new to nature. Indeed, interactions between viruses and bacteria for the induction of severe respiratory disease have been described since the early thirties (Shope, 1931). Obviously, multiple complex and diverse inflammatory mechanisms may underlie this general finding. However, it is worth noting that recent observations from porcine animal models indeed demonstrated that infection with porcine respiratory coronavirus, a highly prevalent virus in swine populations significantly sensitizes the lungs to LPS (Van Gucht et al., 2006). Notably, the effects of separate virus or LPS inoculation were subclinical and failed to induce sustained cytokine levels, whereas the combination of the two agents significantly triggered severe respiratory disease and enhanced particularly TNF-α levels (Van Reeth et al., 2000), which are indeed relevant in the light of the present results showing boosted TNF-α levels in human blood and PBMCs with the combination of LPS and SARS-CoV-2 S protein. In agreement with this, it is also worth noting that the disease denoted 'Shipping fever', which affects cattle particularly in relation to stress and transports, can be triggered by a combination of bovine respiratory coronavirus (BCoV) and inhaled LPS (Saif, 2010).

SWINE INFLUENZA : I. EXPERIMENTAL TRANSMISSION AND PATHOLOGY. [J Exp Med. 1931]
Effect of porcine respiratory coronavirus infection on lipopolysaccharide recognition proteins a [Microbes Infect. 2006]
A potential role for tumour necrosis factor-alpha in synergy between porcine respiratory coronavirus [J Med Microbiol. 2000]
Review Bovine respiratory coronavirus. [Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2010]

In conclusion, we report a previously undisclosed interaction between the SARS-CoV-2 S protein and LPS and its link to induction of NF-κB and cytokine responses in monocytes, PBMCs, and human blood, as well as increased NF-κB responses in experimental animal models. The interaction between S protein and LPS therefore provides a new therapeutic target enabling development of drugs that can ameliorate the hyperinflammation seen during COVID-19 infection.

Materials and methods

Go to:

Proteins

SARS-CoV-2 and SARS-CoV S proteins were produced by ACROBiosystems. The sequence of SARS-CoV-2 S protein contains amino acids Val 16–Pro 1213 [Accession # QHD43416.1 (R683A, R685A)], whereas the sequence of SARS-CoV S protein contains amino acids Ser 14–Pro 1195 [Accession # AAP13567.1 (R667A)]. Briefly, both full-length S proteins with His-Tag (SPN-C52H4) were expressed in human 293 cells (HEK293) and purified. The proteins were lyophilized from a 0.22-µm-filtered solution in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5. Lyophilized products were reconstituted in endotoxin-free water, aliquoted, and stored at −80°C according to the manufacturer's protocol. The purity was >85% and >95% for SARS-CoV-2 S protein and SARS-CoV S protein, respectively. Human His-Tag-CD14 (hCD14-his) was produced recombinantly in insect cells by using the Baculovirus Expression Vector System (BEVS). Since this construct is secreted, medium was centrifuged in a JLA8-1000 rotor at 8000 *g*, 20 min, 4°C, and then the supernatant was filtered with a PES 0.45 µm filter top (0.45 µm pore size). Subsequently, hCD14-his was purified on a 5-ml HisTrap Excel column (GE Healthcare) by employing ÄKTA Pure system (GE Healthcare). Eluted fractions were analyzed by precast SDS–PAGE gel (Bio-Rad) stained with BioSafe Coomassie (Bio-Rad) or subjected to western blotting. Peak fractions containing the protein of interest were pooled and digested with tobacco etch virus (TEV) protease to remove the His-Tag. After TEV digestion, the protein solution was run a second time on the HisTrap column. Fractions containing the protein were collected, pooled, and purified further on a HiLoad 26/60 Superdex 75 pg gel filtration column. At the end of purification, the purity of hCD14 was estimated to >90%. The protein was aliquoted and stored at −80°C before use. Human prothrombin was obtained from Innovative Research.

LAL assay

The content of endotoxin in 1 µg purified SARS-CoV-2 S protein was analyzed using a commercially available Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo-Fisher) according to the manufacturer's protocol with small modifications. In particular, the standard curve was done with LPS from *E. coli* (Sigma) in the range of 0.01–10 pg/ml. All samples were prepared in endotoxin-free tubes kept in a thermoblock set to 37°C. At the end of the incubation, 150 µl of each sample was transferred to 96-well plates and analyzed for absorbance at 405 nm using a spectrophotometer. Pyrogen-free water, used to dissolve the protein, was used as negative control.

SDS–PAGE

SARS-CoV-2 S protein (1 µg) was diluted in loading buffer and loaded on 10%–20% Novex Tricine precast gel (Invitrogen) for electrophoresis at 120 V for 1 h. The gel was stained by using Coomassie Brilliant blue (Invitrogen). The image was obtained using a Gel Doc Imager (Bio-Rad Laboratories).

BN-PAGE

SARS-CoV-2 S protein (2 µg) was incubated with 0.1, 0.25, or 0.5 mg/ml *E. coli* LPS or Lipid A for 30 min at 37°C in 20 µl as final volume. At the end of the incubation, the samples were separated under native conditions on BN-PAGE (Native PAGE BisTris Gels System 4%–16%, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Proteins were visualized by Coomassie staining. For western blotting, the material was subsequently transferred to a PVDF membrane using the Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Primary antibodies against the His-Tag (1:2000, Invitrogen) were followed by secondary HRP-conjugated antibody (1:2000, Dako) for detection of S protein. The protein was visualized by incubating the membrane with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) for 5 min followed by detection using a ChemiDoc XRS Imager (Bio-Rad). In another set of experiments, 2 µg SARS-CoV-2 S protein were incubated with 0.25 mg/ml LPS and Lipid A from *E. coli*, LPS from *P. aeruginosa*, LTA and PGN from *Staphylococcus aureus*, and zymosan from *Saccharomyces cerevisiae*, respectively. BN-PAGE and western blotting were performed as described above. LPS from *E. coli* and *P. aeruginosa* as well as Lipid A were purchased from Sigma-Aldrich, whereas LTA, PGN, and zymosan were purchased from InvivoGen. For the experiment described in Supplementary Figure S2C, we incubated 20 µl of 0.74 µM SARS-CoV-2 S protein or SARS-CoV S protein with 250 µg/ml *E. coli* LPS or 20 µl of 1.48 µM human prothrombin with 500 µg/ml *E. coli* LPS for 30 min at 37°C. Then, 1 µg of each protein was loaded on BN-PAGE followed by western blotting as described above. For the detection of prothrombin, polyclonal rabbit antibodies against the C-terminal prothrombin epitope VFR17 (VFRLKKWIQKVIDQFGE; diluted 1:1000, Innovagen AB) followed by swine anti-rabbit HRP-conjugated antibodies (1:1000, Dako) were used (Papareddy et al., 2010). Densitometric analysis was performed on the ~480 kDa S protein and ~66 kDa prothrombin bands, respectively, by using Image Lab 6.1 software (Bio-Rad Laboratories). Membranes from three independent experiment were analyzed and statistical analysis was performed using unpaired *t*-test with GraphPad Prism software v.8.

Proteolysis of human thrombin generates novel host defense peptides. [PLoS Pathog. 2010]

MS analysis

After separation by SDS–PAGE or BN-PAGE and Coomassie staining, bands in the gels were cut out and the digestion was performed according to Shevchenko et al. (2006). Briefly, the gel pieces were washed with water, and then mixed with 50 mM ammonium carbonate in 50% acetonitrile (ACN). Gel pieces were shrunk with 100% ACN and then reduced with 10 mM DTT for 30 min at 56°C. Alkylation was performed with 55 mM idoacetamide at room temperature (RT). Trypsin solution (10 ng/µl) was added to cover the gel pieces placed on ice and after 1 h, the samples were placed at 37°C for overnight digestion. The supernatant was acidified using 5% formic acid and then analyzed by MALDI MS or LC–MS/MS.

In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. [Nat Protoc. 2006]

MALDI MS analysis

For MALDI MS analysis, digested SARS-CoV-2 S protein samples were mixed with a solution of 0.5 mg/ml α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 50% ACN/0.1% phosphoric acid solution directly on a stainless MALDI target plate. Subsequent MS analysis was performed on a MALDI LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific). Full mass spectra were obtained by using the FT analyzer (Orbitrap) at 60000 resolution (at *m*/*z* 400). Recording of mass spectra was performed in positive mode with an 800–4000-Da mass range. The nitrogen laser was operated at 27 µJ with automatic gain control (AGC) off mode using 10 laser shots per position. Evaluation of the spectra was performed with Xcalibur v 2.0.7. software (Thermo-Fisher Scientific).

LC–MS/MS

The LC–MS/MS detection was performed on HFX Orbitrap equipped with a Nanospray Flex ion source and coupled with an Ultimate 3000 pump (Thermo-Fischer Scientific). Peptides were concentrated on an Acclaim PepMap 100 C18 precolumn (75 µm × 2 cm, Thermo Scientific) and then were separated on an Acclaim PepMap RSLC column (75 µm × 25 cm, nanoViper, C18, 2 µm, 100 Å) with heating at 45°C for both columns. Solvent A (0.1% formic acid) and solvent B (0.1% formic acid in 80% ACN) were used to create a nonlinear gradient to elute the peptides. For the gradient, the percentage of solvent B increased from 4% to 10% in 20 min, increased to 30% in 18 min, increased to 90% in 2 min, and then kept it for a further 8 min to wash the columns.

The Orbitrap HFX instrument was operated in data-dependent acquisition (DDA) mode. The peptides were introduced into mass spectrometer via stainless steel Nano-bore emitter (OD 150 µm, ID 30 µm) with the spray voltage of 1.9 kV and the capillary temperature was set 275°C. Full MS survey scans for *m*/*z* 350–1600 with a resolution of 1200000 were performed in the Orbitrap detector. The automatic gain control (AGC) target was set to 3×10^6 with an injecting time of 20 ms. The most intense ions (up to 20) with charge states 2–5 from the full-scan MS were selected for fragmentation in Orbitrap. MS2 precursors were isolated with a quadrupole mass filter set to a width of 1.2 *m*/*z*. Precursors were fragmented by collision-induced dissociation (CID) with a collision energy of 27%. The resolution was set at 15000 and the values for the AGC target and inject time were 2×10^3 and 60 ms, respectively, for MS/MS scans. The duration of dynamic exclusion was set 15 sec and the mass tolerance window was 10 ppm. MS/MS data were acquired in centroid mode. MS/MS spectra were searched with PEAKS (version 10) against UniProt Homo Sapiens (version 2020_02). The 10 ppm precursor tolerance and 0.02 Da fragment tolerance were used as the MS settings. Trypsin was selected as enzyme with one missed cleavage allowance, methionine oxidation and deamidation of aspargine and glutamine were treated as dynamic modification, and carbamidomethylation of cysteine was treated as a fixed modification. Maximum of posttranslational modifications per peptide was 2.

MST

MST was performed on a NanoTemper Monolith NT.115 apparatus (Nano Temper Technologies). SARS-CoV-2 S protein (40 µg) and recombinant hCD14 (100 µg) were labelled by Monolith NT Protein labelling kit RED–NHS (Nano Temper Technologies) according to the manufacturer's protocol. Either 5 µl of 20 nM labelled SARS-CoV-2 S protein or 20 nM labelled hCD14 were incubated with 5 µl of increasing concentrations of LPS (250–0.007 µM) in 10 mM Tris, pH 7.4. Then, samples were loaded into standard glass capillaries (Monolith NT Capillaries, Nano Temper Technologies) and the MST analysis was performed (settings for the light-emitting diode and infrared laser were 80%). Results shown are mean values± SD of six measurements.

Molecular docking and simulations

LPS and Lipid A were docked onto the structures of prefusion S ECD trimer in the open (PDB: 6VSB) (Wrapp et al., 2020) and closed (PDB: 6XR8) (Cai et al., 2020) states. Missing loops of S ECD were modelled using Modeler version 9.21 (Sali and Blundell, 1993) and the best models were chosen based on the lowest discreet optimized protein energy (DOPE) scores (Shen and Sali, 2006) and stereochemical assessments using Ramachandran analysis (Ramachandran et al., 1963). The initial coordinates for *E. coli* rough LPS (R1 core type) and Lipid A were obtained from the CHARMM-GUI LPS modeler (Lee et al., 2019). Unbiased docking was performed using Vina-Carb (Nivedha et al., 2016) with a grid box of dimension 13 × 13 × 13 nm covering the whole protein surface. All torsion angles in the ligands were treated as flexible and default values were used in the docking configurations. Ten poses were generated for each docking calculation to give a total of 40 poses. Each pose was then inspected using VMD (Humphrey et al., 1996) for residues found within 0.4 nm of the ligand, specifically basic residues around the phosphate groups and hydrophobic residues around the lipid tails, to choose the most probable binding site. Chosen poses were then subject to all-atom MD simulations for the closed state of the S protein ECD. The S ECD–Lipid A/LPS complexes used the CHARMM36 forcefield parameters (Huang and MacKerell, 2013). The systems were solvated with TIP3P water molecules and 0.15 M NaCl salt, before being minimized and equilibrated following the standard CHARMM-GUI protocols (Lee et al., 2016). Two independent 200-ns simulations with different starting distributions of velocities were performed for each system using GROMACS 2018 (Abraham, 2015). The temperature of the system was maintained at 310 K, while the pressure was maintained at 1 atm, using the Nosé−Hoover thermostat (Nosé, 1984; Hoover, 1985) and Parrinello−Rahman barostat (Parrinello and Rahman, 1981), respectively. Coulombic interactions were measured using the smooth particle mesh Ewald (PME) method (Essmann et al., 1995), while the van der Waals interactions were cut off at 1.2 nm with a force-smoothing function applied between 1.0 and 1.2 nm. Constraints were applied to all covalent bonds involving hydrogen atoms using the LINCS algorithm (Hess, 1997) to allow for a 2-fs integration time step. Simulations were visualized in VMD and contact analysis was performed using GROMACS tools.

Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. [Science. 2020]
Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. [Science. 2020]
Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. [J Mol Biol. 1993]
Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. [Protein Sci. 2006]
Stereochemistry of polypeptide chain configurations. [J Mol Biol. 1963]
Helical antimicrobial peptides assemble into protofibril scaffolds that present ordered dsDNA to TLR9. [Nat Commun. 2019]
Vina-Carb: Improving Glycosidic Angles during Carbohydrate Docking. [J Chem Theory Comput. 2016]
VMD: visual molecular dynamics. [J Mol Graph. 1996]
CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. [J Comput Chem. 2013]
CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARM [J Chem Theory Comput. 2016]
Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. [Phys Rev A Gen Phys. 1985]

NF-□B activation assay

THP1-XBlue-CD14 reporter cells (InvivoGen) were seeded in 96-well plates in phenol red RPMI, supplemented with 10% (*v*/*v*) heat-inactivated FBS and 1% (*v*/*v*) antibiotic-antimycotic solution (180000 cells/well). Cells were treated with 2.5 ng/ml LPS (Sigma) with increasing concentrations (0.1–10 nM) of SARS-CoV-2 S protein or with 5 nM SARS-CoV-2 S protein with increasing concentrations of LPS (0.25–1 ng/ml). Then, the cells were incubated at 37°C for 20 h. At the end of incubation, the NF-κB activation was analyzed according to the manufacturer's instructions (InvivoGen), i.e. by mixing 20 µl supernatant with 180 µl SEAP detection reagent (Quanti-BlueTM, InvivoGen), followed by absorbance measurement at 600 nm. For the experiments with SARS-CoV S protein, we incubated THP1-XBlue-CD14 reporter cells with 5 nM SARS-CoV S protein and a dose range of LPS (0.25–1 ng/ml). After an incubation period of 20 h at 37°C, NF-κB activation was measured as described above. Data shown are mean values ± SEM obtained from at least four independent experiments all performed in triplicate.

MTT assay

The cytotoxicity of the treatments was evaluated by adding 0.5 mM thiazolyl blue tetrazolium bromide to the cells remaining from NF-κB activation assay. After 2 h of incubation at 37°C, cells were centrifuged at 1000 *g* for 5 min and then the medium was removed. Subsequently, the formazan salts were solubilized with 100 µl of 100% DMSO (Duchefa Biochemie). Absorbance was measured at a wavelength of 550 nm. Cell survival was expressed as percentage of viable cells in the presence of different treatments compared with untreated cells. Lysed cells were used as positive control. Data shown are mean values ± SD obtained from at least four independent experiments all performed in triplicate.

Blood assay

Fresh venous blood was collected in the presence of lepirudin (50 mg/ml) from healthy donors. The blood was diluted 1:4 in RPMI-1640-GlutaMAX-I (Gibco) and 1 ml of this solution was transferred to 24-well plates and stimulated with 0.05 or 0.1 ng/ml LPS in the presence or the absence of 5 nM SARS-CoV-2 S protein. After 24 h incubation at 37°C in 5% CO_2, the plate was centrifuged for 5 min at 1000 *g* and then the supernatants were collected and stored at −80°C before analysis. The experiment was performed at least four times by using blood from different donors each time.

ELISA

The cytokines TNF-α, IL-1β, and IL-6 were measured in human plasma obtained after the blood experiment described above. The assay was performed by using human inflammation DuoSet® ELISA Kit (R&D Systems) specific for each cytokine, according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at a wavelength of 450 nm. Data shown are mean values ± SEM obtained from at least four independent experiments all performed in duplicate.

PBMC isolation

Fresh venous blood was collected in tubes with sodium citrate. Then, 1.5 part of blood was layered on 1 part of Polymorphprep (Fisher Scientific) before centrifugation at 600 *g* at RT for 35 min (without brakes). The layer containing PBMCs was collected in a new tube, diluted 1:1 (*v*/*v*) in PBS and centrifuged at 500 *g* at RT for 5 min. The supernatant was discarded, and the cells were resuspended in Erythrocyte Lysis Buffer (eBioscience). After 10 min incubation at RT, PBMCs were centrifuged for 5 min, washed once in RPMI (without phenol red) supplemented with 10% (*v*/*v*) heat-inactivated FBS and 1% (*v*/*v*) antibiotic–antimycotic solution, and resuspended in the same media at 1×10^6 cells/ml. Cells were plated in a 96-well plate at a concentration of 180000 cells/well. The PBMCs were then treated with LPS and S protein as described above for the experiment with human blood. The supernatant was collected after 8 and 24 h and stored at −80°C before analysis by Luminex multiple bead assay. The experiment was performed three times using duplicate samples and blood from different donors each time.

Luminex multiplex bead assay

The levels of TNF-α, IL-6, IL-8, IFN-β, IL-1β, CCL5, and IL-10 released by PBMCs in the supernatant after 8 and 24 h, respectively, were analyzed using a custom Human Magnetic Luminex® Assay—human XL cytokine discovery pre-mixed kit (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol. The fluorescence was measured using a Luminex® MAGPIX® analyzer. The supernatants from duplicate samples of three independent experiments were analyzed. Data shown in Figure 3D represent mean of fold increase over control. The raw mean values ± SEM are given in Supplementary Table S1.

Mouse inflammation model

The immunomodulatory effects of 5 µg SARS-CoV-2 S protein in combination or not with 2 µg LPS/mouse were analyzed employing BALB/c Tg(NF-κB-RE-Luc)-Xen reporter mice (Taconic Biosciences, 10–12 weeks old). The dorsum of the mouse was shaved carefully and cleaned. SARS-CoV-2 S protein was mixed with LPS immediately before subcutaneous injection on the dorsums of the mice anesthetized with isoflurane (Baxter). Then the animals were transferred to individually ventilated cages and imaged at 1, 3, and 6 h after the injection. An In Vivo Imaging System (IVIS Spectrum, PerkinElmer Life Sciences) was used for the longitudinal determination of NF-κB activation. Fifteen minutes before the IVIS imaging, mice were intraperitoneally given 100 µl D-luciferin (150 mg/kg body weight). Bioluminescence from the mice was detected and quantified using Living Image 4.0 Software (PerkinElmer Life Sciences).

DLS

The hydrodynamic radii of *E. coli* LPS at increasing doses (100–500 µg/ml) alone or with S protein (1.48 µM) were measured using a DynaPro Plate reader (WYATT Technology) equipped with a temperature-controlled chamber. S protein alone was used for control. The samples were incubated in a 384-well plate at 37°C for 30 min prior the analysis. Each measurement was performed 10 times. The hydrodynamic radii were analyzed using Dynamics 7.19 Software. The results are expressed as mean values ± SD obtained from three independent experiments. In another set of experiments, 500 µg/ml LPS were incubated with different concentrations of S protein (5–250 nM) at 37°C for 30 min. The measurements were performed as described above.

TEM analysis

Different concentrations of *E. coli* LPS (100–500 µg/ml) alone or with S protein (1.48 µM) were used to prepare the samples for TEM. In brief, 5 µl of each sample were adsorbed onto carbon-coated grids (Copper mesh, 400) for 60 sec and stained with 7 µl of 2% uranyl acetate for 30 sec. The grids were rendered hydrophilic via glow discharge at low air pressure before using (Petrlova et al., 2020). Analysis was done on 15 view fields (magnification 4200×) of the mounted samples on the grid (pitch 62 µm) from three independent experiments.

Thrombin-derived C-terminal fragments aggregate and scavenge bacteria and their proinflammator [J Biol Chem. 2020]

Effect of SARS-CoV-2 S protein on LPS-FITC aggregation

LPS-FITC (5 µg/ml; Sigma) was incubated with increasing concentrations of S protein (0.0074–8880 nM) and then analyzed by recording the emission fluorescence spectra for 500–600 nm, following excitation at 488 nm. All the measurements were performed using a Jasco J-810 spectropolarimeter equipped with an FMO-427S fluorescence module, with a scan speed of 200 nm/min and 2 nm slit width. The temperature was set to 25°C. The changes in the emission of FITC-LPS as a function of change in the aggregation state of LPS endotoxin-free water was monitored at 515 nm, as reported previously (Srivastava et al., 2012; Srivastava and Ghosh, 2013). The experiment was performed three times.

Consequences of alteration in leucine zipper sequence of melittin in its neutralization of lipopolysaccha [J Biol Chem. 2012]
Introduction of a lysine residue promotes aggregation of temporin L in lipopolysacc [Antimicrob Agents Chemother. 2013]

Ethics statement

All animal experiments are performed according to Swedish Animal Welfare Act SFS 1988:534 and were approved by the Animal Ethics Committee of Malmö/Lund, Sweden. The use of human blood was approved by the Ethics Committee at Lund University, Lund, Sweden (permit no. 657-2008).

Statistical analysis

All *in vitro* assays were repeated at least three times unless otherwise stated. Data are presented as means ± SEM or means ± SD. Differences in the mean between two groups were analyzed using Student's *t*-test for normally distributed data and Mann–Whitney test otherwise. To compare means between more than two groups, a one-way ANOVA with Dunnett's or Holm-Sidak posttest, or a two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons tests, was used. Statistical analyses, as indicated in each figure legend, were performed using GraphPad Prism software v8. *P*-values <0.05 were considered to be statistically significant.

Supplementary material

Go to:

Supplementary material is available at *Journal of Molecular Cell Biology* online.

Supplementary Material

Go to:

mjaa067_Supplementary_Data

Click here for additional data file. (9.3M, pdf)

Acknowledgements

Go to:

The authors thank Dr Céleste Sele and Dr Wolfgang Knecht at the Lund University Protein Production Platform (LP3) for production of recombinant CD14 and Dr Chun Hwee Lim for support with preparation of PBMCs. The authors also acknowledge Dr Mats Leeman at SOLVE Research & Consultancy AB (Medicon Village, Lund) for excellent support with DLS measurements and the Lund University Bioimaging Centrum (LBIC) for access to electron microscopy facilities. Simulations were performed on the petascale computer cluster ASPIRE-1 at the National Supercomputing Center of Singapore (NSCC) and the A*STAR Computational Resource Center (A*CRC).

Funding

This work was supported by grants from the Swedish Research Council (Project 2017-02341), the Welander-Finsen, Crafoord, Torsten Söderberg, and Österlund Foundations, The Royal Physiographic Society of Lund, The Swedish Government Funds for Clinical Research (ALF), and BII (A*STAR) core funds.

Conflict of interest: A.S. is a founder and shareholder of in2cure AB, a company developing therapies based on host defence peptides. A patent application related to the present work, with A.S. and G.P. listed as inventors, has been filed.

Author contributions: G.P. and A.S. conceived the project and designed the experiments. G.P. performed experiments involving SDS–PAGE, western blotting, blood assay, BN gel assay, DLS, and preparation for MS and TEM. J.P. performed MST assay and TEM imaging, A.-C.S. performed THP-1 cell assay and PBMC assay. S.C. and L.U. performed Luminex multiplex bead assays. F.S. and P.J.B. performed molecular docking and computational simulations. S.K. performed MS and data analysis. M.P. performed the *in vivo* experiments and analysis of Luminex data. G.P. and A.S. wrote the manuscript. All of the authors discussed the results and revised and commented on the final manuscript.

References

Go to:

1. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., et al. (2015). GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2, 19–25. [Google Scholar]
2. Agarwal S., Piesco N.P., Johns L.P., et al. (1995). Differential expression of IL-1β, TNF-α, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.* 74, 1057–1065. [PubMed] [Google Scholar]
3. Alizargar J. (2020). The novel coronavirus (COVID-19) and the risk of Kawasaki disease in children. *J. Formos. Med. Assoc*. 119, 1713–1714. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
4. Alqahtani J.S., Oyelade T., Aldhahir A.M., et al. (2020). Prevalence, severity and mortality associated with COPD and smoking in patients with COVID-19: a rapid systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 15, e0233147. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
5. Awoyemi A., Troseid M., Arnesen H., et al. (2018). Markers of metabolic endotoxemia as related to metabolic syndrome in an elderly male population at high cardiovascular risk: a cross-sectional study. *Diabetol. Metab. Syndr*. 10, 59. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
6. Bangaru S., Ozorowski G., Turner H.L., et al. (2020). Structural analysis of full-length SARS-CoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate. Science *370*, 1089−1094. [PMC free article] [PubMed]
7. Bezzio C., Saibeni S., Variola A., et al. (2020). Outcomes of COVID-19 in 79 patients with IBD in Italy: an IG-IBD study. *Gut* 69, 1213–1217. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
8. Bodet C., Chandad F., Grenier D. (2007). Hemoglobin and LPS act in synergy to amplify the inflammatory response. *J. Dent. Res*. 86, 878–882. [PubMed] [Google Scholar]
9. Bui F.Q., Almeida-da-Silva C.L.C., Huynh B., et al. (2019). Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed. J*. 42, 27–35. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
10. Cai Y., Zhang J., Xiao T., et al. (2020). Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* 369, 1586–1592. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
11. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A., et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772. [PubMed] [Google Scholar]
12. Costa F.F., Rosario W.R., Ribeiro Farias A.C., et al. (2020). Metabolic syndrome and COVID-19: an update on the associated comorbidities and proposed therapies. *Diabetes Metab. Syndr*. 14, 809–814. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
13. Dabke K., Hendrick G., Devkota S. (2019). The gut microbiome and metabolic syndrome. *J. Clin. Invest*. 129, 4050–4057. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
14. Dalgediene I., Luciunaite A., Zvirbliene A. (2018). Activation of macrophages by oligomeric proteins of different size and origin. *Mediators Inflamm*. 2018, 7501985. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
15. de Oliveira M.V., Rocha N.N., Santos R.S., et al. (2019). Endotoxin-induced emphysema exacerbation: a novel model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations causing cardiopulmonary impairment and diaphragm dysfunction. *Front. Physiol*. 10, 664. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
16. Debey S., Schoenbeck U., Hellmich M., et al. (2004). Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenomics J*. 4, 193–207. [PubMed] [Google Scholar]
17. DeForge L.E., Remick D.G. (1991). Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 174, 18–24. [PubMed] [Google Scholar]
18. Esper F., Shapiro E.D., Weibel C., et al. (2005). Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J. Infect. Dis*. 191, 499–502. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
19. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys*. 103, 8577–8593. [Google Scholar]
20. Felsenstein S., Herbert J.A., McNamara P.S., et al. (2020). COVID-19: immunology and treatment options. *Clin. Immunol*. 215, 108448. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
21. Guo Y., Zhou G., He C., et al. (2015). Serum levels of lipopolysaccharide and 1,3-β-D-glucan refer to the severity in patients with Crohn's disease. *Mediators Inflamm.* 2015, 843089. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
22. Hariri L., Hardin C.C. (2020). Covid-19, angiogenesis, and ARDS endotypes. *N. Engl. J. Med*. 383, 182–183. [PubMed] [Google Scholar]
23. Hasday J.D., Bascom R., Costa J.J., et al.(1999). Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* 115, 829–835. [PubMed] [Google Scholar]
24. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J., et al. (1997). LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem*. 18, 1463–1472. [Google Scholar]
25. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., and Pöhlmann, S. (2020). A multibasic cleavage site in the spikeprotein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells . *Mol. Cell 78*, 779–784.e5. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
26. Hoover W.G. (1985). Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* 31, 1695–1697. [PubMed] [Google Scholar]
27. Huang J., MacKerell A.D. Jr. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem*. 34, 2135–2145. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
28. Huber R.G., Berglund N.A., Kargas V., et al. (2018). A thermodynamic funnel drives bacterial lipopolysaccharide transfer in the TLR4 pathway. *Structure* 26, 1151–1161.e4. [PubMed] [Google Scholar]
29. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph*. 14, 33–38. [PubMed] [Google Scholar]
30. Kitchens R.L., Thompson P.A. (2005). Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J. Endotoxin Res*. 11, 225–229. [PubMed] [Google Scholar]
31. Komatsu T., Aida Y., Fukuda T., et al. (2016). Disaggregation of lipopolysaccharide by albumin, hemoglobin or high-density lipoprotein, forming complexes that prime neutrophils for enhanced release of superoxide. *Pathog. Dis*. 74, ftw003. [PubMed] [Google Scholar]
32. Lassenius M.I., Pietilainen K.H., Kaartinen K., et al. (2011). Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care* 34, 1809–1815. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
33. Lee J., Cheng X., Swails J.M., et al. (2016). CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *J. Chem. Theory Comput.* 12, 405–413. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
34. Lee E.Y., Zhang C., Di Domizio J., et al. (2019). Helical antimicrobial peptides assemble into protofibril scaffolds that present ordered dsDNA to TLR9. *Nat. Commun*. 10, 1012. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
35. Li X., Ma X. (2020). Acute respiratory failure in COVID-19: is it 'typical' ARDS? *Crit. Care* 24, 198. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
36. Liu X., Yin S., Chen Y., et al. (2018). LPS induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NFκB, STAT3 or AP1 activation. *Mol. Med. Rep*. 17, 5484–5491. [PubMed] [Google Scholar]
37. Marhl M., Grubelnik V., Magdic M., et al. (2020). Diabetes and metabolic syndrome as risk factors for COVID-19. *Diabetes Metab. Syndr*. 14, 671–677. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
38. Mueller M., Lindner B., Kusumoto S., et al. (2004). Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* 279, 26307–26313. [PubMed] [Google Scholar]
39. Nivedha A.K., Thieker D.F., Makeneni S., et al. (2016). Vina-Carb: improving glycosidic angles during carbohydrate docking. *J. Chem. Theory Comput*. 12, 892–901. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
40. Nosé S. (1984). A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* 52, 255–268. [Google Scholar]
41. Nys M., Ledoux D., Canivet J.L., et al. (2000). Correlation between endotoxin level and bacterial count in bronchoalveolar lavage fluid of ventilated patients. *Crit. Care Med*. 28, 2825–2830. [PubMed] [Google Scholar]
42. Opal S.M., Scannon P.J., Vincent J.L., et al. (1999). Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J. Infect. Dis*. 180, 1584–1589. [PubMed] [Google Scholar]
43. Paju S., Pussinen P.J., Sinisalo J., et al. (2006). Clarithromycin reduces recurrent cardiovascular events in subjects without periodontitis. *Atherosclerosis* 188, 412–419. [PubMed] [Google Scholar]
44. Papareddy P., Rydengard V., Pasupuleti M., et al. (2010). Proteolysis of human thrombin generates novel host defense peptides. *PLoS Pathog*. 6, e1000857. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
45. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., et al. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature* 458, 1191–1195. [PubMed] [Google Scholar]
46. Parrinello M., Rahman A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52, 7182–7190. [Google Scholar]
47. Pastor Rojo, O., López San Román, A., Albéniz Arbizu, E., , et al. (2007). Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis*. 13, 269–277. [PubMed] [Google Scholar]
48. Petrlova J., Hansen F.C., van der Plas M.J.A., et al. (2017). Aggregation of thrombin-derived C-terminal fragments as a previously undisclosed host defense mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, E4213–E4222. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
49. Petrlova J., Petruk G., Huber R.G., et al. (2020). Thrombin-derived C-terminal fragments aggregate and scavenge bacteria and their proinflammatory products. *J. Biol. Chem.* 295, 3417–3430. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
50. Puthia M., Butrym M., Petrlova J., et al. (2020). A dual-action peptide-containing hydrogel targets wound infection and inflammation. *Sci. Transl. Med.* 12, eaax6601. [PubMed] [Google Scholar]
51. Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol*. 7, 95–99. [PubMed] [Google Scholar]
52. Rittirsch D., Flierl M.A., Ward P.A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat. Rev. Immunol*. 8, 776–787. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
53. Ryu J.K., Kim S.J., Rah S.H., et al. (2017). Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4–MD2 for efficient LPS recognition and transfer. *Immunity* 46, 38–50. [PubMed] [Google Scholar]
54. Sahni V., Gupta S. (2020). COVID-19 & periodontitis: the cytokine connection. *Med. Hypotheses* 144, 109908. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
55. Saif L.J. (2010). Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*. 26, 349–364. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
56. Sali A., Blundell T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol*. 234, 779–815. [PubMed] [Google Scholar]
57. Saravanan R., Holdbrook D.A., Petrlova J., et al. (2018). Structural basis for endotoxin neutralisation and anti-inflammatory activity of thrombin-derived C-terminal peptides. *Nat. Commun*. 9, 2762. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
58. Shen M.Y., Sali A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci*. 15, 2507–2524. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
59. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., et al. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc*. 1, 2856–2860. [PubMed] [Google Scholar]
60. Shope R.E. (1931). Swine influenza: I. Experimental transmission and pathology. *J. Exp. Med*. 54, 349–359. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
61. Srivastava S., Ghosh J.K. (2013). Introduction of a lysine residue promotes aggregation of temporin L in lipopolysaccharides and augmentation of its antiendotoxin property. *Antimicrob. Agents Chemother*. 57, 2457–2466. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
62. Srivastava R.M., Srivastava S., Singh M., et al. (2012). Consequences of alteration in leucine zipper sequence of melittin in its neutralization of lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in macrophage cells and interaction with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem*. 287, 1980–1995. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
63. Tamboli C.P., Neut C., Desreumaux P., et al. (2004). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 1–4. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
64. Tobias P.S., Soldau K., Iovine N.M., et al. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. *J. Biol. Chem.* 272, 18682–18685. [PubMed] [Google Scholar]
65. Toubiana J., Poirault C., Corsia A., et al. (2020). Kawasaki-like multisystem inflammatory syndrome in children during the covid-19 pandemic in Paris, France: prospective observational study. *BMJ* 369, m2094. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
66. Tsujimoto H., Takeshita S., Nakatani K., et al. (2001). Delayed apoptosis of circulating neutrophils in Kawasaki disease. *Clin. Exp. Immunol*. 126, 355–364. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
67. van der Poll T., Opal S.M. (2008). Host–pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect. Dis*. 8, 32–43. [PubMed] [Google Scholar]
68. Van Gucht S., Atanasova K., Barbe F., et al. (2006). Effect of porcine respiratory coronavirus infection on lipopolysaccharide recognition proteins and haptoglobin levels in the lungs. *Microbes Infect*. 8, 1492–1501. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
69. Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M. (2000). A potential role for tumour necrosis factor-α in synergy between porcine respiratory coronavirus and bacterial lipopolysaccharide in the induction of respiratory disease in pigs. *J. Med. Microbiol*. 49, 613–620. [PubMed] [Google Scholar]
70. Vors C., Pineau G., Drai J., et al. (2015). Postprandial endotoxemia linked with chylomicrons and lipopolysaccharides handling in obese versus lean men: a lipid dose−effect trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 100, 3427–3435. [PubMed] [Google Scholar]
71. Wan Y., Shang J., Graham R., et al. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol*. 94, [illegible]

[illegible]

Articles from Journal of Molecular Cell Biology are provided here courtesy of Oxford University Press

Paz Azakarian, Zetro Group (Yerevan Medical State University) 11-4-2021

Mechanisms that could increase cancer vulnerability in COVID-19 mRNA vaccine recipients

Abstract

The BNT162b2 and mRNA-1273 vaccines have been rolled out globally in high numbers. Even minimal risk groups have been fully vaccinated in many countries. We observe certain links that show there are ways cancer can have an easier path to establishing itself as a result of COVID-19 mRNA vaccination.

Dysregulation by spike protein

Proteins p53 and BRCA1 are well-known tumor suppressor proteins that regulate downstream genes in response to numerous cellular stresses and are frequently mutated in human cancer [“p53”][Silver, Daniel P., and David M. Livingston]. It is observed to be inhibited by SARS-CoV-2 [Stingi, Aureliano, and Lu.]. The S2 (Spike protein S2) subunit of Sars-CoV-2 has known interactions with p53, but also with BRCA-1/2 proteins [Singh, Nishant, and Anuradha Bharara Singh.]. That could also mean that the proteins generated by the mRNA vaccines would also interact with the p53 gene, and inhibit this tumor suppressor. The SARS-CoV spike protein is also known to cause apoptosis in Vero E6 cells. Cleavage of the S protein into fragments was suggested in previous studies, which includes a form that resembles the S2 protein in this study, suggesting the spike proteins are enough to degrade p53 [Chow, K. Y., et al.][Barhoumi, Tlili, et al.]. Even though vaccines help prevent SARS-CoV-2 spread and infection, individuals with solely vaccine-gained immunity might suffer from opsonization on initial infection, eventually resulting in high viral load and spike overload [Bahnan, Wael, et al.][Acharya, Charlotte B., et al.]. It is important to note that certain results suggest that recombinant spike-based SARS-CoV-2 immunogen glycosylation reproducibly recapitulates signatures of viral glycosylation. [Allen, Joel D., et al.]. Which could potentially be cancer-enhancing [Kremsreiter, Stefanie Maria, et al.], even though this does not seem like a very likely scenario, it would probably increase the chances of p53 being inhibited [May, and May].

Code issues in mRNA

Several natural mechanisms of termination suppression exist, including ribosomal frameshifting. The process of protein synthesis termination, although effective, is not 100% efficient [Dabrowski, Maciej, et al.]. Several +1 frameshift sites have also been recognized in eukaryotic mRNA. For example, the expression of mammalian antizyme 1 (AZ1) requires a +1 frameshift [Moon, et al.]. Codon misreading tRNAs are known to promote tumor growth in mice [Santos, Mafalda, et al.], and it’s known that many human cancers can be caused by illogical frameshifts [Lee, Hui-Ling Rose, & Joseph Dougherty.][X;, Xia.]. In BNT162b2 and mRNA-1273 vaccines there is a relatively high chance of such occurrences due to poor choices of stop codons and shoddy optimization [Mordstein, Christine, et al.].

Discussion

Tumor suppressors are important in preventing cancer from occuring. Mass vaccination on low risk groups requires more data on this matter before determining the safety of the current mRNA vaccines.

References

Acharya, Charlotte B., et al. *No Significant Difference in Viral Load Between Vaccinated and Unvaccinated, Asymptomatic and Symptomatic Groups When Infected with SARS-CoV-2 Delta Variant*. Cold Spring Harbor Laboratory, 29 Sept. 2021, http://dx.doi.org/10.1101/2021.09.28.21264262.

Allen, Joel D., et al. *Site-Specific Steric Control of SARS-CoV-2 Spike Glycosylation*. Cold Spring Harbor Laboratory, 9 Mar. 2021, http://dx.doi.org/10.1101/2021.03.08.433764.

Bahnan, Wael, et al. *Opsonization by Non-Neutralizing Antibodies Can Confer Protection to SARS-CoV-2 despite Spike-Dependent Modulation of Phagocytosis*. Cold Spring Harbor Laboratory, 15 Oct. 2021, http://dx.doi.org/10.1101/2021.10.14.464464.

Barhoumi, Tlili, et al. "SARS-CoV-2 Coronavirus Spike Protein-Induced Apoptosis, Inflammatory, and Oxidative Stress Responses in THP-1-Like-Macrophages: Potential Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor (Perindopril)." *Frontiers in Immunology*, vol. 0, Jan. 2021, https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728896.

Chow, K. Y., et al. "SARS Coronavirus and Apoptosis - PubMed." *Hong Kong Medical Journal = Xianggang Yi Xue Za Zhi*, vol. 14 Suppl 4, Aug. 2008.

Dabrowski, Maciej, et al. "Translational Readthrough Potential of Natural Termination Codons in Eucaryotes--The Impact of RNA Sequence." *RNA Biology*, vol. 12, no. 9, 2015, pp. 950–58, https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1068497.

Johnson, Philip L. F., et al. "Vaccination Alters the Balance between Protective Immunity, Exhaustion, Escape, and Death in Chronic Infections." *Journal of Virology*, vol. 85, no. 11, June 2011, pp. 5565–70, https://doi.org/10.1128/JVI.00166-11.

Kremsreiter, Stefanie Maria, et al. "Glycan-Lectin Interactions in Cancer and Viral Infections and How to Disrupt Them." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 19, Sept. 2021, p. 10577, https://doi.org/10.3390/ijms221910577.

Lazzaro, Sandra, et al. "CD8 T-Cell Priming upon MRNA Vaccination Is Restricted to Bone-Marrow-Derived Antigen-Presenting Cells and May Involve Antigen Transfer from Myocytes." *Immunology*, vol. 146, no. 2, Oct. 2015, pp. 312–26, https://doi.org/10.1111/imm.12505.

Lee, Hui-Ling Rose, and Joseph P. Dougherty. "Pharmaceutical Therapies to Recode Nonsense Mutations in

Inherited Diseases - PubMed." *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 136, no. 2, Nov. 2012, https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.007.

May, and May. "Twenty Years of P53 Research: Structural and Functional Aspects of the P53 Protein." *Oncogene*, vol. 18, no. 53, Dec. 1999, pp. 7621–36, https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203285.

Moon, et al. "Predicting Genes Expressed via −1 and +1 Frameshifts." *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 16, Jan. 2004, pp. 4884–92, https://doi.org/10.1093/nar/gkh829.

Mordstein, Christine, et al. "Transcription, MRNA Export, and Immune Evasion Shape the Codon Usage of Viruses." *Genome Biology and Evolution*, vol. 13, no. 9, May 2021, https://doi.org/10.1093/gbe/evab106.

Peixoto, Andreia, et al. "Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks." *Frontiers in Oncology*, vol. 0, Jan. 2019, https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00380.

Santos, Mafalda, et al. "Codon Misreading TRNAs Promote Tumor Growth in Mice." *RNA Biology*, vol. 15, no. 6, 2018, pp. 773–86, https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1454244.

Silver, Daniel P., and David M. Livingston. "Mechanisms of BRCA1 Tumor Suppression." *Cancer Discovery*, vol. 2, no. 8, Aug. 2012, pp. 679–84, https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0221.

Singh, Nishant, and Anuradha Bharara Singh. "S2 Subunit of SARS-NCoV-2 Interacts with Tumor Suppressor Protein P53 and BRCA: An in Silico Study." *Translational Oncology*, vol. 13, no. 10, Oct. 2020, p. 100814, https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100814.

Stingi, Aureliano, and Luca Cirillo. "SARS-CoV-2 Infection and Cancer: Evidence for and against a Role of SARS-CoV-2 in Cancer Onset." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, vol. 43, no. 8, Aug. 2021, p. e2000289, https://doi.org/10.1002/bies.202000289.

(US), National Center for Biotechnology Information. "The P53 Tumor Suppressor Protein." *NCBI Bookshelf*, 1 Jan. 1998, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22268/.

Xia, Xuhua. "Detailed Dissection and Critical Evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna MRNA Vaccines." *Vaccines*, vol. 9, no. 7, July 2021, p. 734, https://doi.org/10.3390/vaccines9070734.

Pièce n°21

ATTESTATION DU Dr JM SABATIER S’EXPRIMANT EN SON NOM PROPRE

Docteur en Biologie cellulaire et en Biologie moléculaire, HDR en Biochimie

I) Injections « vaccinales » à ARNm anti-Covid-19 et production de protéines « fantômes ».

Dans les « vaccins » à ARNm, comme ceux de Pfizer-BioNTech (Comirnaty) et Moderna (Spikevax), le remplacement des uridines (un des 4 nucléosides) par des N1-méthyl pseudouridines (m1Ψ) vise à améliorer la stabilité de l’ARNm et à réduire la réponse immunitaire innée, afin de favoriser l’efficacité de la traduction en protéine Spike. Cependant, des études scientifiques, notamment celles de Eyler et al. (2019) et de Mulroney et al. (2023), montrent que cette modification entraîne des erreurs de traduction, conduisant à la production de protéines « fantômes » (inconnues ou hors-cible). Il est notable que l’article de Eyler et collaborateurs a été publié avant la vaccination de masse anti-Covid-19 de début 2021.

Ci-dessous, une explication détaillée basée sur ces deux articles.

Contexte : Rôle de la N1-méthylpseudouridine

La N1-méthyl pseudouridine (m1Ψ) est un nucléoside modifié incorporé (plus de mille fois !) dans les ARNm « vaccinaux » anti-Covid-19 pour : (i) stabiliser l’ARNm (les modifications réduisent la dégradation par les RNases), (ii) éviter l’activation immunitaire innée (m1Ψ atténue la reconnaissance par les récepteurs de l’immunité innée comme TLRs ou RIG-I), et (iii) augmenter la traduction de l’ARNm (m1Ψ favorise une interaction plus stable avec le ribosome améliorant l’efficacité de la synthèse protéique).

Cependant, ces modifications altèrent la fidélité de la traduction, comme démontré formellement dans les deux études présentées ci-dessous.

Eyler et al. (article publié dans PNAS en 2019, avant la vaccination de masse anti-Covid-19) : impact de la pseudo uridylation sur la traduction de l’ARNm.

Dans leur article publié dans PNAS (doi : 10.1073/pnas.1821754116), Eyler et collaborateurs explorent comment la pseudo uridylation d’un ARNm affecte la traduction en protéine. Leurs principales conclusions sont : (i) la pseudo uridine (Ψ) modifie les interactions entre l’ARNm et le ribosome, ce qui perturbe la reconnaissance correcte des codons (entraînant des erreurs de traduction), (ii) une augmentation des erreurs de lecture de l’ARNm avec la pseudo uridylation, ce qui provoque des décalages du cadre de lecture (frame shifting) ou des incorporations erronées de résidus d’acides aminés. En fait, il existe une modification de la conformation de l’ARNm qui affecte la précision avec laquelle le ribosome lit les codons, et (iii) un effet contextuel (les erreurs de traduction dépendent de la position des pseudo uridines

dans la séquence de l'ARNm : les pseudo uridines présentes dans des régions riches en uridines ou dans des codons spécifiques augmentent la probabilité d'erreurs).
Cet article montre que les nucléosides modifiés peuvent perturber la fidélité de la traduction entraînant la production de protéines « fantômes ».

Mulroney et al. (article publié dans Nature en 2023) : mise en évidence d'un décalage de cadre de lecture de l'ARNm causé par la N^1-méthyl pseudo uridine.

L'article de Mulroney et al., publié dans Nature (doi : 10.1038/s41586-023-06800-3), examine les effets de la N1-méthyl pseudo uridine (m1Ψ), la modification utilisée dans les vaccins à ARNm de Pfizer-BioNTech et Moderna. Cet article apporte des preuves directes que m1Ψ induit un phénomène appelé +1 ribosomal frame shifting (décalage du cadre de lecture de +1), conduisant à la synthèse de protéines « fantômes » indésirables.

Voici les points clés :

Le remplacement des uridines (par m1Ψ) modifie les propriétés de l'ARNm, notamment la stabilité des appariements codon-anticodon du ribosome. Cela provoque un glissement du ribosome d'une base (+1), changeant ainsi le cadre de lecture et produisant des protéines différentes de la protéine Spike (protéines « fantômes »).

Les expériences sur des modèles cellulaires et animaux montrent que le décalage du cadre de lecture de +1 se produit à une fréquence significative dans les ARNm contenant m1Ψ. Par exemple, les auteurs estiment que ce phénomène peut affecter jusqu'à 10% des traductions.

Les conséquences sont délétères avec la production de protéines « fantômes » indésirables. En effet, les protéines « décalées » sont tronquées ou totalement différentes de la protéine Spike (le décalage du cadre modifie la lecture des codons en aval). Ces protéines « fantômes » aberrantes peuvent inclure des séquences peptidiques non prévues (mais immunogènes) car elles ne correspondent pas à la protéine Spike codée par le « vaccin ». Le décalage du cadre de lecture peut conduire à la production de peptides plus courts et/ou de protéines non fonctionnelles, qui peuvent aussi déclencher des réponses immunitaires imprévues à l'origine de troubles métaboliques, de maladies auto-immunes et de cancers (dont les turbo-cancers).

En conclusion, le remplacement des uridines par des N1-méthyl pseudo uridines dans les ARNm « vaccinaux » perturbe fortement la fidélité de la traduction par plusieurs mécanismes (modification des interactions ribosome-ARNm, décalage du cadre de lecture de +1 entraînant la synthèse de protéines « indésirables » différentes de la protéine Spike).

L'effet est cumulatif : dans les « vaccins », où toutes les uridines sont remplacées par m1Ψ, l'effet est donc amplifié car de nombreuses régions de l'ARNm peuvent subir des erreurs de traduction.

Quelles sont les conséquences ?

Les protéines « fantômes » sont reconnues par le système immunitaire, entraînant potentiellement divers troubles, dont des réponses inflammatoires, auto-immunes, tumorales, etc. Ainsi, les travaux d'Eyler et al. (2019) et de Mulroney et al. (2023) montrent que la N1-méthyl pseudo uridylation introduit de multiples erreurs de traduction de l'ARNm. Ces erreurs conduisent à la production de protéines « fantômes » inconnues ou hors-cible, qui ne peuvent que présenter un caractère délétère sur l'organisme humain.

II) Injections « vaccinales » à ARNm anti-Covid-19 et dérèglement du Système Rénine Angiotensine (SRA) pouvant provoquer des pathologies graves dont les « turbos cancers »

1. Les vaccins à ARNm : Contexte avant 2021

Avant 2021, les vaccins à ARNm étaient une technologie émergente, étudiée principalement pour des maladies spécifiques (i.e. cancer, le Zika, la grippe), mais aucun vaccin à ARNm n'avait encore été approuvé pour un usage généralisé avant les vaccins contre le SARS-CoV-2 et la COVID-19 (« Comirnaty » de Pfizer-BioNTech et « Spikevax » de Moderna, autorisés à la fin 2020). Ces vaccins fonctionnent en injectant dans les organismes des ARNm (protégés par des nanoparticules lipidiques) codant pour une protéine spécifique (la protéine spike - légèrement modifiée- du SARS-CoV-2) qui déclenche une réponse immunitaire.
Les préoccupations théoriques avant 2021 portaient sur :
(i) la stabilité de l'ARNm et son potentiel à provoquer des réactions inflammatoires excessives (un ARNm est hyper-inflammatoire), (ii) les effets à long terme, encore peu documentés en raison de l'absence de suivi prolongé, et (iii) les interactions potentielles avec des systèmes physiologiques, comme le système rénine-angiotensine (SRA), en raison de la production de la protéine spike.

2. Le système rénine-angiotensine (SRA) et la protéine spike (virale ou vaccinale)

Le SRA est un système physiologique hormonal et enzymatique « clé » initialement décrit pour réguler la pression artérielle, l'équilibre hydrosodé et les fonctions autonomes rénale, pulmonaire et cardiovasculaire. Il s'agit en fait du système « Maître » du corps humain, permettant à l'organisme de fonctionner. Il implique plusieurs hormones ainsi que divers récepteurs enzymatiques, dont l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (ECA) et le récepteur ECA2, qui est également la cible du virus SARS-CoV-2 dans les cellules. Avant 2021, des études de Sabatier et collaborateurs sur le SARS-CoV-2 (et non sur les vaccins) ont montré que la protéine spike pouvait interagir avec le récepteur ECA2, et conduire à un dérèglement du SRA, avec une suractivation d'un récepteur « délétère » appelé AT1R (« The renin-angiotensin system: a key role in SARS-CoV-2-induced COVID-19. » El-Arif, G., Farhat, A., Khazaal, S., Annweiler, C., Kovacic, H., Wu, Y., Cao, Z., Fajloun, Z., Abi Khattar, Z., Sabatier, J.M., *Molecules,* 26, 6945 (2021). Doi: 10.3390/molecules26226945). Le récepteur AT1R suractivé est pro-hypertenseur, pro-inflammatoire, pro-oxydant, pro-thrombotique, pro-angiogénique, pro-hypoxémique, pro-hypoxique, pro-fibrosant, pro-hypertrophiant et il fait chuter le monoxyde d'azote NO.

Sabatier et ses collaborateurs ont ultérieurement décrit que les vaccins à ARNm anti-Covid-19 induisent la production d'une protéine spike (par les cellules humaines) modifiée capable de se fixer sur le récepteur ECA2, perturbant ainsi l'équilibre du SRA (excès de l'hormone angiotensine-2 conduisant à une suractivation du récepteur AT1R). La dérégulation du SRA se traduit finalement par l'apparition potentielle de nombreuses pathologies, dont les troubles neuro-dégénératifs, cardiovasculaires, gastrointestinaux, de l'auto-immunité et des cancers (ou turbo-cancers).

Le terme « turbo cancer » (cancer à progression rapide) est utilisé en lien avec les vaccins à ARNm qui contiennent une énorme quantité de molécules d'ARNm (14000 milliards pour le « Comirnaty » et 47000 milliards pour le « Spikevax » pour les injections vaccinales adultes, correspondant à 30 et 100 microgrammes d'ARNm, respectivement) capables de produire une multitude de protéines Spike « vaccinales », ainsi que de multiples protéines « fantômes » dues à la présence du dérivé nucléosidique N^1-méthyl-pseudouridine (Mulroney, T.E., Pöyry, T., Yam-Puc, J.C. *et al.* N^1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting. *Nature* **625**, 189–194 (2024). https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3) qui décale le cadre de lecture (de +1) des ribosomes cellulaires. Comme la protéine Spike, ces protéines « fantômes » inconnues stimulent également le système immunitaire et leurs effets ne peuvent être que délétères. Ainsi, il existe plusieurs liens entre les vaccins à ARNm et les cancers ou turbo-cancers : (i) le SRA dérégulé -donc défaillant- contrôle la différenciation et la multiplication cellulaire (à l'origine d'une multiplication anarchique des cellules), (ii) les vaccins à ARNm peuvent interférer avec les mécanismes de réparation de l'ADN ou de régulation cellulaire, et (iii) les vaccins à ARNm peuvent induire une inflammation chronique via une réponse immunitaire exacerbée, ce qui constitue un environnement propice au développement de cancers.

Liste non exhaustive des maladies liées au dérèglement du Système Rénine Angiotensine (SRA) :

Voici une liste des principales pathologies associées à un dérèglement du SRA, basée sur les connaissances scientifiques disponibles :

1. Pathologies cardiovasculaires

- Hypertension artérielle : Une suractivation du SRA, notamment via une production excessive d'angiotensine-2, entraîne une vasoconstriction et une rétention hydrosodée, augmentant la pression artérielle.

- Insuffisance cardiaque : Un SRA hyperactif contribue à une surcharge volumique et à une hypertrophie cardiaque, aggravant l’insuffisance cardiaque. Une sous-activation (par exemple, via une inhibition excessive d’ECA2) peut aussi perturber l’équilibre cardiovasculaire.

- Athérosclérose : L’angiotensine II favorise l’inflammation et le stress oxydatif dans les parois vasculaires, accélérant la formation de plaques athéroscléreuses.

- Infarctus myocardique : Un dérèglement du SRA peut aggraver l’ischémie myocardique en augmentant la demande en oxygène et en favorisant le remodelage pathologique du cœur.

- Arythmies cardiaques : Une dérégulation du SRA peut perturber l’équilibre électrolytique (notamment potassium et sodium), prédisposant aux arythmies.

2. Pathologies rénales

- Insuffisance rénale chronique : L’hyperactivation du SRA cause une hypertension intraglomérulaire, entraînant une glomérulosclérose et une perte progressive de la fonction rénale.

- Protéinurie : Une altération du SRA peut endommager la barrière de filtration glomérulaire, augmentant l’excrétion urinaire de protéines.

- Néphropathie diabétique : Le SRA joue un rôle central dans les lésions rénales associées au diabète, en favorisant la fibrose et l’inflammation rénale.

3. Pathologies pulmonaires

- Fibrose pulmonaire : Une suractivation du SRA, via l’angiotensine-2, peut stimuler la fibrose dans les tissus pulmonaires, notamment dans des maladies comme la fibrose pulmonaire idiopathique.

- Hypertension artérielle pulmonaire : Un dérèglement du SRA contribue à la vasoconstriction et au remodelage des artères pulmonaires, augmentant la pression dans la circulation pulmonaire.

- Œdème pulmonaire : Dans le cadre d’une insuffisance cardiaque liée au SRA, une rétention hydrosodée peut provoquer une accumulation de liquide dans les alvéoles pulmonaires.

4. Pathologies métaboliques

- Diabète de type 2 : Le SRA influence la sensibilité à l’insuline. Une hyperactivation peut favoriser la résistance à l’insuline, contribuant au diabète.

- Syndrome métabolique : Le SRA est impliqué dans l’obésité, l’hypertension et la dyslipidémie, composants clés du syndrome métabolique.

5. Pathologies inflammatoires et fibrotiques

- Fibrose hépatique : L’angiotensine-2 promeut l’inflammation et la fibrose dans le foie, notamment dans les maladies comme la stéato-hépatite non alcoolique (NASH).

- Inflammation chronique : Un SRA hyperactif stimule la production de cytokines pro-inflammatoires, contribuant à des maladies systémiques comme l'arthrite rhumatoïde ou les maladies auto-immunes.

6. Pathologies neurologiques

- Accident vasculaire cérébral (AVC) : Une hypertension liée au SRA augmente le risque d'AVC ischémique ou hémorragique.

- Maladie d'Alzheimer : Des études suggèrent qu'un dérèglement du SRA pourrait contribuer à l'inflammation cérébrale et à l'accumulation de plaques amyloïdes.

- Hypertension intracrânienne : Une dysrégulation du SRA peut influencer la pression artérielle systémique et cérébrale, aggravant certaines conditions neurologiques.

7. Pathologies liées à l'infection par le SARS-CoV-2

- COVID-19 sévère : Le SARS-CoV-2 utilise ECA2 comme récepteur d'entrée, ce qui peut perturber l'équilibre du SRA. Une downregulation d'ECA2 après infection peut exacerber l'inflammation et les lésions pulmonaires (syndrome de détresse respiratoire aiguë, SDRA).

- Complications cardiovasculaires post-COVID : Une dérégulation du SRA liée à l'infection peut contribuer à des myocardites ou des thromboses.

8. Autres pathologies potentielles

- Cancer : Bien que le lien ne soit pas pleinement établi, certaines études suggèrent que l'angiotensine II pourrait favoriser la prolifération cellulaire et l'angiogenèse dans certains cancers, bien que le terme « turbo cancers » ne soit pas scientifiquement reconnu.

- Une suractivation du SRA peut aggraver les lésions d'organes dans des maladies auto-immunes comme le lupus ou la sclérodermie, en favorisant l'inflammation et la fibrose.

Remarques importantes

- Mécanismes : Les pathologies liées au SRA sont souvent dues à une suractivation (excès d'angiotensine-2) ou, plus rarement, à une sous-activation (par exemple, inhibition excessive d'ECA2). Les traitements comme les inhibiteurs de l'ECA (ex. : captopril) ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ex. : losartan) sont couramment utilisés pour corriger une suractivation.

- Facteurs aggravants : Le stress, l'hypertension, le diabète, l'obésité et certaines infections (comme le SARS-CoV-2) peuvent exacerber le dérèglement du SRA.

- Manque de données pour certains liens : Pour des pathologies comme les cancers, le lien avec le SRA reste hypothétique et nécessite davantage de recherches.

Cette liste couvre les principales pathologies associées à un dérèglement du SRA, basées sur les connaissances scientifiques disponibles.

III) La protéine Spike du SARS-CoV-2 présente des particularités qui montrent un « gain de fonction », avec la présence d'un site furine inédit, d'un adhésiotope RGD, et de motifs de la glycoprotéine d'enveloppe du virus VIH.

1. Le site furine de la protéine Spike du SARS-CoV-2.

Le site furine de la protéine Spike joue un rôle majeur dans l'infectivité et la transmissibilité du virus dans les cellules humaines. Le site de clivage furine est une séquence spécifique de résidus d'acides aminés sur la protéine Spike (S) du SARS-CoV-2. Il est reconnu et clivé par une enzyme cellulaire appelée furine (une protéase de la cellule hôte).

La structure du site furine du SARS-CoV-2 est **atypique** :
PRRAR | S (Proline-Arginine-Arginine-Alanine-Arginine/Sérine) : le clivage se produit entre la dernière arginine et la sérine. Il est notable que ce site furine **atypique** a été breveté par la société MODERNA en 2017. Le site furine « canonique » classique est : RX(K/R)R

Le site furine est situé à la jonction S1/S2 de la protéine Spike (S1 est responsable de la liaison au récepteur ECA2, tandis que S2 est responsable de la fusion de la membrane virale avec la cellule hôte). Le clivage par la furine pré-active la protéine Spike avant l'entrée du virus dans la cellule, ce qui facilite une fusion membranaire plus efficace qui augmente ainsi la capacité du virus à infecter différentes cellules humaines. Il est notable que ce site furine est absent chez d'autres coronavirus proches (comme SARS-CoV-1), ce qui explique la plus grande infectiosité de SARS-CoV-2. L'addition d'un site furine dans la protéine Spike du SARS-CoV-2 est un « gain de fonction » majeur, car il est associé à une plus grande efficacité de transmission virale, une gamme élargie de cellules cibles (tropisme cellulaire accru), et une virulence potentiellement plus importante.

2. L'adhésiotope RGD de la protéine Spike du SARS-CoV-2.

Le motif RGD (Arg-Gly-Asp) est une séquence peptidique courte connue pour sa capacité à interagir avec certaines intégrines, qui sont des récepteurs cellulaires impliqués dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Ce motif joue un rôle clé dans l'internalisation virale chez plusieurs virus, dont le VIH et le SARS-CoV-2. Le motif RGD est présent dans la sous-unité S1 de la protéine Spike en position 403–405 (R403, G404, D405), au niveau du domaine RBD (« Receptor Binding Domain ») de fixation du virus sur son récepteur ECA2. Cette séquence RGD n'est pas présente dans tous les coronavirus, **mais est « spécifique » au SARS-CoV-2 et absente chez le SARS-CoV-1**. Ce motif permet une interaction additionnelle avec des intégrines humaines (αvβ3, α5β1, αvβ5, etc.), en plus du récepteur ECA2 du système rénine-angiotensine SRA. Cela peut contribuer à induire une apoptose ou mort cellulaire programmée de cellules cibles, en activant la voie caspase 3, via les voies caspases 8 et 9. Il est notable que le motif RGD est également présent dans la glycoprotéine d'enveloppe du VIH. Le motif RGD facilite l'interaction avec certaines intégrines, ce qui module l'attachement du virus ou la signalisation intracellulaire après infection, et augmente le tropisme du virus VIH (ex : cellules endothéliales, astrocytes).

La présence du motif RGD augmente donc le potentiel « délétère » de la protéine Spike du SARS-CoV-2.

3. Autres analogies structurales entre la protéine Spike du SARS-CoV-2 et le virus VIH.

La protéine Spike du SARS-CoV-2 et la glycoprotéine d'enveloppe (Env) du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) présentent des homologies structurales (sur 4 domaines). Les deux protéines sont trimériques à la surface du virus (protéine Spike : trimère formé de trois sous-unités S1/S2, et Env : trimère formé de gp120 (surface) et gp41 (transmembranaire). Cette organisation est commune à plusieurs virus enveloppés et facilite l'entrée virale. Les deux protéines (Spike et Env) nécessitent un clivage protéolytique pour être activées : Spike est clivée par furine ou TMPRSS2 ou Cathepsine, entre S1/S2, tandis que Env est clivée en gp120/gp41 par la furine cellulaire. Ainsi, bien qu'il existe une faible homologie globale de séquence entre les deux virus, la protéine Spike du SARS-CoV-2 et la glycoprotéine Env du VIH partagent **étrangement** 4 domaines avec de fortes homologies structurales, qui pourraient répondre des effets « délétères » multiples du SARS-CoV-2 et de la protéine Spike vaccinale qui inclue ces 4 domaines.

IV) Choix inapproprié d'un ARNm vaccinal codant pour la protéine Spike modifiée.

Les concepteurs des vaccins à ARNm ont choisi la protéine Spike (modifiée sur deux résidus d'acides aminés -Pro986 et Pro987- en vue de maintenir une structure pré-fusionnelle de la protéine) comme antigène vaccinal. Ce choix a été une « erreur » à cause des pathologies humaines induites par la protéine Spike (spikopathies), via le dérèglement du système rénine-angiotensine (SRA).

En effet, la protéine N (nucléocapside) du SARS-CoV-2 comme cible pour une approche vaccinale anti-Covid présente plusieurs avantages par rapport à la protéine Spike :

(i) il existe une forte conservation de la protéine N entre les variants viraux (la protéine N mute beaucoup moins que la protéine Spike). Ainsi, la protéine N est hautement conservée entre les différents variants du SARS-CoV-2, ce qui signifie qu'un vaccin basé sur la protéine N pourrait offrir une protection plus large et durable contre de futurs variants ;

(ii) la réponse immunitaire cellulaire est robuste, car la protéine N induit une forte réponse des lymphocytes T (CD4+ auxiliaires et CD8+ cytotoxiques) essentielle pour l'élimination des cellules infectées. La protéine N devrait contribuer à une immunité de longue durée ;

(iii) l'expression de la protéine N est précoce et abondante, ce qui indique que la protéine N est produite en grande quantité dès le début de l'infection virale. Cela la rend facilement détectable par le système immunitaire, augmentant les chances d'une réponse immunitaire protectrice rapide ;

(iv) la pression de sélection de la protéine N est beaucoup plus faible que celle de la protéine Spike. En effet, la protéine Spike est soumise à une forte pression de sélection car elle est la principale cible des anticorps neutralisants, tandis que la protéine N est une protéine interne moins exposée à cette pression évolutive, donc moins sujette à des mutations d'échappement.

En résumé, la protéine Spike (virale ou vaccinale) du SARS-CoV-2 présente des particularités qui démontrent l'existence d'un « gain de fonction », avec la présence d'un site furine inédit breveté par MODERNA (vaccins à ARNm anti-Covid Spikevax de Moderna, mais également Comirnaty de Pfizer-BioNTech), d'un adhésiotope RGD, et de motifs de la glycoprotéine d'enveloppe du virus VIH.

Ces modifications (gains de fonction) ciblant la protéine Spike du SARS-CoV-2 (dont le choix comme antigène est discutable) sont responsables des effets « délétères » du virus et des vaccins anti-Covid sur l'organisme humain, et répondent des pathologies de la Covid-19 associées au dérèglement / suractivation du système rénine-angiotensine (SRA) énumérées au paragraphe (II).

Sabatier

Dr. Jean-Marc Sabatier

(je m'exprime ici en mon nom propre)

**MINISTÈRE
DES SOLIDARITÉS
ET DE LA SANTÉ**
*Liberté
Égalité
Fraternité*

Pièce n°23

Le Ministre

Paris, le 23 DEC. 2020

CAB OV/SSD/ Pégase D-20-026161

Monsieur le Président, cher Patrick Bouet,

Lors des différentes concertations avec les professionnels de santé et plus particulièrement avec les médecins dans le cadre de l'organisation de la campagne vaccinale COVID, vous m'avez alerté sur le degré de responsabilité auquel les médecins pourraient être confrontés.

Je tiens à vous apporter les éléments suivants.

La campagne de vaccination va être lancée par un décret, pris sur le fondement de l'article L. 3131-15 du code de la santé publique et sera publié immédiatement après l'avis de la Haute Autorité de Santé (HAS).

Cet article offre aux personnes vaccinées comme aux professionnels de santé la même sécurité juridique que celle qui est prévue dans le cadre des vaccinations obligatoires.

Les dispositions protectrices des articles L.3131-3 et L.3131-4 permettent, d'une part, aux personnes vaccinées de voir réparés leurs dommages sur le fondement de la solidarité nationale sans avoir à prouver de faute ou de défaut du produit, d'autre part, aux professionnels de santé de pratiquer en urgence des actes sans risquer de voir leur responsabilité recherchée, sauf faute caractérisée.

En conséquence, la réparation intégrale des accidents médicaux imputables à des activités de soins réalisés à l'occasion de la campagne sera donc assurée par l'ONIAM au titre de la solidarité nationale.

La responsabilité des médecins ne pourra pas être engagée au motif qu'ils auraient délivré une information insuffisante aux patients sur les effets indésirables méconnus à la date de vaccination. En outre, pour qualifier une éventuelle faute caractérisée, le juge tiendrait compte de l'urgence qui préside au déploiement des vaccins ainsi que des circonstances (complexité, charge de travail…).

Ces éléments me paraissent de nature à rassurer les médecins sur le niveau de sécurité juridique légitime qu'ils sont en droit d'attendre.

Suite à votre demande, un guide à destination des professionnels de santé, composé de fiches (dont une fiche sur le consentement, sur les effets indésirables…) sera publié sur le site du ministère de la santé et actualisé. Il reprendra les éléments du présent courrier.

**Monsieur Patrick BOUET
Président**
Conseil National de l'Ordre des Médecins
180 Bld Haussman
75008 PARIS

14 avenue Duquesne – 75350 PARIS SP 07
Téléphone : 01 40 56 60 00

Le traitement de vos données est nécessaire à la gestion de votre demande et entre dans le cadre des missions confiées aux ministères sociaux.
Conformément au règlement général sur la protection des données (RGPD), vous pouvez exercer vos droits à l'adresse ddc-rgpd-cab@social.gouv.fr ou par voie postale.
Pour en savoir plus : https://solidarites-sante.gouv.fr/ministere/article/donnees-personnelles-et-cookies

Enfin, dans le cadre du dispositif de pharmacovigilance renforcée, les professionnels de santé seront informés de la survenue d'éventuels effets indésirables nouveaux.

S'agissant précisément de la première phase de la campagne vaccinale, les textes réglementaires indiqueront que tout professionnel de santé, qu'il exerce ses fonctions à titre libéral ou non, peut participer à la campagne vaccinale dans la limite de ses compétences en matière de vaccination telles que prévues par le code de la santé publique.

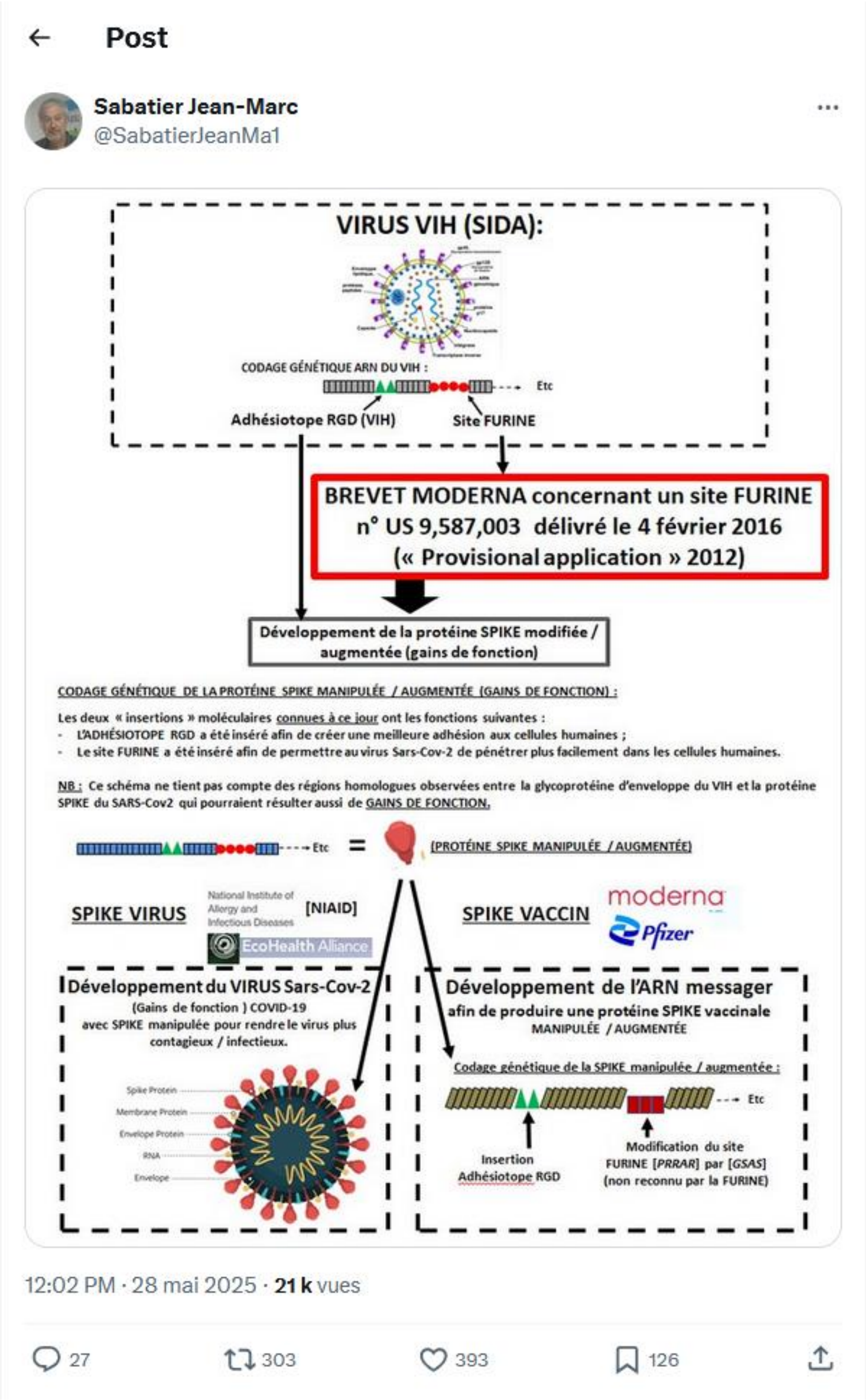
S'agissant plus particulièrement des médecins coordonnateurs en EPHAD, les mêmes textes préciseront qu'ils pourront prescrire et administrer les vaccins aux résidents et aux personnels de l'établissement dans lequel ils exercent, dans les conditions de concertation avec les médecins traitants prévues par le code de l'action sociale et des familles.

En espérant avoir répondu à vos interrogations, je vous réitère mes remerciements les plus sincères pour votre collaboration à la construction de la stratégie vaccinale Covid et pour l'engagement et la mobilisation de votre profession auprès des patients les plus fragiles.

Bien confraternellement

Olivier VERAN

Pièce n°26



Post

Sabatier Jean-Marc
@SabatierJeanMa1

VIRUS VIH (SIDA):

CODAGE GÉNÉTIQUE ARN DU VIH :

Etc
Adhésiotope RGD (VIH)
Site FURINE

BREVET MODERNA concernant un site FURINE
n° US 9,587,003 délivré le 4 février 2016
(« Provisional application » 2012)

Développement de la protéine SPIKE modifiée / augmentée (gains de fonction)

CODAGE GÉNÉTIQUE DE LA PROTÉINE SPIKE MANIPULÉE / AUGMENTÉE (GAINS DE FONCTION) :

Les deux « insertions » moléculaires connues à ce jour ont les fonctions suivantes :
- L'ADHÉSIOTOPE RGD a été inséré afin de créer une meilleure adhésion aux cellules humaines ;
- Le site FURINE a été inséré afin de permettre au virus Sars-Cov-2 de pénétrer plus facilement dans les cellules humaines.

NB : Ce schéma ne tient pas compte des régions homologues observées entre la glycoprotéine d'enveloppe du VIH et la protéine SPIKE du SARS-Cov2 qui pourraient résulter aussi de GAINS DE FONCTION.

(PROTÉINE SPIKE MANIPULÉE / AUGMENTÉE)

SPIKE VIRUS

National Institute of Allergy and Infectious Diseases
[NIAID]
EcoHealth Alliance

SPIKE VACCIN

moderna
Pfizer

Développement du VIRUS Sars-Cov-2
(Gains de fonction) COVID-19
avec SPIKE manipulée pour rendre le virus plus contagieux / infectieux.

Spike Protein
Membrane Protein
Envelope Protein
RNA
Envelope

Développement de l'ARN messager
afin de produire une protéine SPIKE vaccinale
MANIPULÉE / AUGMENTÉE

Codage génétique de la SPIKE manipulée / augmentée :

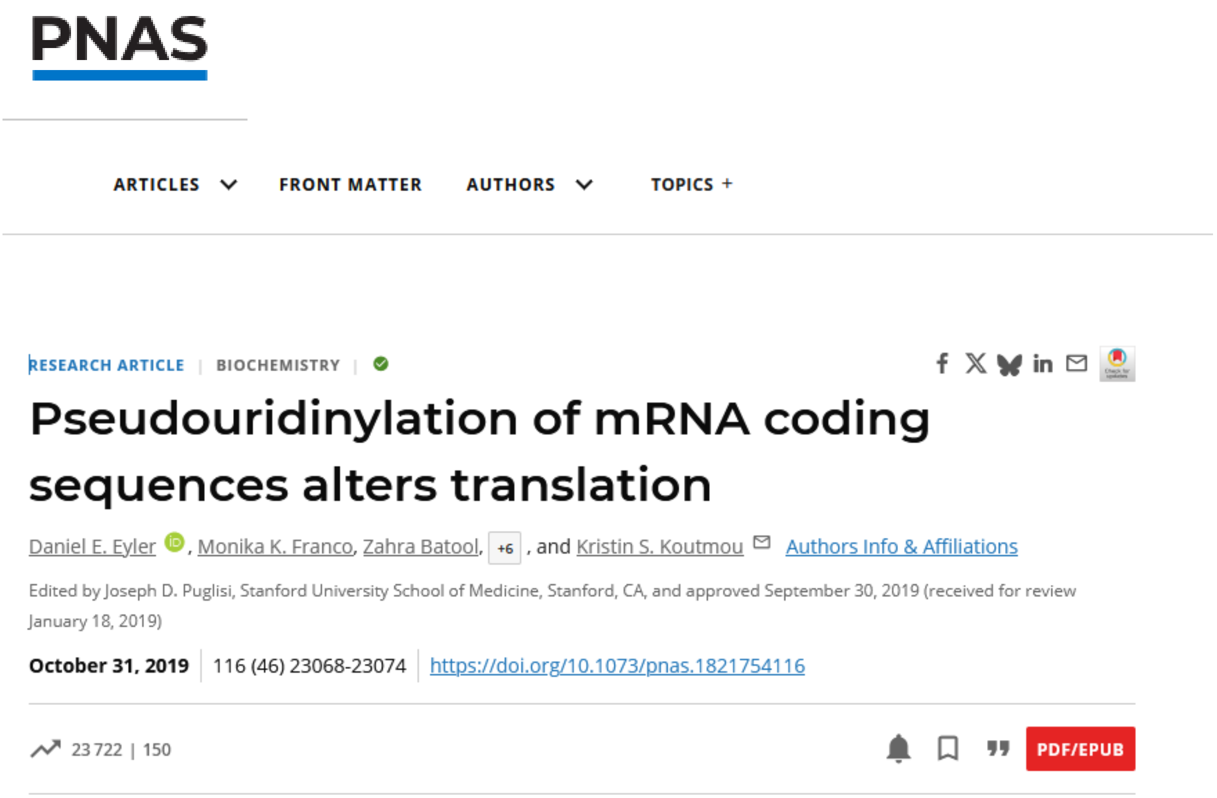
Etc
Insertion
Adhésiotope RGD
Modification du site
FURINE [*PRRAR*] par [*GSAS*]
(non reconnu par la FURINE)

12:02 PM · 28 mai 2025 · **21 k** vues

27
303
393
126

Pièce n°27

https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1821754116?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed



RESEARCH ARTICLE | BIOCHEMISTRY

Pseudouridinylation of mRNA coding sequences alters translation

Daniel E. Eyler, Monika K. Franco, Zahra Batool, +6, and Kristin S. Koutmou Authors Info & Affiliations

Edited by Joseph D. Puglisi, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, and approved September 30, 2019 (received for review January 18, 2019)

October 31, 2019 | 116 (46) 23068-23074 | https://doi.org/10.1073/pnas.1821754116

EXTRAIT TRADUIT :

« La pseudouridinylation des séquences codantes de l'ARNm modifie la traduction »

Importance

La modification post-transcriptionnelle des ARN messagers (ARNm) est une nouvelle frontière de la régulation génique. La compréhension des implications biologiques de l'une des modifications les plus fréquentes de l'ARNm, la pseudouridine, dans les cellules, est compliquée par la fréquence sous-stœchiométrique des modifications de l'ARNm et la difficulté de dissocier les effets sur la traduction de la stabilité de l'ARNm. Nous avons utilisé des études biochimiques et structurales in vitro, ainsi que des tests cellulaires, pour démontrer que la pseudouridine entrave l'élongation de la traduction et augmente la fréquence des substitutions d'acides aminés. Nos travaux étayent l'idée que les modifications de l'ARNm peuvent moduler la traductibilité de l'ARNm et démontrent que la pseudouridine peut altérer la sélection de l'ARNt par le ribosome. Cette étude pose les bases biochimiques nécessaires à une meilleure compréhension des conséquences des modifications des régions codantes de l'ARNm.

Résumé

Les modifications chimiques des ARN sont reconnues depuis longtemps comme des modulateurs clés de la structure et de la fonction des ARN non codants pour les protéines dans les cellules. Il est de plus en plus admis que les séquences d'ARN messager (ARNm) responsables de la synthèse protéique peuvent également être modifiées post-transcriptionnellement. L'incorporation enzymatique de modifications d'ARNm a de nombreux effets potentiels, notamment la modification de la stabilité de l'ARNm, du recrutement des protéines et de la traduction. Nous avons testé l'impact de la pseudouridine (Ψ), l'une des modifications les plus courantes présentes dans les régions codantes de l'ARNm, sur la synthèse protéique, en utilisant un système de traduction bactérien entièrement reconstitué et des cellules humaines. Nos travaux révèlent que le remplacement d'un seul nucléotide uridine par Ψ dans un codon d'ARNm empêche l'ajout d'acides aminés et l'activation de l'EF-Tu GTPase. Une structure cristalline du ribosome 70S de Thermus thermophilus avec un ARNtPhe lié à un codon ΨUU dans le site A corrobore ces résultats. Nous avons également constaté que la présence de Ψ peut favoriser la synthèse à faible dose de multiples produits peptidiques à partir d'une seule séquence d'ARNm dans le système de traduction reconstitué ainsi que dans les cellules humaines, et augmente le taux de Val-ARNtVal quasi-cogné réagissant sur un codon ΨUU. La grande majorité des fragments Ψ des ARNm se trouvent dans les régions codantes, et notre étude suggère qu'une conséquence de la rencontre du ribosome avec Ψ peut être de modifier légèrement la vitesse de traduction et le décodage de l'ARNm.

Pièce n°28

moderna

DARPA Awards Moderna Therapeutics a Grant for up to $25 Million to Develop Messenger RNA Therapeutics™

October 2, 2013

Research to focus on antibody production for immune defense

CAMBRIDGE, Mass., October 2, 2013 —Moderna Therapeutics, the company pioneeringmessenger RNA therapeutics™, a revolutionary new treatment modality to enable the *in vivo* production of therapeutic proteins, announced today that the Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA) has awarded the company up to $25 million to research and develop its messenger RNA therapeutics™ platform as a rapid and reliable way to make antibody-producing drugs to protect against a wide range of known and unknown emerging infectious diseases and engineered biological threats.

Messenger RNA therapeutics™ can be designed to tap directly into the body's natural processes to produce antibodies without exposing people to a weakened or inactivated virus or pathogen, as is the case with the vaccine approaches currently being tested. As a result, Moderna's messenger RNA therapeutics™ platform has the potential to speed the development and manufacture of treatments that can produce a safer, more reliable and more robust immune response than existing technologies.

"We are honored to be chosen by DARPA for this important grant, which will greatly accelerate our efforts to develop antibody messenger RNA therapeutics™ to combat a wide range of infectious diseases," said Stéphane Bancel, president and founding CEO of Moderna. "We were awarded this major grant after an intense and rigorous scientific review, and it is a testament to our team's progress and to the profound implications of messenger RNA therapeutics™ that our work was funded. We look forward to further expanding the development of our platform into this critically important new therapeutic area."

This $24.6 million grant could support research for up to 5 years to advance promising antibody- producing drug candidates into preclinical testing and human clinical trials. The company also received a $0.7 million "seedling" grant from DARPA in March to begin work on the project.

This grant is part of a DARPA program called ADEPT: PROTECT (Autonomous Diagnostics to Enable Prevention and Therapeutics: Prophylactic Options to Environmental and Contagious Threats). The goal is to develop platform technologies that can be deployed safely and rapidly to provide the U.S. population with near-immediate protection against emerging infectious diseases and engineered biological weapons, even in cases when the pathogen or infectious agent is unknown. For more information about DARPA, visit http://www.darpa.mil/about-us/about-darpa.

About Moderna Therapeutics

Moderna is pioneering messenger RNA Therapeutics™, an entirely new in vivo drug modality that produces human proteins or antibodies inside patient cells, which are in turn active intracellularly or secreted. This breakthrough platform addresses currently undruggable targets and offers a superior alternative to existing drug modalities for a wide range of disease conditions. Moderna has developed a broad intellectual property estate, including 144 patent applications with 6,910 claims ranging from novel nucleotide chemistries to specific drug compositions. The company plans to develop and commercialize its innovative mRNA drugs—initially for rare diseases and oncology—while partnering drug candidates in - 2 - other therapeutic areas in order to rapidly deliver this innovation to patients. Moderna is a privately held company based in Cambridge, Massachusetts. Visit www.modernatx.com to learn more.

Pièce n°29

moderna

DARPA Awards Moderna up to $56 Million to Enable Small-Scale, Rapid Mobile Manufacturing of Nucleic Acid Vaccines and Therapeutics

October 8, 2020

Award part of DARPA's Nucleic Acids On-Demand World-Wide (NOW) initiative to develop a medical countermeasure manufacturing platform

Conference call to be held on Thursday, October 8 at 8:00 a.m. ET

CAMBRIDGE, Mass.--(BUSINESS WIRE)--Oct. 8, 2020-- Moderna, Inc., (Nasdaq: MRNA) a biotechnology company pioneering messenger RNA (mRNA) therapeutics and vaccines to create a new generation of transformative medicines for patients, today announced an agreement for a commitment of up to $56 million from the Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA) to fund development of a mobile manufacturing protype leveraging Moderna's existing manufacturing technology that is capable of rapidly producing vaccines and therapeutics. The agreement builds on a previous assistance grant with DARPA established in 2013.

The award is part of DARPA's Nucleic Acids On Demand World-Wide (NOW) initiative to develop a mobile, end-to-end automated manufacturing platform to provide in-field, just-in-time manufacturing of Good Manufacturing Practice (GMP) quality nucleic acid (including mRNA) vaccines and therapeutics intended to deliver near-instantaneous protections and treatments to both military personnel and local populations. The design envisions a manufacturing unit capable of producing hundreds of doses of medicines in a matter of days in a 6 foot x 6 foot x 6 foot (1.8m x 1.8m x 1.8m) container in remote locations around the world.

"We are pleased to continue our collaboration with DARPA with a new award and we look forward to building on our experience rapidly designing and manufacturing vaccines as demonstrated with mRNA-1273, our COVID-19 vaccine currently in a Phase 3 study, and mRNA-4157, our personalized cancer vaccine currently in a Phase 2 study," said Stéphane Bancel, Chief Executive Officer of Moderna. "This new award will allow us to explore the reach of our technology to potentially enable fast, in-field, automated manufacturing of vaccines and therapeutics for both military personnel and civilians around the world in a container that can be deployed rapidly to make customized vaccines or therapeutics. The ability to make medicines in a mobile unit could have an important impact on the ability to respond to future viral challenges. Moderna is committed to being part of the solution in preventing future pandemics."

DARPA's financial support of the NOW program is part the Agency's commitment to creating innovative biotechnological approaches to rapidly detect, characterize and mitigate threats from newly emerging or engineered pathogens.

Conference Call and Webcast Information

Moderna will host a live conference call and webcast at 8:00 a.m. ET on Thursday, October 8, 2020. To access the live conference call, please dial 866-922-5184 (domestic) or 409-937-8950 (international) and refer to conference ID 5596196. A webcast of the call will also be available under "Events and Presentations" in the Investors section of the Moderna website at investors.modernatx.com. The archived webcast will be available on Moderna's website approximately two hours after the conference call.

About Moderna

Moderna is advancing messenger RNA (mRNA) science to create a new class of transformative medicines for patients. mRNA medicines are designed to direct the body's cells to produce intracellular, membrane or secreted proteins that can have a therapeutic or preventive benefit and have the potential to address a broad spectrum of diseases. Moderna's platform builds on continuous advances in basic and applied mRNA science, delivery technology and manufacturing, providing the Company the capability to pursue in parallel a robust pipeline of new development candidates. Moderna is developing therapeutics and vaccines for infectious diseases, immuno-oncology, rare diseases, cardiovascular diseases, and autoimmune and inflammatory diseases, independently and with strategic collaborators.

Headquartered in Cambridge, Mass., Moderna currently has strategic alliances for development programs with AstraZeneca PLC and Merck & Co., Inc., as well as the Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA), an agency of the U.S. Department of Defense; the Biomedical Advanced Research and Development Authority (BARDA), a division of the Office of the Assistant Secretary for Preparedness and Response (ASPR) within the U.S. Department of Health and Human Services (HHS) and the Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI). Moderna has been named a top biopharmaceutical employer by *Science* for the past five years. To learn more, visit www.modernatx.com.

Forward Looking Statements

This press release contains forward-looking statements within the meaning of the Private Securities Litigation Reform Act of 1995, as amended, including statements regarding the Company's collaboration with DARPA to develop a miniaturized manufacturing protype capable of rapidly producing vaccines and therapeutics. In some cases, forward-looking statements can be identified by terminology such as "will," "may," "should," "could", "expects," "intends," "plans," "aims," "anticipates," "believes," "estimates," "predicts," "potential," "continue," or the negative of these terms or other comparable terminology, although not all forward-looking statements contain these words. The forward-looking statements in this press release are neither promises nor guarantees, and you should not place undue reliance on these forward-looking statements because they involve known and unknown risks, uncertainties, and other factors, many of which are beyond Moderna's control and which could cause actual results to differ materially from those expressed or implied by these forward-looking statements. These risks, uncertainties, and other factors include, among others, the fact that there has never been a commercial product utilizing mRNA technology approved for use, and those other risks and uncertainties described under the heading "Risk Factors" in Moderna's most recent Quarterly Report on Form 10-Q filed with the U.S. Securities and Exchange Commission (SEC) and in subsequent filings made by Moderna with the SEC, which are available on the SEC's website at www.sec.gov. Except as required by law, Moderna disclaims any intention or responsibility for updating or revising any forward-looking statements contained in this press release in the event of new information, future developments or otherwise. These forward-looking statements are based on Moderna's current expectations and speak only as of the date hereof.

View source version on businesswire.com: https://www.businesswire.com/news/home/20201008005279/en/

Moderna

Media:
Colleen Hussey
Director, Corporate Communications
617-335-1374
Colleen.Hussey@modernatx.com

Investors:
Lavina Talukdar
Head of Investor Relations
617-209-5834
Lavina.Talukdar@modernatx.com

Source: Moderna, Inc.