

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

ÉQUIPE de RECHERCHE INSERM U1259

**« Morphogenèse et Antigénicité du VIH
et des Virus des Hépatites »**

THÈSE présentée par :

Sébastien EYMIEUX

soutenue le : **5 avril 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline : Sciences de la vie

Spécialité : Virologie

**Analyse du cycle du SARS-CoV-2 en modèle
cellulaire par microscopie électronique à
transmission**

THÈSE co-dirigée par :

Madame BLANCHARD Emmanuelle
Monsieur HOURIOUX Christophe

PU-PH, Université de Tours
PU-PH, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Madame MURIAUX Delphine
Madame JOUVENET Nolwenn

Directrice de recherche, HDR, CNRS Montpellier
Directrice de recherche, HDR, CNRS - Institut Pasteur Paris

PRÉSIDENT DU JURY :

Monsieur GUILLON Antoine

PU-PH, Université de Tours

JURY :

Madame MURIAUX Delphine
Madame JOUVENET Nolwenn
Monsieur ROINGEARD Philippe
Madame BELOUZARD Sandrine
Madame BLANCHARD Emmanuelle

Directrice de recherche, HDR, CNRS Montpellier
Directrice de recherche, HDR, CNRS - Institut Pasteur Paris
PU-PH, Université de Tours
Chargée de recherche, HDR, CNRS - Institut Pasteur Lille
PU-PH, Université de Tours

INVITÉ :

Monsieur HOURIOUX Christophe

PU-PH, Université de Tours

Remerciements

Au Pr Philippe ROINGEARD

Philippe, je te remercie de m'avoir guidé, depuis l'internat et au cours de ces quatre années d'assistanat hospitalier et universitaire, avec écoute et bienveillance. Tu as su me transmettre les passions de la microscopie électronique et de la virologie qui t'animent, et l'émerveillement que l'on peut ressentir face à l'ultrastructure de la cellule. La confiance que tu m'as accordée m'honore, et m'a permis de progresser sur la voie de la biologie cellulaire. Ta vision globale de la recherche, de ses aspects fondamentaux à ses applications au lit du patient, constitue une véritable source d'inspiration. Merci enfin pour tous tes conseils, qui ont aidé à l'aboutissement de ce projet de thèse.

Au Pr Emmanuelle BLANCHARD

Je te remercie de m'avoir initié, dès mon arrivée en tant qu'AHU, à la pratique de la microscopie électronique comme outil de diagnostic hospitalier, afin de poursuivre l'activité que Brigitte avait tant développé. C'est toujours un plaisir de discuter avec toi de biologie cellulaire, passion que nous partageons. Merci également de la confiance que tu m'accordes, notamment pour la coordination de l'équipe du tutorat de biologie cellulaire. Merci de tes conseils et de ton soutien, qui ont permis à la réalisation de ce travail de thèse.

Au Pr Christophe HOURIOUX

Tant d'années ont passé depuis la réalisation de mon stage de M1 du DPRB sous ta direction, en 2010 ! Avec déjà à l'époque de beaux clichés obtenus en microscopie électronique. Il s'agissait de mon premier contact avec le monde de la recherche, une expérience qui m'a fortement incité à poursuivre un double cursus hospitalier et universitaire. J'apprécie toujours aujourd'hui de travailler avec toi, que ce soit pour mener un projet de recherche, co-encadrer un étudiant, ou mettre en place de nouveaux enseignements. Merci du temps que tu as pris pour m'aider dans la réalisation de ce travail de thèse.

Au Dr Delphine MURIAUX et au Dr Nolwenn JOUVENET

Merci d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse de sciences, et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Au Pr Antoine GUILLON

Merci d'avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse de sciences. Merci également de ta confiance lors de nos discussions sur les modèles respiratoires d'étude du SARS-CoV-2 et des virus grippaux, et sur les problématiques communes auxquelles nous sommes confrontés dans nos projets de recherche.

Au Dr Sandrine BELOUZARD

Merci d'avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse de sciences. Je te remercie également pour toutes l'aide que tu m'as apporté, au travers de cette collaboration entre nos unités de recherche, sans laquelle ce travail de thèse n'aurait pas pu être initié.

Aux autres membres de l'équipe « Virologie moléculaire et cellulaire des coronavirus » du Centre d'infection et d'immunité de Lille, en particulier le Pr Jean DUBUISSON et le Dr Yves ROUILLÉ

Merci d'avoir entrepris cette collaboration, qui nous a permis de travailler précocement à l'élucidation des caractéristiques de ce nouveau virus qu'était le SARS-CoV-2, grâce à votre expertise acquise de longue date sur les coronavirus. Merci également pour votre confiance sur ce projet.

Au Dr Hugues DE ROCQUIGNY

Merci de tout ce que tu m'as appris dans le domaine de la recherche fondamentale, et en particulier sur la microscopie confocale et le VHB. La rigueur de ton raisonnement scientifique et de ta méthodologie sont des exemples que je suis dans ma pratique de chercheur. J'admire ta ponctualité alsacienne, et ta patience quand tu es confronté à notre « quart d'heure tourangeau » au début d'une réunion !

Au Pr Catherine GAUDY-GRAFFIN

Je te remercie Catherine pour ces semestres d'internat en virologie médicale à l'interface entre le laboratoire et le patient, mais aussi pour ta gentillesse au quotidien. Je suis fier du contenu numérique pédagogique que nous avons créé sous ta direction, en pensant avant

tout à l'étudiant. Merci aussi d'impulser cette dynamique de collaboration entre le laboratoire de virologie hospitalière et notre unité de microscopie électronique, en particulier pour l'accueil d'internes en biologie médicale.

Au Pr Denys BRAND

Merci de la confiance que tu m'accordes, et des belles collaborations que tu as permis d'initier avec nos collègues de l'INRAE.

Au Pr Laurent MERGHETTI

Merci d'avoir soutenu, avec bienveillance, mon projet de carrière hospitalière et universitaire dès la fin de mon internat en microbiologie.

À tous les membres de la plateforme de Microscopie de l'université de Tours, et de l'unité hospitalière de Biologie cellulaire et Microscopie du CHRU de Tours

Merci de m'avoir accompagné dans l'apprentissage de cette belle discipline qu'est la microscopie électronique. Je pense que nous formons tous une véritable équipe, où chacun apporte ses compétences et ses connaissances complémentaires. J'ai grand plaisir à travailler avec vous au quotidien, dans cette ambiance que je trouve amicale et chaleureuse. **Julien et Pierre-Ivan**, merci pour votre gentillesse, pour ces échanges ludiques et vidéoludiques, au laboratoire ou autour d'un verre, et pour ces rires partagés, notamment en congrès. **Marie**, merci pour ta gentillesse, et pour ces échanges où nous discutons de tout et de rien avec Christophe, lors du déjeuner. **Sonia**, merci pour ta gentillesse, ton dynamisme, ta grande curiosité intellectuelle, et ton aide (très) précieuse sur nos analyses hospitalières et nos collaborations scientifiques. **Fabienne**, merci pour ta gentillesse, et pour nos discussions artistiques, immobilières et de jeune parent / grand parent. **Juliette et Florentine**, merci pour votre aide au quotidien pour la technique des prélèvements hospitaliers et de recherche, sans laquelle ces travaux n'auraient pas été possibles. **Isabelle**, merci pour ta gentillesse, ton optimisme, et ta capacité à trouver des solutions en toute situation. **Rustem**, merci de partager avec moi tes observations axonémales et centriolaires, et tes découvertes cellulaires.

À tous les membres de l'unité INSERM U1259 « Morphogenèse et antigénicité du VIH et des virus des hépatites »

C'est un véritable plaisir de travailler avec vous tous au quotidien, dans une ambiance détendue et sympathique, en particulier lors de nos petits-déjeuners du vendredi.

Anne et Marianne, merci de votre gentillesse, de votre enthousiasme, et de votre expertise pour nos manipulations d'infections par le SARS-CoV-2. **Élodie**, merci de ta gentillesse et des nombreux conseils méthodologiques que tu m'as donnés. **Lorena, Nancy et Mathilde**, merci de votre bonne humeur quotidienne et des rires partagés. **Florian**, merci pour ton aide précieuse sur nos projets de recherche communs, et pour ton humour « anglais » qui me fait bien rire parfois. **Angélique, Emmanuelle, Mélanie et Julie**, c'est toujours un plaisir de se croiser et de discuter avec vous lors de mes excursions à Dutrochet. **Romuald**, merci de tes conseils concernant les enseignements de biologie cellulaire que nous partageons, et de ton écoute.

À mes anciens co-doctorants, Virgile, Elsa et Stéphanie

Que de bons souvenirs avec vous et de rires partagés, c'est toujours un plaisir de vous revoir lors de congrès ou séminaires. Malgré la distance qui nous sépare maintenant, j'espère que nos chemins se rejoindront de nouveau à l'avenir.

À toute l'équipe de l'unité hospitalière de Virologie du CHRU de Tours

Merci pour votre gentillesse et votre dévouement lors de cette pandémie de COVID-19. Cela a été un véritable honneur de travailler à vos côtés, et d'avoir fait face ensemble à l'ampleur de la tâche qui s'est imposée à nous.

Au Dr Julien MARLET

Merci Julien pour tout ce que tu m'as appris pendant mon internat en virologie, avec une grande disponibilité. J'admire ta bienveillance avec les étudiants que tu encadre, et ton dynamisme au quotidien. J'apprécie beaucoup de travailler avec toi, et d'échanger sur nos problématiques de recherche.

Au Dr Caroline VAYNE

Merci Caroline pour ces belles collaborations que nous menons ensemble, c'est un vrai plaisir de travailler avec toi sur ces problématiques hospitalières, avant tout au service des patients. J'admire ta gentillesse, ton altruisme et ton optimisme en toutes circonstances.

Au Dr Adélaïde CHESNAY

Chère consœur Mayennaise, de l'eau a coulé sous les ponts depuis nos tribulations biochimiques, mais nous sommes toujours voisins ! J'apprécie particulièrement nos déjeuners, où nous évoquons nos souvenirs passés, mais aussi notre quotidien d'AHU.

À mes co-assistants HU : Noémie, Olivier, Hugo, Coralie et Lynda

Merci pour ces moments de partage et de travail entre jeunes biologistes médicaux, toujours dans la bonne humeur.

Au Dr Kanav KHANNA

C'est un honneur de travailler avec toi, et tous les membres du GRAHU, groupe dont vous avez initié la formation avec Victoire. Discuter tous les deux de notre quotidien de jeunes papas est également très appréciable.

Au Dr Aude REMOT

Merci Aude pour ces deux années de collaboration entre nos unités INSERM et INRAE. Ce travail commun est une source de fierté pour moi, car il s'enrichit de nos expériences complémentaires, et car il est mené avec une transparence réciproque et dans la bonne humeur.

Au Dr Damien SIZARET

Merci pour ta confiance, à la fois lorsque nous travaillons ensemble sur des diagnostics néphropathologiques. Merci également de ta bonne humeur et ton dynamisme.

À Mr Guy Ilango

Je garde un très bon souvenir de ton passage chez nous, en microscopie. Avec ta curiosité intellectuelle et ton enthousiasme face à tous types de projets, travailler avec toi a été particulièrement stimulant.

À mes ami(e)s : Johanna, Jean-Grégoire, Lucie, Émilie et Antoine

Merci pour ces moments de joie en votre compagnie.

À mes ami(e)s d'enfance : Romain, Agathe, Camille, William et Mathilda

Merci d'être présents depuis tant d'années, pour tous ces souvenirs partagés, et pour ces innombrables fous rires.

À ma famille :

Patrick, Martine, Frédérique, merci pour ces moments de rires partagés, à Noël ou pour la galette des rois !

Françoise, merci pour ces discussions passionnantes que nous partageons. Ta philosophie de vie est pour moi un bel exemple à suivre. Merci pour ta grande gentillesse et ton humour.

Pascale, Denis, Jean-Marc, vous êtes de super beaux-parents, optimistes et attentionnés. Merci pour tous ces bons moments passés en votre compagnie.

À mes beaux-frères / belles-sœurs : Nicolas, Alexis, William, Claire et Fany

Merci pour votre présence et pour tous ces moments partagés.

À ma belle famille : Fanny et Guillaume, Julien et Mathilde, Nathalie et Jacqueline, David et Marie, Anne et Henri, merci de votre soutien et pour tous ces bons moments

À mon frère Robin

Je suis très fier de toi, de ton parcours et de tes talents artistiques. Merci pour cette complicité que nous partageons, et tout ce que tu m'apportes depuis notre enfance.

À mes parents, Laurence et Michel

Vous êtes les meilleurs parents que l'on puisse avoir. Merci de m'avoir fait découvrir le monde, et d'avoir été toujours présents pour moi.

À ma femme Anne-Cécile, et à ma fille Aliénor

Ma chérie, merci d'avoir été là pour moi depuis toutes ces années. Tu me rends heureux chaque jour que nous passons ensemble. Aliénor, tu as illuminé ma vie depuis ta naissance, et je suis très fier de toi. C'est un bonheur de te voir grandir et de t'accompagner. La vie est si belle avec vous, dans notre jolie maison. Je vous aime fort.

Résumé

À l'image d'autres virus à ARN, le cycle des *Coronaviridae* comporte la formation de structures viro-induites, nécessaires à la réplication du génome viral, et dérivées des membranes du réticulum endoplasmique (RE). Concernant cette famille virale, les mécanismes de sortie de la cellule sont encore largement méconnus. Le premier objectif de nos travaux était de décrire les caractéristiques ultrastructurales du réseau membranaire de réplication du SARS-CoV-2, par une analyse cinétique en microscopie électronique à transmission. Le second objectif était de mieux comprendre les mécanismes de sortie de ce virus, en identifiant les structures cellulaires impliquées lors de cette étape du cycle, par la réalisation de coupes sériées. Dès 6 h p.i., les cellules infectées présentent des *annulate lamellae*, organite composé d'une accumulation de pores nucléaires dans des citernes du RE. À 8 h p.i., un réseau de vésicules à double membrane (DMVs) se met en place, associé aux premières images de bourgeonnement de particules virales dans le ERGIC. À 24 h p.i., on observe l'accumulation de particules virales dépourvues de spike au sein de grandes vacuoles intracellulaires. L'analyse des coupes sériées à 10 h p.i. a permis de mettre en évidence une sortie par exocytose de particules virales uniques, au sein de petites vésicules de sécrétion. Ces observations apportent de nouveaux éléments de compréhension du cycle du SARS-CoV-2, et des *Coronaviridae* en général, qui pourront être mis à profit pour la conception et l'évaluation de molécules anti-virus à ARN à large spectre.

Abstract

Like other RNA viruses, *Coronaviridae* life cycle requires the formation of viral-induced organelles derived from the endoplasmic reticulum (ER) membranes, which are necessary for viral genome replication. Concerning this viral family, the mechanisms of cell exit are still largely unclear. The first objective of our work was to describe the ultrastructural characteristics of the membrane replication network of SARS-CoV-2, by a kinetic analysis in transmission electron microscopy. The second objective was to better understand the exit mechanisms of this virus, by identifying the cellular structures involved during this step of the cycle, thanks to serial sections. As early as 6 h p.i., infected cells display *annulate lamellae*, an organelle composed of an accumulation of nuclear pores in ER cisternae. At 8 h p.i., a network composed of double membrane vesicles (DMVs) is established, associated with the first images of viral particle budding in the ERGIC. At 24 h p.i., we observed an accumulation of spikeless viral particles within large intracellular vacuoles. Serial sections analysis at 10 h p.i. revealed a cellular egress by exocytosis of single viral particles, within small secretory vesicles. Our observations provide new insights into the cycle of SARS-CoV-2, and *Coronaviridae* in general. These data could be used for the design and evaluation of broad-spectrum anti-RNA virus molecules.

Serment doctoral d'intégrité scientifique

En présence de mes pairs.

Parvenu à l'issue de mon doctorat en sciences de la vie,
et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir,
l'exercice d'une recherche scientifique exigeante,
en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique
et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique,
je m'engage, pour ce qui dépendra de moi,
dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le
secteur ou le domaine d'activité,
à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir,
mes méthodes et mes résultats.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	9
Abstract.....	10
Serment doctoral d'intégrité scientifique	11
Table des matières.....	12
Liste des figures.....	16
Liste des tableaux.....	20
Liste des abréviations	21
I. Introduction générale	26
A. Le SARS-CoV-2.....	26
1. Historique.....	26
2. Phylogénie et origines zoonotiques	29
3. Génome et protéines virales.....	33
a. Organisation génomique	33
b. Protéines non structurales et complexe de réplication-transcription	34
c. Protéines structurales	38
d. Protéines accessoires.....	40
4. Cycle de réplication	42
5. Dynamique évolutive et variants	48
B. Maladie à coronavirus 2019 (COVID-19).....	51
1. Épidémiologie.....	51
2. Physiopathologie.....	53
3. Atteinte respiratoire et symptomatologie.....	55
4. Atteinte extra-respiratoire	58
a. Rein	58
b. Cœur.....	59
c. Système digestif.....	60
d. Système nerveux	60
5. Diagnostic	61
a. Méthodes diagnostiques.....	61

b.	Formes cliniques	63
6.	Prophylaxie	63
7.	Thérapeutique	66
C.	Modèles d'étude de l'infection par le SARS-CoV-2.....	69
1.	Modèles cellulaires <i>in vitro</i>	69
2.	Modèles tissulaires <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	71
a.	Cultures primaires polarisées	71
b.	Organoïdes	71
c.	Explants / Coupes micrométriques pulmonaires.....	72
3.	Modèles animaux <i>in vivo</i>	73
a.	Souris	73
b.	Hamster	75
c.	Furet	76
d.	Primates non-humains.....	76
D.	Organites de réplication virale, structures et fonctions associées	77
1.	Organites membranaires de réplication des virus à ARN simple brin de polarité positive	79
a.	Amarillovirales / Flaviviridae	87
i.	Flavivirus.....	87
ii.	Hepacivirus	91
b.	Hepelivirales / Matonaviridae.....	93
c.	Martellivirales / Togaviridae.....	95
d.	Nodamuvirales / Nodaviridae	96
e.	Picornavirales.....	96
i.	Picornaviridae	96
ii.	Caliciviridae	99
f.	Nidovirales	100
i.	Coronaviridae	101
ii.	Arteriviridae	105
g.	Virus de plantes.....	106
2.	Facteurs de la biogenèse des organites membranaires de réplication.....	106
a.	Facteurs d'hôte.....	108
i.	Voie sécrétoire et coatomères	108
ii.	Autophagie	109
iii.	Transporteurs et enzymes du métabolisme lipidique	110
iv.	Lipides.....	111
b.	Protéines virales	113
i.	Modificateurs des membranes.....	113
ii.	Complexes de réplication	119
iii.	Pores moléculaires viraux	121
iv.	Sites d'assemblage	123

3.	Immunité innée dirigée contre les organites de réplication	124
4.	Méthodes d'étude en microscopie électronique.....	128
E.	Étapes tardives du cycle des coronavirus	134
1.	Assemblage et bourgeonnement	135
2.	Sécrétion et sortie.....	138
II.	Projet de thèse	146
1.	Objectifs	146
a.	Étude 1	149
b.	Étude 2	162
c.	Travail de synthèse 1	176
d.	Travail de synthèse 2	183
2.	Discussion générale et perspectives	194
a.	Introduction.....	194
b.	Cinétique de la réplication virale	195
c.	Réseau de réplication et mitochondries	196
d.	Autophagie et cycle viral	196
e.	Virions non spiculés.....	197
f.	Annulate lamellae	198
g.	Polarisation du réseau de réplication	199
h.	Mécanismes et voies de sorties	200
i.	Limites de l'étude	202
j.	Conclusion	205
III.	Références bibliographiques.....	209
IV.	Annexes	245
	Productions scientifiques.....	245
	Présentation des travaux lors de congrès	246

Liste des figures

Figure 1 : Chronologie du domaine de la recherche sur les coronavirus	26
Figure 2 : Chronologie des principaux événements aux premiers temps de la pandémie de COVID-19	28
Figure 3 : Arbre phylogénétique des <i>Orthocoronavirinae</i>	29
Figure 4 : Origines zoonotiques des <i>Orthocoronavirinae</i>	30
Figure 5 : Comparaison par alignement des génomes des <i>Orthocoronavirinae</i>	31
Figure 6 : Génome, transcrits viraux, polyprotéine et particule virale du SARS-CoV-2	34
Figure 7 : Structures tertiaire et quaternaire du protéome du SARS-CoV-2	36
Figure 8 : Structures primaire et quaternaire et composants du complexe de réplication-transcription du SARS-CoV-2	37
Figure 9 : Structures et domaines de la glycoprotéine d'enveloppe Spike du SARS-CoV-2	39
Figure 10 : Cycle viral du SARS-CoV-2	43
Figure 11 : Processus de fusion de la particule virale du SARS-CoV-2 et changement conformationnel de la protéine Spike	44
Figure 12 : Mécanismes et voies d'entrée des coronavirus humains	45
Figure 13 : Mécanismes de réplication et de transcription du SARS-CoV-2	47
Figure 14 : Phylogénie et fréquences relatives des variants du SARS-CoV-2 parmi les souches circulantes (Janvier 2020 - Janvier 2023)	49
Figure 15 : Domaines de la protéine Spike et mutations caractérisant les variants préoccupants (VOC) du SARS-CoV-2 (Janvier 2023)	50
Figure 16 : Chronologie de l'apparition des premiers cas de COVID-19 par pays, et de la diffusion du SARS-CoV-2 à l'échelle mondiale	52
Figure 17 : Évolution du nombre de décès quotidiens liés au COVID-19 par zones géographiques (2020 - 2023)	53
Figure 18 : Niveau d'expression d'ACE2 dans l'organisme humain par organe	54
Figure 19 : Physiopathologie du COVID-19	55
Figure 20 : Cinétique de l'infection par le SARS-CoV-2 et sévérité du COVID-19	56
Figure 21 : Mécanismes à l'origine du SDRA lié au COVID-19	57
Figure 22 : Complications du COVID-19 par organe	59
Figure 23 : Cinétique des marqueurs directs et indirects de l'infection par le SARS-CoV-2	61

Figure 24 : Tests diagnostiques cliniques et biologiques de l'infection par le SARS-CoV-2	62
Figure 25 : Mécanismes d'immunisation contre le SARS-CoV-2 pour les vaccins à ARNm et les vaccins à vecteur adénoviral	65
Figure 26 : Mécanismes d'action des antiviraux par voie orale dirigés contre le SARS-CoV-2	66
Figure 27 : Cinétique d'administration des traitements immunomodulateurs et des anticorps monoclonaux en fonction de l'évolution du COVID-19	68
Figure 28 : Modèles d'étude du SARS-CoV-2 classés par complexité croissante	69
Figure 29 : Organites de réplication virale, membranaires vs dépourvus de membrane	78
Figure 30 : Organites de réplication virale dérivés des membranes cellulaires	79
Figure 31 : Comparaison et homologues des génomes des principales familles de virus à ARN simple brin de polarité positive	80
Figure 32 : Classification phylogénétique des virus à ARN simple brin de polarité positive - Partie 1 : Pisuviricota	82
Figure 33 : Classification phylogénétique des virus à ARN simple brin de polarité positive - Partie 2 : Kitrinoviricota	83
Figure 34 : Diversité des structures membranaires composant les organites de réplication virale	84
Figure 35 : Principe de formation et représentation schématique des vésicules à simple membrane et à double membrane	86
Figure 36 : Hypothèses concernant les mécanismes de formation des DMVs chez l'EAV	86
Figure 37 : Mécanismes et étapes de formation des DMVs chez les picornavirus et le MERS-CoV	87
Figure 38 : Schémas, micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus de la dengue (DENV)	89
Figure 39 : Micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus de l'encéphalite à tique (TBEV)	90
Figure 40 : Schéma, micrographies en MET et reconstruction tomographique des organites de réplication du virus de l'hépatite C (HCV)	92
Figure 41 : Schéma, micrographies en MET après cryofracture, et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus de la rubéole (RUBV)	94
Figure 42 : Schéma et micrographies en MET de la biogenèse des organites de réplication du virus de la forêt de Semliki (SFV)	95

Figure 43 : Schéma, micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus Flock House (FHV)	96
Figure 44 : Micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du poliovirus 3	97
Figure 45 : Schéma, micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus coxsackie B3 (CVB3)	98
Figure 46 : Micrographies en MET de la biogenèse des organites de réplication du norovirus murin 1 (MNV1)	100
Figure 47 : Composants membranaires du réseau de réplication des <i>Nidovirales</i>	101
Figure 48 : Schéma des organites de réplication du SARS-CoV	102
Figure 49 : Schéma et micrographies en MET de la biogenèse des organites de réplication du virus de l'hépatite murine (MHV)	103
Figure 50 : Micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV)	104
Figure 51 : Micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication de l'arterivirus équin	105
Figure 52 : Facteurs d'hôte de la voie sécrétoire détournés pour la formation des ROs des virus à ARN simple brin de polarité positive	108
Figure 53 : Nature et organites sources des phospholipides utilisés pour la réplication des virus à ARN simple brin de polarité positive	112
Figure 54 : Mécanismes de courbure membranaire	113
Figure 55 : Protéines structurales et non structurales du HCV, et rôles dans la formation de vésicules et du complexe de réplication	116
Figure 56 : Conservation et homologies de séquence des protéines non structurales formant des DMVs chez les <i>Nidovirales</i>	117
Figure 57 : Mécanismes théoriques de formation des ROs du SARS-CoV, protéines virales impliquées et micrographies en MET	118
Figure 58 : Orientation du complexe de réplication par rapport à la membrane des SMVs, tubules et DMVs	120
Figure 59 : Reconstructions tomographiques de pores moléculaires viraux par cryo-ME	121
Figure 60 : Structure, localisation et association aux ROs des pores moléculaires viraux	123
Figure 61 : Modèle de transit du génome du MHV, des DMVs vers les sites d'assemblage	124
Figure 62 : Stratégies d'échappement à la réponse immunitaire innée chez les coronavirus	125

Figure 63 : Mécanisme hypothétique de ciblage et de perturbation des ROs par les GTPases inductibles par l'IFN	126
Figure 64 : Facteurs inductibles par l'interféron (ISG) ciblant la réplication des flavivirus.	127
Figure 65 : Techniques de marquage en MET utilisables pour la détection d'ARN viraux dans les ROs	130
Figure 66 : Caractéristiques des méthodes de reconstruction 3D en microscopie électronique	131
Figure 67 : Étapes de préparation des échantillons et principe comparé du SBF-SEM et du FIB-SEM	132
Figure 68 : Étapes de préparation des échantillons et principe de la cryo-tomographie en MET appliquée à l'étude des pores viraux	134
Figure 69 : Variabilité de l'ultrastructure des DMVs en fonction de la technique de préparation des échantillons pour la MET	134
Figure 70 : Structure et compartiments d'assemblage et de bourgeonnement des particules virales des coronavirus	136
Figure 71 : Mécanismes hypothétiques de sortie des coronavirus par la voie sécrétoire constitutive	140
Figure 72 : Mécanismes hypothétiques de sortie des coronavirus par une voie sécrétoire non conventionnelle	141
Figure 73 : Schéma de synthèse des mécanismes potentiels de sortie du SARS-CoV-2 de la cellule	202

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fonctions des 16 protéines non structurales (NSP) du SARS-CoV-2	35
Tableau 2 : Recommandations vaccinales françaises en prévention de l'infection par le SARS-CoV-2 à l'automne 2022	64
Tableau 3 : Recommandations pour la prise en charge thérapeutique des patients adultes hospitalisés pour un COVID-19 à l'automne 2022.....	67
Tableau 4 : Caractéristiques des organites membranaires de réplication par famille virale....	85
Tableau 5 : Facteurs d'hôte impliqués dans la biogenèse des ROs	107
Tableau 6 : Protéines virales impliquées dans la biogenèse des ROs.....	114

Liste des abréviations

ACBD3 : acyl-coenzyme A binding domain containing 3
ACE2 : Angiotensin-Converting Enzyme 2
ALI : Air Liquid Interface
ARF1 : ADP-ribosylation factor 1
BCoV : bovine coronavirus
BFA : Brefeldine A
BHE : barrière hémato-encéphalique
BiP : binding protein
BMV : brome mosaic virus
BYV : beet yellow virus
CCoV : canine coronavirus
CERT : ceramide transport protein
CHIKV : virus Chikungunya
CLEM : correlative light and electron microscopy
CMs : convoluted membranes
CMS : cubic membrane structures
CMs : convoluted membranes
CNV : cucumber necrosis virus
CPVs : cytopathic vacuoles
Cryo-ME : cryomicroscopie électronique
CTD : C-terminal domain
CVB3 : coxsackie virus B3
CVs : contiguous vesicles
DMVs : double membrane vesicles
dsRNA : double stranded RNA
EAV : equine arterivirus
ER : endoplasmic reticulum
ERES : endoplasmic reticulum exit sites
ERGIC : endoplasmic reticulum - Golgi intermediate compartment
FAPP2 : human 4-phosphate-adaptor-protein-2
FAS : fatty acid synthetase
FCoV : feline coronavirus
FCV : feline calicivirus
FHV : Flock House virus
FIB : focused ion beam
FMDV : foot-and-mouth disease
FS : freeze substitution
GBF1 : Golgi Brefeldin A Resistant Guanine Nucleotide Exchange Factor 1
GOLPH3 : Golgi phosphoprotein 3
HAE : Human Airway Epithelia
HCoV : human coronavirus
HCV : hepatitis C virus
HE : hémagglutinine-estérase
HPF : high pressure freezing
HR1 / HR2 : Heptad repeat domain 1 / 2
HSPG : Heparan sulfate proteoglycan
IBV : avian infectious bronchitis virus

IEM : immunoelectron microscopy
IFI6 : Interferon alpha-inducible protein 6
IFN-I : interféron de type I
Ig-like : immunoglobulin like
IL-1 β : interleukine 1 bêta
iPSCs : induced Pluripotent Stem Cells
ISG : interferon stimulated genes
IV : intravenous
JAK : janus kinase
kb : kilobase
LC3 : microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LLPS : liquid-liquid phase separation
LVCV : large virions containing vacuoles
MAVS : mitochondrial antiviral signaling protein
ME : microscopie électronique
MEB : microscopie électronique à balayage
MERS-CoV : Middle East respiratory syndrome coronavirus
MET : microscopie électronique à transmission
MHV : murine hepatitis virus
MLB : maze-like bodies
MMV : multi-membrane vesicle
MNV-1 : murine norovirus 1
MO : microscopie optique
MTOC : microtubule-organizing center
MW : membranous web
NETs : neutrophil extracellular traps
nm : nanomètre
NSP : non-structural protein
NTD : N-terminal domain
OAS : 2'-5' oligoadenylate synthetase
OSBP : oxysterol-binding protein
p.i. : post-infection
PALS1 : Protein Associated with Caenorhabditis elegans Lin-7 protein 1
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
PCLS : Precision Cut Lung Slice
PCs : paracrystalline arrays
PDCoV : porcine deltacoronavirus
PE : phosphatidyléthanolamine
PI4KIII α : phosphatidylinositol 4-kinases type III
PI4P : phosphatidylinositol-4-phosphate
PKR : protein kinase R
PO : per os
PRR : pattern recognition receptors
PVs : pathogen-containing vacuoles
QCoV : quail coronavirus
RBD : receptor-binding domain
RBM : receptor-binding motif
RdRp : RNA-dependent RNA polymerase
RE : réticulum endoplasmique
REnd α : recycling endosomes

RER : rough endoplasmic reticulum
ROs : Replication organelles
RTC : replication-transcription complex
RUBV : rubella virus
RVN : reticulovesicular network
SARS-CoV : severe acute respiratory syndrome coronavirus
SBF : serial blockface
SDRA : syndrome de détresse respiratoire aigüe
SEM : scanning electron microscopy
SFV : Semliki forest virus
SINV : Sindbis virus
siRNA : small interfering RNA
SMVs : vésicules à simple membrane
SpO₂ : saturation pulsée en oxygène
SREBP : sterol regulatory element binding protein
(+)ssRNA virus : positive single-stranded RNA virus
STAT : signal transducers and activators of transcription
TAG : targeting by autophagy proteins
TB : tubular bodies
TBEV : tick-borne encephalitis virus
TCoV : turkey coronavirus
TEM : transmission electron microscopy
TGEV : transmissible gastroenteritis coronavirus
TGN : *trans*-Golgi network
TMV : tobacco mosaic virus
TNF : Tumor Necrosis Factor
TOM70 : translocase of outer mitochondrial membrane 70
TRIM79 α : tripartite motif protein 79 α
TRS : transcription regulating sequence
TYMV : turnip yellow mosaic virus
UTR : untranslated region
VAP : vesicle-associated-membrane protein-associated protein
ViCs : vesicles in cluster
VOC : variant of concern
VPs : vesicle packets
VTCs : vesicular tubular clusters
WEEV : western equine encephalitis virus

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. Introduction générale

A. Le SARS-CoV-2

1. Historique

Les Coronavirus (CoVs) forment une grande famille de virus à ARN simple brin de polarité positive, infectant de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux. Le premier membre de cette famille, le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) a été découvert en 1931 chez des poulets présentant une symptomatologie respiratoire (Figure 1).

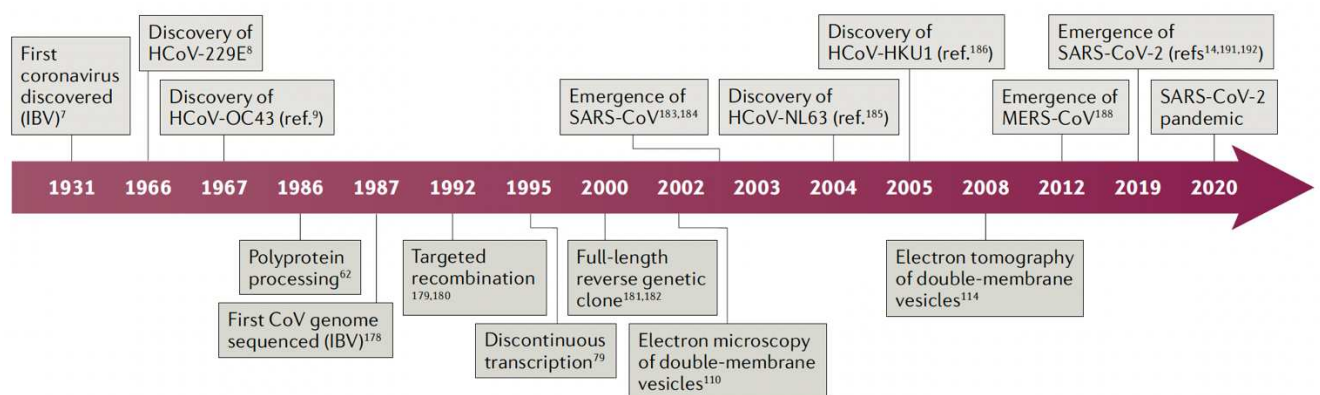


Figure 1 : Chronologie du domaine de la recherche sur les coronavirus

(V'kovski *et al.*, Nat Rev Microbiol 19, 155–170 (2021))

En 1966, Hamre et Procknow réussissent à isoler une nouvelle souche virale en culture cellulaire, à partir des sécrétions respiratoires de patients présentant une rhinopharyngite. L'agent infectieux responsable, nommé 229E, est le premier coronavirus impliqué en pathologie humaine découvert (HCoV) (1). Cette découverte est rapidement suivie par celle d'une autre souche, nommée OC43. Leurs observations en microscopie électronique à transmission (MET) révèlent des particules virales de taille intermédiaire (80-150 nm), enveloppées, couvertes de spicules qui leur confèrent un aspect en couronne (2). Ces caractéristiques morphologiques sont partagées avec l'IBV, ainsi que d'autres virus animaux, tels que le virus de l'hépatite murine (MHV) et le coronavirus de la gastro-entérite transmissible porcine (TGEV). Ainsi, la famille des coronavirus (nommée d'après l'aspect en couronne en ME) est créée, et ces différents virus y sont regroupés (3). En 1986, le génome de l'IBV est intégralement séquencé (4), suivi par la découverte en 1995 du mécanisme de transcription discontinue du génome viral (5). La première

observation en MET du réseau de réplication composé de vésicules à double membrane (DMVs) pour un membre de la famille des coronavirus, effectuée avec le modèle du MHV, est réalisée en 2002 (6). Au cours de cette même année, un nouveau coronavirus d'origine zoonotique, le SARS-CoV, émerge en Chine dans la province du Guangdong (7,8). Il entraîne chez certains patients la survenue d'une atteinte respiratoire sévère avec un taux de mortalité de 10 %, et sera à l'origine d'environ 8000 cas, avant que sa transmission ne soit interrompue par des mesures d'isolement des patients atteints et de limitation des déplacements. L'intérêt porté aux coronavirus consécutif à cette épidémie va permettre l'identification de deux autres coronavirus humains : NL63 et HUK1 (9,10). A l'image des HCoV-229E et HCoV-OC43, ces coronavirus sont responsables d'épidémies saisonnières, et à l'origine de formes respiratoires bénignes chez les individus immunocompétents. En 2012, un autre coronavirus d'origine zoonotique, le MERS-CoV est identifié au Moyen-Orient (11). Ce second coronavirus hautement pathogène est parfois responsable d'une atteinte respiratoire sévère chez les patients infectés, avec un taux de mortalité de 36 %, et a entraîné la survenue de 2500 cas depuis son émergence. En décembre 2019, la survenue de nouveaux cas de pneumopathies atypiques à Wuhan, une ville de la province chinoise du Hubei, conduit à l'identification par séquençage d'un coronavirus dont le génome présente une grande homologie avec le SARS-CoV, nommé de ce fait SARS-CoV-2 (12–14). L'ensemble des symptômes et atteintes d'organe, principalement respiratoires, sont regroupés sous le terme de maladie à coronavirus 2019 (COVID-19). La principale différence qui caractérise le SARS-CoV-2 par rapport à ses prédécesseurs, réside dans la période de contagiosité, qui précède l'apparition des signes pour ce dernier. De fait, l'identification des patients infectés et la mise en place de mesures sanitaires drastiques n'ont pas été suffisantes pour éviter sa diffusion rapide au reste du monde, du fait de patients asymptomatiques contagieux (**Figure 2**).

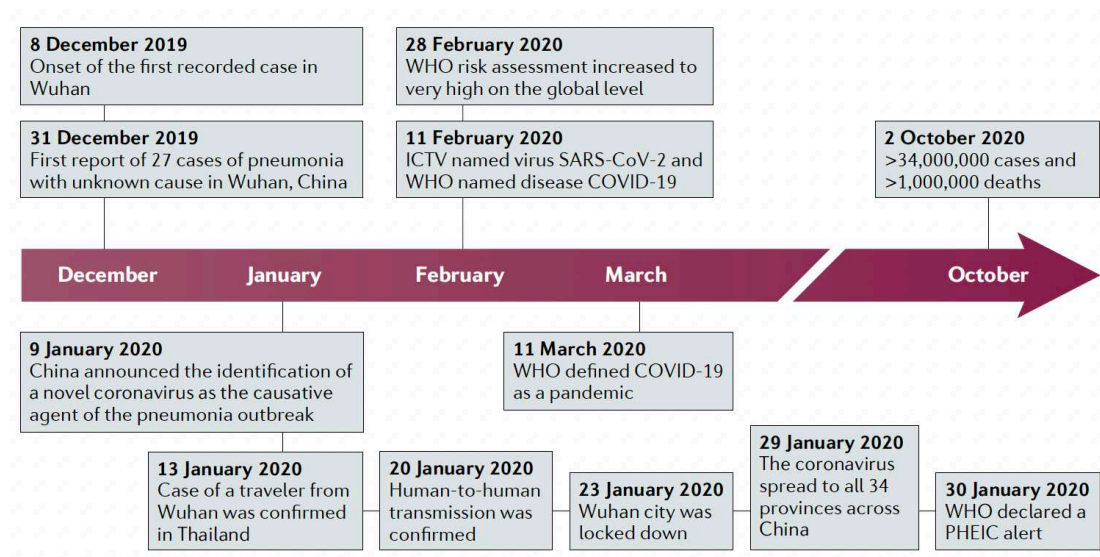


Figure 2 : Chronologie des principaux évènements aux premiers temps de la pandémie de COVID-19
(Hu, B *et al.*, Nat Rev Microbiol 19, 141–154 (2021).)

Le 11 mars 2020, l’OMS déclare l’état de pandémie mondiale, devant la flambée de cas de COVID-19 dans l’ensemble des pays du globe. L’engorgement du système de santé par un grand nombre de cas et la pénurie de dispositifs médicaux conduisent de nombreux États à prendre des mesures de confinement des populations. La circulation du virus va se poursuivre sous la forme de vagues successives de cas, plus importantes à l’automne/hiver. La dynamique de ces vagues est freinée par la mise en place et le maintien de mesures sanitaires, et le respect des gestes barrières à l’échelle individuelle. La mise au point de vaccins à ARNm et à vecteurs adénoviraux, a permis l’immunisation des populations à partir de la fin de l’année 2020, permettant de réduire en partie la transmission et de manière très efficace la survenue de formes sévères du COVID-19. En parallèle du déploiement de la vaccination, l’émergence de variants du SARS-CoV-2, plus contagieux et moins sensibles aux anticorps générés par les vaccins, souligne l’importance d’une réponse coordonnée à l’échelle mondiale. Cependant et depuis les derniers mois de 2022, l’acquisition progressive d’une immunité collective liée à la vaccination et à l’infection par le variant très contagieux Omicron, semblent limiter l’amplitude des vagues de contamination et d’hospitalisation.

2. Phylogénie et origines zoonotiques

Au sein de l'ordre des *Nidovirales*, la famille des *Coronaviridae* est elle-même divisée en deux sous-familles : les *Letovirinae* et les *Orthocoronavirinae*. La sous-famille des *Orthocoronavirinae* est composée de quatre genres, dont les représentants infectent un spectre étendu d'hôtes animaux : les *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* et *Deltacoronavirus* (15) (**Figure 3**).

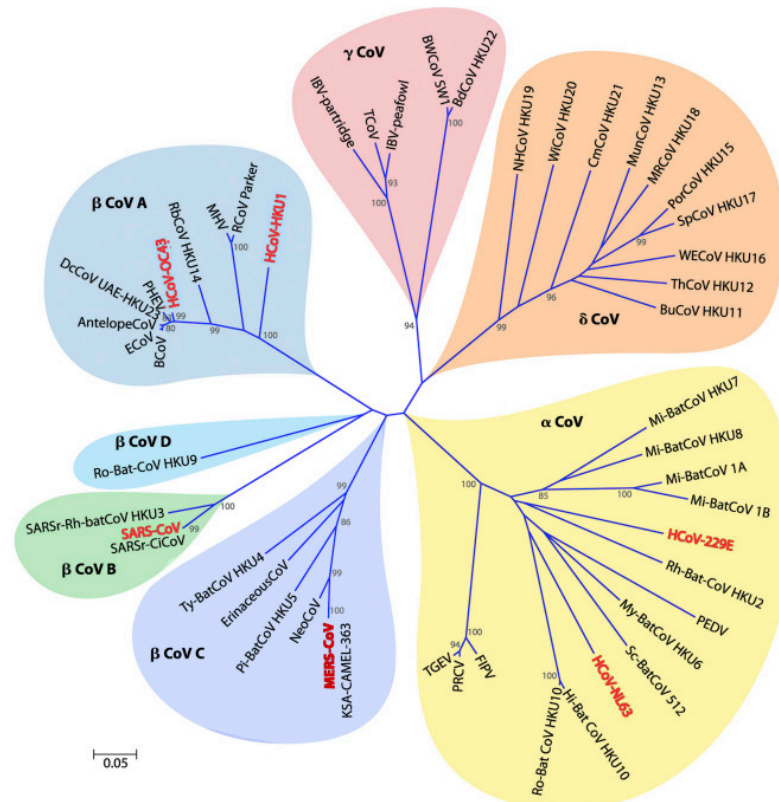


Figure 3 : Arbre phylogénétique des *Orthocoronavirinae*

Les virus infectant l'Homme sont notés en rouge.

(Chan, J. F *et al.* (2015). *Clinical microbiology reviews*, 28(2), 465–522.)

Cette diversité et ce tropisme large s'explique par leur plasticité génomique, facilitée par leur génome viral de grande taille (25 - 31 kb). Ils sont pourvus de mécanismes de correction génétique (16,17), et leur taux de mutation est relativement faible, comparativement aux autres virus à ARN simple brin (18). Ce taux de mutation est cependant majoré par les niveaux de réplication élevés des virions dans la cellule hôte. De plus, les coronavirus effectuent durant leur réplication une étape de transcription discontinue qui leur est propre, et qui implique un changement de matrice lors de la synthèse des ARN sous-génomiques. Ce changement est générateur d'événements de

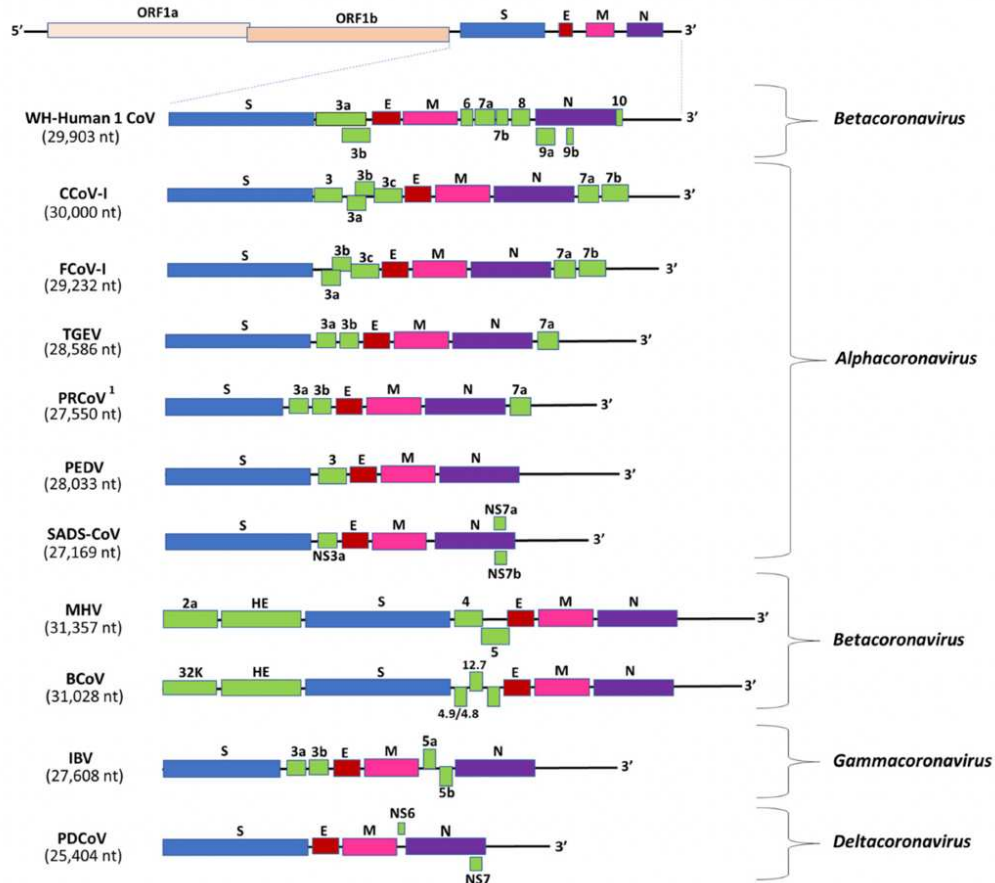


Figure 5 : Comparaison par alignement des génomes des *Orthocoronavirinae*

Les séquences présentant des variations entre les différents coronavirus sont représentées en vert, et concernent des protéines accessoires ou la présence d'une hémagglutinine-estérase (HE) chez certains membres des *Betacoronavirus* (MHV, BCoV...).

(Ghosh, S *et al.*, Microorganisms 2020, 8, 1840.)

En revanche, les *Betacoronavirus* du sous-genre *Embecovirus* possèdent une cinquième protéine structurale : une hémagglutinine-estérase (HE) très proche de celle retrouvée chez les virus de la grippe de type C. Une autre différence entre les coronavirus concerne la présence de protéines accessoires, variables en termes de nombre, de séquence, et de position entre les séquences codant les protéines structurales. La fonction de ces protéines est encore largement méconnue, et bien qu'elles ne soient pas indispensables au cycle de réplication viral, elles semblent notamment jouer un rôle dans la virulence et les interactions entre le virus et l'hôte. Au-delà de leurs divergences sur le plan génomique, il existe également de grandes disparités en termes de pathogénicité et d'organes cibles.

Le genre *Gammacoronavirus* (sous-genre *Igacovirus*) comprend principalement des virus aviaires : virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) responsable d'une atteinte respiratoire et rénale chez le poulet, coronavirus de la dinde

(TCoV) ou de la caille (QCoV) à l'origine d'une atteinte digestive. Le seul membre de ce genre infectant un mammifère est le coronavirus du béluga (Whale-CoV) identifié chez un seul individu présentant une atteinte respiratoire et hépatique. Le genre *Deltacoronavirus* (sous-genre *Buldecovirus*) comprend le deltacoronavirus porcin (PDCoV) responsable d'un tableau de gastro-entérite aigüe, et le coronavirus du moineau (Sparrow-CoV).

Au sein des *Alphacoronavirus*, le sous-genre *Tegacovirus* comporte des souches infectant majoritairement des mammifères carnivores : les coronavirus canins (CCoV-I, CCoV-II) à l'origine des formes digestives spontanément résolutes, et les coronavirus félins (FCoV-I, FCoV-II) également responsables d'atteintes digestives, parfois compliquées d'une péritonite. Enfin, le coronavirus de la gastro-entérite transmissible porcine (TGEV) est un autre membre notable de ce sous-genre. On retrouve deux *Alphacoronavirus* humains à l'origine d'une symptomatologie respiratoire bénigne. Le premier est le HCoV-229E (sous-genre *Duvinacovirus*) qui présente une homologie de séquences avec un *Alphacoronavirus* de chauve-souris hipposideride (24). Le HCoV-229E est plus proche encore d'un coronavirus retrouvé chez des alpagas présentant des symptômes respiratoires (25), soulignant le rôle des camélidés comme hôte intermédiaire. Le second est le HCoV-NL63 (sous-genre *Setracovirus*), qui aurait divergé il y a plusieurs siècles (500 à 800 ans) à partir d'un coronavirus de chauve-souris et dont l'hôte intermédiaire reste inconnu (26).

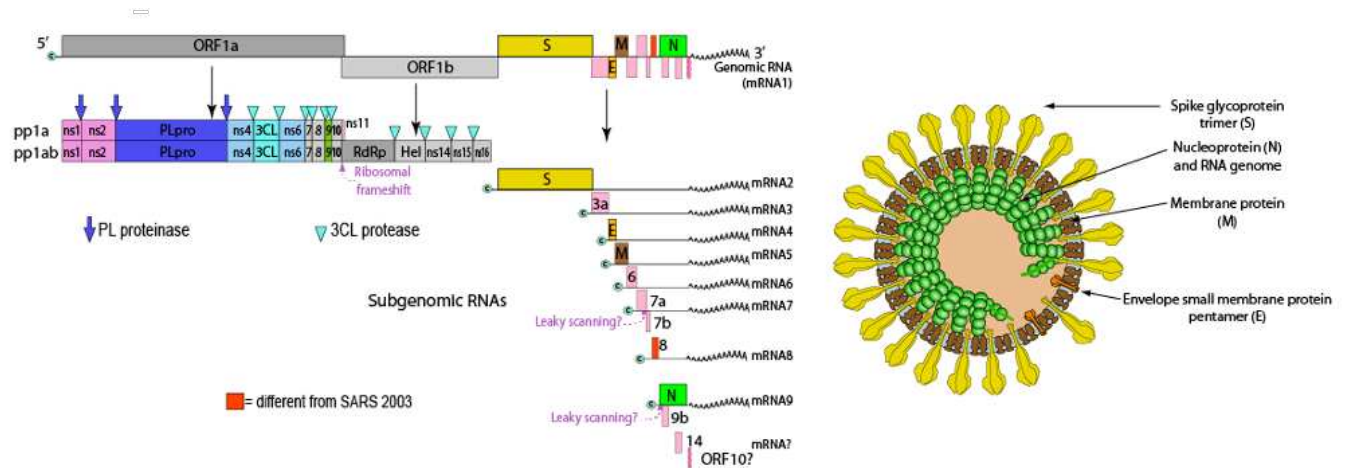
Concernant les *Betacoronavirus*, le sous-genre *Embecovirus* comprend le virus de l'hépatite murine (MHV), le coronavirus bovin (BCoV) à l'origine d'une symptomatologie digestive et/ou respiratoire, et deux autres coronavirus humains « bénins » : le HCoV-OC43 qui dériverait d'un coronavirus murin avec un hôte intermédiaire bovin (27), et le HCoV-HKU1 dont le génome est également proche des *Betacoronavirus* murins (10). Enfin, il existe à l'heure actuelle trois *Betacoronavirus* humains responsables d'atteintes respiratoires sévères. Le MERS-CoV appartient au sous-genre *Merbecovirus*, son histoire évolutive étant étroitement liée à celle d'un coronavirus de chauve-souris passé chez le dromadaire avant d'infecter l'Homme (28,29). Le SARS-CoV et le SARS-CoV-2 appartiennent tous deux au sous-genre *Sarbecovirus*. Le SARS-CoV est probablement issu d'événements successifs de recombinaisons ayant eu lieu chez la chauve-souris, et dont l'hôte intermédiaire probable est la civette masquée (*Paguma larvata*), un mammifère présent en captivité sur certains marchés en Chine (30,31). L'origine zoonotique du SARS-CoV-2 est encore discutée à ce jour. Les premiers

éléments à ce sujet ont mis en évidence un degré d'homologie de 96,2 % entre son génome et celui du coronavirus de chauve-souris RaTG13, isolé chez une espèce de rhinolophe (*Rhinolopus affinis*) (12). D'autre part, il existe une grande similarité (97 %) entre la séquence « Region Binding Domain » (RBD) du SARS-CoV-2, et celle d'un coronavirus retrouvé chez le pangolin javanais (*Manis javanica*), suggérant que cette espèce de mammifère ait fait office d'hôte intermédiaire avant le passage à l'Homme (32). Cependant, une analyse ultérieure des séquences a remis en cause cette hypothèse, les similarités observées au niveau des RBD s'expliqueraient plutôt par une évolution convergente liée à la sélection naturelle (33). Une revue récente de la littérature soutient cependant que l'origine zoonotique du SARS-CoV-2 reste l'hypothèse la plus probable, dans la mesure où cette émergence présente de nombreux points communs avec celle d'autre virus dont le caractère zoonotique a été attesté avec un haut degré de certitude (notamment le SARS-CoV) (34). En outre, l'hypothèse d'une sortie du virus d'un laboratoire de recherche, bien que possible, n'est pour l'instant pas étayée par un nombre suffisant d'éléments de preuve.

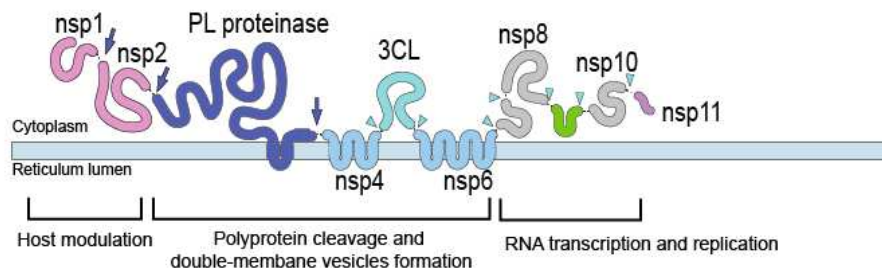
3. Génome et protéines virales

a. Organisation génomique

Le génome du SARS-CoV-2 présente une organisation similaire à celle des coronavirus humains qui l'ont précédé (35), codé par un ARN simple brin de polarité positive proche des 30 kb. Cet ARN présente une coiffe en 5' (5'-cap) et une queue poly(A) en 3', et peut ainsi faire office d'ARNm traduit d'emblée par la machinerie cellulaire. Il comporte également des régions 5' et 3' non traduites (UTR) formant des structures tiges-boucles, essentielles à la réplication et à la transcription de l'ARN viral. Les deux premiers tiers du génome situés en 5' codent les gènes de la réplicase (ORF1a et ORF1b) permettant la synthèse de deux polyprotéines par décalage du cadre de lecture ribosomique : pp1a qui donnera par clivage les protéines non structurales NSP1 à NSP11, et pp1ab dont seront également issues les protéines non structurales NSP12 à NSP16 (36) (**Figure 6**). Le dernier tiers du génome code les quatre protéines structurales S, M, E et N, ainsi que neuf protéines accessoires (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c, ORF10).



pp1a topology



pp1ab topology

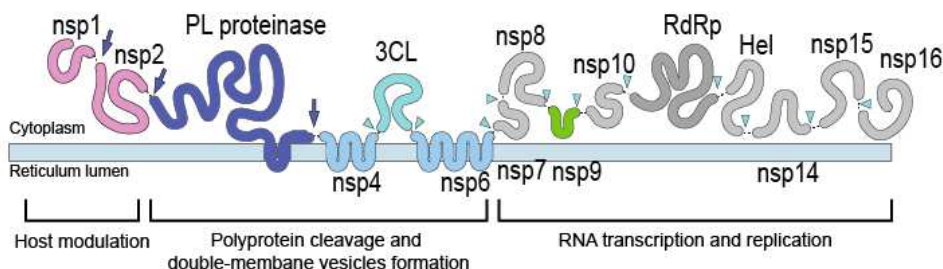


Figure 6 : Génome, transcrits viraux, polyprotéine et particule virale du SARS-CoV-2

Les séquences du génome notées en rouge diffèrent entre le SARS-CoV et le SARS-CoV-2.

La papaïne-like protéase (PLpro) est codée dans la séquence de la NSP3. La protéase 3C-like (3CL) est codée dans la séquence de la NSP5. La RdRP est codée dans la séquence de la NSP12. L'hélicase (Hel) est codée dans la séquence de la NSP13.

(<https://viralzone.expasy.org/>, SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

b. Protéines non structurales et complexe de réplication-transcription

Les coronavirus sont de gros virus complexes, comparativement aux autres virus à ARN, dont le génome de grande taille permet de coder de multiples protéines non

structurales, au nombre de 16. Ces protéines non structurales ont pour rôle d'initier et de favoriser la réplication et la transcription du génome viral par plusieurs mécanismes (**Tableau 1**) (**Figure 7**) : par le clivage initial des polyprotéines (par NSP3, NSP5), par la formation de structures cellulaires viro-induites (DMVs) fournissant un environnement favorable à la réplication (grâce à NSP3, NSP4, NSP6), en formant le complexe de réplication-transcription (composé de NSP7, NSP8, NSP12, NSP13), en réalisant des modifications post-transcriptionnelles des ARN viraux (par NSP10, NSP14, NSP16), et en interagissant avec le fonctionnement cellulaire normal au profit de la réplication virale (grâce à NSP1, NSP2). Du fait d'une grande homologie de séquence avec le SARS-CoV, une grande partie des rôles de ces protéines ont déjà été élucidés avant l'émergence du SARS-CoV-2 et lui sont donc transposables.

Name	Protein (Full Name)	Length (aa)	Range	Role
NSP1	N-terminal product of the viral replicase	180	1–180	Leader protein which acts as host translation inhibitor and also degrade host mRNAs
NSP2	N-terminal product	638	181–818	Binds to prohibitin 1 and prohibitin 2 (PHB1 and PHB2)
NSP3	Papain-like proteinase	1945	819–2763	Responsible for release of NSP1, NSP2, and NSP3 from the N-terminal region of pp1a and 1ab
NSP4	Membrane-spanning protein containing transmembrane domain 2	500	2764–3263	Viral replication-transcription complex and it helps modify ER Membranes
NSP5	Proteinase and main proteinase	306	3264–3569	Cleaves at multiple distinct sites to yield mature and intermediate nonstructural proteins
NSP6	Putative transmembrane domain	290	3570–3859	Induces formation of ER-derived autophagosomes As well as induces double-membrane vesicles
NSP7	RNA-dependent RNA polymerase	83	3860–3942	Forms complex with NSP8 and NSP12 to yield the RNA polymerase activity of NSP8
NSP8	Multimeric RNA polymerase; replicase single-stranded	198	3943–4140	Makes heterodimer with NSP8 and 12
NSP9	RNA-binding viral protein	198	4141–4253	May bind to helicase
NSP10	Growth-factor-like protein possessing two zinc binding motifs	139	4254–4392	Yet to be deciphered
NSP11	Consists of 13 amino acids (sadaqsflngfav) and identical to the first segment of Nsp12	13	4393–4405	Unknown
NSP12	RNA-dependent RNA polymerase	932	4393–5324	Replication and methylation
NSP13	RNA-dependent RNA polymerase (Pol/RdRp)	932	5325–5925	A helicase core domain that binds ATP. Zinc-binding domain is involved in replication and transcription
NSP14	Proofreading Exoribonuclease domain (ExoN/nsp14)	527	5926–6452	Exoribonuclease activity acting in a 3'-5' direction and N ⁷ -guanine methyltransferase activity
NSP15	EndoRNase; nsp15-A1 and nsp15B-NendoU	346	6453–6798	Mn(2+) -dependent endoribonuclease activity
NSP16	2'-O-ribose methyltransferase	298	6799–7096	Methyltransferase that mediates mRNA cap 2'-O-ribose methylation to the 5'-cap structure of viral mRNAs

Tableau 1 : Fonctions des 16 protéines non structurales (NSP) du SARS-CoV-2

(Yadav, R. *et al.*, Cells 2021, 10, 821.)

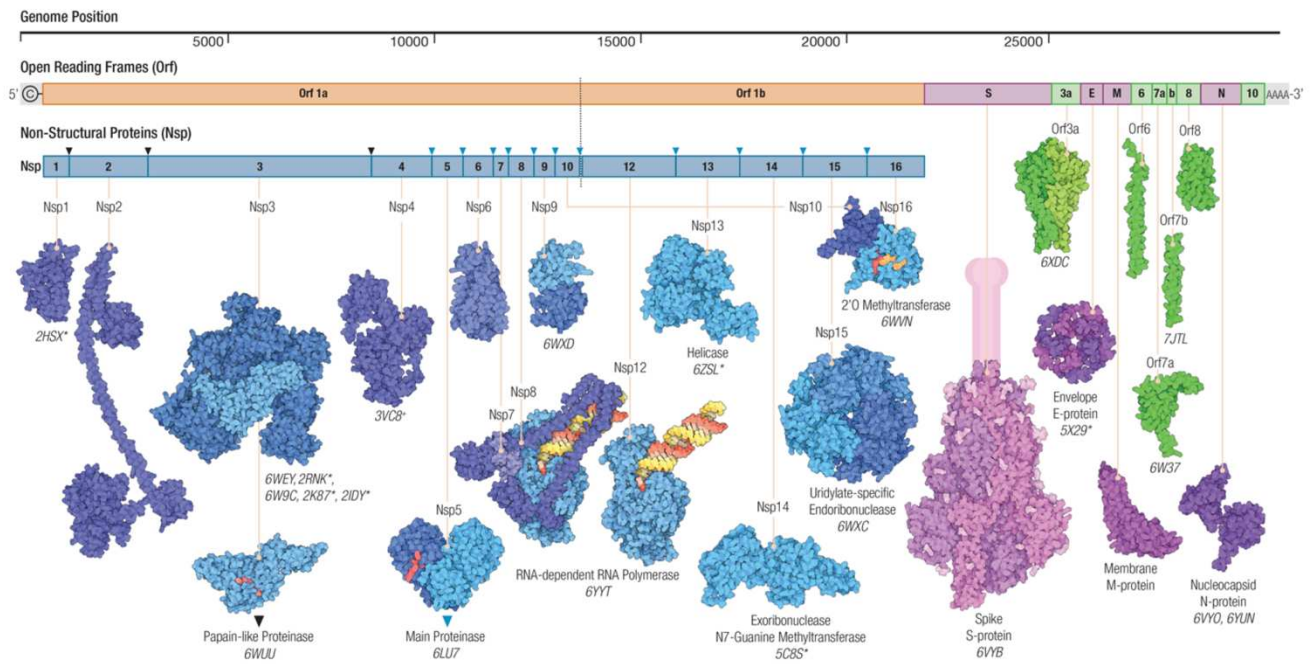


Figure 7 : Structures tertiaire et quaternaire du protéome du SARS-CoV-2

Les protéines non structurales sont colorées en bleu, les protéines structurales en rose, et les protéines accessoires en vert. Les sites de clivage des polyprotéines sont indiqués par des triangles inversés pour la protéinase de type papaine (PLPro, noir) et la protéase principale (NSP5, bleu). Pour l'ARN double brin synthétisé par la RdRP, le brin matrice est coloré en rouge et le brin produit en jaune. (Lubin *et al.*, Proteins. 2021; 1- 27.)

La protéine pléiotropique NSP3 est une volumineuse protéase de type papaine comportant plusieurs domaines (37). Deux domaines protéases lui permettent de cliver précocement les polyprotéines pp1a et pp1ab, afin d'obtenir les différentes protéines non structurales, un rôle partagé avec la protéine NSP5. La présence de deux domaines de type ubiquitine indique des fonctions supplémentaires : le premier domaine de type ubiquitine permettrait l'interaction de NSP3 avec la protéine N et les ARN simple brin, tandis que le second domaine jouerait un rôle dans la modulation de l'immunité innée. D'autre part, cette protéine joue un rôle majeur dans le recrutement et l'assemblage du complexe de réplication-transcription (RTC) au niveau des membranes des DMVs. Enfin, la NSP3 s'associe aux protéines transmembranaires NSP4 et NSP6 pour former un complexe à l'origine de la modification des membranes du réticulum endoplasmique (RE), qui par un mécanisme en cours d'élucidation, conduit à la formation de vésicules à double membrane (cf. partie I.D.2.b.i) (38,39).

La prise en charge des génomes viraux est assurée par un complexe formé de la protéine NSP12, associée à un hétérodimère NSP7-NSP8, à un second exemplaire de la NSP8, et à deux exemplaires de la protéine NSP13 (**Figure 8**) (40,41). La protéine NSP12 est une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), comportant un domaine

polymérase en forme de « main droite incurvée » (cupped right hand) similaire à d'autres polymérases, et divisé en trois sous-domaines (finger, palm, thumb). La matrice ARN est prise en étau entre les « doigts » et le « pouce » de la polymérase, et entre en contact avec le site actif situé dans la « paume ». Les protéines NSP7 et NSP8 jouent le rôle de cofacteurs de l'activité de la RdRp, en assurant la synthèse efficace de l'ARN du brin complémentaire (42). La protéine NSP13 est une hélicase qui catalyse l'ouverture de la double hélice d'ARN, cette activité nécessitant la présence d'un domaine liant le zinc situé à l'extrémité N-terminal (43,44).

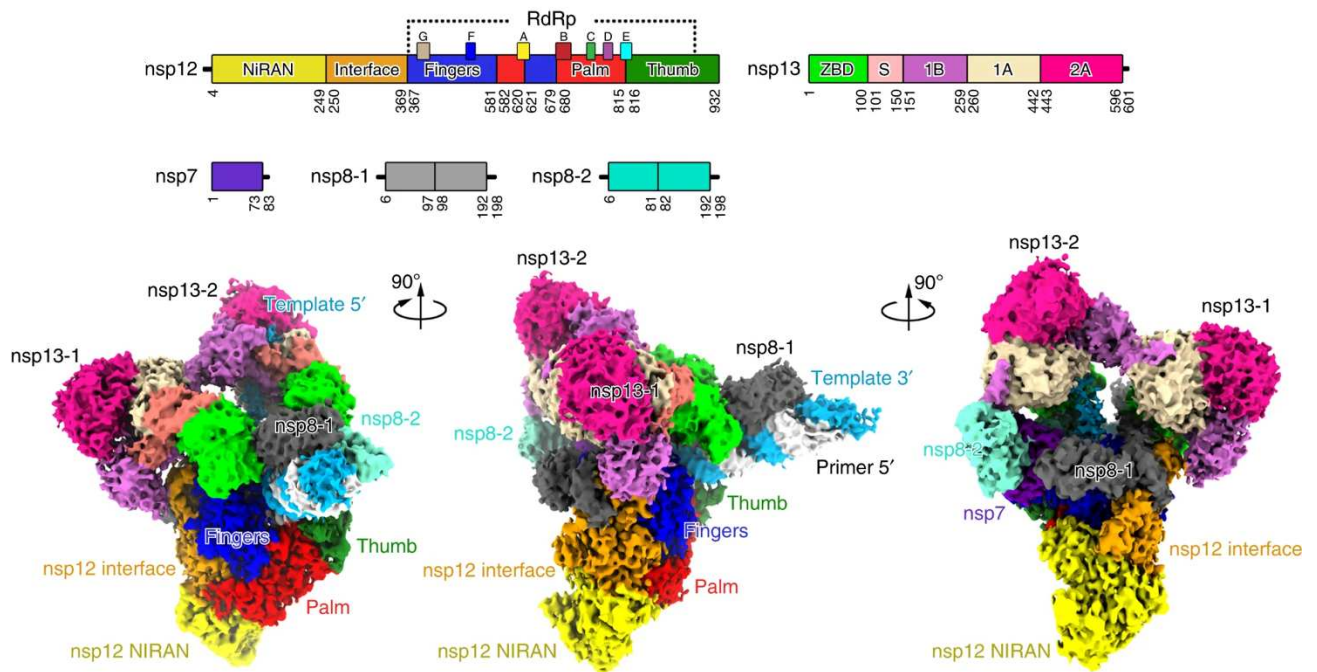


Figure 8 : Structures primaire et quaternaire et composants du complexe de réplication-transcription du SARS-CoV-2

(Yan, L *et al.*, Nat Commun 11, 5874 (2020))

Une fois les ARN viraux synthétisés, les modifications post-transcriptionnelles sont assurées par le complexe NSP10-NSP14-NSP16, lui-même couplé au complexe de réplication-transcription précédemment décrit. Ces modifications sont essentielles, afin de prémunir les ARN viraux néosynthétisés de la reconnaissance par les senseurs de l'immunité cellulaire (cf. partie I.D.3.) (45). La protéine NSP14 possède une activité exonucléasique et méthyltransférase, lui permettant d'assurer d'une part une activité correctrice (« proof-reading ») et d'autre part la première étape de synthèse de la coiffe protectrice de l'ARNm (« capping ») (46,47). La NSP16 possède uniquement une activité méthyltransférase, et assure la seconde étape de la synthèse de la

coiffe (48,49). La NSP10 ne semble pas posséder d'activité enzymatique intrinsèque, mais jouerait le rôle d'échafaudage permettant le recrutement de NSP14 et NPS16, et permettrait de synchroniser les activités de correction et de synthèse de la coiffe de ces deux protéines (50).

Enfin, la protéine NSP1 a la capacité de se coupler avec les sous-unités ribosomiques de la cellule, et d'inhiber ainsi la traduction des ARNm cellulaires au profit des ARNm viraux (51–53). Elle est également capable d'effectuer des coupures endonucléolytiques en 5' des ARNm cellulaires, favorisant leur dégradation (54). Bien que les rôles précis de la protéine NSP2 soient encore méconnus, il a été montré qu'elle pouvait se lier aux protéines prohibitines (PHB1 et PHB2) (55). Ces protéines jouent un rôle dans de nombreux processus cellulaires physiologiques, comme l'apoptose, le fonctionnement mitochondrial ou la régulation du cycle cellulaire. De fait, il est probable qu'à l'image de NSP1, NSP2 puisse promouvoir la réplication virale, en interférant avec des fonctions normales de la cellule hôte.

c. Protéines structurales

La protéine S (Spike) (**Figure 9**) est une volumineuse glycoprotéine de fusion de classe I impliquée dans l'entrée virale, par la reconnaissance du récepteur cellulaire ACE2. A la surface du virion, cette protéine s'organise sous forme de trimère, chaque monomère étant formé de deux sous-unités S1 et S2 séparés lors du clivage par la furine (56). La région S1 est responsable de l'interaction avec les molécules présentes à la surface de la cellule : le domaine N-terminal (NTD) interagit préférentiellement avec des molécules glycosylées qui peuvent agir en tant que facteur d'adhérence ou co-récepteur, tandis que le domaine C-terminal (CTD), qui se lie préférentiellement à des protéines, interagit avec le récepteur d'entrée ACE2 *via* son « receptor-binding domain » (RBD). Les résidus directement au contact du récepteur forment le « receptor-binding motif » (RBM). Le RBD peut adopter deux configurations, un état « up » qui l'expose à l'extérieur de la Spike et facilite l'interaction avec l'ACE2, et un état « down » placé à l'intérieur de la structure de la Spike et qui le rend moins accessible aux anticorps neutralisants.

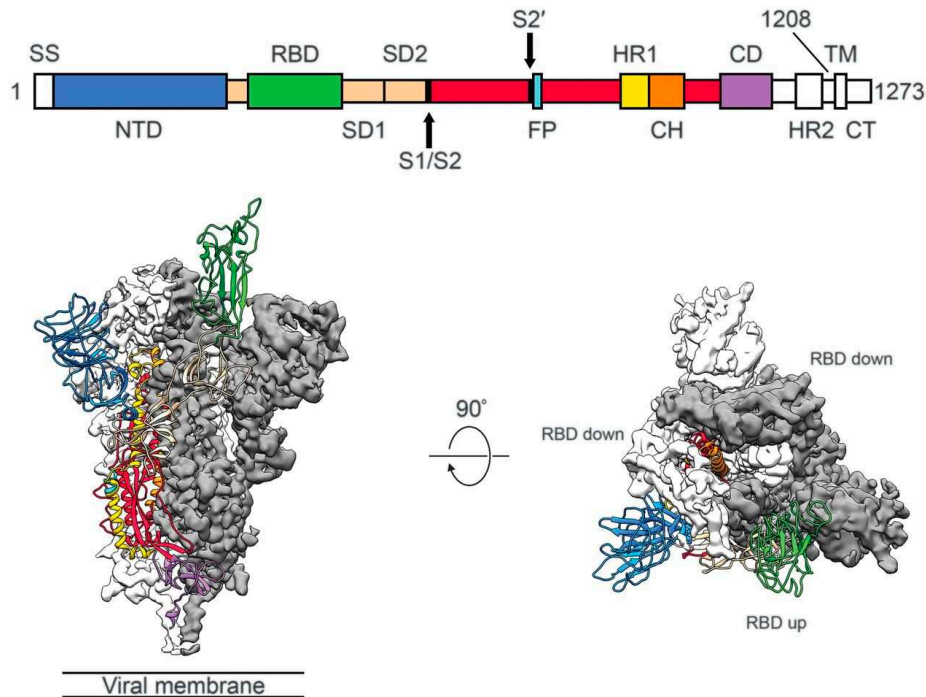


Figure 9 : Structures et domaines de la glycoprotéine d'enveloppe Spike du SARS-CoV-2

Structure primaire (en haut), et structure quaternaire (en bas) en vues latérale et supérieure de la forme pré-fusion de la protéine S, avec un seul « RBD up ». Les deux autres protéines S avec un RBD « down » sont représentées en gris. Les domaines de la protéine S en « RBD up » sont représentés en couleurs, correspondant à celles utilisées pour la structure primaire de la protéine S.

SS : signal sequence; S2' : S2' protease cleavage site; FP : fusion peptide; HR1 : heptad repeat 1; CH : central helix; CD : connector domain; HR2 : heptad repeat 2; TM : transmembrane domain; CT : cytoplasmic tail.

(Wrapp Daniel *et al.*, Science. 13 mars 2020;367(6483):1260-3.)

Sur les virions, plusieurs combinaisons de trimères co-existent : le plus souvent, ils présentent leur trois RBD en position « down », quand d'autres exposent un RBD en « up » et deux RBD en « down » (57). La région S2 est responsable de la fusion entre les membranes cellulaires et virales. Elle comporte deux « heptad repeat domains » (HR1 et HR2) qui subissent un changement conformationnel très important pendant le processus de fusion, permettant d'ancrer le peptide de fusion dans la membrane de cellule afin de la déstabiliser. La protéine Spike est ancrée dans l'enveloppe virale *via* un domaine transmembranaire, et se termine à l'intérieur de la particule virale par une courte extrémité C-terminale palmitoylée. Enfin, cette protéine possède de nombreux motifs de N-glycosylation, impliqués dans la modulation de la reconnaissance par le système immunitaire (« shielding ») et les changements conformationnels liés au processus de fusion.

La protéine N (Nucléocapside) possède trois domaines distincts : un domaine N-terminal (NTD) impliqué dans l'interaction avec l'ARN viral, un domaine de liaison central non structuré, et un domaine C-terminal (CTD) impliqué dans la dimérisation des protéines N (58). Lors de la morphogenèse virale, les protéines vont s'assembler le long du génome (conformation en « collier de perles ») et faciliter son emballage au sein de la particule virale, tout en favorisant son bourgeonnement. La colocalisation de N avec le complexe réplicase indique également un rôle plus précoce, promoteur de la transcription des génomes viraux (59).

La protéine M (Membrane) possède trois domaines transmembranaires, et s'oligomérisent au sein des membranes du compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC) (60,61). Son rôle principal consiste à servir de plateforme d'assemblage des virions, en recrutant les trois autres protéines structurales autour d'elle et en augmentant la courbure des membranes lors du bourgeonnement (cf. partie I.E.1.) (62).

Enfin, la protéine E (Enveloppe) est une petite protéine transmembranaire formant un canal ionique. Bien que facultative pour la réplication virale, la présence de la protéine E semble améliorer le processus d'assemblage des particules virales, en favorisant la courbure des membranes en synergie avec la protéine M (cf. partie I.E.1.). Elle agit aussi probablement comme une viroporine, en induisant une dépolarisation membranaire favorable au processus de fission des membranes lors du bourgeonnement. Elle joue aussi un rôle direct dans la pathogenèse virale, notamment par l'activation de l'inflammasome (63,64). Enfin, il a été montré pour le SARS-CoV et le SARS-CoV-2 que la protéine E pouvait former un complexe avec la protéine membranaire PALS1, qui participe à la formation des jonctions cellulaires. Cela entraîne la déstabilisation des jonctions serrées, perturbant la polarité des épithélium infectés et contribuant ainsi à la diffusion du virus à travers les barrières de l'organisme (65,66).

d. Protéines accessoires

Au-delà des protéines structurales, les ARN sous-génomiques synthétisés à partir de l'extrémité 3' du génome du SARS-CoV-2 codent 11 protéines accessoires. Certaines de ces protéines possèdent leur propre cadre de lecture (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF10), d'autres ont émergé par chevauchement au sein d'une séquence codante déjà existante (« novel overlapping ») à l'image de ORF3b et ORF3d, ou par décalage du cadre de lecture (« leaky scanning ») lors de la traduction (ORF9b dans la séquence de la N). Ces protéines sont donc liées à l'histoire évolutive des *Coronaviridae*,

la disparition ou l'émergence d'une nouvelle protéine accessoire caractérisant souvent l'espèce virale émergente. Bien que majoritairement facultatives pour la réplication virale, elles interfèrent avec de nombreux facteurs cellulaires et immunitaires, et jouent ainsi un rôle de premier plan dans la virulence et la pathogenèse du virus (67). En particulier, plusieurs protéines accessoires du SARS-CoV-2 interfèrent avec la réponse interféron de type I, comme cela est évoqué dans les revues de Sa Ribero *et al.* (68) et Jouvenet *et al.* (69). Il est important de noter que de nombreuses inconnues persistent à ce jour concernant la structure et/ou la fonction de certaines protéines accessoires.

ORF3a est une protéine transmembranaire structurée comme une viroporine, et la plus volumineuse des protéines accessoires (275 aa). Elle détourne plusieurs mécanismes cellulaires essentiels, avec la capacité d'induire l'apoptose *via* la voie extrinsèque, par l'activation de la caspase 8 (70). Elle perturbe également la voie lysosomale, affaiblissant ainsi l'activité d'autophagocytose de la cellule et en favorisant l'évasion lysosomale des virions néoformés (71). Elle est également impliquée dans la génération de l'orage cytokinique observé dans les formes sévères de COVID-19, en induisant notamment la sécrétion d'IL-1 β et l'activation de la voie NF- κ B (72).

ORF3b est une très petite protéine (22 aa), bien plus courte que son homologue exprimée par le SARS-CoV (153 aa). Il a été montré que cette protéine est un puissant antagoniste de la voie de l'interféron de type I, plus efficacement que lors d'une infection au SARS-CoV (73). Sur le plan phylogénétique, cette délétion de la protéine ORF3b est retrouvée chez des virus de chauve-souris et de pangolins apparentés au SARS-CoV-2. ORF3d est une innovation récente présente chez le SARS-CoV-2, qui semble interagir avec certaines protéines mitochondriales (74).

ORF6 et ORF7a sont également deux antagonistes de la voie de l'interféron de type I, par des mécanismes différents. ORF6 a la capacité de bloquer l'import du facteur de transcription STAT du cytoplasme vers le noyau, inhibant la transcription des gènes liés à l'interféron (75). ORF7a utilise probablement l'ubiquitination pour augmenter sa capacité à inhiber l'IFN-I (76).

L'expression d'ORF8, une protéine sécrétée et structurée sous-forme de domaines Ig-like, est une caractéristique unique du SARS-CoV-2 (77). A l'image de la protéine N et de ORF3d, ORF8 génère une des plus puissantes réponses anticorps spécifiques, parmi tous les antigènes du virus (78). La délétion de l'ORF8 chez certains variants entraîne une diminution de la sévérité clinique de l'infection chez les patients, avec une hypoxie moins importante et un relargage de cytokines inflammatoires moins

élevé (79). Elle semble être un immunomodulateur très efficace, en diminuant la réponse IFN-I, et en interagissant avec la présentation du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (80).

La protéine ORF9b a également la capacité d'inhiber la voie de synthèse de l'IFN de type I, en formant un complexe avec la protéine mitochondriale TOM70 (81). Enfin, il a été montré que la protéine ORF10 inhibe la réponse immunitaire innée *via* l'induction de la mitophagie, par la dégradation de la protéine MAVS (76).

4. Cycle de réplication

L'étape initiale du cycle du SARS-CoV-2 (**Figure 10**) est celle de la rencontre entre la particule virale et les molécules glycosylées présentes à la surface d'une cellule permissive pour l'infection, utilisées comme facteurs d'attachement (82,83). La liaison s'effectue par le biais d'interactions électrostatiques entre le glycanes (ex : HSPG), chargé négativement, et le RBD de la protéine Spike qui comporte un motif fortement électropositif. Ce motif d'interaction avec les molécules glycosylées est adjacent mais distinct du RBM, impliqué dans l'interaction avec le récepteur primaire ACE2, les deux liaisons n'étant donc pas mutuellement exclusives.

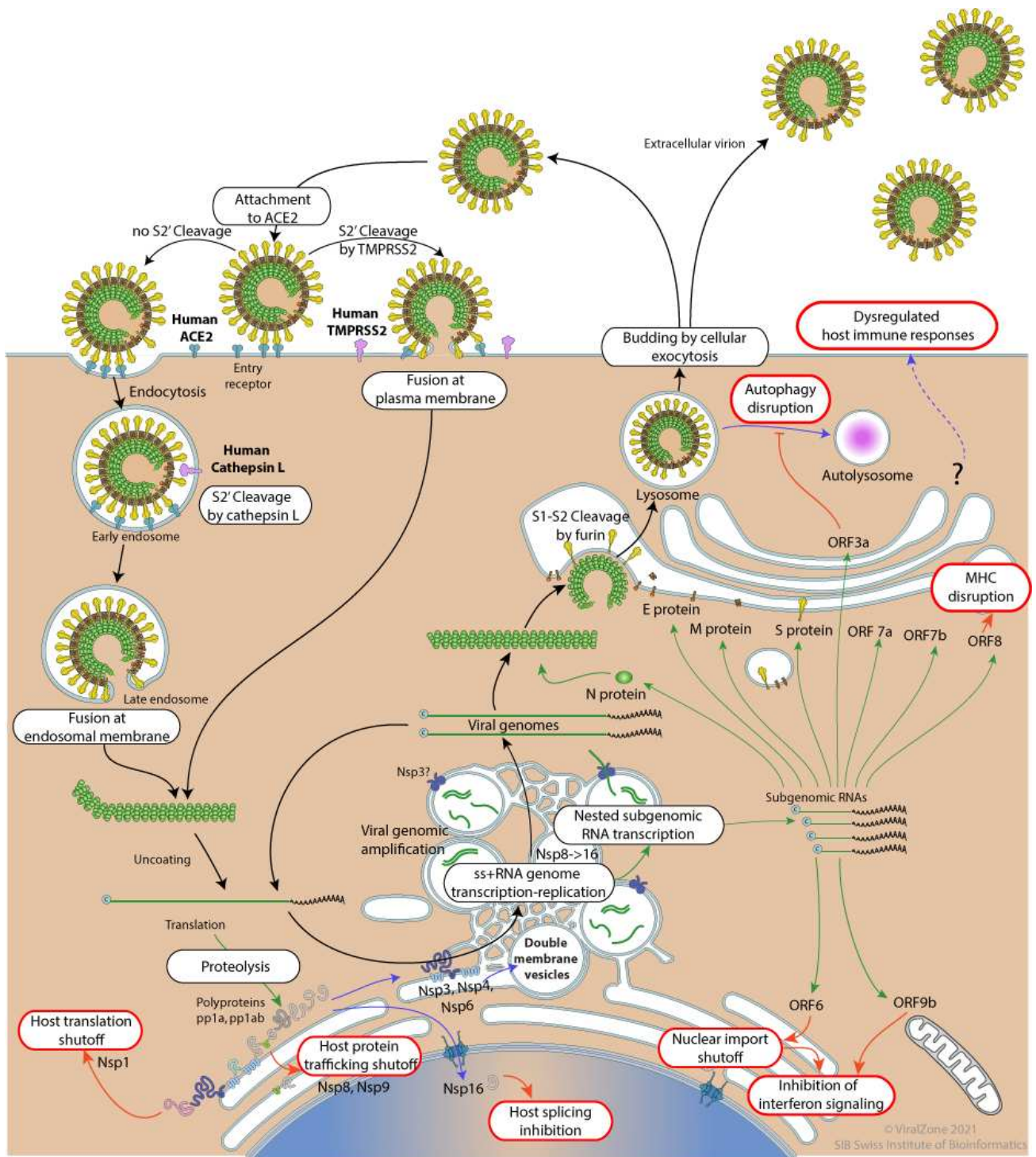


Figure 10 : Cycle viral du SARS-CoV-2

Les interactions entre le virus et la cellule hôte sont entourées en rouge.

(<https://viralzone.expasy.org/>, SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

L'ACE2 a été récemment identifié comme récepteur primaire d'entrée du SARS-CoV-2. Cette protéine transmembranaire s'organise sous forme de dimère à la surface des cellules, sur lequel un exemplaire de protéine Spike (parmi les trois

exemplaires de l'homotrimère) va reconnaître le domaine peptidase situé en N-terminal de la protéine (**Figure 11**). Le processus de fusion nécessite une étape d'amorçage (« priming protease »), par le clivage protéolytique de la protéine Spike (84,85).

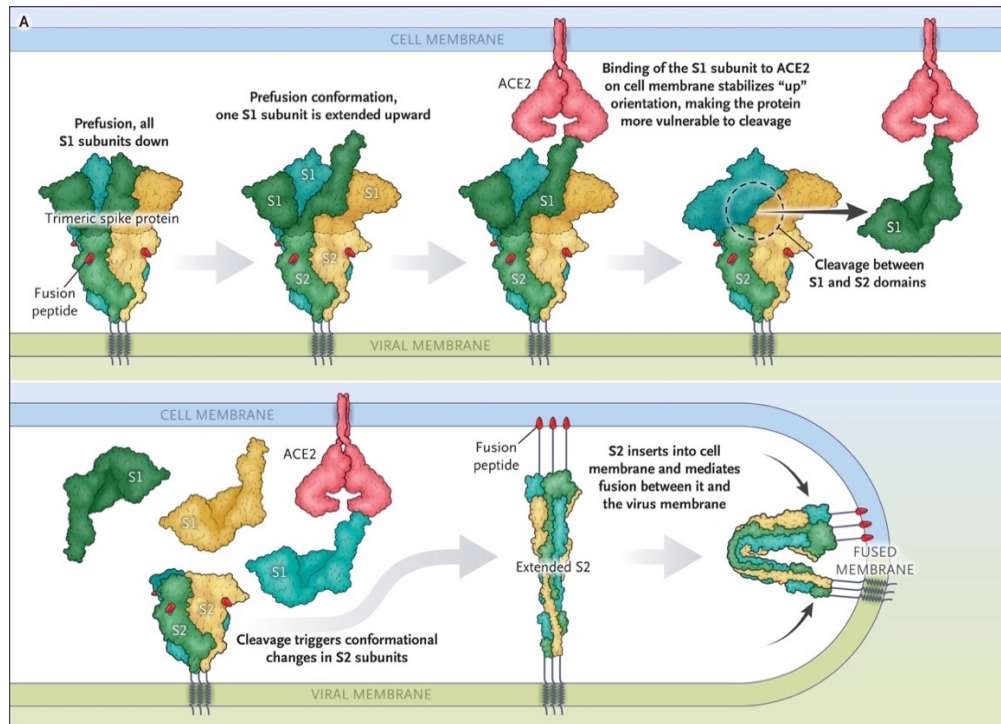


Figure 11 : Processus de fusion de la particule virale du SARS-CoV-2 et changement conformationnel de la protéine Spike

(Sasisekharan R., N Engl J Med. 22 avr 2021;384(16):1568-71.)

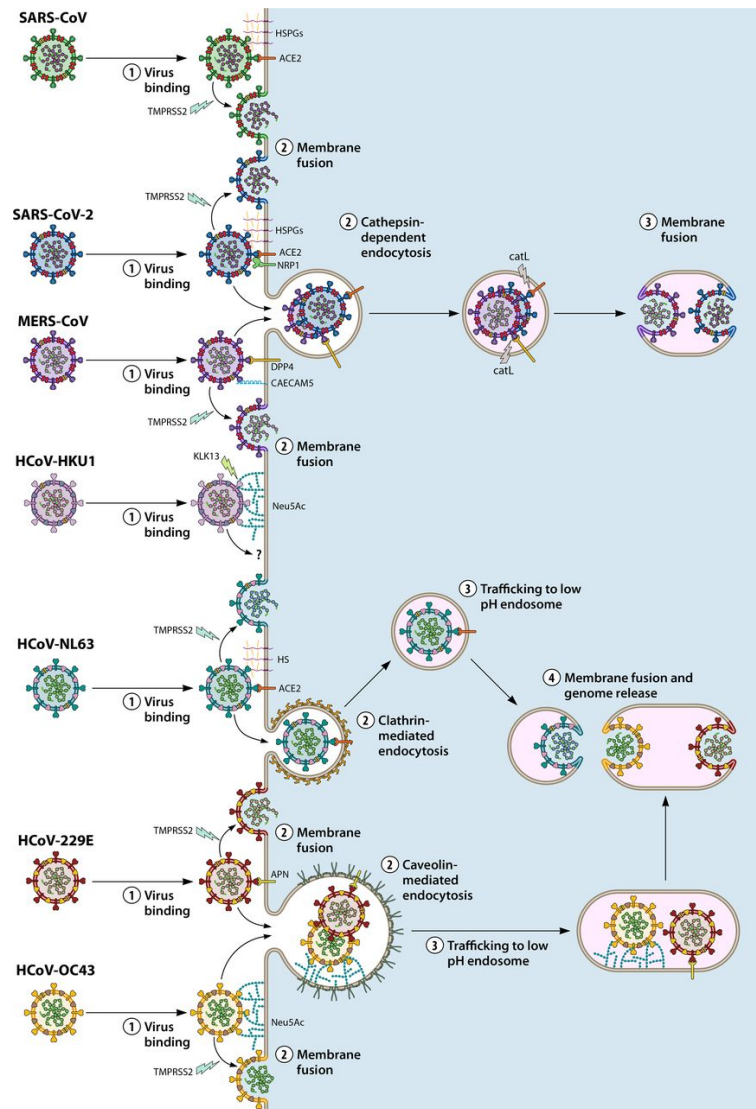


Figure 12 : Mécanismes et voies d'entrée des coronavirus humains

HSPG : heparan sulfate proteoglycans; Neu5Ac : N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid; CEACAM5 : carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5; APN : aminopeptidase N ; DPP4 : dipeptidyl peptidase 4 ; NRP1 : neuropilin 1; KLK13 : kallikrein 13 ; cathepsin L : catL (Synowiec A, Clin Microbiol Rev. 2021 Jan 13;34(2):e00133-20.)

Par rapport aux autres coronavirus humains, le SARS-CoV-2 se distingue par un site de clivage par la furine S1/S2, clivage qui sera réalisé dans un premier temps et en extracellulaire. L'exposition du peptide de fusion nécessite un deuxième clivage (« activating protease ») au niveau du site S2', l'enzyme compétente variant en fonction de la voie d'entrée (**Figure 12**), comme cela a été montré pour le clivage par la furine de la Spike du SARS-CoV, par Belouzard *et al.* (84). Il peut aussi être effectué par la protéase à sérine transmembranaire TMPRSS2, d'emblée à la surface de la cellule, médiant une fusion directe à la membrane plasmique de la particule virale. En l'absence de clivage par TMPRSS2, la particule virale sera endocytée, et le clivage aura lieu secondairement dans

l'endosome par une protéase intracellulaire (cathepsine B ou L), induisant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale. Le clivage protéolytique de la protéine Spike entraîne un changement conformationnel majeur, conduisant à l'ancrage du peptide de fusion dans la membrane plasmique ou endosomale, puis au rapprochement des membranes cellulaires et virales initiant la formation du pore, précédant la fusion.

Finalement, pour les coronavirus, les voies d'entrée et les mécanismes mis en jeu varient selon l'espèce considérée : par fusion directe à la membrane plasmique, ou par internalisation *via* l'endocytose (dépendante de la clathrine ou de la cavéoline) puis fusion à la membrane de l'endosome (**Figure 12**). Ces deux voies ne sont pas mutuellement exclusives chez une même espèce virale. Concernant le SARS-CoV-2, la souche sauvage et le variant Delta rentrent dans la cellule préférentiellement par fusion directe, là où le variant Omicron rentre par endocytose. Ces différences pour l'étape d'entrée virale peuvent en partie expliquer les différences de tropisme et de physiopathologie observées entre ces variants.

La libération du génome viral dans le cytoplasme puis sa décapsidation, sont suivies par la traduction de l'ORF1a et ORF1b, présentes sur l'ARN viral de polarité positive, en polyprotéines (pp1a et pp1ab) (86). Les deux polyprotéines sont ensuite clivées par les protéases virales NSP3 et NSP5 en 16 protéines non structurales matures. Une fois le clivage effectué, la protéine NSP1 va cibler la machinerie cellulaire dédiée à la traduction, en se couplant aux sous-unités ribosomales pour favoriser la traduction des ARN viraux au détriment des ARN cellulaires (53). En parallèle, les protéines NSP3, NSP4 et NSP6 s'insèrent dans les membranes du RE, et en modifient la courbure pour générer des organites de réplication virale (« viral replication organelles »), principalement des DMVs, au sein d'un réseau de membranes convolutées (CMs) (cf. partie I.D.1.f.i.) (38,87). Les DMVs fournissent au virus un environnement compartimenté favorable à la réplication et probablement protégé des senseurs de l'immunité cellulaire innée présents dans le cytoplasme. Les protéines NSP7, NSP8, NSP12 et NSP13 s'assemblent ensuite pour former le complexe de réplication-transcription (RTC), en s'insérant dans les membranes des DMVs (cf. partie I.D.2.b.ii.) (88,89). Les ARN viraux néosynthétisés sortent ensuite des DMVs par des pores moléculaires viraux, constitués de protéines NSP3 (cf. partie I.D.2.b.iii.), pour rejoindre le cytoplasme.

La réplication virale commence, à partir du génome viral de polarité positive, par la synthèse de l'ARN génomique de polarité négative, ce nouveau brin servant à son

tour de matrice pour la génération de nouveaux génome viraux de polarité positive (**Figure 13**).

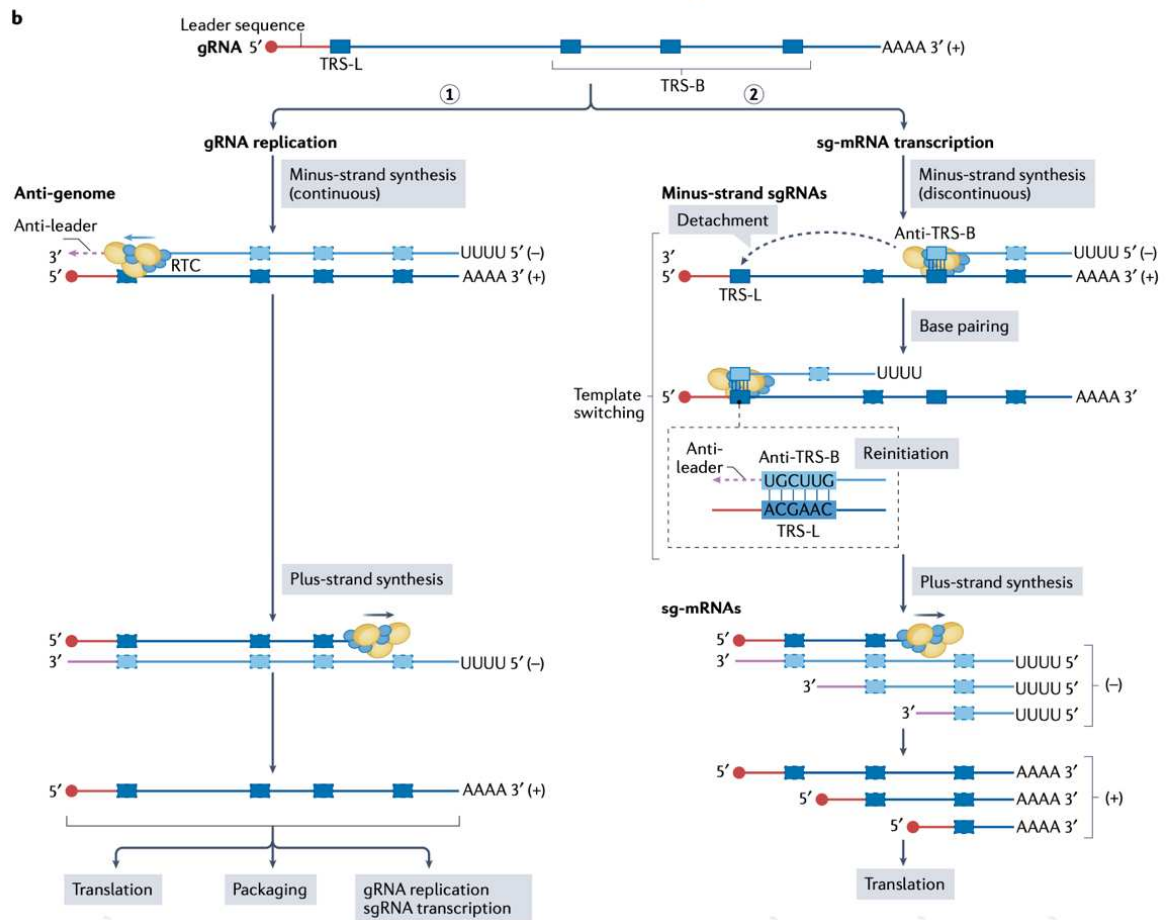


Figure 13 : Mécanismes de réplication et de transcription du SARS-CoV-2

gRNA: genomic RNA, sgRNA : subgenomic RNA, TRS : transcription regulatory sequence

(Malone B et al., Nat Rev Mol Cell Biol. janv 2022;23(1):21-39.)

Ces génomes seront ensuite empaquetés dans les virions en formation. En parallèle de la réplication des génomes viraux, la synthèse des ARN sous-génomiques s'effectue par un mécanisme original de transcription discontinue ou nichée (« nested / discontinuous transcription ») (90). C'est d'après ce mécanisme original de transcription nichée que l'ordre des *Nidovirales* a été nommé. Au sein des séquences codant les protéines structurales, chaque ORF comporte en 5' une séquence de régulation transcriptionnelle (TRS), qui a pour fonction de rediriger la polymérase virale vers un autre site présent sur l'ARN, et de servir d'amorce pour poursuivre l'élongation du brin en cours de synthèse. Les TRS présents au sein des séquences codant les ARN sous-génomiques sont nommés « TRS-Body » (TRS-B), tandis que le TRS présent en 5' du génome viral est nommé « TRS-Leader » (TRS-L) (**Figure 13**). Lors de la synthèse du brin de polarité négative

d'un ARN sous-génomique, la transcription est interrompue lorsque la polymérase rencontre un TRS-B. La polymérase peut ensuite soit réinitier la transcription jusqu'au TRS-B suivant, soit se détacher de l'ARN génomique. Après ce détachement, la complémentarité en base des TRS-B et TRS-L permet ensuite au brin négatif en cours de synthèse de s'hybrider avec la polymérase sur le TRS-L (« template switching »), et finir l'élongation par la synthèse de la courte séquence de tête (« leader sequence »). Enfin, les ARN sous-génomiques de polarité positive sont synthétisés à partir des brins de polarité négative, avant d'être traduits en protéines structurales ou accessoires. Ainsi, tous les ARN sous-génomiques, de longueurs variables, sont pourvus d'une séquence de tête similaire en 5', et d'une queue poly-A en 3'.

Une fois traduites par la machinerie cellulaire, les protéines structurales S, M, E et N s'ancrent dans les membranes du RE, puis transitent par le ERGIC au sein duquel les protéines N interagissent avec les génomes viraux néosynthétisés (cf. partie I.E.1.) (91). Les virions bourgeonnent ensuite dans la lumière de vésicules apparentées au ERGIC avant d'être sécrétés, par un mécanisme encore mal compris, hors de la cellule (cf. partie I.E.2.).

5. Dynamique évolutive et variants

Bien que son taux de mutation soit plus bas que ceux des autres virus à ARN, le nombre très important d'infections par le SARS-CoV-2 à l'échelle mondiale, a rapidement conduit à une divergence des séquences des virus circulants à partir de la souche initiale. Bien que ces mutations surviennent partout dans le génome, celles qui concernent la séquence codant la protéine Spike peuvent avoir un effet majeur sur la transmissibilité, notamment en modifiant les interactions avec le récepteur d'entrée virale. La description de nouveaux variants est donc principalement basée sur la combinaison de mutations situées dans cette séquence. Les variants préoccupants (VOC), désignés par l'OMS par une lettre grecque, sont porteurs de mutations formellement identifiées comme modifiant la transmissibilité, la sévérité de l'infection, et/ou l'efficacité des outils prophylactiques et thérapeutiques (échappement aux vaccins et aux anticorps monoclonaux). Le regroupement de variants issus d'un même ancêtre commun forme une lignée, dont la nomenclature est régie par le système PANGOLIN (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages). Du fait de l'augmentation de la transmissibilité des variants, l'histoire évolutive du SARS-CoV-2 s'explique par une

compétition pour l'hôte entre les différentes souches circulantes, avec des événements de remplacement du variant majoritaire par un nouveau variant plus contagieux (**Figure 14**).

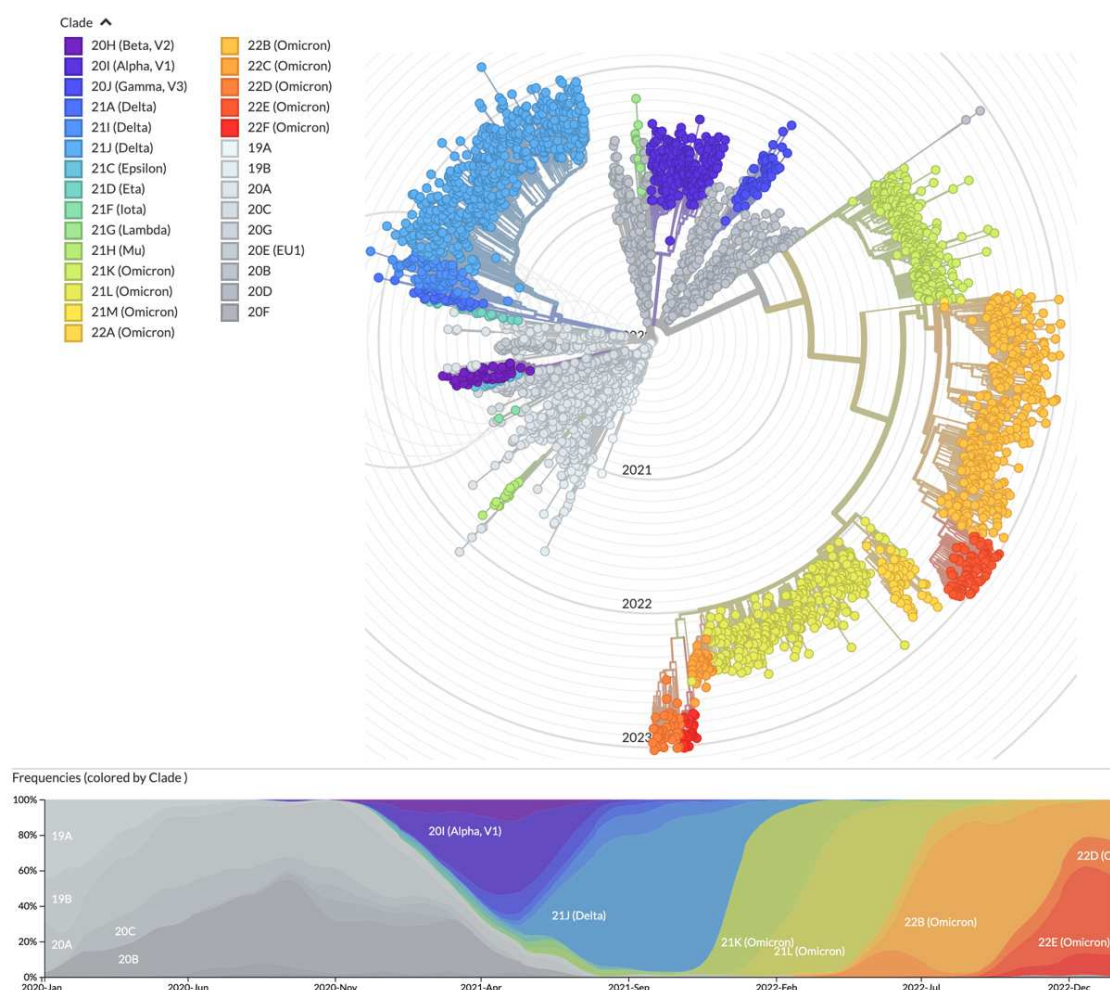


Figure 14 : Phylogénie et fréquences relatives des variants du SARS-CoV-2 parmi les souches circulantes (Janvier 2020 - Janvier 2023)

La souche sauvage Wuhan est représentée en gris, et les sous-variants d'Omicron en vert/ jaune / orange / rouge. Les autres variants sont représentés en violet / bleu.

(<https://gisaid.org/phylogenetics/global/nextstrain/>)

Si lors des premiers mois de la pandémie, l'histoire évolutive du virus présentait une certaine stabilité, la fin de l'année 2020 a vu l'émergence de deux nouveaux variants préoccupants à partir de zones géographiques distinctes. Le variant Alpha (lignée B.1.1.7) a été identifié au Royaume-Uni en décembre 2020 (92), porteur de 8 mutations dans la Spike (**Figure 15**), dont la mutation N501Y située dans le RBD qui augmente l'affinité pour le récepteur ACE2 et l'entrée dans les cellules (93,94).



Figure 15 : Domaines de la protéine Spike et mutations caractérisant les variants préoccupants (VOC) du SARS-CoV-2 (Janvier 2023)

Les flèches rouges en pointillés indiquent l'apparition d'un sous-lignage.

(<https://viralzone.expasy.org/>, SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

Ce variant a été estimé entre 43 % et 82 % plus transmissible que la souche sauvage, et est devenu majoritaire dans le monde en mai 2021. Le variant Béta (lignée B.1.351) a été pour la première fois identifié en Afrique du Sud en octobre 2020 (95) et comportait 8 mutations dans la Spike, dont 3 situées dans le RBD (K417N, E484K, et N501Y), également identifiées comme augmentant son affinité pour ACE2. En dehors d'une plus grande transmissibilité de ce variant, il a aussi été mis en évidence une résistance accrue aux anticorps neutralisants (96). Ces deux variants ont rapidement été supplantés par le variant Delta (lignée B.1.617.2), identifié pour la première fois dès octobre 2020 en Inde (97) et porteur de 10 mutations dans la Spike. Plus transmissible encore que les précédents variants, et de nouveau à l'origine d'une diminution de l'efficacité vaccinale en particulier

chez les patients n'ayant pas reçu de dose de rappel, il va s'imposer pour devenir le variant majoritaire dans le monde en septembre 2021. Les variants Alpha, Béta et Delta ont pour point commun d'être porteurs de la mutation D614G de la Spike, identifiée comme un élément déterminant de l'augmentation de la transmissibilité de ces souches, en stabilisant la structure de la Spike et en favorisant son interaction avec la protéase TMPRSS2 (98,99). Enfin, une étape majeure de l'évolution du SARS-CoV-2 a été franchie avec l'émergence du variant Omicron (lignée B.1.1.529) identifié en Afrique du Sud en novembre 2021. Son génome diverge clairement des variants qui l'ont précédé, notamment du fait de nouvelles mutations situées dans les séquences codant les quatre protéines structurales du virus, dont la protéine de nucléocapside, ainsi que de nombreuses mutations des protéines non structurales (100). Des modélisations ont estimé sa contagiosité comme 10 fois plus importante que la souche sauvage, et environ 2,8 fois plus contagieux que le variant Delta (101), remplaçant ce dernier à l'échelle mondiale en seulement deux mois. En outre, l'immunité conférée par les précédents variants semble perdre en efficacité, augmentant considérablement le nombre de réinfections (102). L'évolution rapide de ce nouveau variant a conduit à l'émergence de sous-lignées, la sous-lignée BA.1 initiale étant remplacée par la BA.2, puis à l'été 2022 par les sous-lignées BA.4 et BA.5. Vis-à-vis de ces deux dernières sous-lignées, les vaccins et les anticorps monoclonaux utilisés jusque-là présentaient une efficacité fortement réduite (103), ce qui a conduit à la mise au point de vaccins bivalents Wuhan et Omicron (cf. partie I.B.6.). La sous-lignée BA.2 a évolué en sous-variant BA.2.75, détecté en Inde en mai 2022. Enfin, le sous-variant XBB.1.5 issu d'une recombinaison entre le BA.2.75 et le BA.2.10.1, est de nouveau plus transmissible que ses prédécesseurs, et devenu majoritaire aux USA en janvier 2023.

B. Maladie à coronavirus 2019 (COVID-19)

1. Épidémiologie

Le SARS-CoV-2 est un virus à transmission respiratoire interhumaine, par le biais de gouttelettes ou d'aérosols (104). Il existe également des arguments en faveur d'une transmission par le biais de fomites (105) ou par voie féco-orale (106). Concernant les fomites, plusieurs études ont démontré la persistance du virus dans l'environnement parfois plusieurs jours, sur des surfaces en plastique ou métalliques (105,107). La diffusion rapide du virus à l'échelle mondiale avec la mise en défaut des premières

mesures barrières, s'explique probablement par une réplication intense et précoce dans le nasopharynx des patients infectés, à l'origine d'une contagiosité survenant environ 2 jours avant l'apparition des symptômes. Ainsi, certains patients encore asymptomatiques mais déjà contagieux ont pu passer au travers des mesures d'isolement pourtant mises en place précocement. A l'inverse, la diffusion limitée du SARS-CoV en 2002-2003 s'expliquait probablement par une contagiosité survenant après le début des symptômes, facilitant l'isolement des patients contagieux car symptomatiques (**Figure 20**) (108). Depuis son émergence en Chine fin 2019, le SARS-CoV-2 a diffusé à l'ensemble des pays du globe en avril 2020 (**Figure 16**).

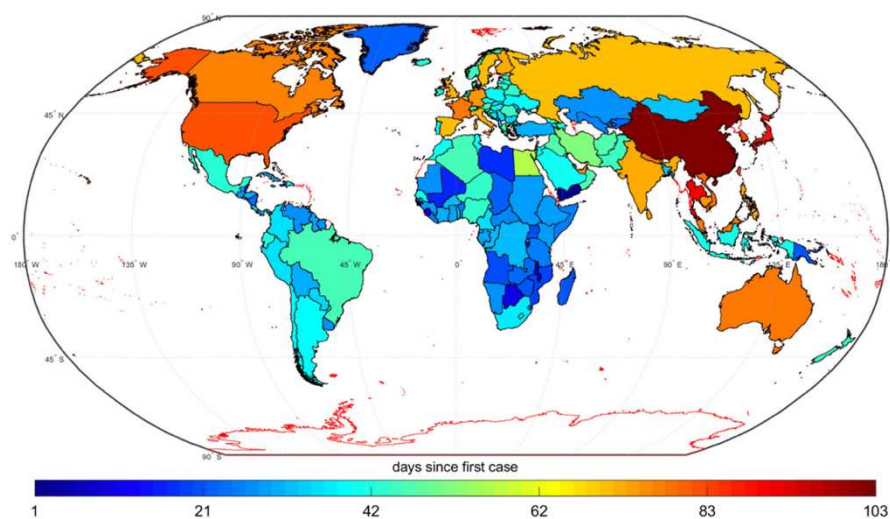


Figure 16 : Chronologie de l'apparition des premiers cas de COVID-19 par pays, et de la diffusion du SARS-CoV-2 à l'échelle mondiale

La couleur des pays correspond au nombre de jours depuis l'apparition du premier cas de COVID-19 en Chine. Les pays colorés en rouge / orange ont été les premiers touchés, les pays en bleu les derniers touchés.

(Machado JAT, Lopes AM., Nonlinear Dyn. 1 mai 2020;100(3):2953-72.)

Depuis lors, dans son bulletin épidémiologique du 11 janvier 2023, l'OMS a estimé le nombre de cas à 659 millions depuis le début de la pandémie, et le nombre de décès à environ 6,6 millions. Les pays les plus touchés sont les États-Unis (1 127 000 décès), le Brésil (695 000 décès) et l'Inde (530 000 décès) (**Figure 17**). La Chine fait probablement aussi partie des pays les plus touchés, mais aucun chiffre officiel ne permet de s'en assurer.

Concernant la survenue d'une forme sévère de COVID-19, il a été montré une association claire avec les caractéristiques suivantes : obésité, pathologie cardiaque ou

respiratoire préexistante, insuffisance rénale chronique, diabète, cancer, immunodépression, sexe masculin, âge > 65 ans, grossesse (109,110).

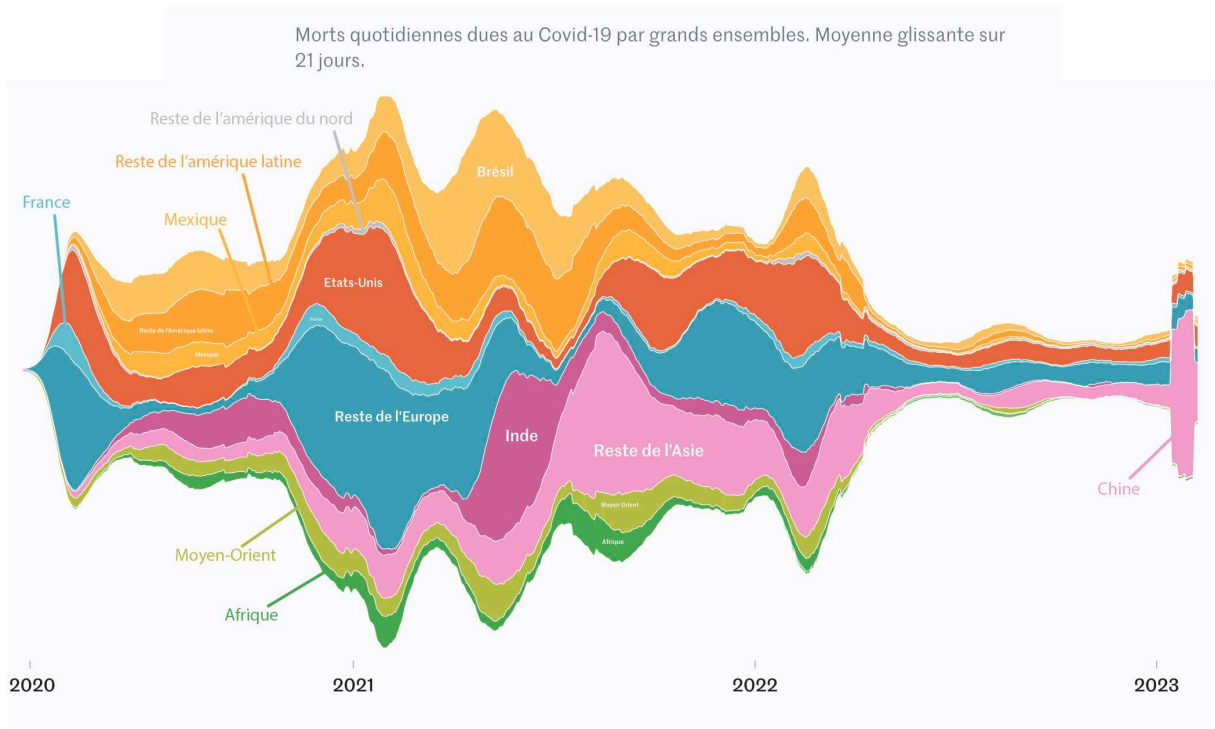


Figure 17 : Évolution du nombre de décès quotidiens liés au COVID-19 par zones géographiques (2020 - 2023)

(<https://www.lemonde.fr/les-decodeurs/article/2022/06/29/covid-19-le-tableau-de-bord-de-l-epidemie>)

2. Physiopathologie

L'entrée du SARS-CoV-2 dans une cellule hôte s'effectue par le biais de l'interaction de la protéine Spike et du récepteur primaire ACE2. Cette protéine cellulaire transmembranaire est une enzyme jouant un rôle essentiel dans le système rénine - angiotensine - aldostérone, une cascade endocrinienne de régulation de la pression artérielle et de l'homéostasie hydrosodée. De fait, l'ACE2 est exprimé dans de nombreux organes et types cellulaires : cellules épithéliales du tractus respiratoire (cellules ciliées, cellules à mucus, pneumocytes de types I et II), entérocytes du duodénum et de l'iléon, cellules épithéliales du tube proximal du rein, cellules myocardiques, cellules endothéliales capillaires et des gros vaisseaux (**Figure 18**) (111).

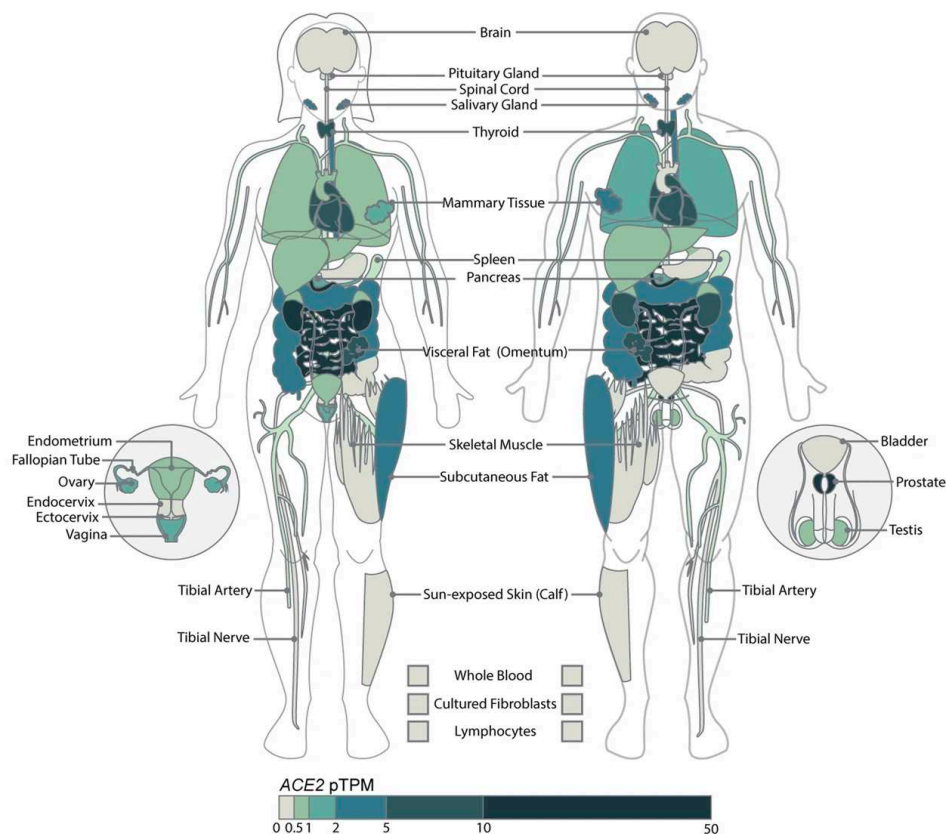


Figure 18 : Niveau d'expression d'ACE2 dans l'organisme humain par organe

Médiane du niveau d'expression mesuré par séquençage de l'ARN, en pTPM (protein-transcripts per million). (Ong, S.Y.Q., Exp Mol Med 53, 483–494 (2021).)

L'infection par le SARS-CoV-2 peut ainsi avoir des conséquences vasculaires en entraînant des dommages sur les cellules endothéliales exprimant l'ACE2. Cette action pro-inflammatoire et pro-thrombotique passe par la génération de thrombine, l'inhibition de la fibrinolyse et l'activation de la cascade du complément, menant à la formation de microthrombi dans plusieurs organes (poumon, rein, foie, myocarde...) (112,113). L'activation des polynucléaires neutrophiles entraîne la formation de « neutrophil extracellular traps » (NETs) qui majorent l'activation de la coagulation et les dommages endothéliaux (114). Au cours d'un COVID-19 sévère, l'atteinte systémique et multi-organe est également favorisée par une hyperactivation du système immunitaire avec le recrutement de monocytes et de polynucléaires neutrophiles (115). Ces cellules inflammatoires sécrètent massivement des cytokines ($\text{TNF } \alpha$, GM-CSF, IL-1, IL-6, IFN- γ ...) à l'origine d'un véritable « orage cytokinique » (**Figure 19**).

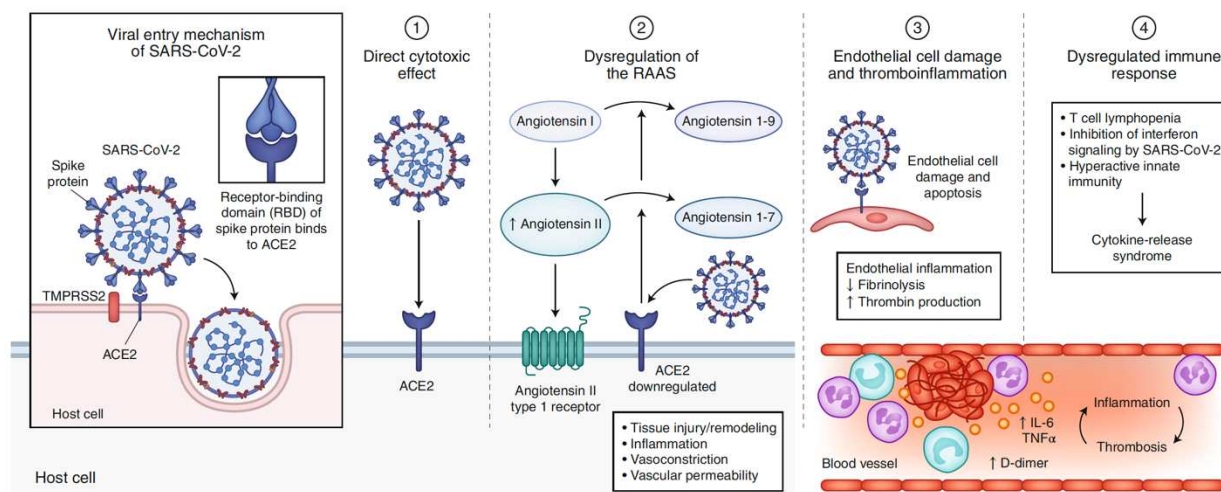


Figure 19 : Physiopathologie du COVID-19

(Gupta, A., Nat Med 26, 1017–1032 (2020))

Ainsi, si les formes bénignes de COVID-19 se manifestent uniquement au niveau respiratoire, les formes sévères doivent être vues comme une véritable pathologie systémique avec une atteinte multi-organe. L'expression d'ACE2 dans de nombreux types cellulaires de l'organisme pose la question de la réplication virale potentielle dans les organes touchés, se surajoutant à des mécanismes inflammatoires et de microthromboses indirects avérés.

3. Atteinte respiratoire et symptomatologie

Les premières cellules ciblées par le SARS-CoV-2 lors d'une infection naturelle semblent être les cellules ciliées du nasopharynx ou de la trachée (116). Ainsi, le site primaire d'infection est le plus souvent situé au niveau de la sphère respiratoire haute. Une première réponse immunitaire locale va se mettre en place : détection des ARN viraux par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs, notamment le MDA5) des cellules ciliées entraînant la sécrétion d'interférons (type I et III) et de chimiokines (117,118). Cette réponse est amplifiée par les cellules épithéliales voisines et les cellules immunitaires résidentes (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques) activées de manière paracrine, ou *via* les TLRs endosomaux des cellules inflammatoires (119). Lors de cette phase initiale, les premiers symptômes surviennent entre 4 et 5 jours après l'infection (**Figure 20**), avec l'apparition d'une toux, d'une fièvre, de céphalées et de myalgies.

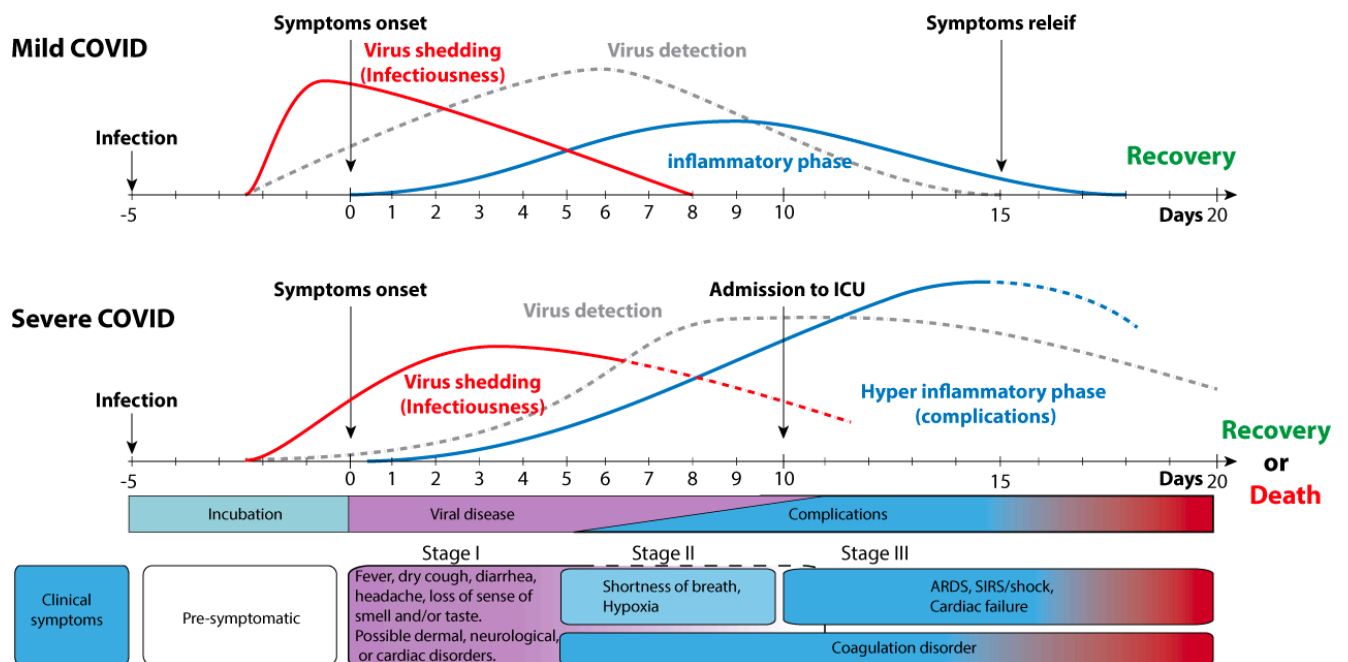


Figure 20 : Cinétique de l'infection par le SARS-CoV-2 et sévérité du COVID-19

<https://viralzone.expasy.org/>, SIB Swiss Institute of Bioinformatics

Chez les patients présentant une forme légère ou intermédiaire de COVID-19, l'infection est spontanément résolutive avec une disparition complète des symptômes dans les 15 jours suivant l'infection. En revanche chez les patients présentant une forme sévère de COVID-19, l'absence de clairance de l'infection virale par la réponse immunitaire initiale (réponse IFN-I/III trop faible et retardée) permet au virus de disséminer à l'ensemble du tractus respiratoire de manière descendante, en infectant majoritairement les cellules ciliées bronchiques. L'infection de ces cellules a probablement pour conséquence une diminution de la clairance muco-ciliaire, avec une stase des sécrétions respiratoires favorisant la diffusion du virus en distalité de l'arbre bronchique (120). Une fois l'alvéole atteinte, le virus infecte en priorité les pneumocytes de type II (121) dont la mort cellulaire entraîne une destruction de l'épithélium alvéolaire. Ces dommages alvéolaires initient la survenue d'un syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA), cliniquement caractérisé par une hypoxémie sévère, associée à des opacités pulmonaires bilatérales à l'imagerie thoracique. Le SDRA survient généralement 10 jours après le début des symptômes. Sur le plan tissulaire, le SDRA est caractérisé par la survenue de dommages alvéolaires diffus en suivant trois phases : exsudative, proliférative et fibrotique. La phase exsudative est définie par la formation d'un œdème interstitiel et intra-alvéolaire (**Figure 21**).

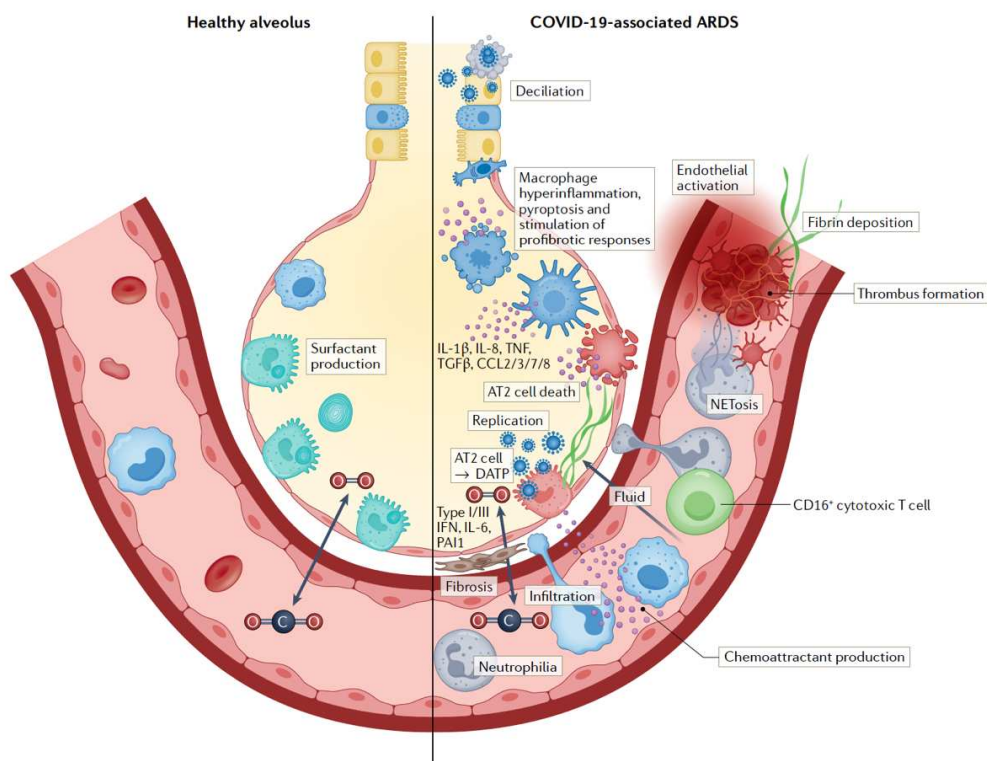


Figure 21 : Mécanismes à l'origine du SDRA lié au COVID-19

AT2 : alveolar type 2 epithelial cell

(Lamers, M.M., Nat Rev Microbiol 20, 270–284 (2022).)

Lors de cette phase, la destruction par le SARS-CoV-2 de l'épithélium alvéolaire et de l'endothélium capillaire sous-jacent entraîne l'exposition du facteur tissulaire avec le plasma, activant la cascade de la coagulation (122). Ce processus est à l'origine de la formation de membranes hyalines, exsudats riches en fibrine qui vont limiter les échanges gazeux au niveau de la barrière alvéolo-capillaire. L'activation de la coagulation génère également des microthrombi dans les capillaires pulmonaires qui vont migrer dans la circulation, responsables de complications thrombotiques extra-respiratoires. L'interaction du virus avec le récepteur ACE2 entraîne la diminution de son activité enzymatique et l'activation de la voie kinine-kallicréine, augmentant la perméabilité vasculaire (123,124). D'autre part, la libération de médiateurs de l'inflammation et de substances vasoactives par les cellules immunitaires entraîne le relâchement des jonctions cellulaires inter-endothéliales. Ces deux mécanismes favorisent la fuite vasculaire génératrice de l'œdème alvéolaire. Enfin, la destruction des cellules épithéliales libère des substances chimio-attractantes, entraînant le recrutement de monocytes/macrophages et de polynucléaires neutrophiles dans l'alvéole. Les macrophages présentent un

phénotype pro-inflammatoire et participent à l'orage cytokinique par la sécrétion d'IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-6, TNF α et GM-CSF (125). L'infection abortive de macrophages par le SARS-CoV-2 est probablement à l'origine de l'activation de la pyroptose et des acteurs de l'inflammasome (126). De plus, il a été montré un déficit de la réponse lymphocytaire T dans le cadre de la survenue d'un SDRA (127). La phase proliférative du SDRA lié au COVID-19 est caractérisée par une hyperplasie des pneumocytes de type II, associée à une anomalie de différenciation de ces cellules en pneumocytes de type I (phénotype de « damage associated transient progenitors ») (128,129). Cette prolifération est donc inefficace pour réparer les dommages alvéolaires générés lors de la phase exsudative. Enfin, la phase fibrotique du SDRA est caractérisée par une prolifération de fibroblastes, majorée par la présence de macrophages de phénotypes pro-fibrotique, avec le remplacement du parenchyme alvéolaire par de la matrice extracellulaire (130). L'importance de la fibrose semble corrélée à la durée d'une forme sévère de COVID-19, et mène chez ces patients à une insuffisance respiratoire chronique.

4. Atteinte extra-respiratoire

a. Rein

Le COVID-19 est associé chez de nombreux patients à la survenue d'une insuffisance rénale aigüe, qui est la manifestation extrapulmonaire la plus souvent rencontrée (**Figure 22**) (131,132). Cette insuffisance rénale est probablement multifactorielle. Le premier mécanisme serait lié à une endothélite lymphocytaire à l'origine d'une dysfonction et de lésions de la microcirculation rénale (112). Le second mécanisme mettrait en jeu des lésions glomérulaires d'origine immunitaire liées à la formation de complexes immuns viro-induits (133). La question d'une cytotoxicité directe du virus infectant certains types cellulaires du rein se pose. En effet, plusieurs types cellulaires expriment l'ACE2, notamment les podocytes, les cellules épithéliales pariétales, et les cellules épithéliales tubulaires (134). Cette hypothèse est supportée par l'infection et la réplication du SARS-CoV-2 dans plusieurs lignées cellulaires d'origine rénale (Vero, HEK-293T...) (135). En revanche, l'observation de particules virales en microscopie électronique dans le tissu rénal post-mortem doit-être prise avec précaution, car certains éléments cellulaires peuvent-être identifiés à tort comme des virions (ex : vésicules recouvertes de clathrine, pores nucléaires...) (136,137). Enfin, d'autres facteurs systémiques liés au caractère sévère du COVID-19 peuvent participer à l'insuffisance

rénale aigüe : hypovolémie, utilisation de drogues néphrotoxiques, ou la survenue d'une rhabdomyolyse (138,139).

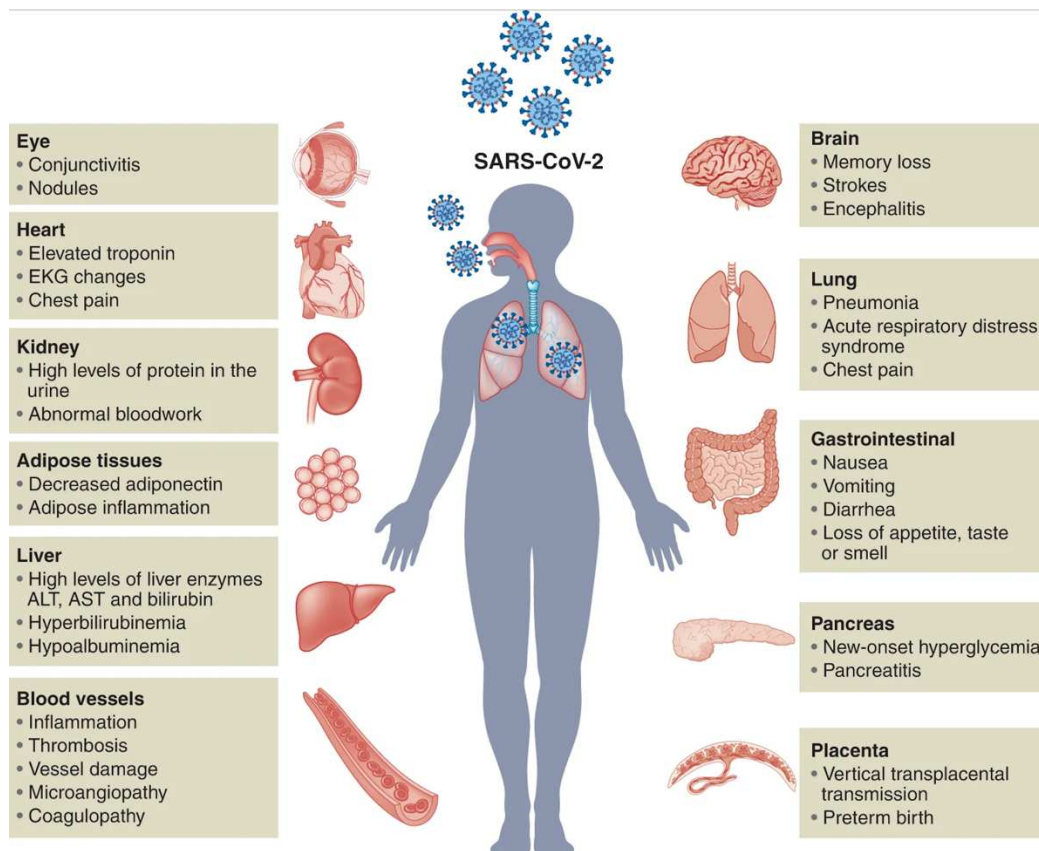


Figure 22 : Complications du COVID-19 par organe

(Han, Y., Nat Methods 19, 418–428 (2022).)

b. Cœur

La survenue d'une ischémie myocardique ou d'une myocardite sont deux manifestations fréquemment associées à un COVID-19, en particulier chez les patients présentant des facteurs de risque ou des antécédents cardio-vasculaires (140,141). À l'image de l'atteinte rénale, l'atteinte cardiaque dans ce contexte est probablement multifactorielle. Un effet direct du virus sur le tissu cardiaque est une hypothèse également supportée par l'expression d'ACE2 par plusieurs types cellulaires (cardiomyocytes, fibroblastes, péricytes, cellules endothéliales) (142,143). Il est probable que cette atteinte se fasse par le biais de l'infection des cellules endothéliales des vaisseaux cardiaques, avec une part inflammatoire liée à l'endothélite qui en résulte (112). Cependant, et bien que la présence d'ARN viral ait été détectée dans le myocarde de patients infectés (144), il n'existe pas de preuve suffisantes pour confirmer avec certitude une répllication virale au niveau cardiaque. Le relargage de médiateurs de l'inflammation

au cours du COVID-19, tels que l'IL-6, peut également contribuer à la survenue d'une myocardite (145). De même, l'état d'hypercoagulabilité, la génération de microthrombi et l'hypoxie, peuvent participer à la survenue d'une ischémie myocardique par atteinte de la circulation coronaire.

c. Système digestif

A l'image d'autres coronavirus humains, l'infection par le SARS-CoV-2 peut s'accompagner de symptômes digestifs non spécifiques (diarrhée, nausées/vomissement...) (146). Plusieurs éléments plaident en faveur d'un mécanisme direct d'infection virale dans les cellules digestives : le caractère permissif de cellules de lignées digestives (Caco-2, T84...) (147), la mise en évidence de la protéine de nucléocapside par immunofluorescence dans des biopsies digestives étagées (106), la forte expression d'ACE2 dans les cellules digestives notamment glandulaires (148), et la détection d'une excrétion virale parfois prolongée dans les selles des patients. *A minima*, la mise en évidence d'un infiltrat lympho-plasmocytaire dans le chorion duodénal et rectal de patients infectés est en faveur de l'origine inflammatoire des symptômes digestifs (106).

d. Système nerveux

Avant l'émergence du SARS-CoV-2, le caractère neuro-invasif du SARS-CoV et du MERS-CoV avait déjà été démontré. D'autre part, les patients avec un COVID-19 présentent plusieurs symptômes neurologiques non spécifiques (céphalées, vertiges, anosmie, agueusie). D'autres manifestations sont rencontrées dans les formes sévères : AVC, méningoencéphalite, polyneuropathie aiguë démyélinisante. La réplication du SARS-CoV-2 dans une lignée de glioblastome (U251) est un argument en faveur de son neurotropisme (135). L'expression d'ACE2 dans les cellules sustentaculaires de la muqueuse olfactive indique une possible porte d'entrée dans le système nerveux central, suivi d'un transport axonal rétrograde dans les neurones. Il existe également des arguments en faveur d'une perturbation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) lors d'une infection par le SARS-CoV-2, avec un possible passage transcellulaire du virus du compartiment sanguin vers le système nerveux (149). Le passage au travers de la BHE peut également s'effectuer par le biais de leucocytes infectés (150). Enfin, la génération de microthrombi dans la circulation générale est probablement impliquée dans la survenue d'ischémies vasculaires cérébrales.

5. Diagnostic

a. Méthodes diagnostiques

Le diagnostic biologique standard d'une infection par le SARS-CoV-2 repose sur la détection du génome viral par RT-qPCR sur prélèvement respiratoire obtenu par écouvillonnage nasopharyngé (151) (**Figure 23**) (**Figure 24**). Les régions amplifiées varient en fonction du kit commercial utilisé, et concernent dans la majorité des cas les séquences codant pour la polymérase virale (RdRp), les protéines E, S, N, ou une partie de l'ORF1ab (152).

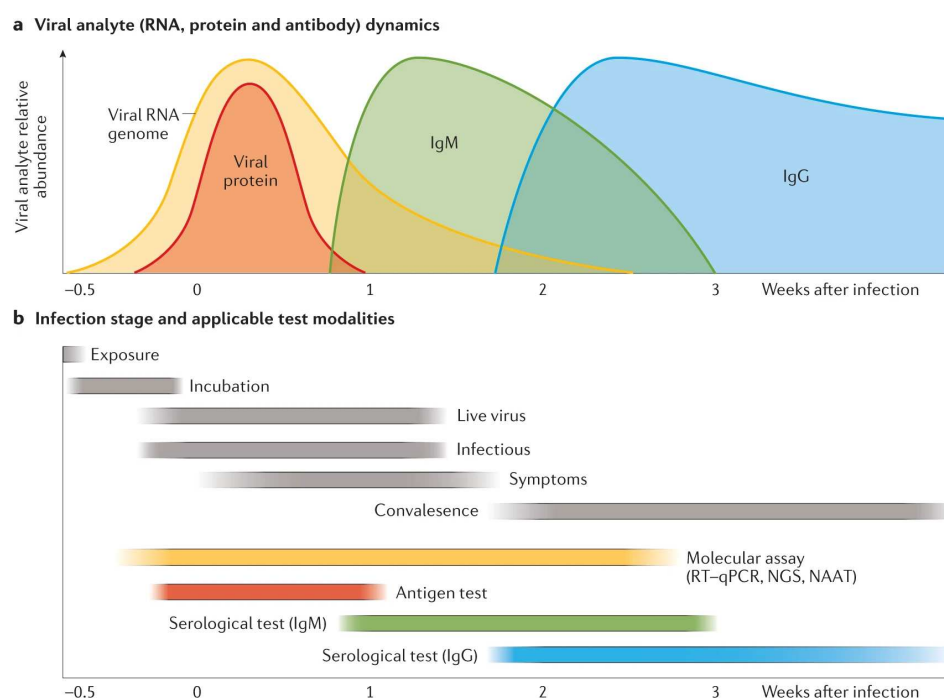


Figure 23 : Cinétique des marqueurs directs et indirects de l'infection par le SARS-CoV-2

(Mercer, T.R., Nat Rev Genet 22, 415–426 (2021))

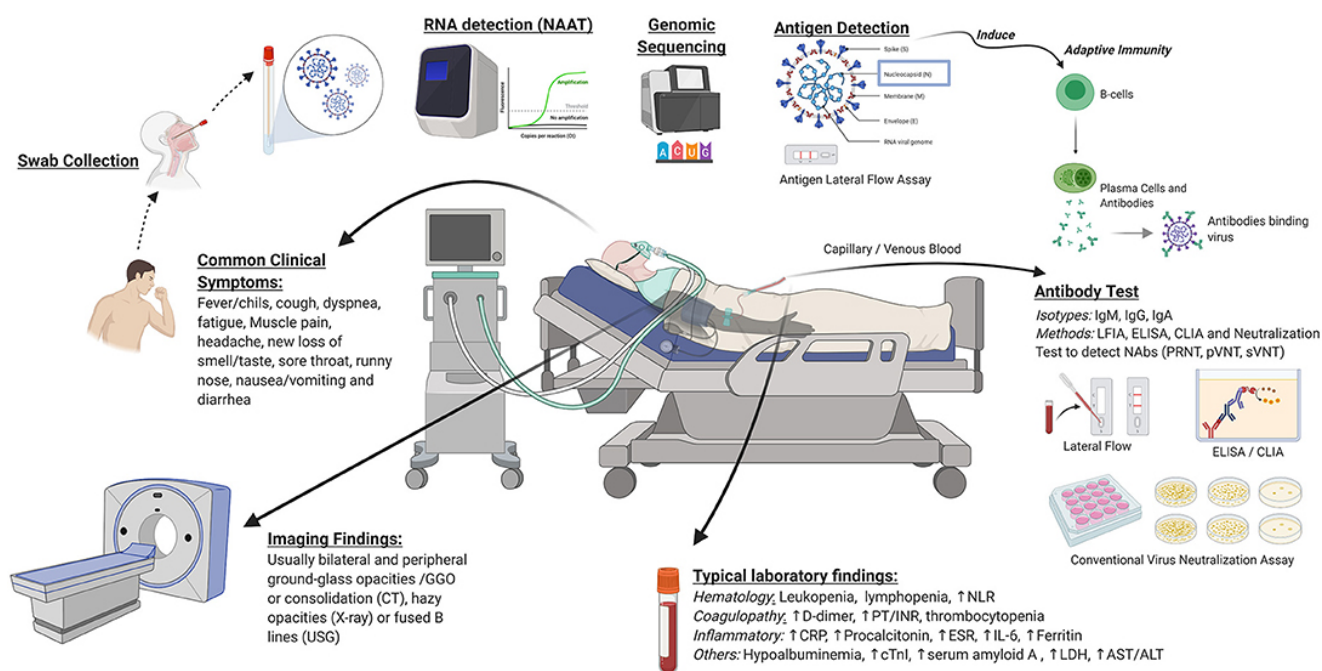


Figure 24 : Tests diagnostiques cliniques et biologiques de l'infection par le SARS-CoV-2

(Mardian Y, Frontiers in Medicine. 2021)

La recherche du génome viral peut également se faire sur prélèvement salivaire, avec une sensibilité moins bonne que sur prélèvement nasopharyngé, quand celui-ci n'est pas réalisable chez le patient (153). Elle peut également être réalisée sur prélèvements respiratoires profonds (lavage broncho-alvéolaire) chez les patients hospitalisés en unités de soins intensifs, en particulier à la phase tardive d'un COVID-19 (154). La détection du génome viral n'est cependant pas synonyme d'infection ou de contagiosité, elle peut en effet persister plusieurs semaines après la phase aiguë à l'état résiduel. En parallèle, le développement de tests de biologie moléculaire « point of care » permet de détecter le génome viral dans un délai court (< 1h) afin de guider rapidement la prise en charge du patient, en particulier dans les services d'urgence (155). Le diagnostic sérologique d'une infection par le SARS-CoV-2 passe par la détection des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines virales, dans la quasi-totalité des cas la Spike ou la protéine de nucléocapside, par une technique immunoenzymatique (ELISA, CLIA...) (156,157). La détection des anticorps permet de rechercher un contact avec le virus, ou une immunité potentielle post-vaccinale ou liée à une infection, elle revêt donc un caractère épidémiologique. Enfin, la détection des antigènes viraux, la plupart du temps la protéine de nucléocapside, sur prélèvement respiratoire haut et par technique immunochromatographique, permet l'obtention d'un résultat dans les 15-30 min (155).

Ils sont particulièrement adaptés à une utilisation en ambulatoire à grande échelle, afin de briser les chaînes de transmission.

b. Formes cliniques

Le National Institutes of Health a établi une classification de la sévérité d'un COVID-19 basée sur des critères cliniques du patient adulte (158). Le COVID-19 asymptomatique est défini par l'absence de manifestation clinique associée à une détection du SARS-CoV-2 en RT-PCR. Le COVID-19 léger est défini par la survenue de symptômes bénins non spécifiques (fièvre, myalgies, toux, anosmie, dysgueusie...) sans dyspnée et en l'absence de signes d'imagerie. Le COVID-19 modéré est défini par la présence de symptômes compatibles, associés à des signes radiologiques en faveur d'une atteinte respiratoire basse, avec une $SpO_2 \geq 94\%$ en air ambiant. Le COVID-19 sévère est défini par une $SpO_2 \leq 94\%$ en air ambiant, un rapport entre la pression partielle de l'oxygène artériel et la fraction d'oxygène inspirée (PaO_2/FiO_2) < 300 mmHg, une tachypnée marquée avec une fréquence respiratoire > 30 respirations/min, ou la présence d'infiltrats pulmonaires touchant $> 50\%$ du parenchyme à l'imagerie. Enfin, le COVID-19 critique est défini par la survenue d'une insuffisance respiratoire aigüe avec ou sans SDRA, et/ou d'un choc septique, et/ou d'un syndrome de défaillance multiviscérale. Les complications infectieuses liées à un COVID-19 sont catégorisées de la manière suivante : co-infection (virus grippal ou autre virus respiratoire), réactivation d'une infection latente sous corticoïdes (herpes simplex, anguillulose en zone d'endémie), infection nosocomiale (pneumopathie acquise sous ventilation mécanique), infection fongique opportuniste (aspergillose, mucormycose).

6. Prophylaxie

La vaccination demeure le moyen de prévention de première intention dans la population générale, en particulier pour les patients présentant des facteurs de risque d'infection sévère. Les vaccins autorisés actuellement en France sont élaborés selon différentes méthodologies. Les vaccins à ARNm autorisés en France sont les suivants : Comirnaty Original monovalent ou Comirnaty Original/Omicron BA.4-5 bivalent (BNT162b2, BioNTech-Pfizer), Spikevax monovalent ou Spikevax Original/Omicron BA.4-5 bivalent (mRNA-1273, Moderna) (**Tableau 2**).



accin
COVID-19

TOUS VACCINÉS, TOUS PROTÉGÉS

QUELS VACCINS POUR QUEL PUBLIC
CET AUTOMNE ?

 Ma situation	 Mon âge	 Pfizer bivalent	 Moderna bivalent	 Quand ?
60 à 79 ans		✓	✓	Dès 6 mois après ma dernière injection*
80 ans et plus		✓	✓	Dès 3 mois après ma dernière injection ou infection
Je suis résident en EHPAD ou en USLD		✓	✓	Dès 3 mois après ma dernière injection ou infection
Je suis immunodéprimé	12 à 29 ans	✓		Dès 3 mois après ma dernière injection ou infection
	30 ans et plus	✓	✓	
Je suis à risque de forme grave de Covid-19	12 à 29 ans	✓		Dès 6 mois après ma dernière injection*
	30 à 59 ans	✓	✓	
Je suis enceinte (dès le 1 ^{er} trimestre de grossesse)	Moins de 30 ans	✓		Dès 6 mois après ma dernière injection*
	30 ans et plus	✓	✓	
Je suis en contact régulier avec des personnes immunodéprimées ou vulnérables	12 à 29 ans	✓		Dès 6 mois après ma dernière injection*
	30 ans et plus	✓	✓	

* En cas d'infection récente au Covid-19, la vaccination est recommandée dès 3 mois après l'infection, en respectant un délai minimal de 6 mois après la dernière injection.

Si je débute la vaccination

 Mon âge	 Ma situation	 Pfizer-BioNTech	 Moderna	 Novavax
5 à 11 ans		✓ forme pédiatrique		
12 à 29 ans		✓		
30 ans et plus		✓	✓	
18 ans et plus	J'ai une contre-indication ou je souhaite une alternative aux vaccins à ARN-m			✓

Tableau 2 : Recommandations vaccinales françaises en prévention de l'infection par le SARS-CoV-2 à l'automne 2022

(<https://www.mesvaccins.net/web/diseases/57-covid-19>)

En cas de contre-indication à l'administration d'un vaccin à ARNm, il est possible d'avoir recours à un vaccin à vecteur adénoviral Jcovden (Ad26.COV2.S, Johnson & Johnson), ou à un vaccin sous-unitaire Nuvaxovid (NVX-CoV2373, Novavax). Les mécanismes d'immunisation mis en jeu ne sont pas tout à fait identiques entre les vaccins à ARNm et les vaccins dérivés de vecteurs adénoviraux, notamment concernant les senseurs de l'immunité cellulaire qui détectent les ARN viraux exogènes, ainsi que le mode de présentation des protéines Spike aux cellules immunitaires (**Figure 25**).

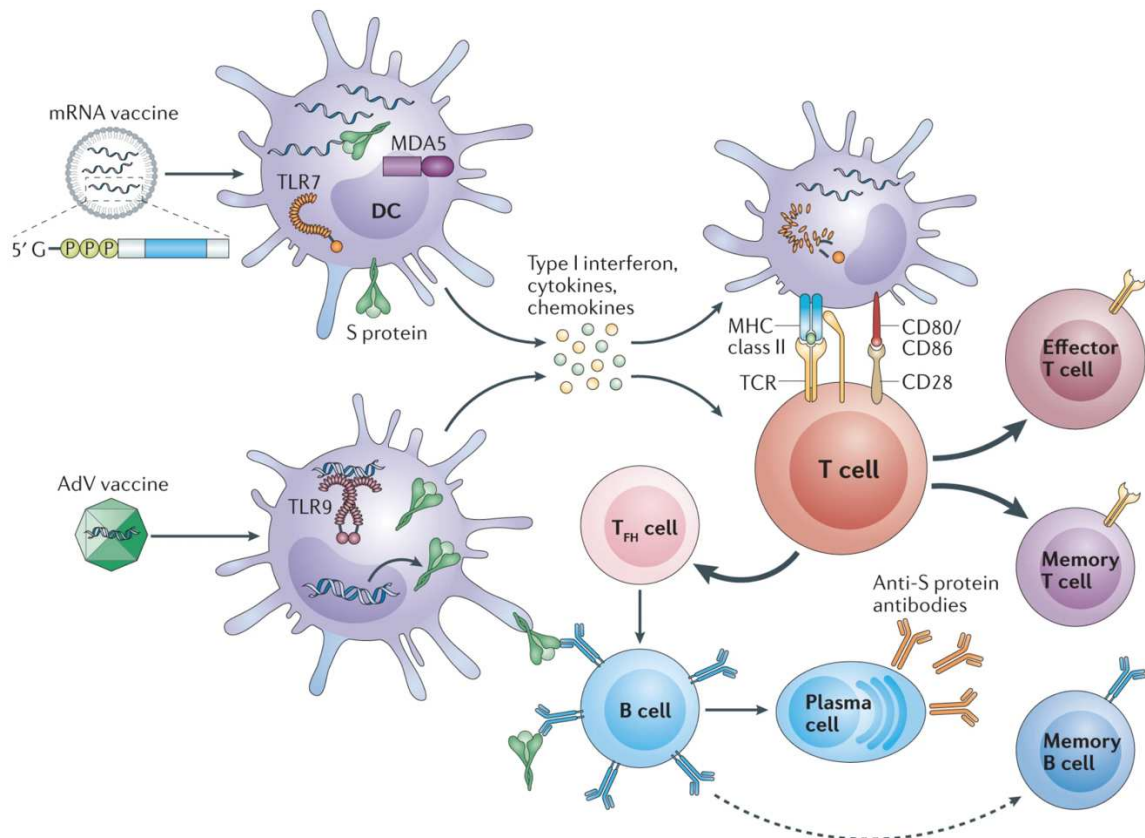


Figure 25 : Mécanismes d'immunisation contre le SARS-CoV-2 pour les vaccins à ARNm et les vaccins à vecteur adénoviral

DC : dendritic cell; T_{FH} : T follicular helper; MHC : major histocompatibility complex; TCR : T cell receptor, TLR : Toll-like receptor

(Teijaro, J.R., Nat Rev Immunol 21, 195–197 (2021).)

Le Tixagevimab et le Cilgavimab sont deux anticorps monoclonaux neutralisants anti-Spike se fixant sur le domaine RBD de cette protéine. La combinaison de ces deux anticorps (Evusheld, AstraZeneca) a montré son efficacité au cours d'essais cliniques en tant que prophylaxie pré-exposition chez des patients à haut risque de COVID-19 sévère, avec une activité diminuée mais conservée sur les sous-variants d'Omicron (159). Cette prophylaxie est recommandée dans les cas suivants : absence d'infection en cours par le SARS-CoV-2 et risque de non-réponse vaccinale du fait d'une immunodépression ou de la prise d'immunosuppresseurs, ou contre-indication absolue à la vaccination du fait d'effets indésirables sévères dans les antécédents.

7. Thérapeutique

Les molécules antivirales ayant démontré une efficacité clinique en diminuant le risque d'hospitalisation ou de décès, appartiennent majoritairement à la classe des inhibiteurs de la polymérase virale ou aux inhibiteurs des protéases virales (**Figure 26**).

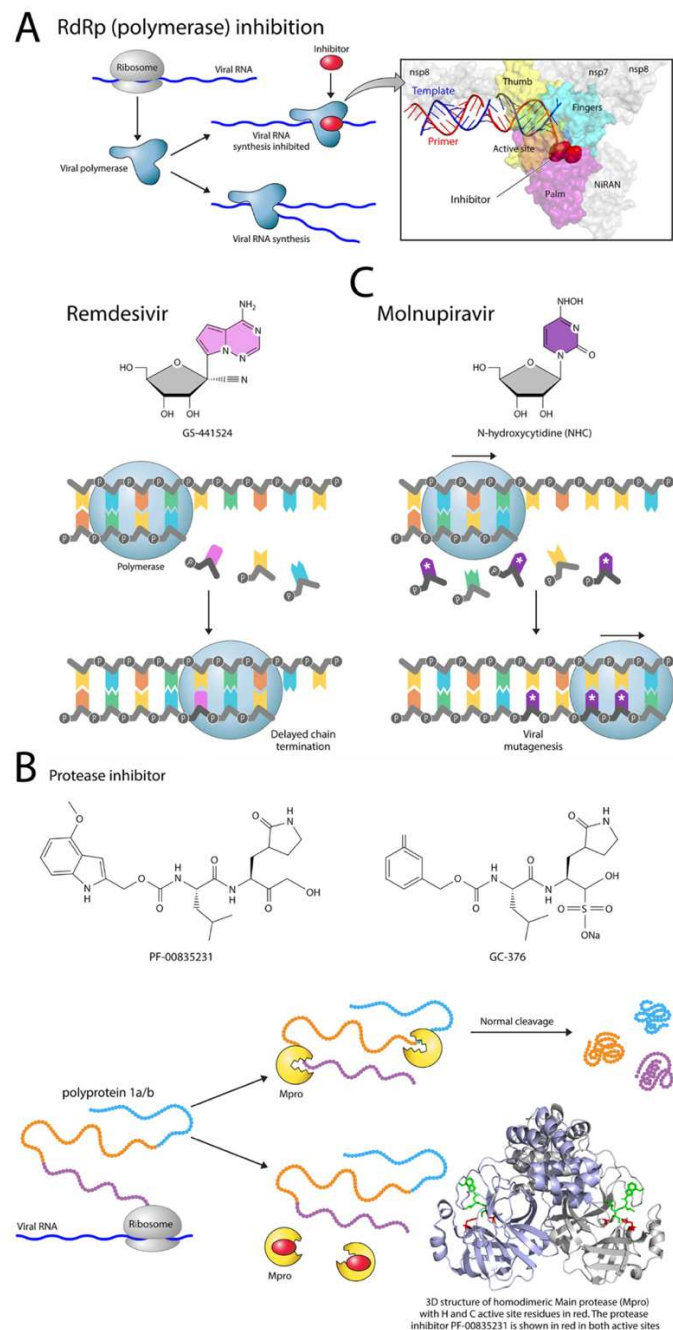


Figure 26 : Mécanismes d'action des antiviraux par voie orale dirigés contre le SARS-CoV-2

(Tao K, Clinical Microbiology Reviews. 28 juill 2021;34(4):e00109-21.)

L'association ritonavir / nirmatrevir (Paxlovid) fonctionne comme un inhibiteur de la protéase virale NSP5 (3CL-like protease) en interférant avec le mécanisme de clivage de la polyprotéine virale (160). Il est recommandé en première intention par voie orale chez les patients non hospitalisés, présentant un COVID-19 léger à modéré, dans les 5 jours suivant le début des symptômes (**Tableau 3**) (158).

Patient Disposition	Recommendations for Antiviral or Immunomodulator Therapy	
	Clinical Scenario	Recommendation
Hospitalized for Reasons Other Than COVID-19	Patients with mild to moderate COVID-19 who are at high risk of progressing to severe COVID-19 ^a	See Therapeutic Management of Nonhospitalized Adults With COVID-19 .
Hospitalized but Does Not Require Oxygen Supplementation	All patients	The Panel recommends against the use of dexamethasone (AIII) or other systemic corticosteroids (AIII) for the treatment of COVID-19. ^b
	Patients who are at high risk of progressing to severe COVID-19 ^a	Remdesivir ^c (BIII)
Hospitalized and Requires Conventional Oxygen^d	Patients who require minimal conventional oxygen	Remdesivir ^e (BIIa)
	Most patients	Use dexamethasone plus remdesivir ^e (BIIa). If remdesivir cannot be obtained, use dexamethasone (B).
	Patients who are receiving dexamethasone and who have rapidly increasing oxygen needs and systemic inflammation	Add PO baricitinib ^f or IV tocilizumab ^f to 1 of the options above (BIIa).
Hospitalized and Requires HFNC Oxygen or NIV	Most patients	Promptly start 1 of the following, if not already initiated: • Dexamethasone plus PO baricitinib^f (AI) • Dexamethasone plus IV tocilizumab^f (BIIa) If baricitinib, tofacitinib, tocilizumab, or sarilumab cannot be obtained: • Dexamethasone^h (AI) Add remdesivir to 1 of the options above in certain patients (CIIa). ⁱ
Hospitalized and Requires MV or ECMO	Most patients	Promptly start 1 of the following, if not already initiated: • Dexamethasone plus PO baricitinib^f (BIIa) • Dexamethasone plus IV tocilizumab^f (BIIa) If baricitinib, tofacitinib, tocilizumab, or sarilumab cannot be obtained: • Dexamethasone^h (AI)

Rating of Recommendations: A = Strong; B = Moderate; C = Weak

Tableau 3 : Recommandations pour la prise en charge thérapeutique des patients adultes hospitalisés pour un COVID-19 à l'automne 2022

(National Institutes of Health's Coronavirus Disease (COVID-19) Treatment Guidelines.)

Le remdesivir est un analogue nucléosidique avec effet terminateur de chaîne (161). Il est recommandé en deuxième intention chez les patients non hospitalisés présentant un COVID-19 léger à modéré dans les 7 jours suivant le début des symptômes, et administré par voie orale. Le molnupiravir est un ribonucléoside générateur de mutations lors de la synthèse de l'ARN viral par la polymérase, et administré par voie orale (162). Le bebtelovimab est un anticorps monoclonal neutralisant ciblant le domaine RBD de la protéine Spike, avec une activité conservée contre les sous-variants d'omicron, à administration intraveineuse (163). Le molnupiravir et le bebtelovimab sont recommandés en alternative au paxlovid et au remdesivir, en cas de contre-indication ou de non-disponibilité de ces traitements, chez les patients présentant un COVID-19 léger

à modéré. L'administration d'une corticothérapie (dexaméthasone) est recommandée en complément du traitement antiviral, chez les patients présentant un COVID-19 modéré, sévère ou critique (164). Les deux traitements immunomodulateurs validés pour la prise en charge d'une COVID-19 sont le baricitinib (inhibiteur sélectif de JAK1 et JAK2, administré par voie orale) (165) et le tocilizumab (anticorps monoclonal dirigé contre les récepteurs de l'interleukine 6, administré par voie intraveineuse) (166) (**Figure 27**).

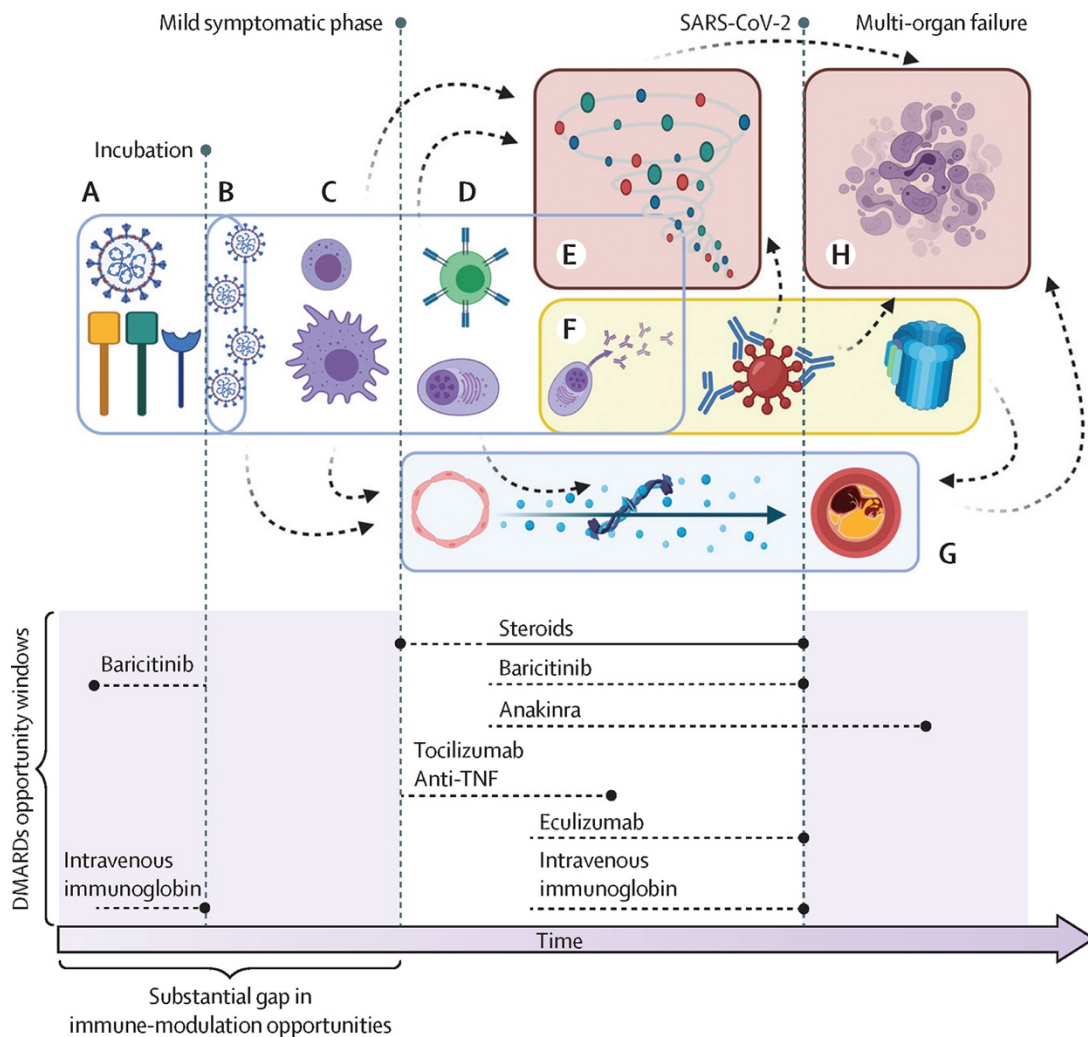


Figure 27 : Cinétique d'administration des traitements immunomodulateurs et des anticorps monoclonaux en fonction de l'évolution du COVID-19

DMARDs : Disease-modifying antirheumatic drugs

(Nissen CB, The Lancet Rheumatology. 1 juin 2021;3(6):e447-59.)

Ils sont recommandés pour la prise en charge de COVID-19 sévères à critiques en complément de la corticothérapie. Le dispositif d'oxygénothérapie est guidé par la sévérité du COVID-19 et la profondeur de l'hypoxie (167–169), respectivement et de

manière croissante : administration conventionnelle par masque ou lunettes, oxygénothérapie à haut débit, ventilation non invasive, ou intubation et ventilation mécanique. L'administration d'une dose d'héparine prophylactique, en prévention des thromboses liées au COVID-19, est recommandée chez tous les patients hospitalisés (170). Enfin concernant les patients non hospitalisés ne nécessitant pas d'oxygénothérapie et cependant à risque d'aggravation du COVID-19, il est recommandé l'utilisation d'une molécule antivirale : paxlovid (PO) ou remdesivir (PO) en première intention, molnupiravir (PO) ou bebtelovimab (IV) en deuxième intention.

C. Modèles d'étude de l'infection par le SARS-CoV-2

1. Modèles cellulaires *in vitro*

L'utilisation de cellules immortalisées en culture 2D présente l'avantage d'être peu coûteuse, simple dans sa mise en œuvre, adaptée au criblage à haut débit de molécules antivirales et permet d'obtenir des résultats reproductibles (**Figure 28**).

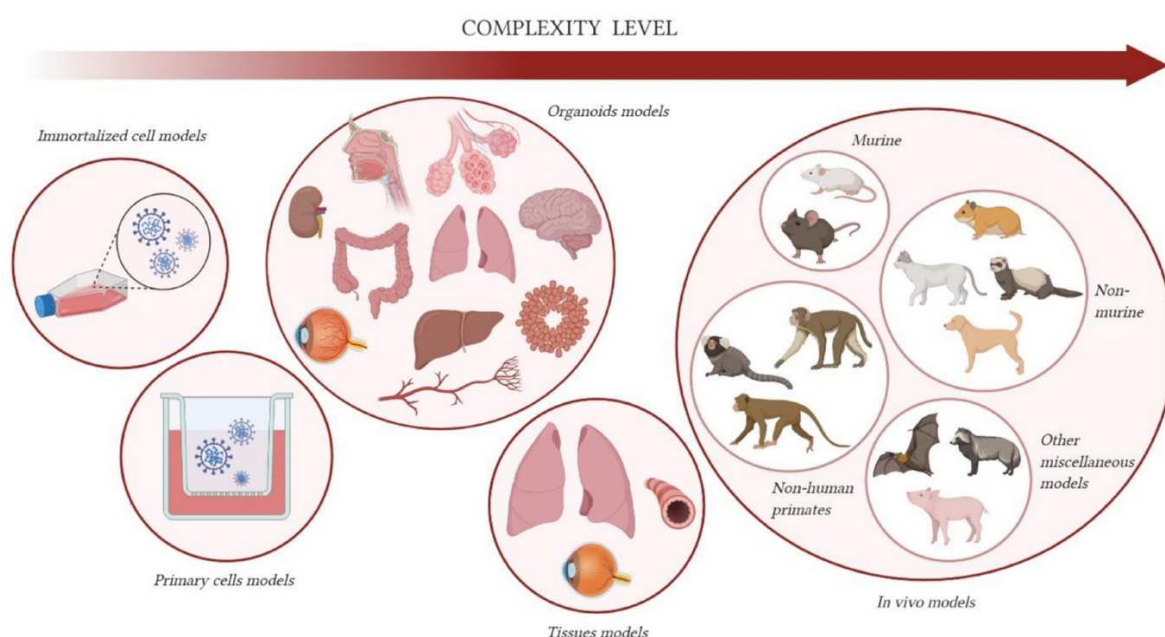


Figure 28 : Modèles d'étude du SARS-CoV-2 classés par complexité croissante

(Rosa RB, Dantas WM, do Nascimento JCF, da Silva MV, de Oliveira RN, Pena LJ. In Vitro and In Vivo Models for Studying SARS-CoV-2, the Etiological Agent Responsible for COVID-19 Pandemic. Viruses. 2021 Feb 27;13(3):379.)

Les cellules Vero ont été un des premiers modèles cellulaires disponibles : une lignée cellulaire issue du tissu rénal de singe vert (*Chlorocebus sabeus*) déjà utilisée pour l'étude d'autres virus (polyomavirus SV40, virus de la rougeole, virus de la rubéole ou

adénovirus) (171,172). Cette lignée a pour particularité d'être dépourvue des gènes associés à la réponse interféron de type I, du fait d'une délétion sur le chromosome 12, ce qui favorise une réplication virale élevée. D'autre part, elle exprime fortement le récepteur ACE2 ce qui la rend permissive à l'infection par le SARS-CoV-2 (173). En revanche, les faibles niveaux d'expression de la protéase TMPRSS2 ont conduit à la génération de cellules Vero modifiées pour exprimer fortement ce co-récepteur afin de favoriser l'entrée du virus (174). Il a également été montré que la sous-lignée E6 permet d'obtenir des niveaux de propagation du SARS-CoV-2 plus élevés que dans la lignée Vero originelle (175). Ainsi, cette lignée cellulaire a déjà été utilisée pour l'étude du SARS-CoV en 2003, et dès la survenue en 2019/2020 des premiers cas de pneumopathie atypique, afin d'isoler et d'identifier le SARS-CoV-2. La mise en culture du liquide broncho-alvéolaire de patients infectés, sur un tapis cellulaire de Vero, a permis d'observer un effet cytopathogène à 3 jours post-infection (p.i.), avec la visualisation de particules virales intracellulaires de morphologie compatible en microscopie électronique à transmission. La lignée Vero est également adaptée à la production de particules virales utilisables pour l'infection *in vitro* d'autres modèles cellulaires ou tissulaires, et à l'évaluation de candidats vaccins par des tests de neutralisation (176). Enfin, c'est à partir de cette lignée qu'a été identifié le rôle d'ACE2 en tant que récepteur primaire du SARS-CoV (177).

La lignée Vero étant une lignée rénale de primate, d'autres modèles cellulaires d'origine humaine ont été évalués pour leur caractère permissif à l'infection par le SARS-CoV-2, afin d'être plus relevant vis-à-vis de son tropisme d'espèce et de tissu. La lignée Caco-2 (adénocarcinome colorectal) et Calu-3 (adénocarcinome pulmonaire) ont montré les plus hauts niveaux de réplication virale (178). Les lignées Huh7 (carcinome hépatocellulaire), HEK293T (lignée rénale embryonnaire), et A-549 (adénocarcinome pulmonaire) se sont également montrées permissives à l'infection avec des niveaux de réplication plus faibles.

Bien qu'elle soit facile à mettre en œuvre, la culture 2D de lignées immortalisées présente de nombreuses limites. Une lignée immortalisée est une population cellulaire homogène et le plus souvent non polarisée, à l'inverse d'une population cellulaire étudiée en modèle tissulaire ou animal. Le phénotype cellulaire est éloigné de cellules cultivées en conditions 3D, analogues à celles rencontrées dans un organe. La présence de mutations pro-oncogènes (p53, KRAS, EGFR...) et/ou un génome non diploïde, peuvent modifier les interactions virus-cellules et le cycle viral. De plus, les

mécanismes immunitaires à l'œuvre dans un tissu infecté, en particulier ceux relevant de l'immunité adaptative, ne peuvent pas être étudiés. Enfin, il n'est souvent pas possible d'étudier une infection virale sur le long terme, les cellules infectées perdant rapidement en viabilité.

2. Modèles tissulaires *in vitro* et *ex vivo*

a. Cultures primaires polarisées

Concernant l'étude de pathogènes respiratoires dont les *Coronaviridae*, l'utilisation de cellules primaires humaines respiratoires (HAE) permet de se rapprocher des conditions rencontrées dans un épithélium respiratoire (179,180). Ces cellules sont isolées à partir de poumons issus de don d'organes ou de poumons explantés chez des receveurs d'une transplantation pulmonaire. Elles peuvent ensuite être cultivées en système d'interface air-liquide (ALI), sur un support poreux où les cellules ont leurs faces apicales au contact de l'air et leurs faces basales en contact avec le milieu de culture. On obtient ainsi un épithélium polarisé pseudostratifié et composé des différents types cellulaires respiratoires (cellules ciliées, cellules à mucus, cellules basales...). Ce modèle permet de reconstituer *in vitro* les épithéliums des étages nasopharyngés, bronchiques et alvéolaires. Il est adapté à l'étude du tropisme viral, et a notamment permis de mettre en évidence un tropisme préférentiel du SARS-CoV-2 pour les voies respiratoires hautes par rapport aux voies respiratoires basses (181). Il est aussi largement utilisé pour l'évaluation et le criblage de molécules antivirales, ce qui a permis de valider le remdesivir comme un inhibiteur puissant de la réplication virale (182). À l'inverse, l'efficacité de l'hydroxychloroquine, qui semblait inhiber la réplication virale en cellule Vero, a été invalidée en modèle HAE-ALI (183).

L'utilisation de cultures primaires polarisées est limitée par la disponibilité restreinte des prélèvements issus de l'activité chirurgicale, et par la variabilité inhérente à des populations cellulaires obtenues de donneurs différents. Ce modèle est également plus complexe et plus chronophage dans sa mise en œuvre, par rapport à une lignée immortalisée cultivée en 2D. Enfin, la viabilité cellulaire reste limitée dans le temps et n'est donc pas adaptée à l'étude des conséquences tardives d'une infection virale.

b. Organoïdes

Un organoïde est un modèle tissulaire généré *in vitro* à partir de cellules souches (embryonnaires ou extraites à partir de tissus d'individus adultes) ou de cellules

souches pluripotentes induites (iPSCs). La mise en culture de ces cellules dans un support 3D (hydrogel de matrice extra-cellulaire), associée à l'ajout de facteurs de croissances et de différenciation, induit une auto-organisation reproduisant l'architecture et les types cellulaires retrouvés dans un tissu *in vivo*. Il reflète parfaitement l'hétérogénéité cellulaire et les interactions cellule-cellule de ce tissu, et peut être gardé en culture sur le long terme. À l'heure actuelle, des modèles d'organoïdes ont été mis au point pour la quasi-totalité des tissus de l'organisme humain. Au début de la pandémie, les organoïdes respiratoires alvéolaires n'étant pas suffisamment caractérisés, l'infection par le SARS-CoV-2 a été étudiée dans le cadre d'organoïdes intestinal (148) et rénal (184). Dans un second temps, le développement d'organoïdes alvéolaires adaptés au SARS-CoV-2, a permis d'étudier en temps réel sur cellules vivantes les phases précoces et la réponse immunitaire innée à l'infection (185,186). Les organoïdes cérébraux ont permis de confirmer le neurotropisme du SARS-CoV-2, et de mettre en évidence les mécanismes physiopathologiques associés (redistribution et phosphorylation de la protéine Tau) (187). L'utilisation d'organoïdes de l'œil a également permis de documenter son tropisme pour les cellules cornéennes (188).

Bien que les organoïdes permettent de se rapprocher de la complexité d'un organe, certains éléments en sont absents. Dans la majorité des cas, les organoïdes sont dépourvus de cellules immunitaires, de vascularisation, et ne comportent pas d'interface air-liquide (retrouvée dans les épithéliums polarisés). Ils sont également dénués d'activités mécaniques, notamment de contractilité, d'échanges gazeux, de flux aérien ou vasculaire. Enfin, la matrice extracellulaire est remplacée par un gel, dont la viscosité peut diminuer la perméabilité et la pénétration de molécules antivirales.

c. Explants / Coupes micrométriques pulmonaires

La principale alternative à l'élaboration de modèles tissulaires *in vitro*, à partir de cellules isolées, réside dans l'obtention d'explants à partir d'un organe, maintenus en culture *ex vivo*. Ces prélèvements peuvent être effectués sur modèles animaux, ou par l'utilisation d'exérèses chirurgicales chez l'Homme. Afin de limiter et de standardiser le volume de tissu à infecter, il est possible de réaliser avec un vibratome des coupes d'épaisseur micrométrique d'un explant pulmonaire (PCLS). Ce modèle est donc bien plus simple dans sa réalisation, en comparaison d'épithéliums polarisés ou d'organoïdes, qui nécessitent au préalable de longues étapes de différenciation et de prolifération. Dans les PCLS, les différents types cellulaires sont maintenus dans une architecture tissulaire entièrement conservée, avec la préservation des jonctions cellulaires et des interactions

cellule-matrice sur le tissu conjonctif sous-jacent. Les cellules immunitaires résidentes sont également présentes, tout en s'affranchissant de la migration de cellules immunitaires d'origine systémique dans le poumon, possible lors d'une manipulation en modèle animal. La susceptibilité à l'infection par le SARS-CoV-2 a été évaluée et confirmée en PLCS de hamster et de chat, et infirmée chez le cochon (189). Chez l'Homme, l'infection de PCLS par le SARS-CoV-2 a permis de mettre en évidence un tropisme pour les cellules immunitaires respiratoires myéloïdes (macrophages et monocytes) (190).

Ce modèle est cependant limité par une forte variabilité inter-individuelle. En outre, l'utilisation d'exérèses issues de l'activité chirurgicale implique de prendre en compte les comorbidités et la pathologie du patient, dans l'analyse des paramètres mesurés au cours d'une infection.

3. Modèles animaux *in vivo*

a. Souris

Le recours au modèle murin (*Mus musculus*) pour l'étude du SARS-CoV-2 est limité par sa non-susceptibilité à l'infection. En effet la protéine Spike du virus ne se lie pas efficacement au récepteur ACE2 de la souris (191). L'identification d'ACE2 comme récepteur du SARS-CoV a motivé le développement dès 2007, de souris transgéniques hACE2-HB-01 (192), K18-hACE2 (193) et HFH4-hACE2 (194) exprimant toutes l'ACE2 humain (hACE2) dans plusieurs organes dont les poumons, et donc adaptées à l'infection par ce virus. Ces lignées murines diffèrent par la nature du promoteur du gène codant l'ACE2 humain. Pour le SARS-CoV comme pour le SARS-CoV-2, la sévérité de l'infection est variable selon la lignée murine et les conditions d'inoculation (voie d'administration et dose infectieuse). Certaines lignées murines (ex : hACE2-HB-01, HFH4-hACE2) sont limitées par l'absence de symptômes ou de lésions pulmonaires, et donc non adaptées à l'étude des formes sévère de COVID-19. A l'inverse, d'autres lignées (ex : K18-hACE2) présentent une inflammation pulmonaire, voire un orage cytokinique, et sont donc adaptées à l'étude des complications du COVID-19. L'émergence du SARS-CoV-2 a conduit d'une part à la redécouverte de ces lignées murines exprimant l'hACE2, d'autre part à la mise au point de nouvelles lignées par des méthodes transgéniques « classiques » ou par des méthodes « innovantes » (utilisation de vecteur adénoviral, knock-in par CRISPR-Cas9). Ces nouvelles méthodes permettent de modifier des souris issues de lignées commerciales existantes et bien caractérisées (ex :

BALB/c), sans génération de nouvelles souches qui auraient un génome largement remanié. Une autre limite des souris transgéniques est la survenue d'une encéphalite létale, liée à une dissémination cérébrale du virus, pour les lignées K18-hACE2 et HFH4-hACE2. Le développement de la lignée AdV-hACE2 par le biais d'un vecteur adénoviral a permis l'obtention d'une lignée exempte d'atteinte cérébrale (195). L'autre avantage de cette méthodologie réside dans le caractère transitoire de la modification génétique, du fait de l'absence d'intégration du transgène et de la clairance immunitaire de l'hôte. En revanche, la délivrance du gène codant l'hACE2 est non spécifique et aléatoire, ce qui peut conduire à son expression dans des types cellulaires non pertinents, avec une variabilité interindividuelle. De plus, les souris AdV-hACE2 infectées par le SARS-CoV-2 ne présentent pas de signes de sévérité et restent asymptomatiques, en dehors d'une perte de poids. L'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 Knock-in permet à l'inverse de cibler les types cellulaires modifiés, avec l'obtention d'un haut niveau d'expression de l'hACE2 dans le tissu pulmonaire (196). Lors d'une infection par le SARS-CoV-2, ces souris présentent des signes et des lésions similaires à celles rencontrées lors d'un SDRA (thrombi, membranes hyalines, hémorragies alvéolaires focales, infiltrat inflammatoire) sans atteinte cérébrale associée, ce qui en fait un modèle particulièrement pertinent.

La génération d'une infection répliquative par le SARS-CoV-2 chez la souris peut également être obtenue en adaptant le virus à son hôte. La première méthode consiste à modifier l'interface Spike-mACE2 par génétique inverse, afin d'augmenter la liaison et l'affinité entre la protéine d'enveloppe virale et le récepteur murin, favorisant l'entrée du virus dans la cellule cible. Cette approche a conduit au développement d'une souche virale recombinante SARS-CoV-2-MA, capable de se répliquer dans les voies respiratoires proximales et distales de la souris infectée (197). Les souris infectées par ce recombinant présentaient des lésions inflammatoires pulmonaires sans mortalité associée. La deuxième méthode consiste à modifier progressivement le virus par des passages successifs dans les poumons des souris BALB/c, conduisant à l'obtention de la souche SARS-CoV-2-MASCp6 (198). L'infection des souris par cette souche est génératrice d'une pneumopathie interstitielle avec une forte réponse inflammatoire, sans mortalité associée.

Quelle que soit la méthodologie, le modèle murin reste incontournable pour l'étude d'un virus émergent comme le SARS-CoV-2, en raison du grand nombre de lignées murines et de réactifs disponibles, notamment pour la mise au point et l'évaluation de vaccins et de molécules antivirales. La pertinence du modèle réside avant tout dans

l'obtention d'une infection virale avec une forte réplication au niveau respiratoire et des lésions pulmonaires, afin de se rapprocher au plus près de la physiopathologie et de la symptomatologie de l'infection observée chez les patients.

b. Hamster

Le hamster doré syrien (*Mesocricetus auratus*) a pour particularité de présenter un récepteur ACE2 très proche de l'ACE2 humain sur le plan de la séquence et de la structure, avec seulement 4 acides aminés différents au sein du domaine de liaison à la protéine Spike du SARS-CoV et du SARS-CoV-2 (199). Ainsi, il est naturellement susceptible à l'infection par ces deux virus sans nécessiter de manipulations supplémentaires, et a très tôt servi de modèle d'étude. Le hamster doré possède de nombreux avantages pour l'analyse de l'infection par le SARS-CoV-2. Il présente spontanément une réplication virale élevée dans tout l'arbre respiratoire, et développe des signes et des lésions de pneumopathie presque identiques à ceux retrouvés lors d'un COVID-19 (200). Le virus est transmis efficacement à partir d'un hamster infecté par le biais d'aérosols et par le contact avec les fomites. Cela a notamment permis de démontrer l'efficacité des masques chirurgicaux dans la diminution de la transmission virale entre individus (201). Ce modèle a aussi permis de mettre en évidence la plus grande transmissibilité du variant Alpha (lignée B.1.1.7), liée à une plus grande réplication dans la cavité nasale par rapport à la souche sauvage Wuhan (202). Le hamster peut également reproduire l'influence de caractéristiques épidémiologiques sur la sévérité de l'infection, comme l'âge ou le sexe : les hamsters mâles âgés développent une infection plus sévère avec un infiltrat inflammatoire plus important, par rapport aux jeunes hamsters femelles (203). De plus, les hamsters infectés développent des anticorps neutralisants qui les protègent de la réinfection pour un même variant (199).

Les principales limites de ce modèle sont liées au métabolisme très rapide du hamster en comparaison d'autres modèles mammifères, ce qui le rend non adapté pour des études pharmacologiques de molécules antivirales, ou pour l'étude de la physiopathologie à long terme d'une infection. Enfin et contrairement au modèle murin, la disponibilité de réactifs validés chez le hamster est fortement limitée.

c. Furet

Le furet (*Mustela putorius furo*) a été largement utilisé pour l'étude des virus respiratoires, en particulier le virus de la grippe A. En effet, il existe plusieurs points communs entre ce modèle animal et l'organisme humain. Sa morphologie, caractérisée par un thorax long et fin, permet une compartimentalisation anatomique entre les voies respiratoires hautes et basses, et une étude des conséquences d'une infection pour ces deux étages (204). D'autre part, la glycosylation des protéines de surface des muqueuses respiratoires du furet est similaire à celle du tractus respiratoire humain, en particulier la présence d'acide sialique de type alpha-2,6, ce qui lui confère une susceptibilité accrue à l'infection par le SARS-CoV-2 (205,206). Cette susceptibilité élevée s'explique également par la présence de résidus critiques pour l'attachement à la protéine Spike, au sein du RBD de l'ACE2 du furet (191). Les furets possèdent le réflexe de toux et d'éternuement, ce qui leur confère la capacité de transmettre le virus par voie aérienne à d'autres individus de manière analogue à la transmission interhumaine (207). Le système immunitaire du furet réagit de manière similaire à celui de patients présentant un COVID-19, notamment concernant la sécrétion de chimiokines et la réponse IFN- γ (208).

Cependant, la symptomatologie des furets infectés par le SARS-CoV-2 se limite à une absence de symptômes ou à une forme légère, avec une répllication beaucoup plus élevée au niveau du tractus respiratoire haut par rapport au poumon distal. De plus, l'élevage de furets reste plus coûteux par rapport à la souris ou au hamster, notamment du fait de leur longévité.

d. Primates non-humains

Les primates non-humains représentent le modèle animal le plus proche phylogénétiquement de l'Homme, et sont donc au premier plan des essais vaccinaux et de molécules antivirales. Historiquement, ils ont joué un rôle majeur dans la compréhension de la physiopathologie du SARS-CoV et du MERS-CoV (209). Concernant le SARS-CoV-2, les deux espèces susceptibles à l'infection et les plus fréquemment utilisées sont le macaque rhésus (*Macaca mulatta*) et le singe vert (*Chlorocebus aethiops*), qui présentent des différences notables en termes de sévérité. Les macaques rhésus développent une atteinte respiratoire entre 8 et 16 jours post-infection, avec des charges virales élevées dans les prélèvements nasaux et pharyngés, associée à la présence d'infiltrats pulmonaires à l'imagerie (210). Ils ne présentent pas de signes de sévérité, avec une infection limitée à une forme légère de la pathologie. Cependant, et à

l'image du COVID-19 chez les patients, l'âge apparaît comme un facteur associé à une plus grande sévérité de l'infection, avec des macaques rhésus âgés présentant une pneumopathie avec atteinte interstitielle diffuse (211). L'infection de macaques rhésus, avec un variant homologue à distance d'une première inoculation, a permis de mettre en évidence l'acquisition d'une immunité protectrice neutralisante contre la réinfection (212). C'est dans ce modèle que l'efficacité des vaccins ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) et Ad26 (Johnson & Johnson) contre l'infection par le SARS-CoV-2, a été démontrée (213,214). L'utilisation du remdesivir chez le macaque rhésus a permis d'obtenir une réduction significative des infiltrats pulmonaires et des titres viraux dans les lavages broncho-alvéolaires, ouvrant la voie à son utilisation chez le patient (215). L'infection de singe vert par le SARS-CoV-2 entraîne des manifestations cliniques plus importantes par rapport au macaque rhésus, avec de hauts niveaux de réplication virale dans tout l'arbre respiratoire, une pneumopathie sévère et une atteinte digestive (216).

Le recours au modèle primate est limité par son coût important, la complexité des manipulations et les considérations éthiques qui lui sont inhérentes. Ainsi, le faible nombre d'individus par groupe lors d'un essai thérapeutique diminue la puissance statistique des effets observés, qui doivent donc être interprétés avec prudence.

D. Organites de réplication virale, structures et fonctions associées

La formation de DMVs dans les cellules infectées par le SARS-CoV-2 montre une capacité à déformer les membranes de la cellule à son profit, capacité partagée avec plusieurs autres virus. En effet, au cours de leur cycle, de nombreux virus induisent la formation de compartiments intracellulaires dédiés aux étapes de réplication de leur génome et d'assemblage des néovirions. Ces organites de réplication viraux (viral replication organelles / ROs) également qualifiés « d'usines virales » (viral factories), peuvent dériver d'une membrane et être délimités par celle-ci (membrane-limited organelles) (**Figure 29**).

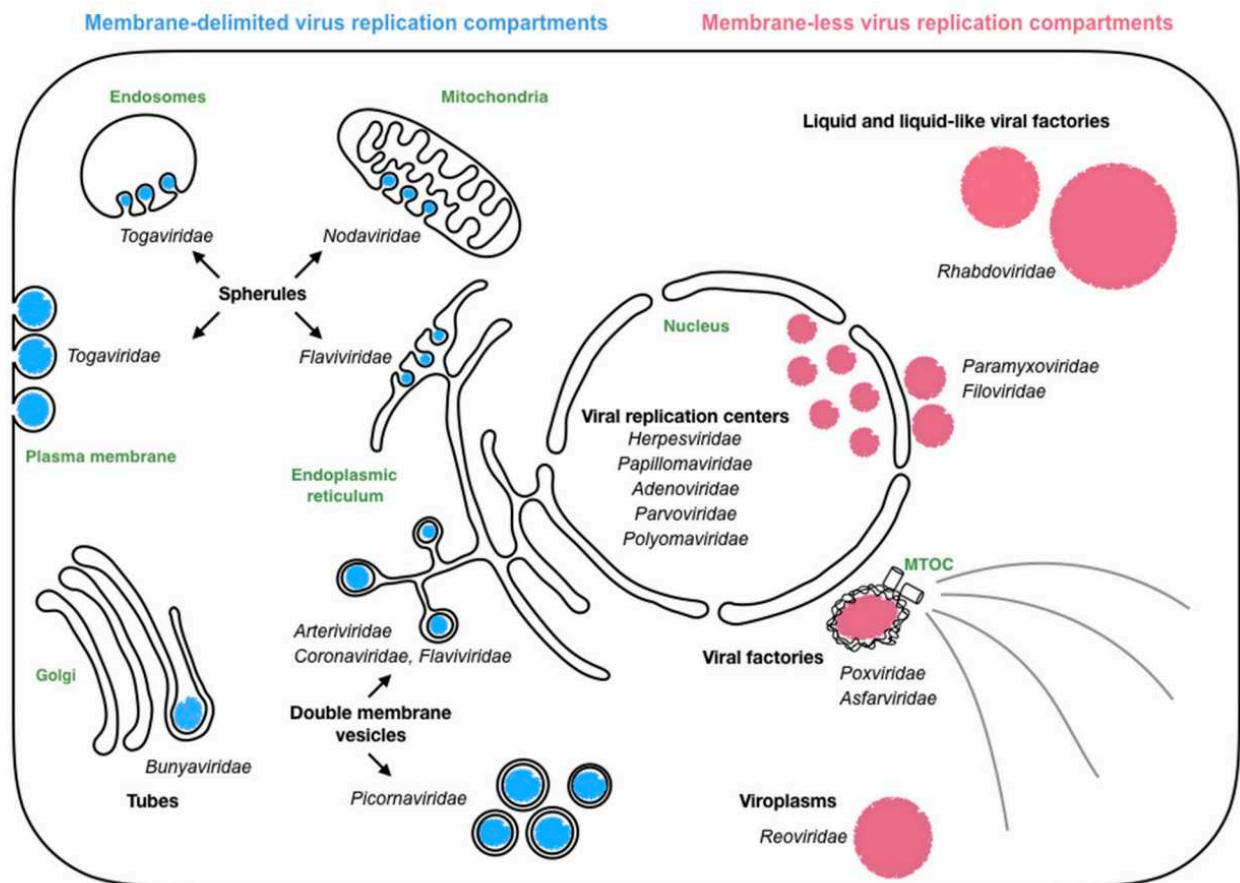


Figure 29 : Organites de réplication virale, membranaires vs dépourvus de membrane

MTOC : microtubule-organizing center

(Nevers Q, Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2020 Dec;1867(12):118831.)

Ils peuvent également former des structures dépourvues de membranes (membrane-less organelles) et sont alors uniquement constitués de composants viraux, on parle alors de viroplasmes, qui peuvent être visualisés en microscopie sous la forme d'inclusions virales cytoplasmiques et/ou nucléaires (217). La formation de ces derniers dépend de la concentration en composants viraux et de mécanisme physiques de séparation de phase liquide-liquide (LLPS) entre ces composants et le cytosol (218), et se structurent à l'image des condensats biomoléculaires de la cellule. Quelle que soit leur structure, les ROs ont pour fonctions communes : de concentrer localement les composants nécessaires à la réplication, de fournir un support physique aux complexes de réplication virale, de compartimentaliser le processus de réplication dans une localisation subcellulaire spécifique, et de prévenir l'activation de l'immunité cellulaire innée par les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) des intermédiaires de réplication. Les ROs dépourvus de membrane (ROs « liquides ») sont formés par des virus à ARN simple

brin de polarité négative (*Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Rhabdoviridae*), à ARN double brin (*Reoviridae*) ou à ADN (*Poxviridae*, *Herpesviridae*, *Polyomaviridae*). Les ROs membranaires concernent en quasi-totalité des virus à ARN simple brin de polarité positive ((+)ssRNA), à l'exception notable des *Bunyaviridae* (**Figure 30**).

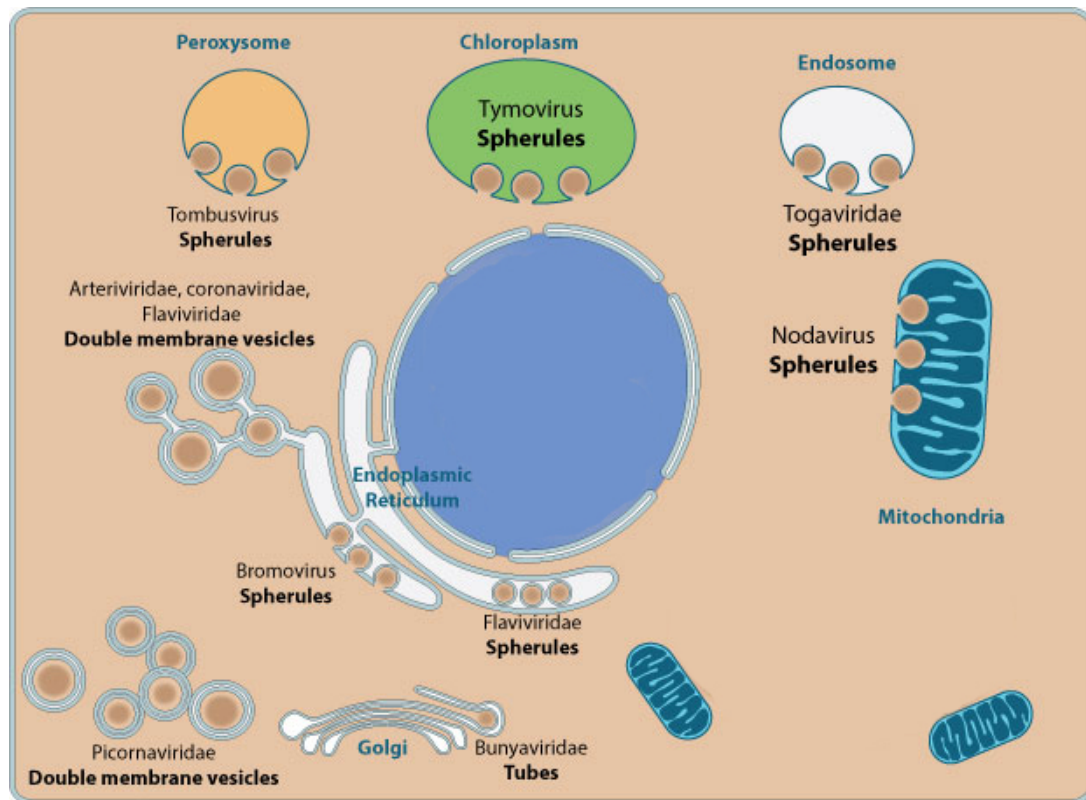


Figure 30 : Organites de réplication virale dérivés des membranes cellulaires

(<https://viralzone.expasy.org/>, SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

1. Organites membranaires de réplication des virus à ARN simple brin de polarité positive

Au sein du monde viral, les virus (+)ssRNA constituent la plus grande classe de virus infectant les organismes eucaryotes, que ce soit parmi les unicellulaires, les plantes ou les animaux (219). Les progrès dans le domaine de la métagénomique ont redessiné la phylogénie virale, et affine la classification de Baltimore basée uniquement sur la nature du génome viral et son mode de réplication. L'analyse de la séquence de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), présente chez tous les virus à ARN (*Riboviria*, *Orthonavirae*), a permis de mettre en évidence une relation évolutive à partir

d'un ancêtre commun théorique infectant les premiers organismes eucaryotes (220) (Figure 31).

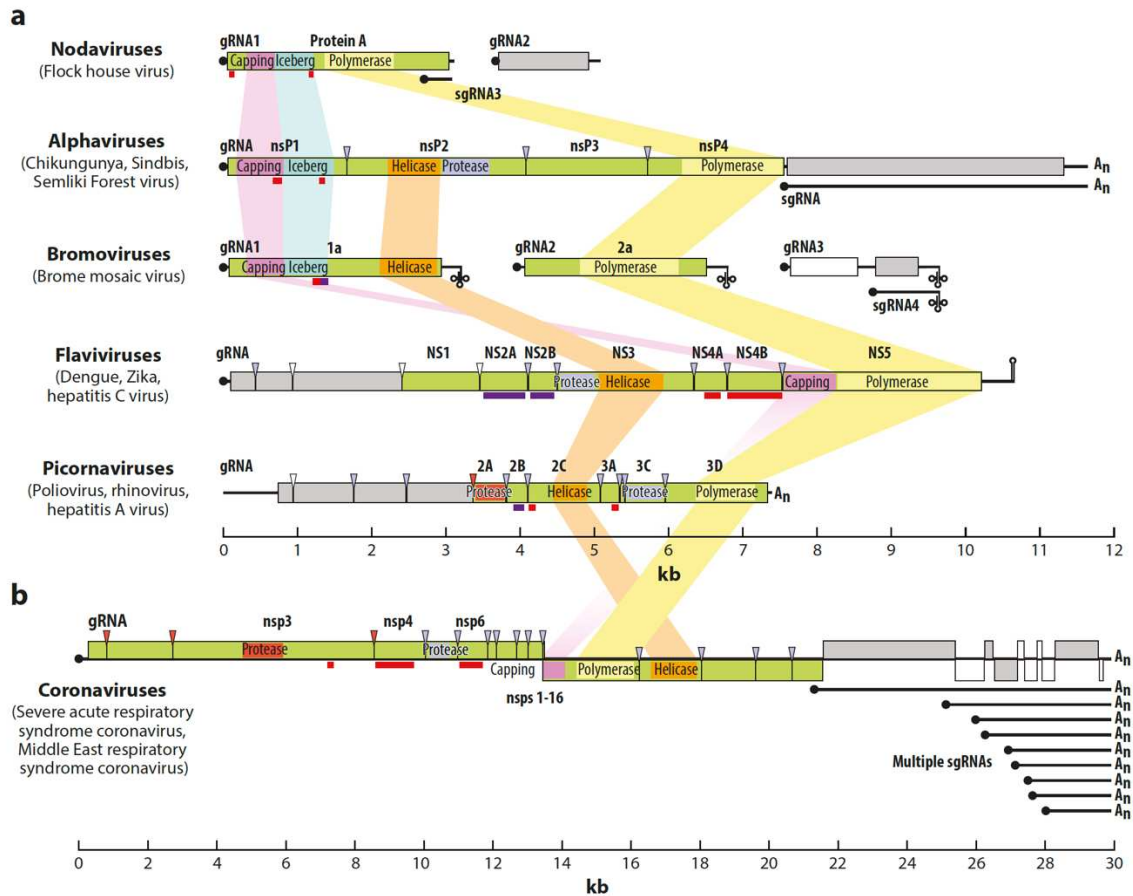


Figure 31 : Comparaison et homologies des génomes des principales familles de virus à ARN simple brin de polarité positive

Les domaines verts représentent les séquences codant les protéines du complexe de la réplicase, avec les domaines enzymatiques suivants : jaune pour la polymérase/RdRp, orange pour la NTPase/hélicase, et magenta pour les domaines de synthèse de la coiffe en 5' des ARN. Les triangles inversés indiquent les sites de clivage de la polyprotéine virale par les protéases, colorés en fonction de la protéase impliquée : rouge ou lavande pour une protéase virale, et blanc pour les protéases de l'hôte ou l'autocatalyse. Les barres rouges représentent les séquences codant des domaines de liaison à la membrane. Les barres violettes représentent les séquences codant des viroporines. Les séquences blanches et grises codent les protéines accessoires et les protéines structurales respectivement. Sur les ARN, les points noirs indiquent les structures de coiffe en 5'.

An : poly(A) sequences; gRNA : genomic RNA; NS : nonstructural; nsp/nsP : nonstructural protein; (+)RNA : positive-strand RNA; RdRp : RNA-dependent RNA polymerase; sgRNA : subgenomic RNA.

(Masaki Nishikiori, Annual Review of Virology 2022 9:1, 193-212)

Ainsi, les virus (+)ssRNA sont regroupés au sein de deux phylums : les *Pisuviricota* (Figure 32) et les *Kitrinoviricota* (Figure 33). Les *Pisuviricota* comprennent notamment deux ordres de virus infectant les vertébrés : les *Picornavirales* auxquels appartiennent les *Picornaviridae* et les *Caliciviridae*, et les *Nidovirales* au sein desquels on retrouve les *Coronaviridae* et les *Arteriviridae*. Les *Kitrinoviricota* comprennent des familles virales

infectant les vertébrés et les insectes (*Togaviridae*, *Flaviviridae*), uniquement les insectes (*Nodaviridae*) et spécifiques des plantes (*Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Tymoviridae*...). Toutes ces familles virales ont en commun de modifier les membranes cellulaires afin de générer des organites de réplication. L'organite cellulaire le plus fréquemment utilisé est le réticulum endoplasmique (221), en particulier par les virus infectant les vertébrés. Les organites de la voie sécrétoire, tels que l'appareil de Golgi, les endosomes et les lysosomes, peuvent également être utilisés comme source de membrane. Les *Nodaviridae*, infectant les insectes, utilisent quant à eux la mitochondrie. Enfin, les virus à ARN infectant les plantes exploitent les membranes des chloroplastes et des peroxysomes.

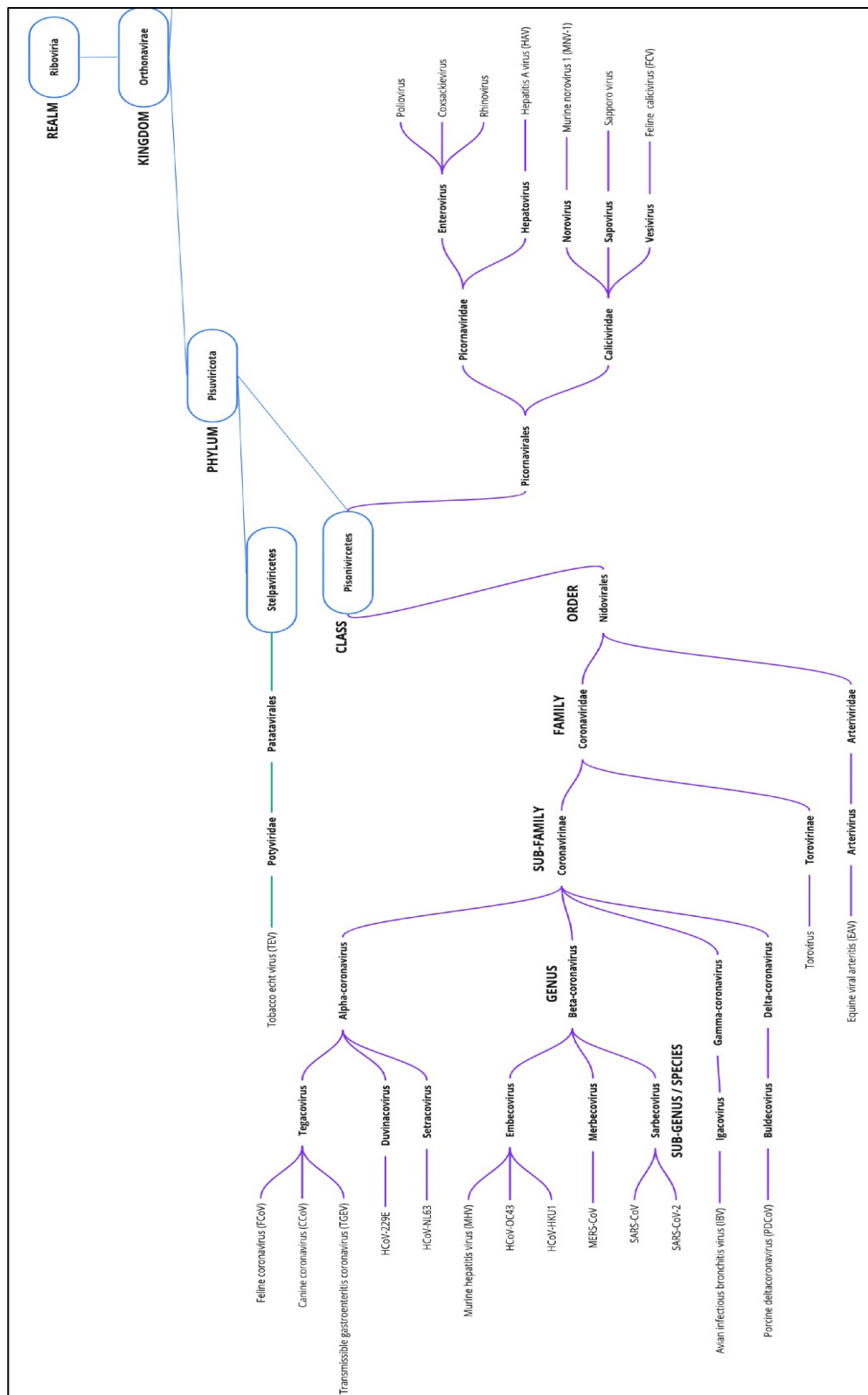


Figure 32 : Classification phylogénétique des virus à ARN simple brin de polarité positive - Partie 1 : Pisuviricota

La couleur des branches de l'arbre phylogénétique correspond à l'espèce de l'hôte infecté (ou au moins d'un des hôtes infectés) : violet pour les mammifères, orange pour les arthropodes, vert pour les végétaux.

(Adapté de : Wolf YI, mBio. 27 nov 2018;9(6):e02329-18.)

Les ROs sont composés d'une ou plusieurs structures membranaires différentes, en fonction de l'espèce virale considérée (**Figure 34**) (**Tableau 4**).

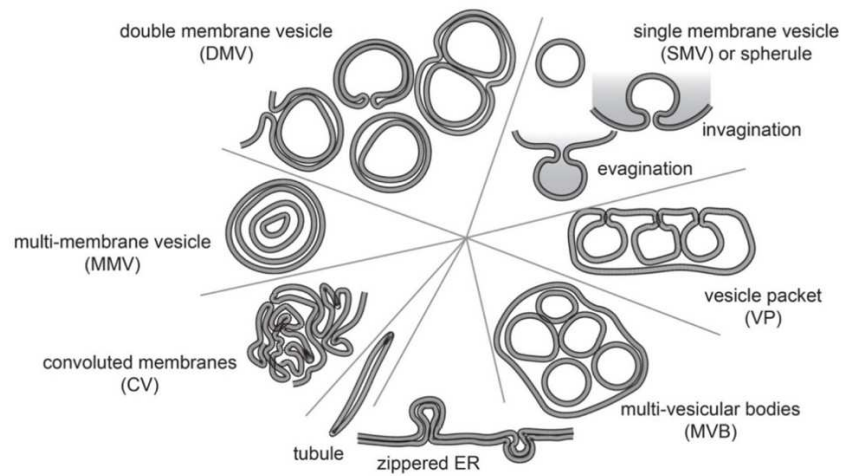


Figure 34 : Diversité des structures membranaires composant les organites de réplication virale
(Harak C, Virology. 1 mai 2015;479-480:418-33.)

Morphotype	Virus Group and Representative Member		Name of Membrane Alteration	Size/Diameter	Membrane Source
Single-membrane vesicles	Nodaviruses	FHV	Spherules	~50 nm	Mitochondria
	Bromoviruses	BMV		~60 nm	ER (adjacent to the nucleus)
	Togaviruses	RUBV	Cytoplasmic vacuoles (CPVs)	600–2000 nm	Lysosomes
		SFV	CPVs with spherules	CPVs: 600–2000 nm Spherules: 50 nm	
		DENV	Invaginated vesicles	80–120 nm	ER
	Flaviviruses	WNV _{KUN}		50–100 nm	
		TBEV		60–100 nm	
		MVEV, SLEV and JEV		75–145 nm	
		YFV		unknown	
Double-membrane vesicles	Hepaciviruses	HCV	Double membrane vesicles (DMVs)	~150 nm	ER
	Coronaviruses	SARS-CoV		200–300 nm	
		MHV		200–350 nm	
		MERS-CoV		150–320 nm	
	Arteriviruses	IBV		~200 nm	Golgi
		EAV		~95 nm	
	Picornaviruses	Poliovirus		100–300 nm	unknown (probably ER)
		CV3B		~160 nm	
		FMDV		~100 nm	
	Calicivirus	MNV-1		~200 nm	ER/Golgi
	Closterovirus	BYV		~100 nm	ER/Mitochondria

Abbreviations: FHV, Flock House Virus; BMV, Brome Mosaic Virus; RUBV, Rubella Virus; SFV, Semliki Forest Virus; DENV, Dengue Virus; WNV_{KUN}, West Nile Virus (Kunjin strain); TBEV, Tick Borne Encephalitis Virus; MVEV, Murray Valley Encephalitis Virus; SLEV, St. Louis Encephalitis Virus; JEV, Japanese Encephalitis Virus; YFV, Yellow Fever Virus; HCV, Hepatitis C Virus; SARS-CoV, Severe Acute Respiratory Virus-Coronavirus; MHV, Mouse Hepatitis Virus; MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus); IBV, Infectious Bronchitis Virus; EAV, Equine Arterivirus; CVB3, Coxsackie B3 Virus; FMDV, Foot and Mouth Disease Virus; MNV-1, Murine Norovirus-1; BYV, Beet Yellows Virus.

Tableau 4 : Caractéristiques des organites membranaires de réplication par famille virale
(Romero-Brey I, Viruses. juill 2014;6(7):2826-57.)

Les deux structures les plus largement retrouvées sont les vésicules à simple membrane (SMVs), aussi appelées sphérules et générées par invagination (incurvation négative) de la membrane cellulaire, et les vésicules à double membrane (DMVs) générées par une

incurvation positive de la membrane cellulaire (**Figure 35**). Le mécanisme de formation des DMVs est plus complexe que celui des sphérules, et reste mal compris pour certains virus. Les deux mécanismes proposés en premier, pour le virus de l'artérite virale équine (EAV) sont : le double bourgeonnement d'une vésicule au sein du RE, ou la protrusion à partir d'une citerne du RE (**Figure 36**).

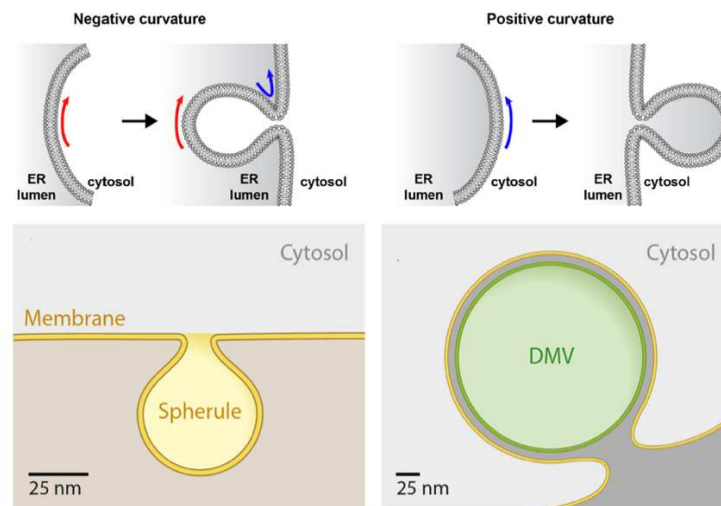


Figure 35 : Principe de formation et représentation schématique des vésicules à simple membrane et à double membrane

(Adapté de : Romero-Brey I, Annual Review of Virology. 2022;9(1):193-212.)

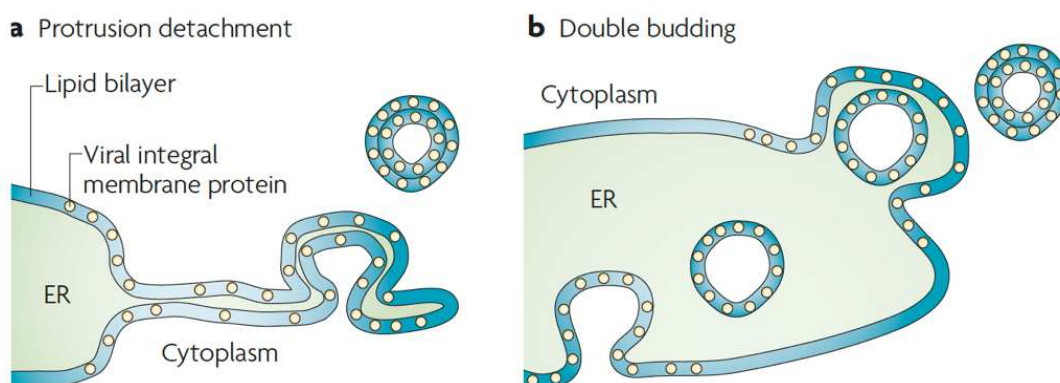


Figure 36 : Hypothèses concernant les mécanismes de formation des DMVs chez l'EAV

(Miller S, Nat Rev Microbiol. mai 2008;6(5):363-74.)

Plus récemment, un mécanisme similaire, élucidé pour les picornavirus, met en jeu une vésicule à simple membrane qui évolue ensuite vers une citerne, dont la membrane va s'incurver sur elle-même puis fusionner (222) (**Figure 37**).

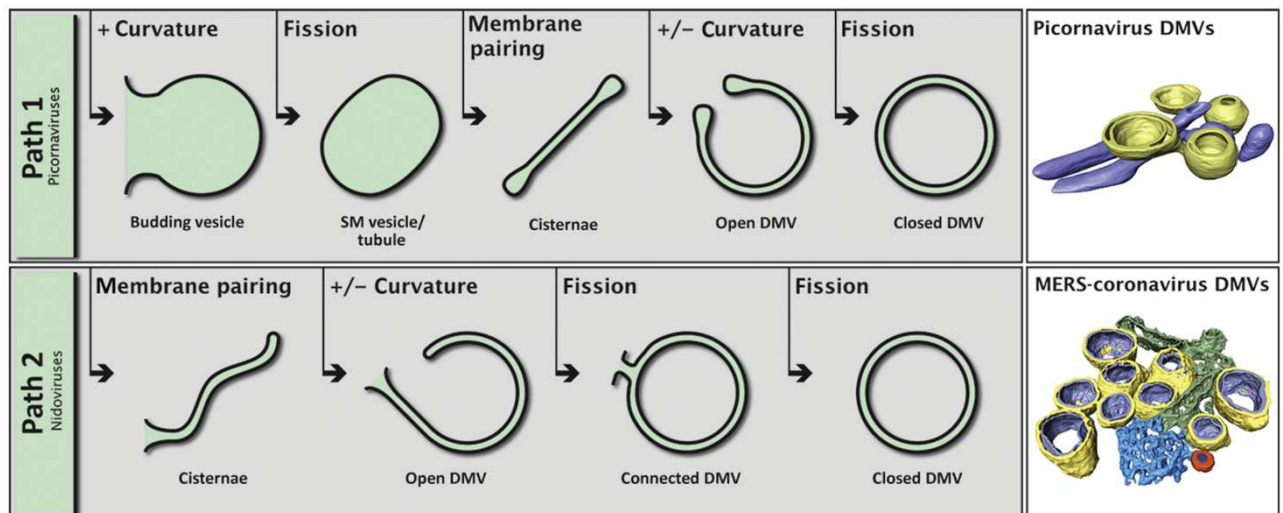


Figure 37 : Mécanismes et étapes de formation des DMVs chez les picornavirus et le MERS-CoV

(Wolff G, Trends in Microbiology. 1 déc 2020;28(12):1022-33.)

L'intérieur des sphérules est toujours connecté au cytoplasme par un pore. L'intérieur des DMVs peut être ouvert sur le cytoplasme, sur la lumière de l'organite cellulaire dont il dérive, ou être complètement scellé. Le regroupement de plusieurs vésicules forme des « paquets de vésicules » (vesicle packets, VPs). Les vésicules multi-membrane (multi-membrane vesicle, MMV) sont des structures plurilamellaires de grande taille. Les membranes convolutées (convoluted membranes, CMs) sont composées d'un réseau complexe de citernes tubulaires replié sur lui-même, souvent associé au réticulum endoplasmique. Les tubules sont des éléments cylindriques et allongés à simple membrane. Enfin, le réticulum endoplasmique zippé / en fermeture éclair (zippered ER) est formé par le rapprochement et l'apposition des deux faces de la membrane d'une citerne. Une particularité des virus (+)ssRNA réside dans la génération d'ARN double brin (dsRNA) comme intermédiaire de réplication, qui constitue un puissant activateur de la réponse cellulaire innée à l'infection virale.

a. Amarillovirales / Flaviviridae

i. Flavivirus

Les premières publications décrivant les modifications des endomembranes en cellules de mammifère par le virus de la dengue (DENV) datent des années 1970 (223,224). Le développement de la tomographie électronique sur échantillons inclus en résine, a permis une analyse en 3D du réseau de réplication généré par ce virus en cellule Huh7 (225) (**Figure 38**). Ce réseau est composé d'un enchevêtrement complexe de

membranes convolutées, associé à des sphérules (SMVs) de 80 à 120 nm. Ces SMVs sont retrouvées invaginées dans des tubules dérivés du RE ou libres dans le cytoplasme au sein de VPs, et communiquent avec le cytosol *via* des pores d'environ 10 nm. Un immunomarquage a permis de mettre en évidence la présence de dsRNA dans les vésicules ou sur le versant cytosolique de ces vésicules, ainsi que celle de la protéine NS3 (protéase virale impliquée dans la maturation de la polyprotéine) au sein des CMs. De plus, des images de bourgeonnement de virions sont observées à proximité des vésicules, indiquant une probable coordination spatiale entre les sites de réplication et les sites d'assemblage. Une analyse réalisée en cellule de moustique C6/36 infectées retrouve ces différentes structures, à l'exception des CMs. De plus, une analyse aux temps tardifs de l'infection a permis d'observer l'apparition de tubules au voisinage de VPs. Ces tubules peuvent représenter un marqueur de cellules d'insecte chroniquement infectées, à l'image d'observations réalisées dans des cellules de tiques infectées par le virus de l'encéphalite à tique (TBEV) (226).

L'étude de l'infection par le virus du Nil occidental (West Nile virus), en particulier son variant australien (WNV Kunjin virus), a été réalisée en cellules Vero. Son réseau de réplication comporte trois structures : des CMs, des VPs contenant des SMVs de 50-100 nm connectées au cytosol par un pore, et des zones de membranes paracrystallines (PCs) (227). La colocalisation de marqueurs du trans-Golgi (TGN) avec le dsRNA des vésicules, suggère une contribution de cet organe dans leur biogenèse (228). Il est également noté une association étroite des membranes des vésicules avec le réticulum endoplasmique rugueux (RER) (229).

De nombreux flavivirus sont à transmission vectorielle par des arthropodes (arbovirus), et ont donc la capacité de se répliquer en cellules de mammifère, et en cellules d'insecte ou de tique. Le TBEV représente donc un modèle permettant de comparer les modifications cellulaires induites par le virus dans ces deux contextes. Il a été observé un nombre de SMVs moindre en cellules de tique (ISE6) par rapport à la lignée Vero (226). A l'inverse, les cellules ISE6 infectées présentent fréquemment des tubules, là où ces structures sont rarement rencontrées en cellules de mammifère, à l'image du DENV. Les SMVs (60 - 100 nm) sont préférentiellement observées à proximité du RE et ouvertes *via* des pores sur le cytoplasme, mais aussi connectées aux vésicules voisines par ces mêmes pores (**Figure 39**). Les tubules se présentent sous la forme de vésicules allongées mesurant jusqu'à 800 nm de longueur, ont tendance à se regrouper en faisceaux, et sont systématiquement scellés et dépourvus de pores. Le rôle des tubules et leur implication

dans le cycle du TBEV est encore méconnu, et il n'est pas déterminé si ces structures participent au processus de réplication ou si elles sont formées par un remaniement défectueux des membranes cellulaires.

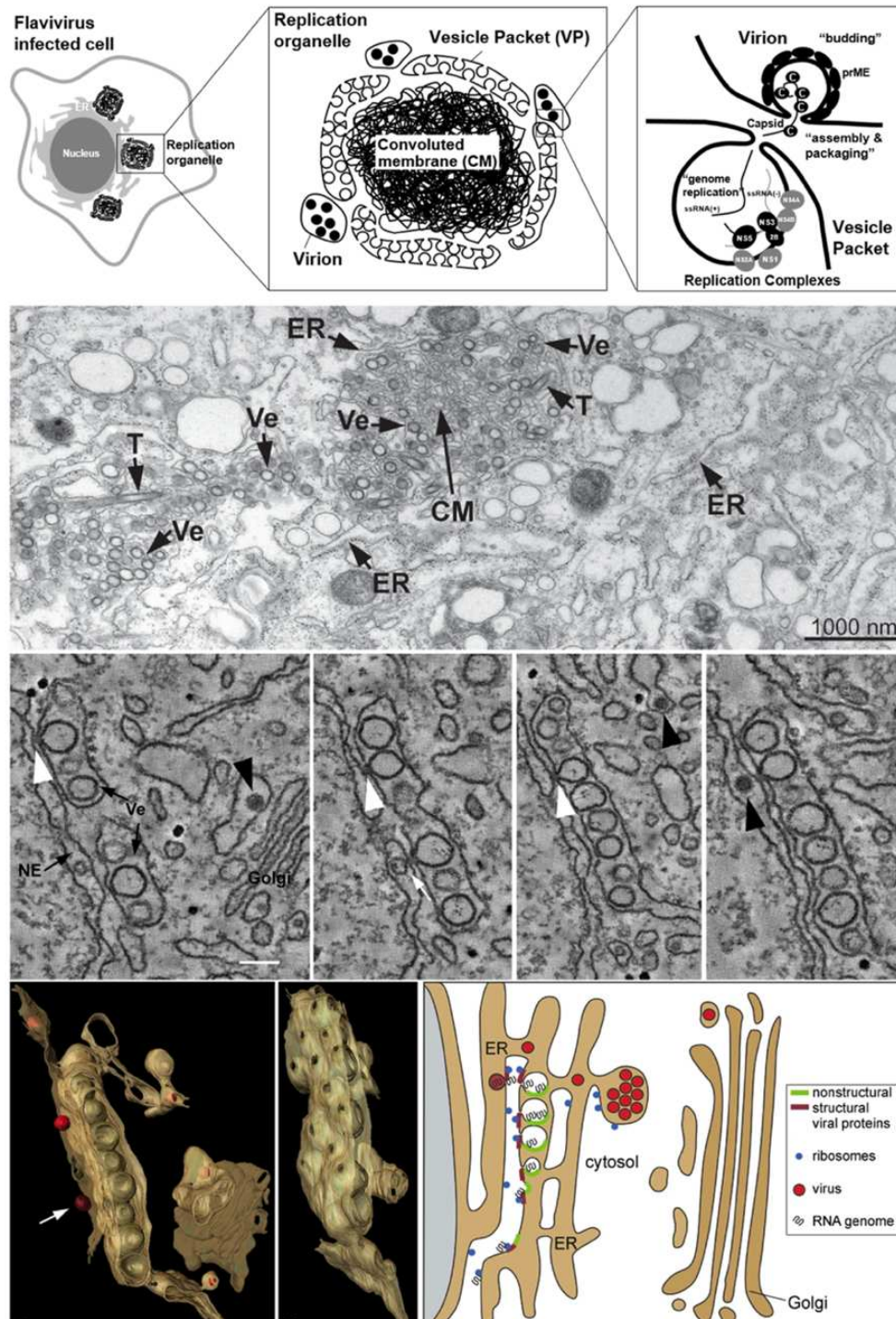


Figure 38 : Schémas, micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus de la dengue (DENV)

Ve : single membrane vesicles

(Adapté de : Morita E, *Viruses*. 2021 Jun 3;13(6):1060 et Ci, Y., *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 4939–4954 (2021).)

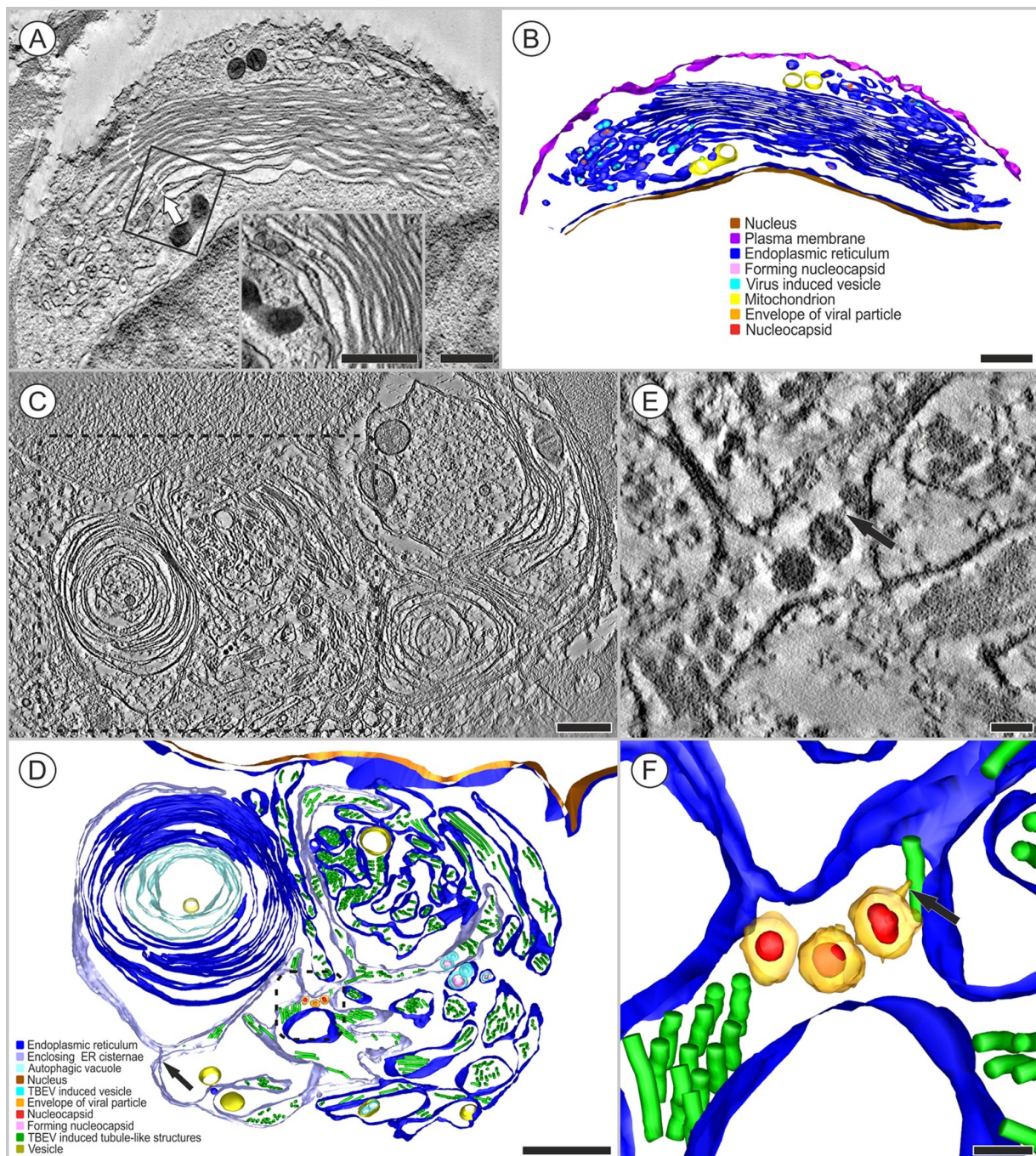


Figure 39 : Micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus de l'encéphalite à tique (TBEV)

(Bíly, T., *Sci Rep* 5, 10745 (2015).)

Le dsRNA est détecté uniquement à l'intérieur des SMVs. Le rôle protecteur des vésicules pour le dsRNA, vis-à-vis des senseurs de l'immunité innée cellulaire, a notamment été démontré en cellules infectées par le TBEV. Ces cellules ont été traitées par du Triton, qui perméabilise toutes les membranes cellulaires, ou de la streptolysine O qui perméabilise uniquement la membrane plasmique (230). Les cellules infectées traitées

par le Triton présentent une activation des gènes stimulés par l'interféron, non observée dans les cellules traitées par la streptolysine O où les endomembranes restent intactes et isolent le dsRNA des PRRs du cytosol. Le traitement de cellules infectées avec le WNV_{KUN} ou le TBEV par la bréfeldine A (BFA), qui désorganise le réseau golgien, n'entraîne pas d'inhibition de la réplication virale (230,231). En revanche dans le cas du WNV_{KUN}, il entraîne une réponse antivirale par la protéine MxA induites par l'IFN. Le même traitement sur des cellules infectées par le TBEV n'entraîne pas de réponse antivirale, indiquant que les compartiments induits par ce virus protègent toujours le dsRNA et sont résistants à la BFA.

Le pourcentage de vésicules contenant un pore semble varier en fonction du modèle viral. Dans des cellules BHK-21 infectées avec la particule virale complète du TBEV, environ la moitié des SMVs comporte un pore, contre 75 % dans des cellules transfectées avec un réplicon du TBEV (232,233). De plus, la connexion des vésicules entre elles par les pores est observée pour le WNV_{KUN} mais pas pour le TBEV, pour lequel les vésicules sont uniquement ouvertes sur le cytoplasme.

Plus globalement, l'ensemble des flavivirus utilise le réticulum endoplasmique comme source de membranes lors de la formation de leur ROs, suivi d'un assemblage des néovirions dans des saccules de RE à proximité des sites de réplication, puis d'une maturation des virions dans le Golgi.

ii. Hepacivirus

Par contraste avec les autres membres des *Flaviviridae*, le virus de l'hépatite C (HCV) génère un ROs original dans sa composition et son organisation, appelé « membranous web » (MW) (234) (**Figure 40**). Ce terme désigne une accumulation de vésicules au sein d'une matrice membranaire (membranes ondulantes et très serrées), générée dans les cellules exprimant la polyprotéine du HCV. L'amélioration des techniques de ME et l'observation de cellules Huh7.5 infectées a permis d'identifier les DMVs comme étant l'élément le plus représenté dans le MW (235,236). Ces DMVs sont connectées au RE par leur membrane externe, contiennent du dsRNA et comportent un pore ouvert sur le cytosol dans environ 10 % des vésicules. Lors des phases tardives de l'infection, des MMVs sont observées et proviennent vraisemblablement d'évènements de repliement secondaire de DMVs. Une autre étude, basée sur l'infection de Huh7.5 avec le clone JFH-1, a réalisé une description détaillée de l'organisation des populations vésiculaires au sein du MW (237). Les vésicules en cluster (ViCs) sont de petites SMVs

de tailles variables (100 - 200 nm) regroupées en amas dans des zones subcellulaires localisées, la plupart comportant une invagination interne.

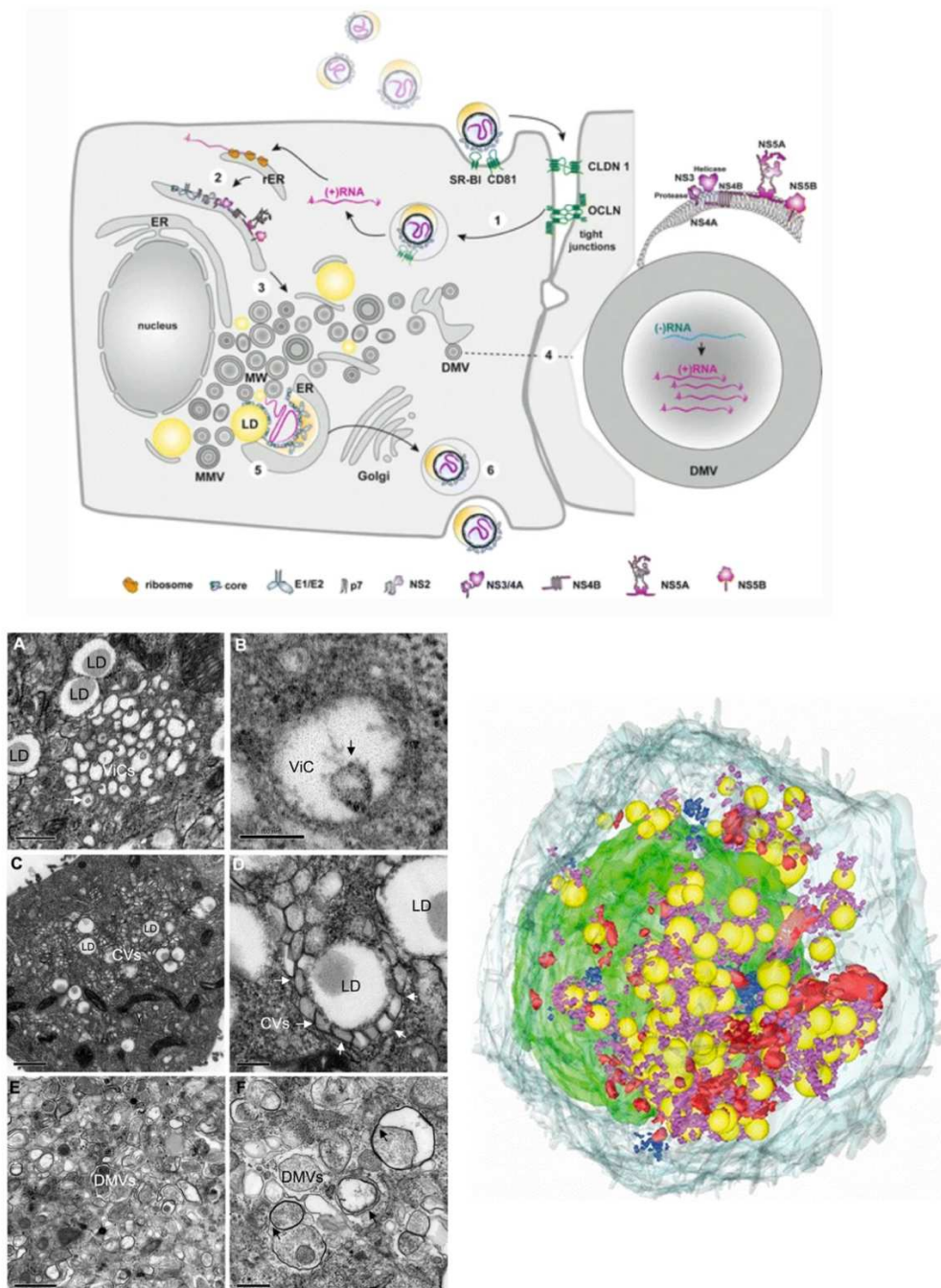


Figure 40 : Schéma, micrographies en MET et reconstruction tomographique des organites de réplication du virus de l'hépatite C (HCV)

3D reconstruction color code :

Cell components : plasma membrane (light gray), nucleus (green), lipid droplets (yellow)

Viral replication organelles : ViCs (blue), CVs (purple), DMVs (red).

(Adapté de : Ferraris, P., *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 1297–1306 (2013) et Romero-Brey I, Hepatitis C Virus I. 2016 Apr 8:149–96.)

Les vésicules contiguës (CVs) sont également de petites SMVs avec une taille homogène (≈ 100 nm), présentes en grand nombre et distribuées dans tout le cytoplasme. Les CVs sont étroitement associées entre elles et ont tendance à s'organiser en collier autour des gouttelettes lipidiques. Les DMVs observées présentent une grande hétérogénéité de taille (150 - 1000 nm). L'augmentation du nombre de CVs semble corrélée à une augmentation de la réplication virale, ce qui est en faveur d'un rôle lors des phases précoces de la réplication. Cette hypothèse est confortée par la colocalisation de la protéine NS5A (composant de la réplicase virale) dans les CVs en immunogold. La présence de protéine Core dans les CVs, à l'image de ce qui est observé à la surface des gouttelettes lipidiques, pose également la question de leur rôle comme plateforme d'assemblage viral. A l'inverse des DMVs, les ViCs ne contiennent pas de dsRNA ou d'autres composants viraux. Quoiqu'il en soit, toutes les structures membranaires décrites précédemment sont toujours fortement associées aux gouttelettes lipidiques, acteur cellulaire majeur de la morphogenèse du HCV.

b. Hepelivirales / Matonaviridae

Le virus de la rubéole (RUBV) est le seul membre du genre rubivirus, longtemps classé dans la famille des *Togaviridae*. Bien qu'il appartienne toujours au supergroupe des Alphavirus (*Alsuviricetes*), il est maintenant le seul représentant de la famille des *Matonaviridae*. L'analyse de cellules BHK-21 infectées par ce virus a permis de mettre en évidence la génération de vacuoles cytopathiques (CPVs) de grande taille (600 - 2000 nm) dérivées des endosomes et des lysosomes (238,239) (**Figure 41**). Ces CPVs présentent une structure très hétérogène et complexe, composée d'empilement de membranes, de petites vésicules et de grandes vacuoles (240). La formation de ces CPVs dépend principalement de voies d'endocytose, comme le montre l'incorporation dans ces structures de particules d'or couplées à la BSA et endocytées. Les CPVs sont étroitement liées aux autres organites de la cellule infectée (RE, Golgi, mitochondries), qui sont recrutés dans leur périphérie et dont l'ensemble forme les usines à virions du RUBV. Le RER établit des contacts avec les CPVs par le biais de ponts protéiques de 10 - 15 nm. On trouve aussi des points de contact avec les vésicules golgiennes, en revanche aucun contact physique n'a été identifié avec les mitochondries, pourtant recrutées à leur voisinage. Les protéines de la réplicase virale et le dsRNA ont été localisés dans les vésicules des CPVs. Ces vésicules dans un premier temps de petite taille, évoluent probablement secondairement en grandes vacuoles.

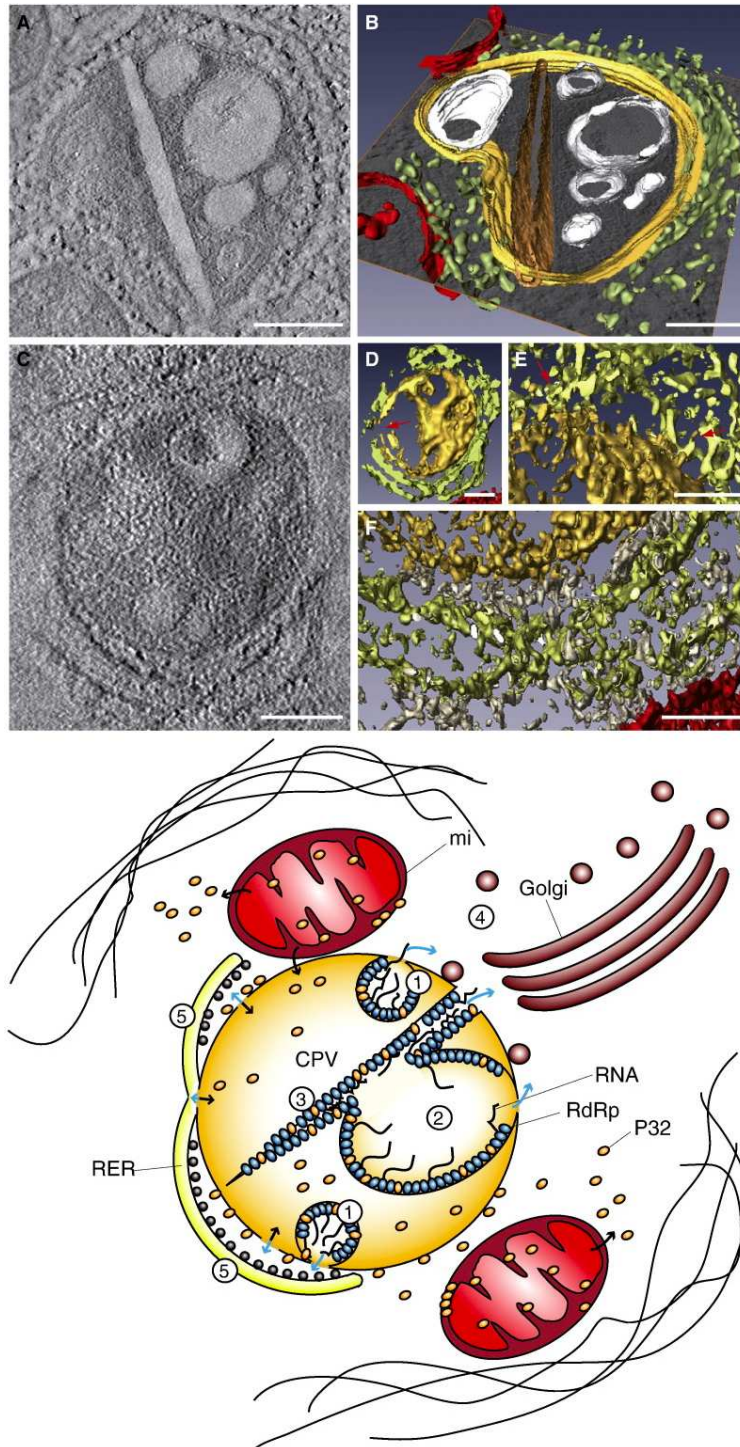


Figure 41 : Schéma, micrographies en MET après cryofracture, et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus de la rubéole (RUBV)

(Fontana J, Virology. 2010 Sep 30;405(2):579-91)

c. Martellivirales / Togaviridae

La formation de CPVs dérivés des endosomes tardifs et des lysosomes est une caractéristique du RUBV partagée avec les *Togaviridae* du genre *Alphavirus* : virus de la forêt de Semliki (SFV), virus Chikungunya (CHIKV), virus Sindbis (SINV), virus de l'encéphalite équine de l'Ouest (WEEV) (241,242). La surface interne des CPVs de ces virus est couverte de sphérules à simple membrane de 50 nm, invaginées et dérivées de la membrane plasmique (**Figure 42**). Ces sphérules apparaissent comme le site de la réplication virale, et sont connectées au cytoplasme par des pores de 5 à 10 nm (243,244). L'étude cinétique de la formation des CPVs des alphavirus en cellules BHK-21, a permis de mettre en évidence un mécanisme de formation tout à fait original, qui met en jeu des échanges à grande échelle entre différents compartiments cellulaires. Les sphérules sont initialement formées par exvagination de blebs à la surface de la membrane plasmique, par l'action des protéines non structurales NSP1 et NSP4. Elles sont ensuite internalisées par un processus d'endocytose dépendant du cortex d'actine-myosine (245). Une fois endocytées, les sphérules fusionnent avec un endosome tardif transporté sur les microtubules vers un site localisé en région péricentriolaire, où elles s'accumulent dans les CPVs.

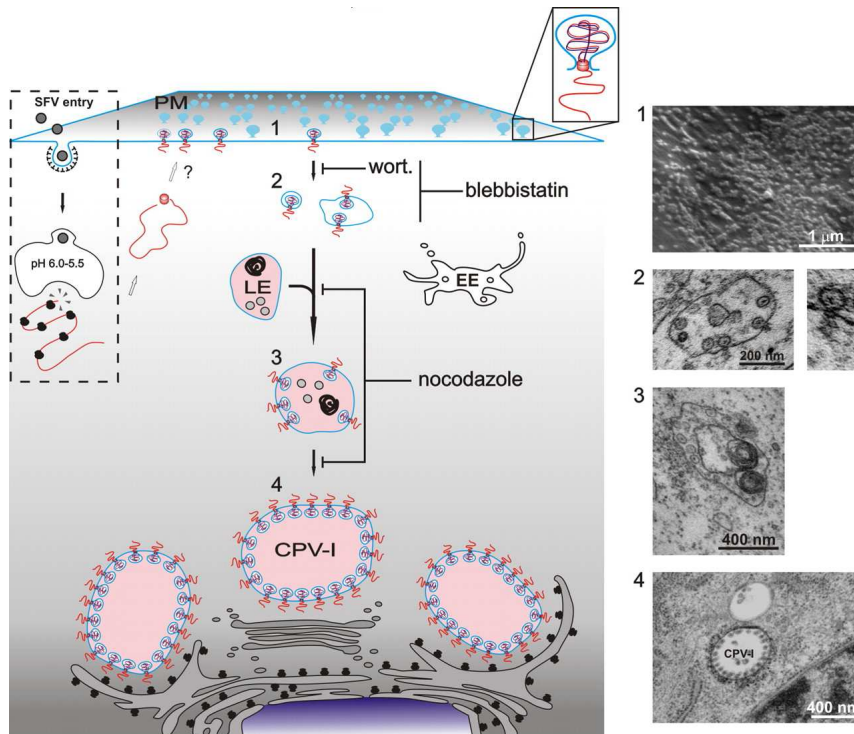


Figure 42 : Schéma et micrographies en MET de la biogenèse des organites de réplication du virus de la forêt de Semliki (SFV)

wort. : wortmannin

(Spaul P, J Virol. 2010 Aug;84(15):7543-57.)

d. Nodamuvirales / Nodaviridae

Les *Nodaviridae* infectent majoritairement les insectes, son représentant le mieux caractérisé étant le virus Flock House (FHV). Le FHV a pour particularité de générer, en cellules de drosophile S2, des invaginations de la membrane externe mitochondriale formant des sphérules de 50 nm, connectées au cytoplasme par des pores de 10 nm (246,247) (**Figure 43**). La localisation d'ARN viraux par immunogold, entre la membrane interne et la membrane externe mitochondriale, valide le rôle de ces sphérules dans la réplication du génome du FHV. L'utilisation de la mitochondrie dans la biogenèse de ROs est particulièrement rare à l'échelle du monde viral, bien qu'elle soit également retrouvée chez certaines familles virales infectant les plantes.

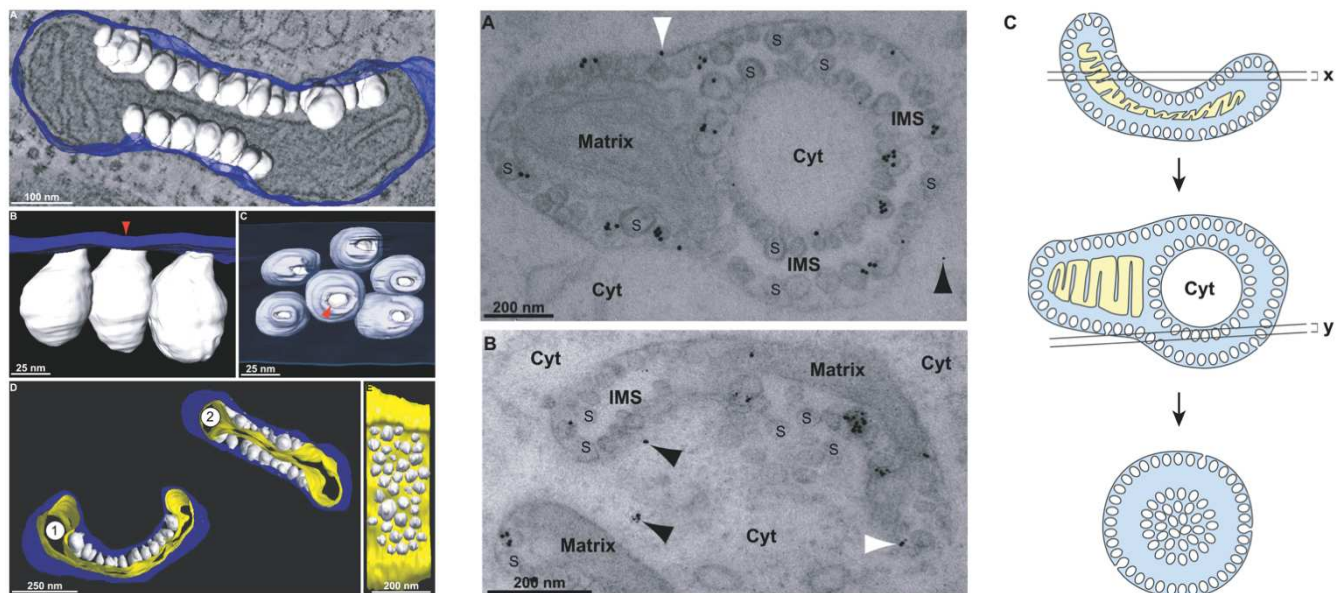


Figure 43 : Schéma, micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus Flock House (FHV)

cyt : cytoplasm; IMS : intermembrane space

(Kopek BG, PLoS Biol. 2007 Sep;5(9):e220.)

e. Picornavirales

i. Picornaviridae

Une des premières descriptions en microscopie électronique de modifications de l'architecture cellulaire induites par un virus, concerne le virus de la poliomyélite et date de 1958 (248). L'origine des ROs des poliovirus est toujours incomplètement caractérisée à l'heure actuelle. En cellules HeLa, la présence de marqueurs du Golgi dans les usines virales est retrouvée au stade précoce de l'infection (249), suivi de l'ajout de

marqueurs du RE et des lysosomes au stade tardif de l'infection (250). Au stade précoce de l'infection, le réseau de réplication est majoritairement composé de regroupements de petites SMVs rondes/ovales, qui évoluent ensuite vers des vésicules à simple membrane de grande taille et de forme irrégulière (**Figure 44**).

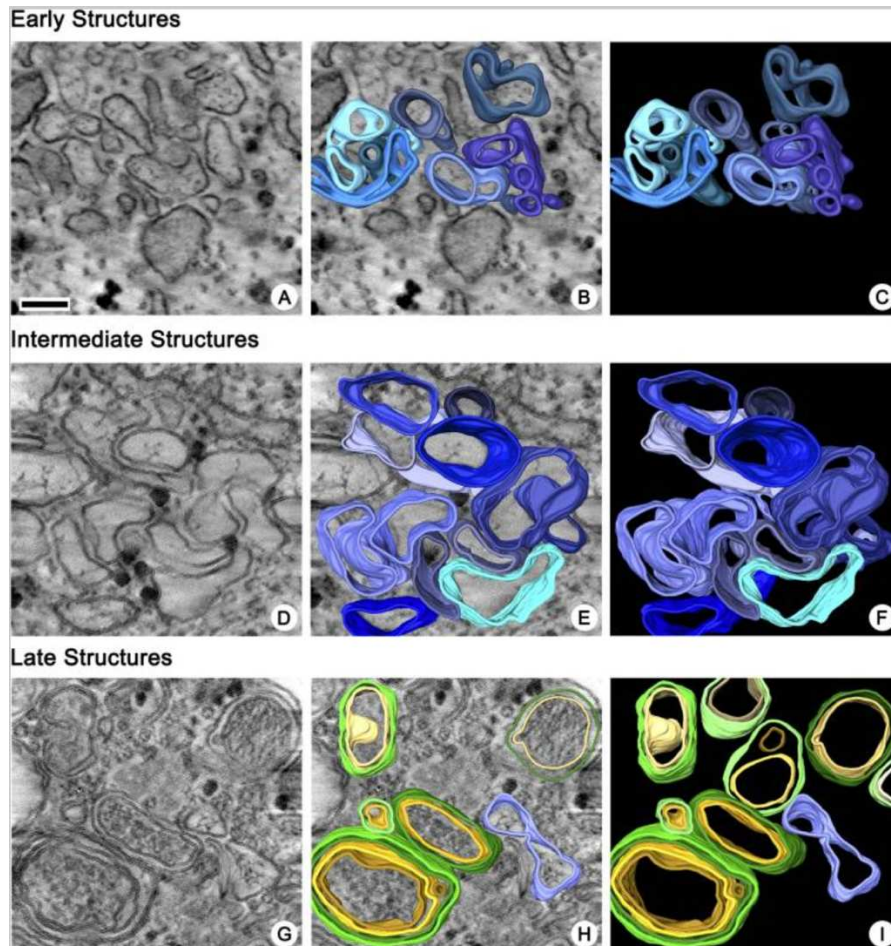


Figure 44 : Micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du poliovirus 3

(Belov GA, J Virol. 2012 Jan;86(1):302-12.)

Leur remplacement au profit de DMVs (100 - 300 nm) au stade tardif de l'infection, amène à considérer les SMVs comme un possible précurseur de leur formation, par un mécanisme d'appariement des membranes et de courbure de la vésicule sur elle-même (**Figure 37**) (222,251). L'observation de corps en U (U-bodies) avec une forme de « fer à cheval », est probablement un stade intermédiaire de cette biogenèse, entre la SMV et la DMV. Il est intéressant de noter que les SMVs contiennent des marqueurs du *cis*-Golgi (GM130) mais pas de marqueurs du RE (calnexine). Cela n'exclue pas pour autant une participation du RE dans la formation des SMVs, dans la mesure où les protéines résidentes de cet organe peuvent être évacuées après formation de la vésicule. La phase

exponentielle de la synthèse d'ARN viral coïncide avec l'apparition des SMVs et des corps en U, ce qui les désigne comme principaux acteurs de la réplication virale.

Les mécanismes de formation des ROs ont aussi été étudiés en cellules Vero avec le virus coxsackie B3 (CVB3), qui induit aussi des SMVs et des DMVs, dont la proportion relative est directement liée au stade de la réplication virale (252) (**Figure 45**). La disparition de l'appareil de Golgi plaide en faveur de réarrangements de cet organe menant à la formation des SMVs.

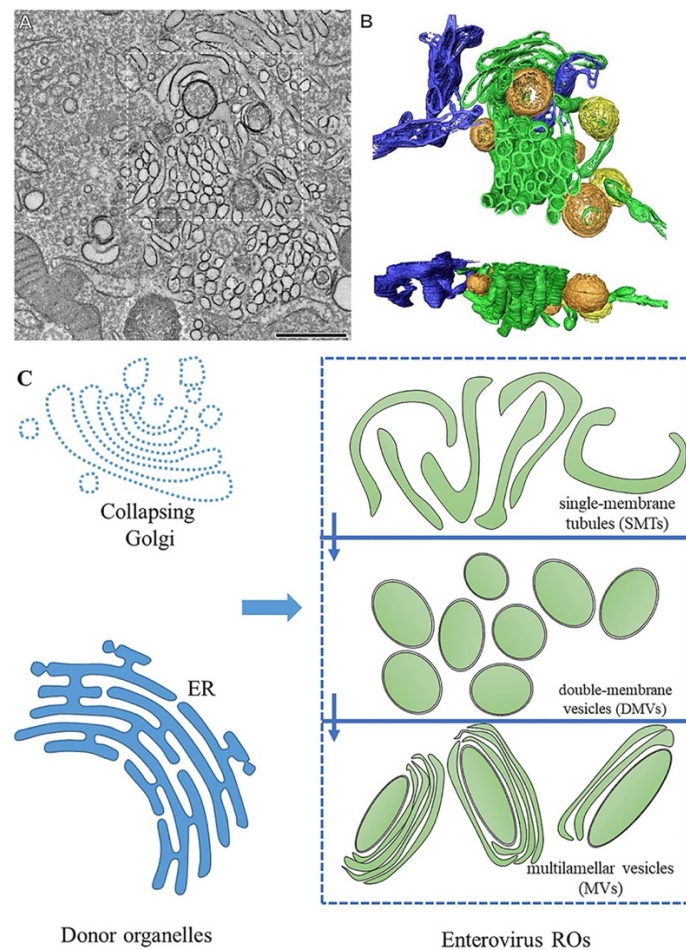


Figure 45 : Schéma, micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus coxsackie B3 (CVB3)

(Li X, *Frontiers in Microbiology*. 2020)

L'augmentation du nombre de DMVs au cours du temps est également observée, à l'image des cellules infectées par les poliovirus. Les SMVs prennent parfois la forme de tubules de 600 à 700 nm, qui représentent là encore un potentiel intermédiaire de formation des DMVs, par un phénomène d'auto-enveloppement similaire à ceux observés

lors de l'autophagie. Ces DMVs ne présentent pas de connexion physique avec les organites voisins, à l'inverse de ce qui est observé pour les nidovirus. Une autre structure est observée tardivement dans les cellules infectées par le CVB3 : des corps multilamellaires probablement dérivés des DMVs, dont ils contiennent chacun un exemplaire entouré de plusieurs couches de membranes.

L'ensemble de ces observations a aussi été confirmée en cellules BHK-38 infectées avec le virus pied-main-bouche (FMDV), avec une apparition séquentielle et consécutive de SMVs suivie de DMVs, concomitante à la progression du cycle viral au cours du temps (253).

ii. Caliciviridae

Le genre Norovirus comprend des agents infectieux responsable chez l'Homme d'épidémies saisonnières de gastro-entérite virale. L'analyse ultrastructurale de cellules dendritiques et de macrophages infectés avec le norovirus murin 1 (MNV-1) a permis de mettre en évidence des particules virales au voisinage ou à l'intérieur de SMVs et de DMVs (254) (**Figure 46**). À 24 h p.i., un grand nombre de vésicules et de particules virales est généré ,et refoule le noyau par encombrement au sein du volume cellulaire. Ces ROs semblent provenir de plusieurs compartiments d'après les marqueurs détectés : RE, *trans*-Golgi et endosomes (255). Ces observations n'ont pas pu être menée avec le norovirus humain, impossible à cultiver en lignée cellulaire à l'heure actuelle.

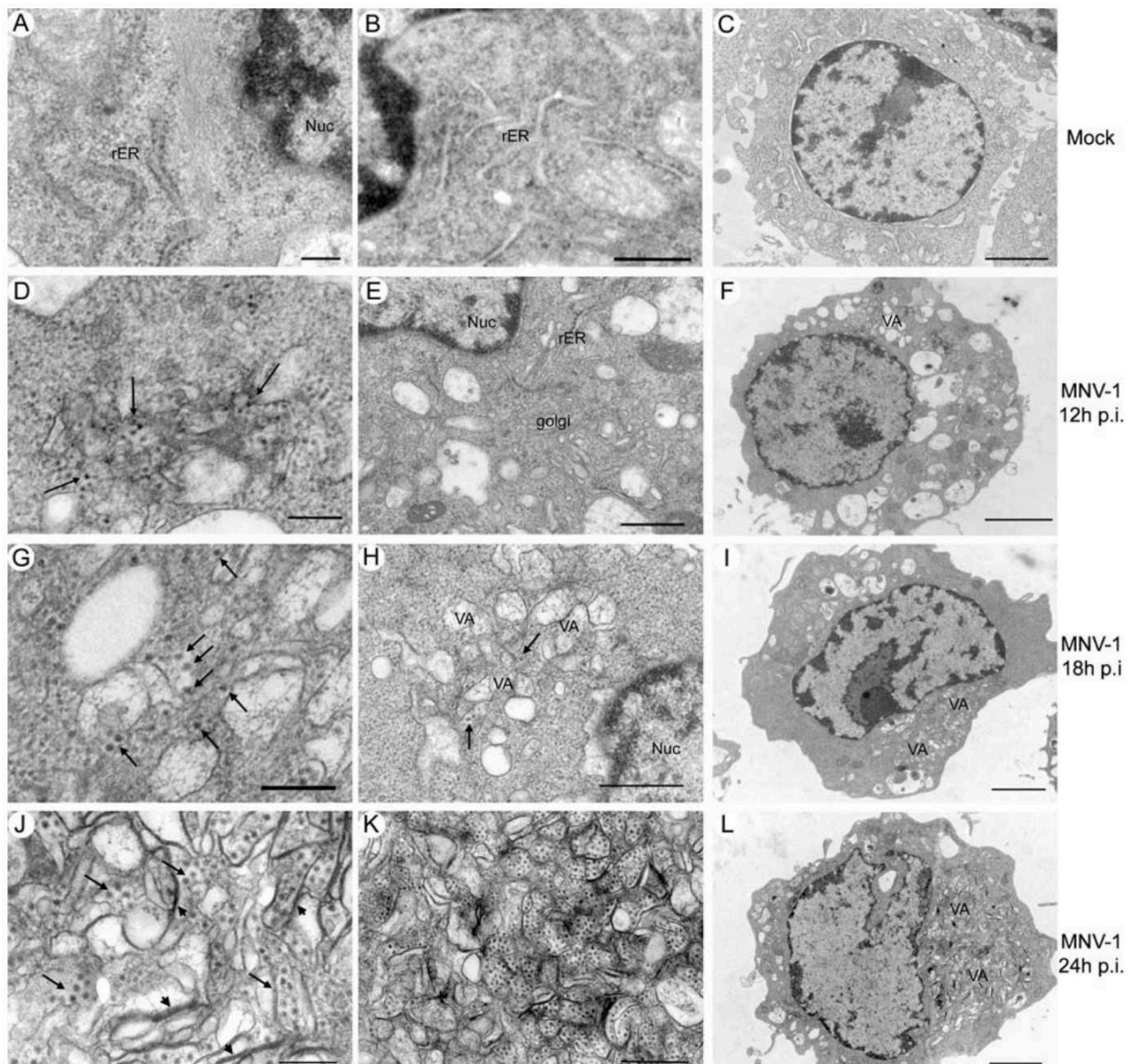


Figure 46 : Micrographies en MET de la biogenèse des organites de réplication du norovirus murin 1 (MNV1)

(Wobus CE, PLoS Biol. 2004 Dec;2(12):e432.)

f. Nidovirales

Au sein des *Nidovirales*, l'architecture et les composants des ROs varient significativement entre les différentes familles virales (**Figure 47**). On retrouve des DMVs chez les *Alpha-*, *Betacoronavirus* et les *Arteriviridae*, des membranes appariées chez les *Gammacoronavirus* et les *Arteriviridae*, des CMs uniquement chez les *Alpha-* et *Betacoronavirus*, et des sphérules issues de RE zippé chez les *Gammacoronavirus*.

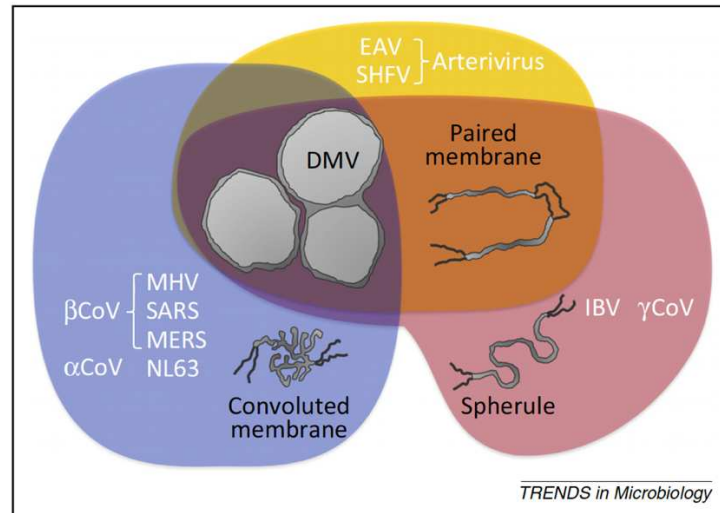


Figure 47 : Composants membranaires du réseau de réplication des *Nidovirales*

(Neuman BW, Trends in Microbiology. 1 nov 2014;22(11):642-7.)

i. Coronaviridae

Concernant les *Betacoronavirus*, l'étude du SARS-CoV a été une opportunité de documenter l'ultrastructure de leur réseau de réplication. Pour ce virus, l'analyse de cellules Vero infectées a permis d'observer la formation d'un réseau réticulo-vésiculaire (RVN) généré à partir des membranes du RE, composé de CMs, de DMVs (200 - 300 nm), et de paquets de vésicules (VPs) (256) (**Figure 48**). En immunogold, les CMs contiennent des composants de la réplicase virale (NSP), et les DMVs du dsRNA. Bien que les DMVs présentent des connexions avec les DMVs adjacents, les CMs et le RE *via* leur membrane externe, il n'a initialement pas été identifié avec certitude de connexion avec le cytoplasme *via* des pores chez le SARS-CoV.

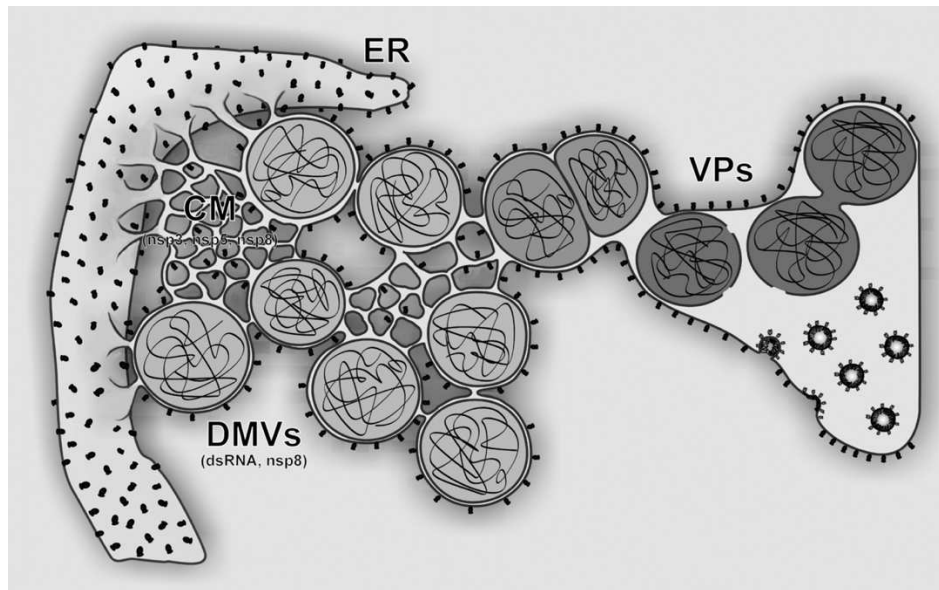


Figure 48 : Schéma des organites de réplication du SARS-CoV

(Knoops K, PLoS Biol. sept 2008;16;6(9):e226.)

Dans des cellules HeLa infectées avec le MHV, on observe l'apparition séquentielle dans cet ordre de différents éléments : des DMVs (200 - 350 nm), des CMs, de grandes vacuoles contenant des virions (LVCV), des corps tubulaires (TB) et enfin des structures membranaires cubiques (CMS) (257) (**Figure 49**). Les TB sont décrits comme une accumulation de membranes en « pelote de laine », en continuité avec le RE. Les CMS sont organisées sous la forme d'un maillage membranaire cubique et périodique (paracristallin) de membranes du RE, probablement par accumulation et auto-assemblage de protéines Spike en excès dans le RE, avec un rôle majeur du cholestérol dans ces remaniements membranaires de forme géométrique. Le MERS-CoV induit la formation de ROs en région périnucléaire, comportant des DMVs (150 - 320 nm) et des CMs (258). Les CMs sont toujours entourées de DMVs, qui précèdent leur apparition au stade tardif de l'infection.

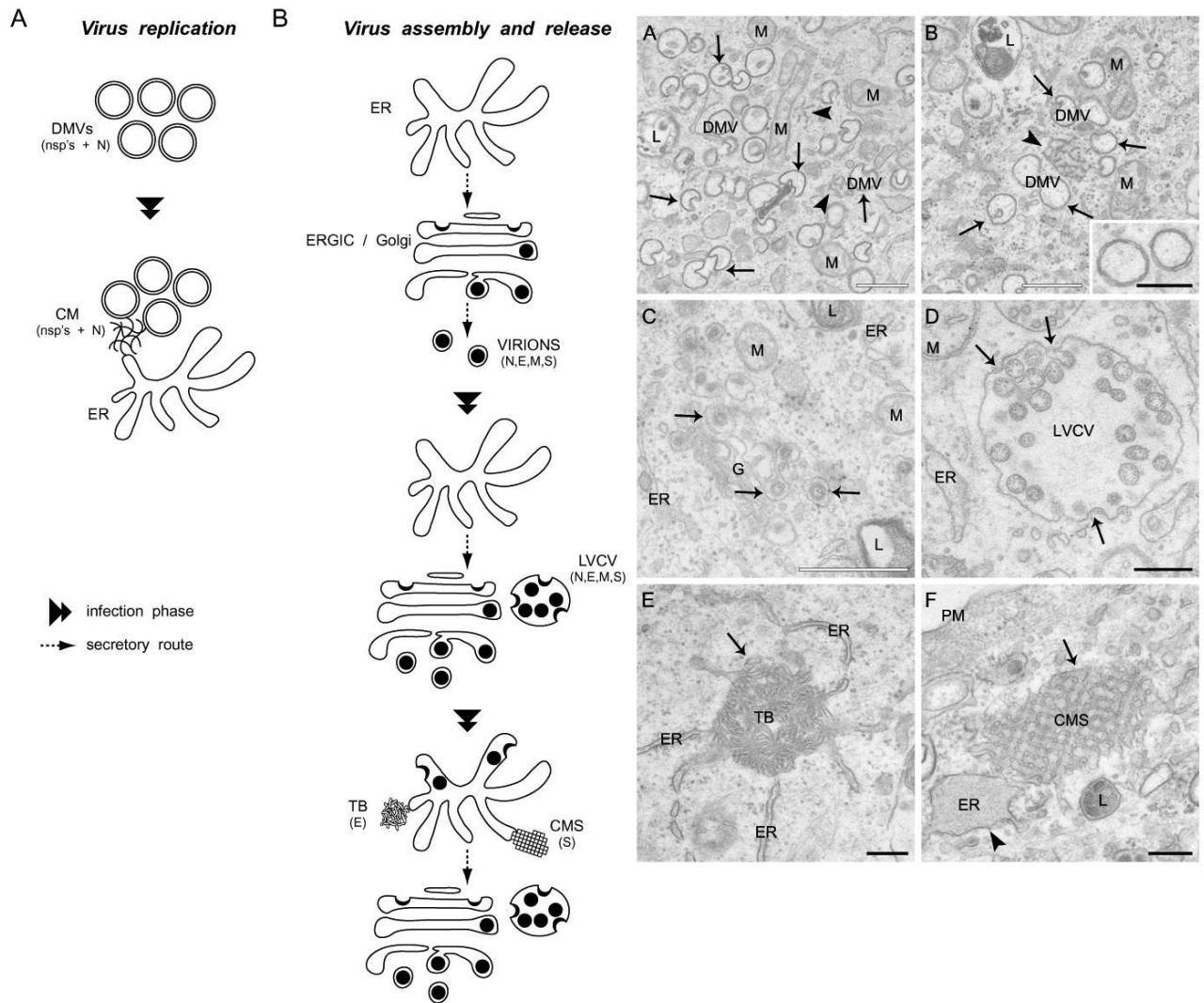


Figure 49 : Schéma et micrographies en MET de la biogenèse des organites de réplication du virus de l'hépatite murine (MHV)

(Ulasli M, Cellular Microbiology. 2010;12(6):844-61.)

Dans le cas des *Gammacoronavirus*, l'IBV cultivé en cellules de poulet CK génère des remaniements membranaires de RE zippé, par un accollement étroit des deux faces de la membrane de cet organite (259) (**Figure 50**). Le RE zippé est fréquemment attaché à des sphérules de 60 à 80 nm, qui sont connectées au cytoplasme par le biais d'un canal de 4,4 nm. Il est également observé des DMVs de 200 nm environ, au voisinage de ces structures.

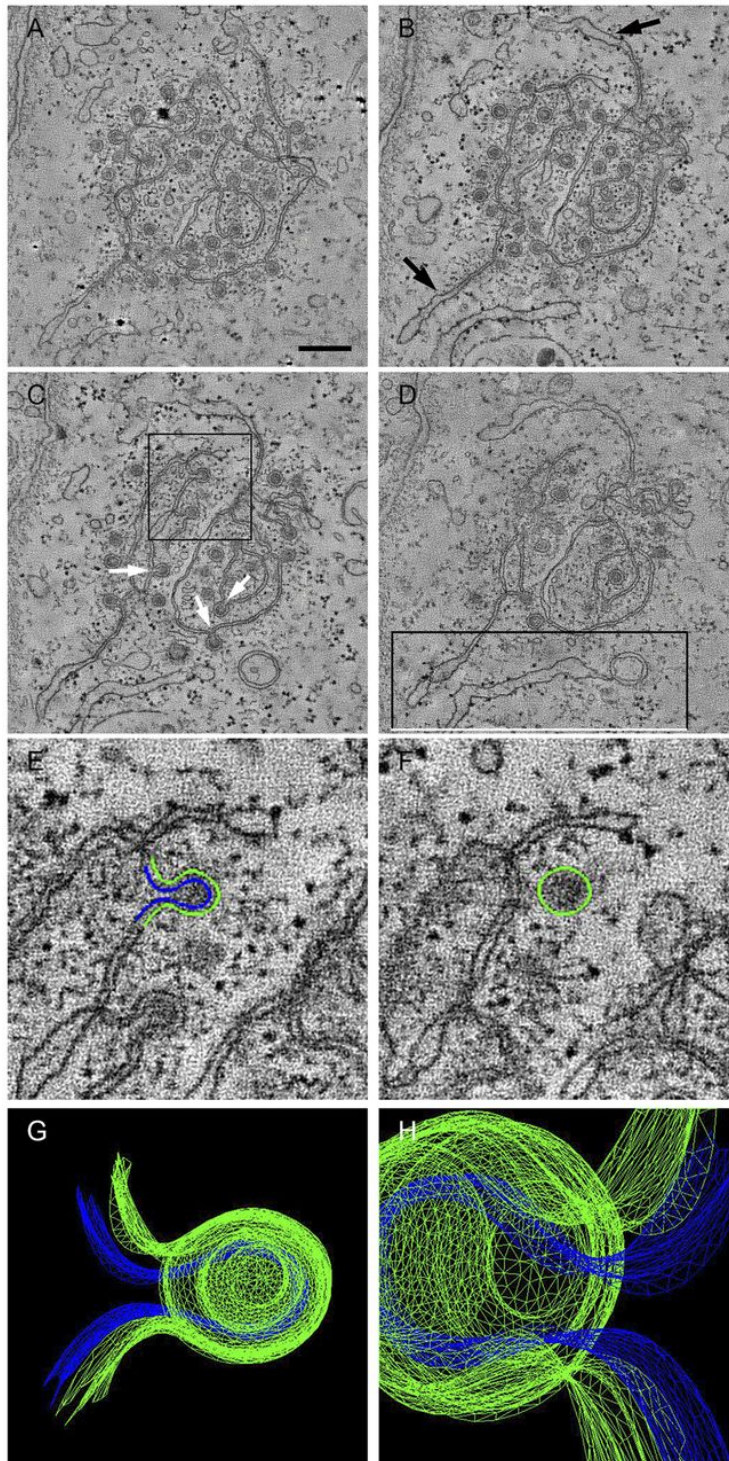


Figure 50 : Micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication du virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV)

(Maier HJ, mBio. 22 oct 2013;4(5):e00801-13.)

ii. Arteriviridae

Au sein des *Nidovirales*, la famille des *Arteriviridae* est proche des *Coronaviridae*, son principal représentant étant l'arterivirus équin (EAV). On observe, en cellules BHK-21 infectées avec ce virus, des DMVs environ deux à trois fois plus petites (95 nm) que celles générées par les coronavirus (260) (**Figure 51**). A l'image du SARS-CoV, ces DMVs apparaissent connectées entre elles et au RE par leur membrane externe, formant de fait également un RVN. Comme pour le SARS-CoV, le dsRNA semble compartimentalisé à l'intérieur des DMVs qui ne comportent pas de pore les connectant au cytoplasme. De manière originale car cela n'est pas observé chez les coronavirus, l'analyse en MET de cellules Vero a mis en évidence des tubules contenant des protéines de nucléocapside, étroitement connectés au RVN (261). Ces observations sont en faveur d'une coordination spatiale dans la cellule des étapes de réplication et d'assemblage pour l'EAV.

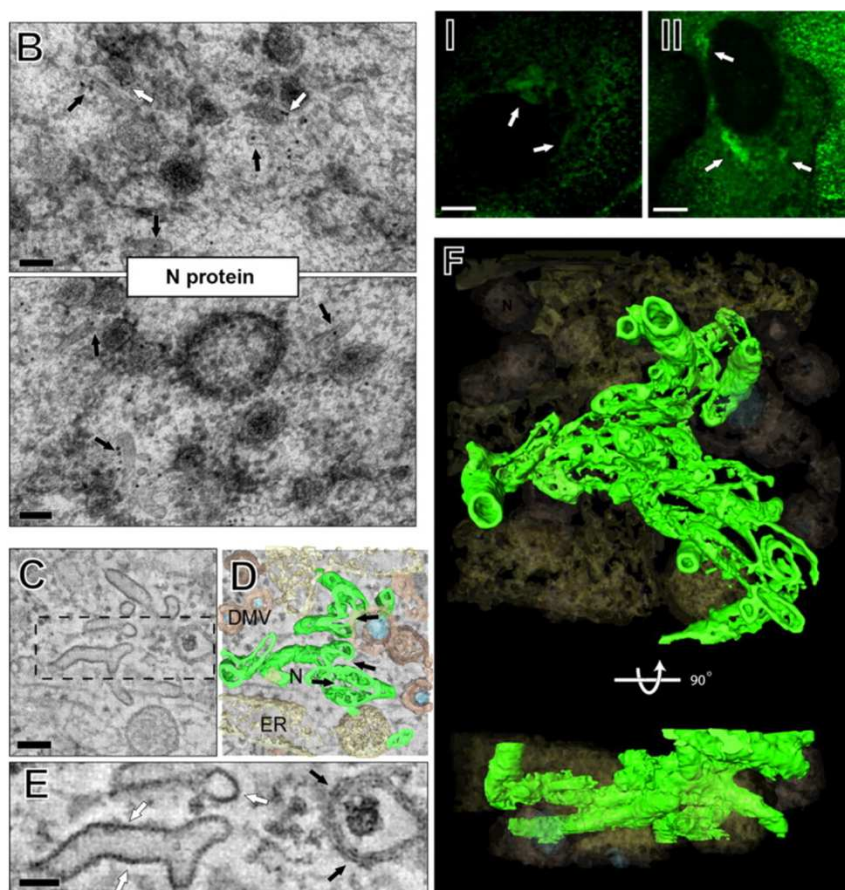


Figure 51 : Micrographies en MET et reconstructions tomographiques des organites de réplication de l'arterivirus équin

(Knoops K, Journal of Virology. mars 2012;86(5):2474-87.)

g. Virus de plantes

Les virus (+)ssRNA infectant les plantes génèrent également des usines virales dans les cellules végétales infectées. Dans le supergroupe des Alphavirus (classe des *Alsuviricetes*) et proche phylogénétiquement des *Togaviridae*, les *Bromoviridae* comme le virus de la mosaïque du brome (BMV) et les *Virgaviridae* comme le virus de la mosaïque du tabac (TMV) utilisent le RE comme source de membranes (262). Le BMV induit la formation de sphérules très similaires à celles des *Nodaviridae* comme le FHV, non pas dans la mitochondrie mais dans le RE en région périnucléaire (263). Les *Closteroviridae* comme le virus de la jaunisse de la betterave (BYV) forment des DMVs (100 nm) et des complexes multi-vésiculaires composés de SMVs entourées par une même membrane (264). Ces complexes multi-vésiculaires sont souvent retrouvés au voisinage de particules filamenteuses virales alignées. Les membranes participant à leur formation proviennent du RE ou de la mitochondrie. Les *Tymoviridae* comme le virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV) ancrent leurs sites de réplication dans les chloroplastes dont ils invaginent la membrane pour former des sphérules de 50 à 100 nm (265). Dans la classe des *Tolucaviricetes*, les *Tombusviridae* comme le virus de la nécrose du concombre (CNV) génèrent des sphérules à partir de la membrane des peroxysomes (266).

2. Facteurs de la biogenèse des organites membranaires de réplication

La biogenèse des ROs implique d'une part de former ses composants en modifiant les membranes de la cellule hôte, d'autre part de stabiliser et de maintenir ces structures dans le temps, au sein d'une cellule dont les compartiments sont en perpétuel remaniement. L'expansion massive des membranes des compartiments cellulaires passe nécessairement par un détournement des mécanismes cellulaires physiologiques (**Tableau 5**), les virus (+)ssRNA étant limités par la taille de leur génome pour coder des protéines remplissant toutes ces fonctions. Le principal composant des structures membranaires viro-induites étant les lipides, les virus utilisent à leur profit les acteurs du métabolisme lipidique. Le recyclage réalisé par le biais de l'autophagie constitue probablement une source importante de membranes. Enfin, la morphogenèse des SMVs, DMVs et des tubules s'effectue également par des mécanismes de courbure des membranes, notamment ceux utilisés pour la formation de vésicules de transport dans la cellule. L'étude des interactions virus-cellule pour la formation des ROs est

particulièrement documentée pour deux familles virales d'importance en pathologie humaine : les *Flaviviridae* (en particulier HCV) et les *Picornaviridae* (en particulier les poliovirus et les virus coxsackies). Pour la génération de leurs ROs, les *Flaviviridae* utilisent principalement le RE, là où les *Picornaviridae* utilisent principalement l'appareil de Golgi, expliquant pour partie l'origine des facteurs d'hôte utilisés. Dans une moindre mesure, les *Coronaviridae* ont également été étudiés dans ce contexte.

	Host factor	Cellular function	Virus	Function for the virus
Lipids	Sphingo-lipids	Signal transmission, cell recognition (Brown and London, 2000)	HCV	Stimulation of polymerase activity (Hirata et al., 2012)
	PI4P	Golgi recruitment of adapter proteins, membrane identity (Clayton et al., 2013)	HCV	Recruitment of OSBP (Wang et al., 2014) or FAPP2 (Khan et al., 2014)
	Cholesterol	Lipid rafts, detergent-resistant membranes (Silvius, 2003)	Rhinoviruses	Recruitment of OSBP (Roulin et al., 2014)
			Enteroviruses	Recruitment of 3D polymerase (Hsu et al., 2010)
			WNV	Immune response perturbation (Mackenzie et al., 2007)
	Saturated fatty acids	Membrane component	Enteroviruses	Impacts replication membrane architecture (Illytska et al., 2013)
			HCV	Impacts replication membrane architecture (Paul et al., 2013; Wang et al., 2014)
	Phospho-lipids	Membrane component	RUBV	Unknown, enriched in infected cells (Williams et al., 1994)
	FAS	Synthesis of fatty acids at the ER (Smith et al., 2003)	FHV	Facilitates membrane association of polymerase (Castorena et al., 2010; Stapleford et al., 2009)
			HCV	Interacts with NS5A, impacts replication membrane architecture (Reiss et al., 2011, 2013), induces PI4P synthesis for recruitment of OSBP (Wang et al., 2014) or FAPP2 (Khan et al., 2014)
Lipid metabolism and transport	PI4KIII α	PI4P synthesis at the ER and plasma membrane (Clayton et al., 2013)	HCV	Interacts with NS5A, impacts replication membrane architecture (Reiss et al., 2011, 2013), induces PI4P synthesis for recruitment of OSBP (Wang et al., 2014) or FAPP2 (Khan et al., 2014)
	PI4KIII β	PI4P synthesis at Golgi membranes (Clayton et al., 2013)	Enteroviruses	PI4P enrichment for recruitment of 3D polymerase (Hsu et al., 2010)
	OSBP	Sterol transport from ER to Golgi (Mesmin et al., 2013)	HCV	Unknown, possibly PI4P enrichment and connected with GBF1 & ARF1 functions (Zhang et al., 2012)
			Rhinoviruses	PI4P/Cholesterol shuttling via OSBP (Roulin et al., 2014)
	FAS	Synthesis of fatty acids at the ER (Smith et al., 2003)	HCV	Impacts replication membrane architecture (Wang et al., 2014)
			DENV	Recruitment and stimulation by NS3 (Heaton et al., 2010)
	Sphingosin kinase 2	Lipid peroxidation (Maceyka et al., 2005)	WNV	Unknown, required for replication (Martin-Acebes et al., 2011)
			HCV	Interferes with membrane rearrangements (Yamane et al., 2014)
	FAPP2	Glycosphingolipid transport (D'Angelo et al., 2007)	HCV	Sphingolipid transport to replication membranes (Khan et al., 2014)
Vesicle transport	VAP-A	Binding of SNARE proteins (Weir et al., 2001), ER/Golgi transport, OSBP binding (Wyles et al., 2002)	HCV	Interacts with a specific NS5A phosphoform (Evans et al., 2004)
	VAP-B	Similar to VAP-A, forms heterodimers with VAP-A (Hamamoto et al., 2005)	HCV	Interacts with NS5A and NS5B (Hamamoto et al., 2005)
	COPI (including ARF1, GBF1, ARFGAP1, ACBD3)	Retrograde Golgi/ER transport, phospholipase D activation (Mitchell et al., 2003)	Enteroviruses	Blocked by 3A interaction (Wessels et al., 2006)
	COPII	Vesicular ER/Golgi transport (D'Arcangelo et al., 2013)	Coronaviruses	Interaction with NS4 (Oostra et al., 2007) and spike protein (McBride et al., 2007)
			HCV	Unknown, probably connected to PI4KIII β functions (Zhang et al., 2012)
Cyclophilins	CypA	Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> isomerase (Wang and Heitman, 2005)	PV	Recruitment on 2BC-induced vesicles (Rust et al., 2001), increased membrane recruitment of Sec16A (Trahey et al., 2012)
	FKBP	Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> isomerase (Wang and Heitman, 2005)	HCV	Interacts with NS5A, impacts replication membrane architecture (Madan et al., 2014)
			Coronaviruses	Involved in RNA synthesis (Carbajo-Lozoya et al., 2014), binds to nucleocapsid (Luo et al., 2004)
			Arteriviruses	Unknown, required for replication (de Wilde et al., 2013b)
	PSTPIP2	Actin-associated in macrophages (Yeung et al., 1998)	Tombusviruses	Interacts with p33 and viral RNA (Kovalev and Nagy, 2013)
Membrane curvature	Amphi-physins	Membrane bending via its BAR-domain (Arkhipov et al., 2009)	Coronaviruses	Unknown, required for replication (Carbajo-Lozoya et al., 2014)
	Reticulon proteins	ER membrane shaping (Voeltz et al., 2006)	HCV	Impacts replication membrane formation, probably by membrane bending (Chao et al., 2012)
			HCV	Impacts NS5A phosphorylation and replication membrane formation (Masumi et al., 2005)
Autophagy	LC3, ATG4B, ATG5, ATG7, ATG12, Beclin-1	Delivery of cytoplasmic components to the lysosome (Mizushima, 2007)	Alphaviruses	Recruitment by nsP3 (Neuvonen et al., 2011)
			BMV	Impacts replication membrane formation (Diaz et al., 2010)
			Picornaviruses	Interacts with 2C (Tang et al., 2007)
	LC3, ATG4B, ATG5, ATG7, ATG12, Beclin-1	Delivery of cytoplasmic components to the lysosome (Mizushima, 2007)	PV	LC3 required for replication (Taylor and Kirkegaard, 2007)
			Coronaviruses	ATG5/12 required for replication (Prentice et al., 2004)
			DENV	ATG5 required for replication (Lee et al., 2008), manipulates lipid metabolism (Heaton and Randall, 2010)
			HCV	ATG4B/5/12, Beclin-1 required for translation and replication (Dreux et al., 2009), autophagosome formation by inducing LC3 lipidation (Sir et al., 2008), ATG7 involved in particle production (Tanida et al., 2009), ATG5 interacts with NS5B (Guevin et al., 2010), NS4B-induced autophagy connected with Rab5 and Vps34 (Su et al., 2011)

Tableau 5 : Facteurs d'hôte impliqués dans la biogenèse des ROs

(Harak C, Virology. 1 mai 2015;479-480:418-33.)

a. Facteurs d'hôte

i. Voie sécrétoire et coatomères

Plusieurs membres des *Picornaviridae* utilisent des coatomères de la voie sécrétoire, antérograde ou rétrograde. Pour les poliovirus, le détournement de COPII peut initier la formation des regroupements de SMVs à partir de la voie antérograde RE - Golgi (267,268). L'interaction entre ARF1-GTPase (ADP-ribosylation factor 1), son effecteur GBF1 (Golgi Brefeldin A Resistant Guanine Nucleotide Exchange Factor 1) et les protéines non structurales 3A et 3CD des poliovirus, permet d'inhiber le recrutement de COPI et donc la formation de vésicules rétrogrades Golgi - RE, stabilisant ainsi le ROs dérivé du Golgi (**Figure 52**) (269).

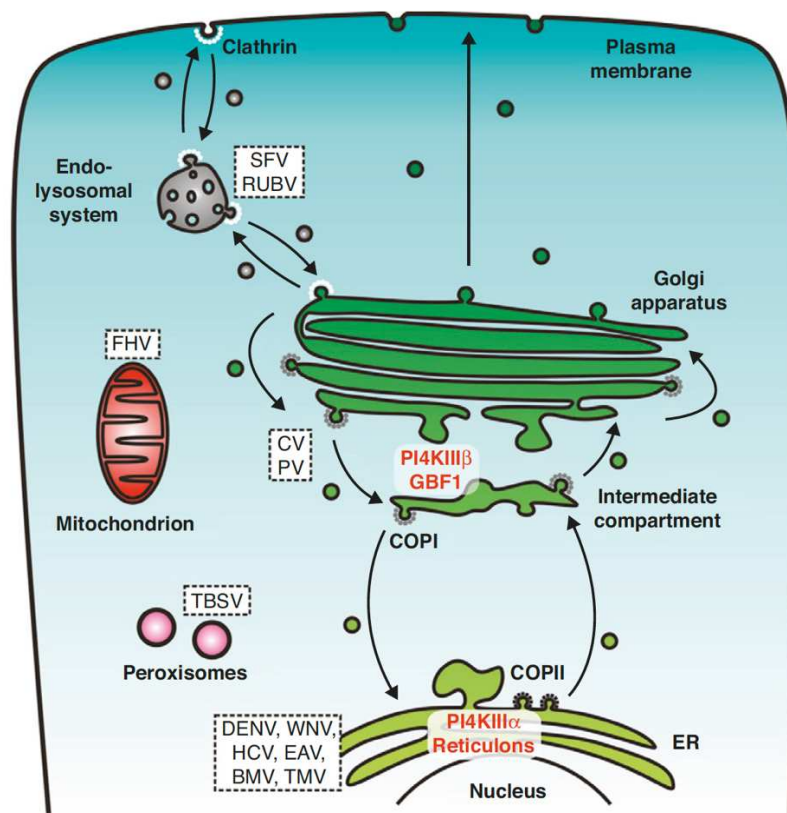


Figure 52 : Facteurs d'hôte de la voie sécrétoire détournés pour la formation des ROs des virus à ARN simple brin de polarité positive

(Belov GA, Curr Opin Virol. 1 déc 2012;2(6):740-7.)

L'utilisation de COPI semble variable chez les *Picornaviridae*, jouant un rôle pour l'entérovirus 71 (270), l'échovirus 11 et le parechovirus 1 (271), à l'inverse du virus de l'encéphalomyocardite chez qui COPI n'est pas retrouvée dans les membranes des ROs. La différence d'utilisation de COPI chez ces virus reflète la sensibilité à la BFA, une molécule inhibitrice de la fusion des vésicules COPI. La réplication du HCV semble

également dépendante de ARF1 et GBF1, bien que le mécanisme exact ne soit pas connu (272). Le SARS-CoV interagit également avec COPI (273), bien que l'intégrité des mécanismes précoces de la voie sécrétoire ne semble pas essentiel au remodelage membranaire du RE, en faveur d'un rôle différent de COPI par rapport aux *Picornaviridae*. Concernant HCV, il a été montré une interaction entre les protéines non structurales NS5A et NS5B et la protéine multifonctionnelle VAP (vesicle-associated-membrane protein-associated protein) (274). Cette protéine est impliquée dans le transport intracellulaire, notamment en régulant le trafic vésiculaire lié à COPI. VAP joue un rôle majeur pour la formation du complexe de réplication du HCV et interagit avec NIR2, une protéine impliquée dans la régulation du trafic membranaire et dans le métabolisme des phospholipides. Une hypothèse postule que VAP remodele le RE en interagissant avec NIR2, afin de promouvoir la formation du MW (275).

ii. Autophagie

L'autophagie joue un rôle dans le cycle de nombreux virus, notamment les poliovirus, les coronavirus, le virus de la dengue, et le HCV (276). Pour HCV cependant, il n'a pas été confirmé avec certitude si l'ensemble du processus est impliqué, ou si certains facteurs de l'autophagie suffisent individuellement à promouvoir la formation du membranous web (236,277). La similarité morphologique entre les DMVs et les autophagosomes pose la question de leur relation, bien que les premiers soient significativement plus petits que les structures autophagiques. De plus, la formation des membranes des autophagosomes et celles des vésicules virales à partir du RE, est un autre point qui plaide en faveur d'une origine commune. Ce lien potentiel a été évoqué dès les premiers travaux sur les poliovirus par George Palade et al. en 1965, en se basant sur la ressemblance entre les U-bodies en « fer à cheval » et les autophagosomes au stade d'omégasome (278). Plus récemment, il a été montré la présence de LC3 et de marqueurs lysosomaux dans les vésicules en cluster des poliovirus, en faveur d'un possible rôle des étapes tardives de l'autophagie (279). A l'inverse l'inhibition par des siRNA des facteurs de l'autophagie (comme Atg12) et des composants du complexe Atg5, interrompt la sécrétion des virions hors de la cellule sans impacter la réplication (280), en faveur d'une implication des vésicules des poliovirus et de l'autophagie dans l'étape de sortie virale. Concernant les *Coronaviridae*, une étude a montré la localisation de LC3 dans les vésicules induites par le MHV (281), mais pas dans celles induites par le SARS-CoV (61). L'infection d'une lignée cellulaire murine Atg5-knockout par le MHV donne une

production virale fortement diminuée par rapport au contrôle, en faveur d'une implication des étapes précoces de l'autophagie (281).

iii. Transporteurs et enzymes du métabolisme lipidique

Le détournement de la voie sécrétoire pour la formation des ROs par les virus passe également par l'utilisation d'enzymes de la classe des transférases, comme les phosphoinositide kinases (**Figure 52**). Une caractéristique commune de la réplication des *Picornaviridae* et du HCV réside notamment dans la dépendance aux phosphatidylinositol 4-kinases de type III (PI4KIII α) et leur produit le PI4P (phosphatidylinositol-4-phosphate). Les PI4KIII α existent sous deux isoformes : alpha et bêta. La PI4KIII α est localisée dans le RE, et joue un rôle dans la réplication du HCV (282). La PI4KIII β est retrouvée dans les membranes du Golgi, et joue un rôle dans la réplication des *Picornaviridae* (249), mais également pour certains génotypes du HCV (283).

L'infection *in vitro* de cellules par HCV entraîne une augmentation de la concentration en PI4P dans les endomembranes (284). De même, les niveaux de PI4P sont augmentés dans les biopsies hépatiques de patients infectés par HCV (283). Pour HCV, la stimulation de la synthèse de PI4P passe probablement par l'interaction entre la NS5A (*via* 7 acides aminés dans le domaine 1) et la PI4KIII α (285). L'accumulation de PI4P est essentiel pour la formation du MW, comme le montre le knockdown de PI4KIII α qui entraîne une désorganisation du réseau de réplication, avec l'accumulation de DMVs regroupés et de petite taille (285). En plus de l'augmentation globale de PI4P, son accumulation locale semble aussi importante pour la biogenèse du MW. En effet, il a été montré que le PI4P contribue au recrutement d'OSBP (oxysterol-binding protein), une protéine impliquée dans le transfert du cholestérol entre les membranes de la cellule. Le knockdown d'OSBP entraîne les mêmes conséquences que celui de la PI4KIII α sur le MW, en faveur d'un rôle du cholestérol dans la formation du réseau de réplication du HCV (286). En outre, l'accumulation locale de PI4P semble agir par plusieurs mécanismes : l'induction de la courbure membranaire (287), la génération d'un gradient de concentration en lipides entre les membranes cellulaires et celles des ROs (288), et le recrutement localisé des enzymes du métabolisme lipidique afin d'influer sur la composition en lipides des membranes du réseau de réplication. D'autres PI4P-binding protéines ont été identifiées comme actrices du cycle du HCV : GOLPH3 (Golgi

phosphoprotein 3) (289) et CERT (ceramide transport protein) (290) pour l'assemblage de particules virales, FAPP2 (human 4-phosphate-adaptor-protein-2) (291) pour la réplication de l'ARN.

Concernant les *Picornaviridae*, l'inhibition de la PI4KIII β bloque la synthèse de l'ARN du CVB3 et des poliovirus (292), en cohérence avec l'origine golgienne de leurs réseaux de réplication. L'interaction de la protéine non structurale 3A avec GFB1, entraînant l'activation de ARF1, est probablement à l'origine du recrutement de la PI4KIII β dans les membranes des ROs (293). La protéine adaptatrice golgienne ACBD3 (acyl-coenzyme A binding domain containing 3) semble aussi jouer un rôle dans ce recrutement et l'accumulation localisée de PI4P, de nouveau par une interaction avec la protéine 3A (292). De plus, la PI4P fonctionne comme un adaptateur de la polymérase entérovirale 3D, pour son association aux sites de réplication (249). Enfin, et à l'image du HCV, l'implication d'OSBP plaide en faveur d'un rôle majeur du cholestérol pour la formation des compartiments de réplication (294).

iv. Lipides

Les lipides constituent le composant fondamental des membranes cellulaires et à ce titre, l'infection d'une cellule par un virus générant des ROs entraîne une perturbation significative de l'homéostasie des lipides. Ainsi, les profils lipidomiques des cellules infectées montrent souvent des niveaux anormaux en stérols, sphingolipides et phospholipides (295). En particulier, pour les virus entraînant une infection chronique (hépatite chronique liée à HCV, myocardite chronique liée au CVB3), les perturbations des niveaux de lipides persistent pendant de nombreuses années dans les tissus (283). Les lipides jouent de nombreux rôles vis-à-vis des ROs : ils aident à l'accrochage et à la concentration des protéines virales de réplication, ils catalysent certaines réactions enzymatiques virales, et ils participent au mécanisme fondamental de la courbure membranaire à l'origine des vésicules du réseau de réplication.

Les organites d'une cellule présentent physiologiquement une composition différente en phospholipides. Lorsqu'un virus infecte une cellule et débute son cycle, les mécanismes d'amplification de la synthèse et du recrutement des lipides n'ont pas encore été initiés. Ainsi, le virus va commencer par modifier et détourner les membranes des organites qui contiennent préférentiellement les lipides impliqués dans son cycle viral (**Figure 53**). Les virus infectant les plantes et ceux infectant les insectes ont une réplication dépendante du phosphatidyléthanolamine (PE), qu'ils vont capter à partir de

la membrane du peroxysome (*Tombusviridae* comme le CNV) ou de la membrane externe de la mitochondrie (*Nodaviridae* comme le FHV) (296). Les virus infectant les animaux vertébrés dont l'Homme dépendent eux du PI4P, qu'ils vont initialement capter à partir des membranes du RE ou du Golgi. Que les virus utilisent le PE ou le PI4P, les stérols jouent un rôle majeur et complémentaire à celui des phospholipides.

Concernant le HCV, la perturbation de la lipogenèse s'effectue *via* la protéine Core et la NS4B, en induisant le clivage des facteurs de transcription SREBP (sterol regulatory element binding protein), promoteurs de gènes de la synthèse des lipides comme FAS (fatty acid synthetase) (297). FAS interagit en retour avec la polymérase NS5B et stimule son activité (298). Il a aussi été montré l'implication de FAS dans la réplication du DENV (299) et du WNV (300). La présence de sphingolipides explique la résistance aux détergents des membranes des ROs du HCV. Le cholestérol est systématiquement augmenté dans les sites de réplication du HCV, du WNV (301), et des entérovirus. Chez les entérovirus, les bicouches lipidiques riches en cholestérol sont recrutées vers les ROs, depuis la membrane plasmique, par l'intermédiaire de la voie de l'endocytose dépendante de la clathrine (302). De manière originale, le virus de rubéole requiert une forte concentration d'acides gras saturés dans ses sites de réplication (303).

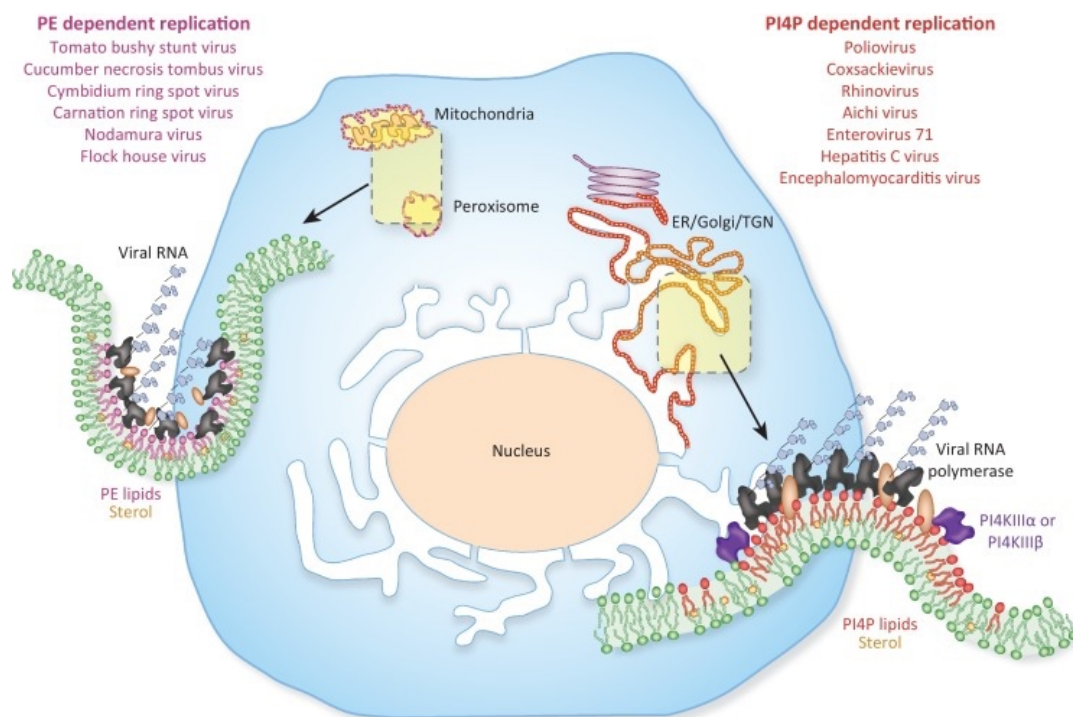


Figure 53 : Nature et organites sources des phospholipides utilisés pour la réplication des virus à ARN simple brin de polarité positive

(Altan-Bonnet N. Trends in Cell Biology. 1 mars 2017;27(3):201-13.)

b. Protéines virales

i. Modificateurs des membranes

La génération de ROs, en particulier des SMVs et DMVs, à partir des membranes cellulaires nécessite plusieurs mécanismes complémentaires : le ciblage vers la membrane de facteurs promoteurs, l'induction d'une courbure membranaire, l'accolement de deux membranes, et la fusion des membranes. L'induction d'une courbure membranaire peut elle-même résulter de plusieurs mécanismes (**Figure 54**), dont le point commun est d'entraîner une asymétrie entre les deux feuillet d'une membrane : l'insertion transmembranaire d'une protéine virale conique, l'insertion d'une protéine virale comportant une hélice α amphipathique, l'insertion de protéines virales oligomérisées, l'association de protéines périphériques/d'échafaudage, et l'augmentation du caractère asymétrique de la concentration d'une espèce de phospholipide dans un feuillet de la bicouche.

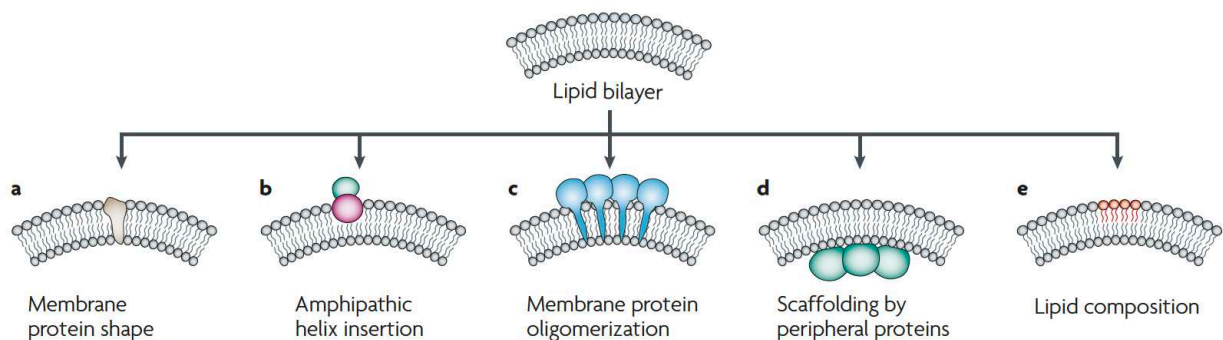


Figure 54 : Mécanismes de courbure membranaire

(Miller, S., *Nat Rev Microbiol* **6**, 363–374 (2008).)

Pour la quasi-totalité des virus (+)ssRNA, les protéines virales impliquées dans la modification des membranes cellulaires sont des protéines non structurales (**Tableau 6**), comportant la plupart du temps une hélice α amphipathique et/ou un domaine hydrophobe transmembranaire, avec la propriété de s'oligomériser.

Concernant la formation de SMVs, les flavivirus comme le DENV et le WNV utilisent principalement la protéine non structurale NS4A (304,305). En revanche, le rôle de cette protéine n'a pas été confirmé pour le TBEV. La NS4A contient un domaine transmembranaire central qui lui permet de s'insérer dans le feuillet luminal du RE. Sa propriété d'oligomérisation participe probablement à la dilatation du feuillet luminal, induisant une invagination de la membrane dans la lumière du RE (306). Cependant, l'expression de NS4A seule n'est pas suffisante pour induire la formation des ROs. Une

NS4A dépourvue de son domaine C-terminal 2K, c'est-à-dire identique à une NS4A déjà clivée par la protéase virale, n'induit pas d'altérations membranaires (304). Cela souligne l'importance de l'étape de clivage de la polyprotéine virale dans l'induction des remaniements membranaires. Chez les *Picornavirales*, pour le calicivirus félin (FCV) l'expression isolée de la protéine non structurale p30 induit en cellules HEK293T une réorganisation massive du RE sous la forme d'un réseau de membranes fenêtrées (307). De plus, la co-expression de la p39 et de la p32 induit également une réorganisation du RE, en faveur d'une formation des ROs principalement à partir de cet organelle.

Order	Family	Type	Proteins
Nidovirales	Arteriviridae	DMV, PM	nsp2, 3
	Coronaviridae	DMV, CM, spherule, PM	nsp3, 4, 6
	Mesoniviridae	PM, tubule	nr ^e
	Roniviridae	Vesicle	nr
Picornavirales	Dicistroviridae	nr	nr
	Iflaviridae	Vesicle	nr
	Marnaviridae	Vesicle	nr
	Picornaviridae	DMV	2BC, 3A
	Secoviridae	Vesicle, CM	nr
Tymovirales	Alphaflexiviridae	VP	TGB1
	Betaflexiviridae	VP, DMV	nr
	Gammaflexiviridae	VP	nr
	Tymoviridae	DMV	nr
	Alphatetraviridae	VP	Rep
	Alverniviridae	VP	nr
	Astroviridae	DMV	nsP1a
	Barnaviridae	nr	nr
	Bromoviridae	Spherule	Protein 1a
	Caliciviridae	Vesicle	P30
	Carmotetraviridae	VP	nr
	Closteroviridae	VP, DMV	nr
	Flaviviridae	Spherule	NS4A, 4B
	Hepeviridae	Vesicle, PM	nr
	Leviviridae		
	Luteoviridae	SMV, tubule	nr
	Narnaviridae	nr	nr
	Nodaviridae	Spherule	Protein A, viral RNA
	Permutotetraviridae	nr	nr
	Potyviridae	Vesicle	6K, 6K2
	Togaviridae	Spherule	P123
	Tombusviridae	Spherule	nr
	Virgaviridae	Spherule	nr

Tableau 6 : Protéines virales impliquées dans la biogenèse des ROs

(Neuman BW, Trends in Microbiology. 1 nov 2014;22(11):642-7.)

Dans la famille des *Togaviridae*, le SFV présente un mécanisme tout à fait original de biogenèse de son réseau de réplication composé de vacuoles, par bourgeonnement et internalisation de vésicules à partir de la membrane plasmique, puis leur fusion avec les endosomes. Ce mécanisme repose principalement sur la protéine non structurale NSP1, qui présente une affinité pour les lipides, par le biais d'une hélice α amphipathique (242). Cette affinité est plus particulièrement dirigée vers les phospholipides chargés négativement, ce qui explique son interaction avec le feuillet interne de la membrane plasmique, dans lequel on retrouve une forte concentration de ces lipides, notamment la phosphatidylsérine (308). Cependant, NSP1 seule ne suffit pas à la formation complète des vacuoles de réplication. La protéine NSP3 joue un rôle important dans cette biogenèse, en contribuant au transport de la polyprotéine réplicase depuis la membrane plasmique vers la surface des endosomes (309). Un point intéressant concernant le SFV réside dans le fait que la taille des sphérules semble dépendante de la longueur de l'ARN génomique (310), contrairement au FHV pour lequel la taille des sphérules ne semble pas corrélée à ce paramètre (311). Cette observation indique un rôle clé de l'ARN viral génomique pour la formation des ROs du SFV, en plus du rôle de ses protéines non structurales. Toujours concernant le FHV, nodavirus infectant les insectes, l'expression de la protéine non structurale A est nécessaire mais pas suffisante pour induire la formation de sphérules. L'expression isolée de cette protéine induit cependant l'apposition en « zippering » des membranes externes de mitochondries adjacentes. La co-expression de la protéine A et de l'ARN viral génomique conduit cette fois à la formation de sphérules mitochondriales (311). Enfin chez le BMV, virus infectant les plantes et générant des sphérules, l'expression isolée de la protéine NS1a est suffisante pour induire leur formation à partir du RE (312).

Concernant les virus formant des DMVs, le HCV utilise pour former le MW, une combinaison de ses protéines non structurales composants de sa réplicase : NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B (**Figure 55**).

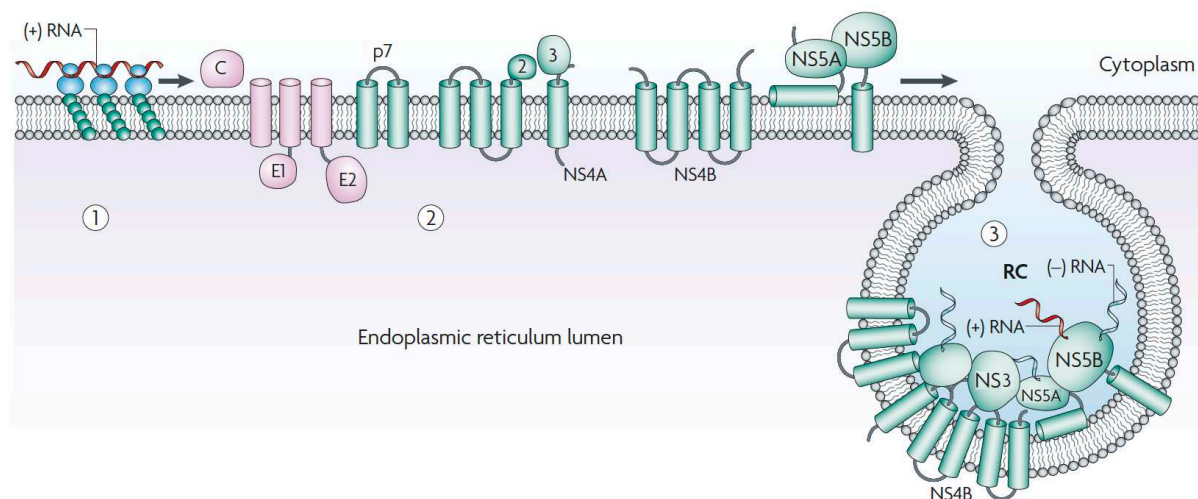


Figure 55 : Protéines structurales et non structurales du HCV, et rôles dans la formation de vésicules et du complexe de réplication

RC : replication complex

(Miller S, Nat Rev Microbiol. mai 2008;6(5):363-74.)

L'expression isolée de chacune de ces protéines est suffisante pour induire un remaniement membranaire, bien que la NS5A ait la plus grande capacité à générer des ROs, en particulier des DMVs complètement formés (236). La NS4B joue également un rôle de premier plan, en favorisant la courbure des membranes cellulaires (234). Ces deux protéines non structurales ont en commun de contenir une hélice α amphipathique, et de s'oligomériser entre elles. La mutation du domaine de dimérisation de la NS4B conduit à la formation de DMVs de morphologie aberrante, soulignant l'importance de l'oligomérisation pour la génération de vésicules de réplication (313,314). La formation de complexes de protéines oligomérisées permet aussi probablement de maintenir et stabiliser la courbure membranaire. Chez les *Picornaviridae*, les poliovirus et le CVB3 font appel aux protéines non structurales 2BC et 3A. Leur co-expression induit la formation de vésicules dérivées du RE similaires à celles observées lors d'une infection (279). De nouveau, les protéines 2B et 2C contiennent toutes deux un motif inducteur de courbure membranaire, sous la forme d'une hélice α amphipathique (315,316). Le FMDV adresse les protéines 2B et 2BC vers le RE, entraînant une dilatation des citernes du RE (317). Dans l'ordre des *Nidovirales*, les protéines non structurales impliquées dans la

formation des DMVs sont relativement conservées entre ses différents membres, malgré de grandes variations de la taille de leur génome (12,7 kb chez les arterivirus, jusqu'à 31,7 kb chez les coronavirus). En particulier les domaines transmembranaires des protéines NSP3, NSP4, NSP5 et NSP6 sont retrouvés pour tous les virus de cet ordre (**Figure 56**).

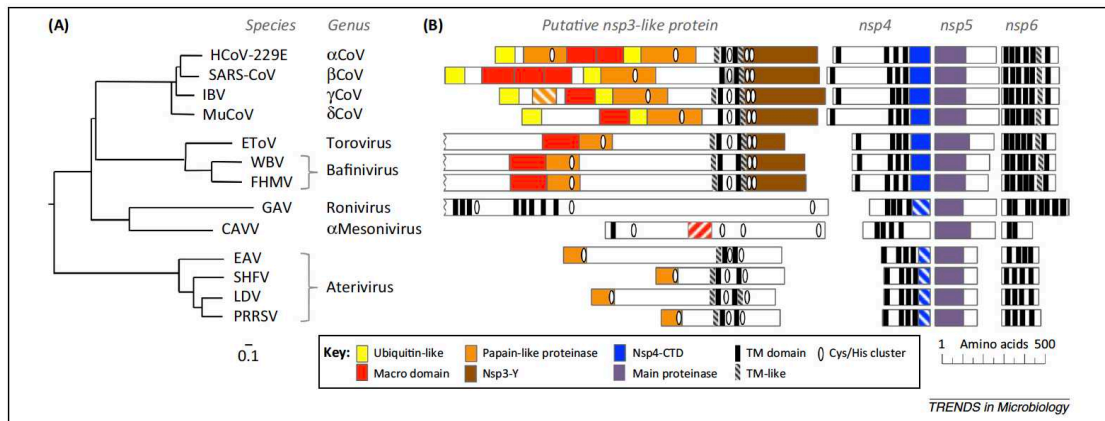


Figure 56 : Conservation et homologies de séquence des protéines non structurales formant des DMVs chez les Nidovirales

(Neuman BW, Trends in Microbiology. 1 nov 2014;22(11):642-7.)

Pour l'EAV la co-expression de la NSP2 et de la NSP3 et leur interaction, sont suffisantes pour induire des remaniements membranaires similaires à ceux observés lors d'une infection (318). La mutation des domaines transmembranaires de la NSP3 altère ces remaniements, soulignant leur importance pour leur biogenèse (319). La protéine NSP5 joue aussi un rôle dans la génération de ces remaniements. Pour le SARS-CoV, les protéines impliquées sont la NSP3, la NSP4 et la NSP6 (**Figure 57**).

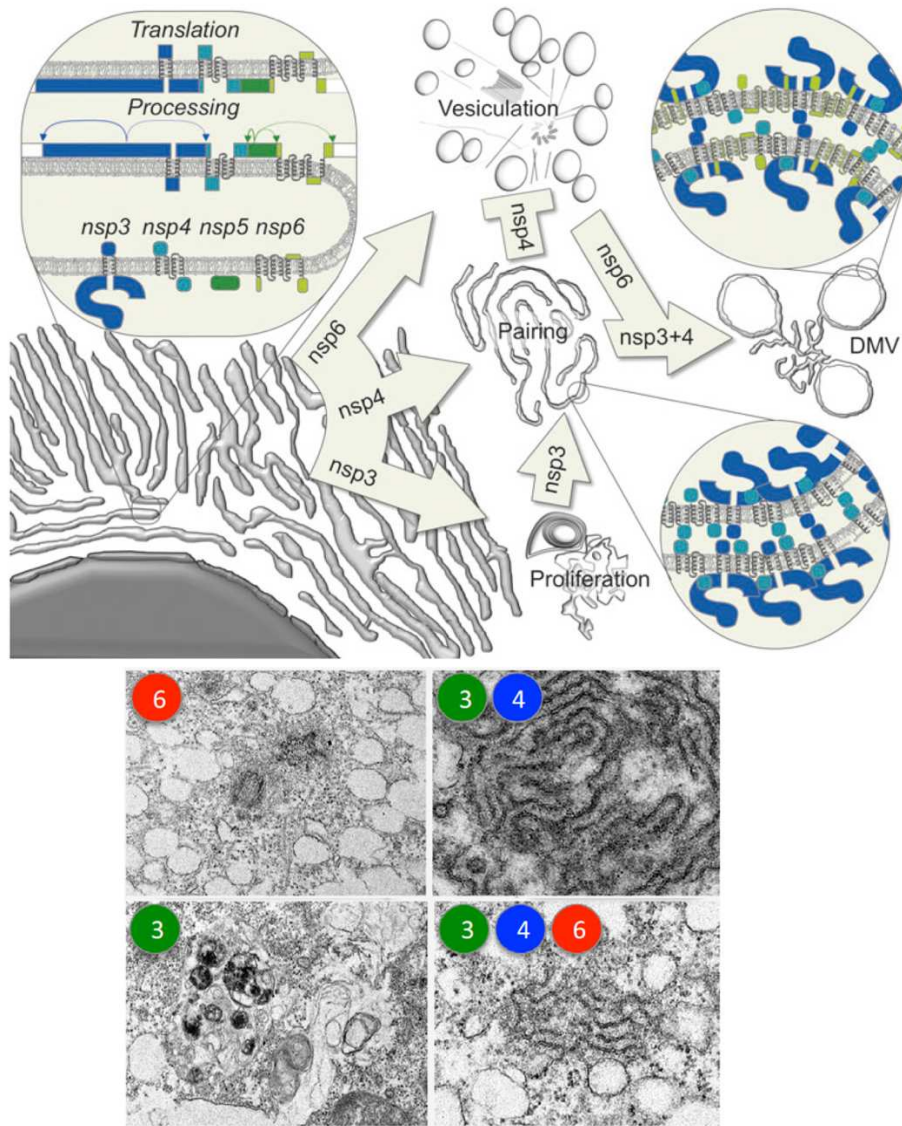


Figure 57 : Mécanismes théoriques de formation des ROs du SARS-CoV, protéines virales impliquées et micrographies en MET

(Adapté de : Wolf YI, mBio. 27 nov 2018;9(6):e02329-18., Megan Mary Angelini, DNA and Cell Biology. Mar 2014;122-127., Neuman BW, Trends in Microbiology. 1 nov 2014;22(11):642-7.)

Après traduction de la polyprotéine virale et clivage protéolytique, ces trois protéines restent insérées dans la membrane du RE (320). D'une part, leur forme conique leur permet d'incurver la bicouche lipidique. D'autre part, elles forment un échafaudage par leurs co-interactions, dont l'encombrement stérique participe à l'induction et au maintien de la déformation membranaire (321,322). Les interactions des trois protéines entre elles ont été objectivées par spectrométrie de masse, des techniques du double hybride en levure, et de co-immunoprécipitations (323). Une étude menée par Angelini et al. en 2013 (38), a analysé les modifications viro-induites en cellules HEK-293T, en transfectant

isolément ou en combinaison des plasmides codant NSP3, NSP4 et NSP6. L'expression isolée de *nsp3* induit une prolifération membranaire sous la forme de corps multilamellaires vésiculés, et d'accumulation de corps membranaires désordonnés. L'expression isolée de NSP4 n'est pas suffisante pour induire des remaniements membranaires, là où la co-expression de NSP3 et NSP4 induit la formation de membranes appariées avec une organisation géométrique régulière (maze-like bodies, MLB). L'expression isolée de NSP6 induit la formation de vésicules à simple membrane autour du MTOC, formation inhibée par la co-expression de NSP4, qui recrute et relocalise probablement NSP6 à distance du MTOC. Enfin, la co-expression NSP3-NSP4-NSP6 conduit à la formation de CMs et de DMVs de forme et de taille comparable à ceux observés dans une cellule infectée par le SARS-CoV. Cela suggère que NSP6 modifie la forme des membranes appariées en les incurvant, sans altérer l'appariement généré par NSP3-NSP4.

ii. Complexes de réplication

Les virus (+)ssRNA codent une (ou plusieurs) protéine(s) non structurale(s) dont le rôle est d'ancrer le complexe de réplication dans les membranes cellulaires. On peut par exemple citer NS4A et NS4B pour DENV et HCV, la protéine A du FHV, ou la protéine 3A des poliovirus. De manière similaire à l'association de protéines cellulaire membranaires dans une bicouche lipidique, ces protéines virales peuvent s'intégrer dans les membranes par une insertion co-translationnelle *via* des ribosomes liés au RE. La NS5B est une exception, car elle est insérée dans la membrane en post-translationnel *via* son domaine hydrophobe C-terminal (324). La traduction d'une polyprotéine virale facilite probablement l'ancrage et la co-localisation des différentes protéines non structurales dans les membranes de la cellule. De même, l'étape de clivage protéolytique semble jouer un rôle majeur dans leur association aux membranes, et pour leur propriété à induire des remaniements membranaires. Cela explique la difficulté, chez les virus (+)ssRNA, à trans-complémenter une protéine virale présente au sein du complexe de réplication (325). L'ancrage dans la bicouche des composants de la réplicase virale s'effectue souvent *via* une hélice α amphipathique, à l'image de la NSP1 du SFV, ou de la NS4B et NS5A du HCV. Elle peut aussi s'effectuer par l'attachement covalent d'un lipide sur la protéine virale, comme la palmitoylation de la NSP1 du SFV (326). Certaines protéines virales non structurales dépourvues de domaines d'ancrage membranaires peuvent malgré

La localisation du complexe de réplication par rapport à la structure des ROs est différente selon la famille virale considérée, et dépend du caractère clos ou ouvert de la vésicule sur le cytoplasme (**Figure 58**).

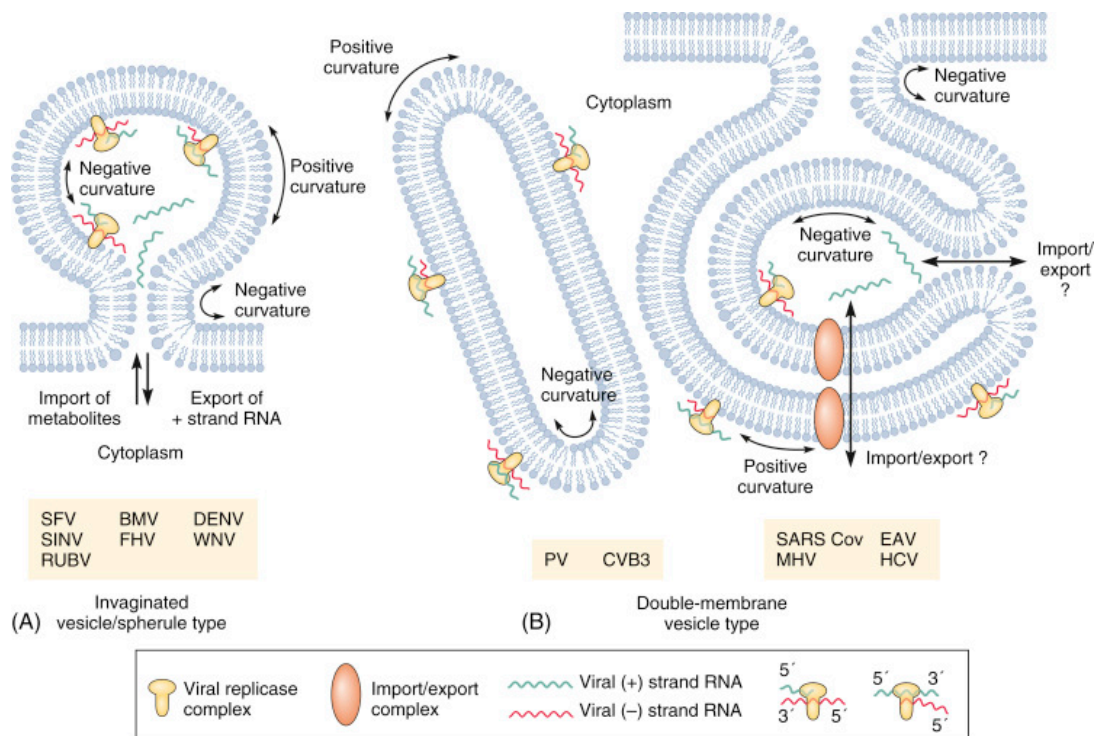


Figure 58 : Orientation du complexe de réplication par rapport à la membrane des SMVs, tubules et DMVs

(James H. Strauss, Ellen G. Strauss, Chapter 3 - Plus-Strand Rna Viruses, Viruses And Human Disease Second Edition, Academic Press, 2008)

Une vésicule fermée implique nécessairement une orientation de la réplicase vers l'extérieur de la vésicule, sur son versant cytoplasmique, comme cela a été montré pour les entérovirus (327). Une vésicule ouverte permet la localisation de la réplicase à l'intérieur de celle-ci, afin qu'elle puisse importer les métabolites nécessaires et exporter les ARN viraux néosynthétisés. Concernant les sphérules, les flavivirus, le SFV, le RUBV, et le FHV, ont tous leur complexe de réplication localisé sur le versant interne des sphérules. Concernant les DMVs ouverts sur le cytosol, la réplicase peut être localisée dans la membrane externe et tournée vers l'extérieur, ou dans la membrane interne et tournée vers l'intérieur. C'est notamment le cas du HCV (328) et des *Nidovirales*. Le caractère ouvert ou fermé d'une vésicule dépend de la présence d'un canal en « forme de col » (« necked channel »). Il a récemment été découvert, grâce à l'apport de la cryo-ME,

que ces points de passage peuvent être ménagés par des pores viraux, à l'image des pores nucléaires de la cellule.

iii. Pores moléculaires viraux

En 2017, une analyse en microscopie électronique a été effectuée sur des cellules de drosophile S2 transfectées avec des plasmides codant le génome du FHV (329). Cette analyse s'est focalisée sur le canal qui permet aux sphérules mitochondriales du réseau de réplication d'être ouvertes sur le cytoplasme. Une reconstruction tomographique en cryo-ME a permis de mettre en évidence, au niveau de la face cytosolique de ce canal, un complexe protéique en « couronne » présentant une symétrie d'ordre 12 (**Figure 59**).

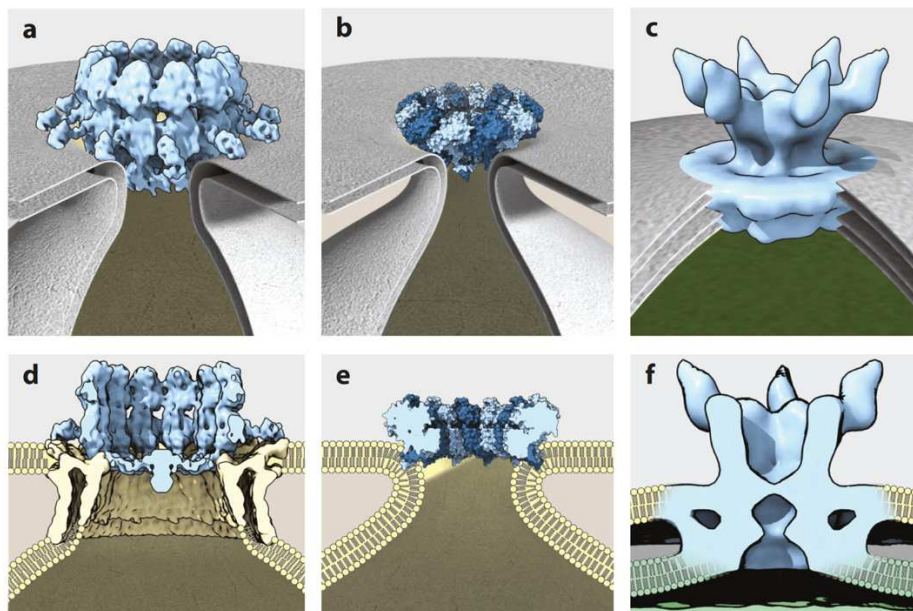


Figure 59 : Reconstructions tomographiques de pores moléculaires viraux par cryo-ME

a,d : Nodavirus, **b,e** : Alphavirus, **c,f** : Coronavirus
(Masaki Nishikiori, Annual Review of Virology 2022 9:1, 193-212)

Ce complexe, véritable pore viral de 50 à 80 nm, est composé uniquement de protéine A de réplication. Ses douze sous-unités interagissent toutes avec la membrane externe de la mitochondrie à la base de la couronne, stabilisant ainsi la forte courbure membranaire du col de la sphérule, en compensant les forces de répulsion électrostatique des copies de dsRNA contenues dans la vésicule. En 2021, une étude ayant recours à la cryo-ME a identifié un pore viral chez le CHIKV, sous la forme d'un dodécamère (douze sous-unités) en anneau, composé de protéines NSP1 (330). Ce pore viral étroit (7 nm) participe à la formation de sphérules, et régule l'entrée et la sortie des métabolites et des ARN. La

taille réduite de ce pore permet malgré tout le passage des ARN viraux, d'une longueur nanométrique. Très récemment chez les coronavirus, une analyse de cellules infectées par le MHV a permis d'identifier sur les DMVs, grâce à la cryo-ME, un pore viral cylindrique composé de 6 copies de protéine NSP3 (89). L'observation de telles structures en ME conventionnelle dans des cellules infectées par le SARS-CoV-2, laisse présager qu'un pore viral également composé de NSP3 existe pour ce virus, et constitue probablement une structure commune à tous les coronavirus. Pour les picornavirus, la protéine 2C semble un candidat potentiel pour la formation de pores viraux, du fait de sa capacité à interagir avec les membranes, induire la formation de DMVs et à s'organiser en hexamères (331).

Les pores viraux présentent de nombreuses similitudes avec les pores nucléaires des cellules eucaryotes : les deux ménagent un passage au travers des membranes, et régulent l'import et l'export d'acides nucléiques et de métabolites (**Figure 60**). Cependant contrairement au pore cellulaire, complexe massif composé de dizaine de protéines différentes, les pores viraux ont évolué pour remplir plusieurs fonctions avec un minimum de protéines. Pour les pores nucléaires, l'évolution a favorisé la duplication et la cyclisation des nucléoporines, afin de permettre la perméabilité, la sélectivité, et le transport de macromolécules de taille et de forme très différentes. Cela est probablement vrai dans le cas des pores viraux, bien que la limite du nombre de protéines virales codées par un génome de petite taille ait conduit à cumuler ces fonctions chez une ou deux protéines non structurales. Il est intéressant de constater des similitudes entre les pores viraux des virus (+)ssRNA, et les canaux protéiques situés sur les sommets des capsides des virus à ARN double brin (ex : capsid du bacteriophage $\phi 6$ qui comporte à chaque sommet un hexamère de protéine structurale P4). Enfin, de nombreux herpesvirus et bactériophages à ADN utilisent un complexe protéique de 12 sous-unités comme moteur de relargage de leur génome dans la noyau, après ancrage sur le pore nucléaire.

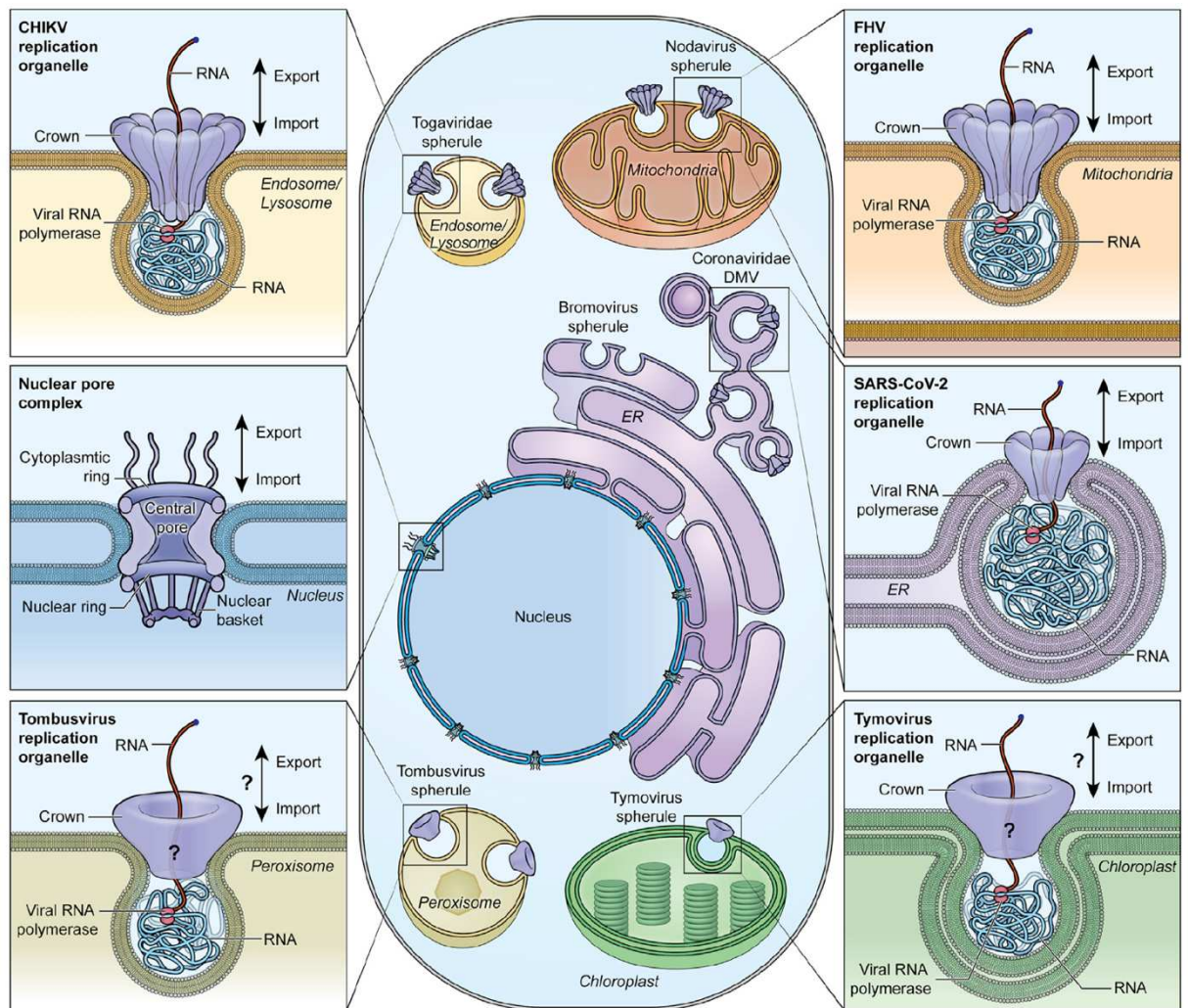


Figure 60 : Structure, localisation et association aux ROs des pores moléculaires viraux

(Kumar M, Mol Cell. 20 mai 2021;81(10):2061-3.)

iv. Sites d'assemblage

Pour de nombreux virus (+)ssRNA, les réseaux de réplication sont associés physiquement et sur le plan fonctionnel avec les sites d'assemblage des particules virales. Pour les coronavirus, les sites d'assemblage et le bourgeonnement des virions sont juxtaposés avec les DMVs et leurs répliques. L'encapsidation des ARN viraux dans les particules virales est notamment dirigée par une interaction entre la protéine NSP3, présente dans les pores viraux, et la protéine de nucléocapside N (**Figure 61**) (37). Cette temporalité est validée par une étude montrant que la protéine N du SARS-CoV-2 est exprimée plus précocement que les autres protéines structurales, dès 5 h p.i., et s'associe aux membranes du RE puis aux DMVs (332). Les *Flaviviridae* s'assemblent et bourgeonnent aussi à proximité de leurs ROs. Pour HCV, la protéine NS2 est un acteur majeur qui coordonne et établit des contacts entre le recrutement de protéines structurales, les gouttelettes lipidiques et les structures membranaires dérivées du RE

(333). Chez les *Nodaviridae*, de grands amas de virions s'accumulent directement au voisinage des mitochondries portant les sphérules (247). Le lien entre assemblage et réseau de réplication est illustré par le fait que les ARN génomiques sont encapsidés par les protéines de capsid traduites à partir des ARN néosynthétisés par les répliques des sphérules mitochondriales. De plus, le domaine N-terminal de la protéine de capsid permet son adressage vers les sites de réplication mitochondriaux (334).

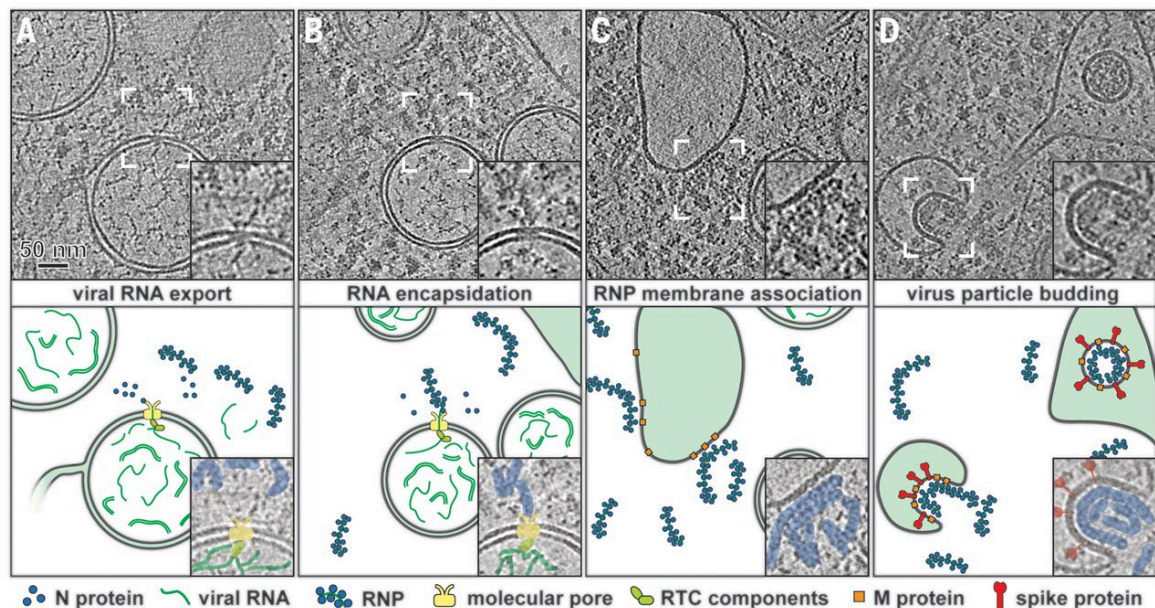


Figure 61 : Modèle de transit du génome du MHV, des DMVs vers les sites d'assemblage

RNP : ribonucleoprotein; RTC : replication-transcription complex

(Wolff G, Science. 11 sept 2020;369(6509):1395-8.)

3. Immunité innée dirigée contre les organites de réplication

Il a très tôt été proposé que les ROs des virus (+)ssRNA ont pour rôle de protéger les ARN viraux (en particulier le dsRNA) des senseurs cellulaires de l'immunité innée. Cette hypothèse est notamment supportée par le fait que les ARN viraux, chez les flavivirus, sont dégradés par un traitement à la nucléase, uniquement après rupture préalable des membranes par un détergent tensioactif non ionique (335). De plus pour le DENV, une corrélation positive a été identifiée entre l'exposition des ARN viraux dans cytosol et l'induction de la voie de l'IFN (336).

Une autre stratégie d'échappement au système immunitaire de ces virus consiste à mimer les ARN messagers eucaryotes, par exemple en ajoutant une coiffe en 5' de leurs ARN viraux chez les flavivirus grâce à une phosphatase virale (337). Chez les coronavirus,

le MHV échappe également à la reconnaissance de ses dsRNA par PKR et OAS, en utilisant une endonucléase virale qui clive les ARN viraux libres dans le cytosol, pour prévenir l'induction du signal antiviral (**Figure 62**) (338).

Figure 62 : Stratégies d'échappement à la réponse immunitaire innée chez les coronavirus

(Minkoff, J.M., *Nat Rev Microbiol* (2023).)

aberrantes ne soit pas connu avec précision, des études récentes ont montré que la cellule marque les PVs de *Toxoplasma gondii* avec la microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3), marqueur de l'autophagie, afin d'initier ce processus (343). Le marquage des membranes des PVs par LC3 entraîne le recrutement des GTPases, qui déstabilisent la bicouche et exposent le parasite aux senseurs immunitaires du cytosol. Ce processus a été nommé « ciblage par les protéines de l'autophagie » (TAG). Les PVs sont également reconnus et marqués par la voie de l'ubiquitination induite par l'interféron gamma, qui conduit également au recrutement et à l'activation des GTPases inductibles par l'interféron (344). Il est logique de penser que de tels mécanismes puissent être mis à profit par la cellule pour le ciblage et la désorganisation des ROs, afin d'exposer les PAMPs viraux aux senseurs de l'immunité innée (**Figure 63**). Bien que les indices manquent encore à l'heure actuelle, la LC3 a été détectée dans les membranes des ROs de cellules infectées par le MNV, l'EAV et le MHV. Cependant, et de manière paradoxale, il n'a pas été établi si la LC3 favorise la formation des ROs par le biais de l'autophagie, ou s'il s'agit d'un ciblage de ces structures par la cellule. Chez les *Nidovirales*, il a été montré que l'interféron β influence négativement les ROs de l'EAV en cellules Huh7 infectées (345). En effet, les cellules traitées avec l'IFN- β présentent moins de DMVs, et des accumulations de feuillettes à double membrane, indiquant une possible perturbation de la biogenèse des DMVs, plutôt qu'une perturbation des structures déjà formées.

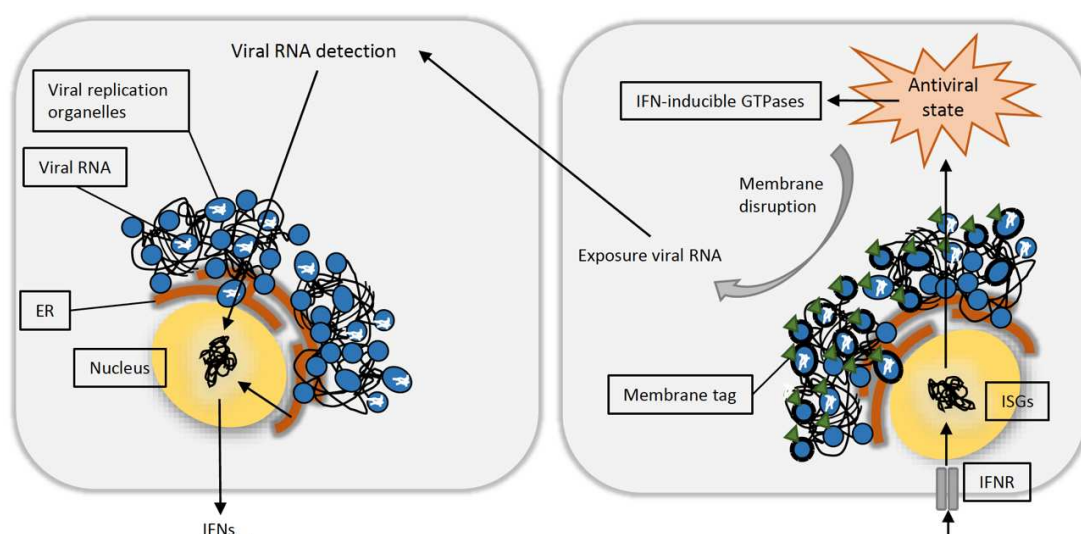


Figure 63 : Mécanisme hypothétique de ciblage et de perturbation des ROs par les GTPases inductibles par l'IFN

(Scutigliani EM, Cytokine Growth Factor Rev. 1 oct 2017;37:17-27.)

Concernant les *Flaviviridae*, plusieurs mécanismes immunitaires liés à la famille des ISG ont été identifiés, ciblant les ROs, les complexes de réplication, ou les ARN viraux (**Figure 64**). Il a été montré que les NS5A des répliques du HCV sont ciblées et inhibées par la vipérine, un ISG associé au RE (346). La vipérine synthétise le ddCTP, qui agit comme un terminateur de chaîne pour la polymérase. La reconnaissance des dsRNA viraux par l'OAS produit du 2',5'-oligoadénylate, qui induit l'activation de la RNase L, qui dégrade les ARN viraux détectés (347). IFI6, un autre ISG associé au RE, limite la formation des ROs en inhibant l'invagination des membranes du RE, par l'intermédiaire de BiP (348). Chez le TBEV, la réplication est inhibée par TRIM79 α , qui semble promouvoir la dégradation lysosomale de la protéine virale NS5 (349). Enfin, C19orf66 est un ISG identifié récemment, qui inhibe la réplication du DENV par deux mécanismes : l'interruption de la traduction des protéines virales (350), et la dégradation des ARN viraux néosynthétisés (351).

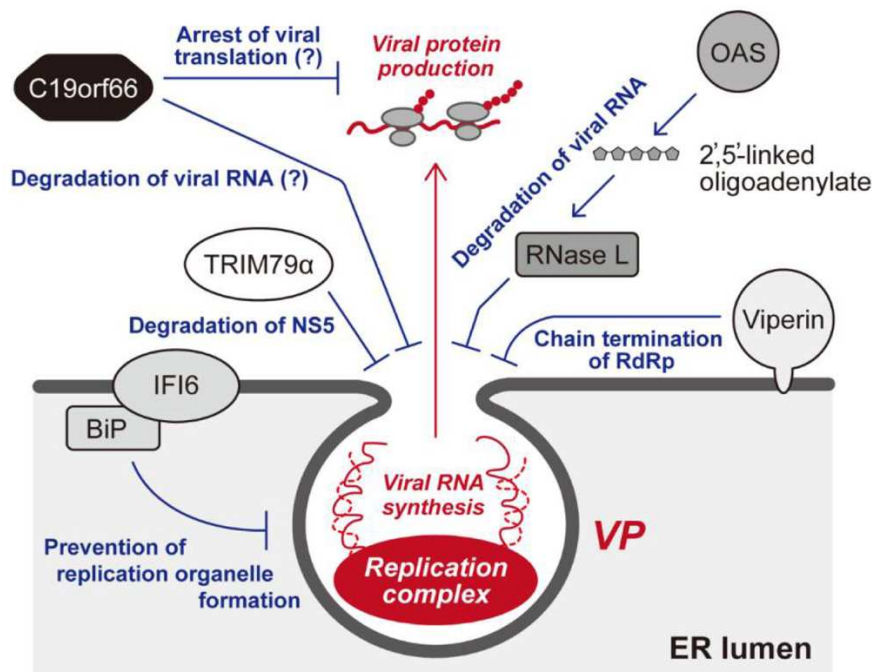


Figure 64 : Facteurs inductibles par l'interféron (ISG) ciblant la réplication des flavivirus.

(Morita E, Viruses. 2021 Jun 3;13(6):1060.)

4. Méthodes d'étude en microscopie électronique

La microscopie électronique (ME) et la recherche en virologie, fondamentale ou clinique, sont deux domaines intimement liés, depuis la mise au point du premier microscope électronique par le physicien Ernst Ruska en 1933. La ME permet l'observation d'échantillons biologiques avec une résolution nanométrique, 1000 fois supérieure à celle d'un microscope optique (MO). Elle révèle ainsi l'ultrastructure de la cellule, en fournissant des informations morphologiques et fonctionnelles sur ses organites, et sur les interactions virus-hôte, dans une cellule infectée. Depuis la ME conventionnelle initialement utilisée, plusieurs techniques innovantes ont été mises au point, ajoutant deux aspects fondamentaux lors de l'acquisition d'une image : la structure 3D d'un élément, et l'élargissement du spectre d'échelle observable du tissu à la macromolécule. Ce large spectre d'échelle est notamment illustré par la complémentarité entre la microscopie électronique à transmission (MET) adaptée à l'observation de la structure interne d'échantillons ultrafins avec une résolution moléculaire, et la microscopie électronique à balayage (MEB) adaptée à l'observation de la surface d'échantillons plus volumineux, avec une résolution plus faible. Une avancée majeure a été le développement de la cryomicroscopie électronique, qui permet l'observation d'échantillon biologique proche de l'état natif en conservant l'environnement aqueux, par la formation de glace amorphe au lieu d'une fixation et d'une résine chimiques. Ainsi, ce perfectionnement des techniques de ME a été déterminant pour la description et la compréhension des ROs viraux.

La MET dite conventionnelle a permis les premières observations de membranes cellulaires modifiées lors d'une infection virale dès le début des années 1960, bien que la fonction précise de ces structures demeurait mal comprise. Ces modifications étaient regroupées de manière indistincte dans la catégorie des effets cytopathogènes, au même titre que ceux observés en MO. La MET conventionnelle nécessite de préparer l'échantillon pour stabiliser l'ultrastructure, mais aussi pour le rendre observable sous-vide et suffisamment fin pour être traversé par un faisceau d'électrons (**Figure 67**). L'échantillon est préalablement fixé par des aldéhydes, puis l'environnement aqueux est progressivement déshydraté par des bains de concentration croissante en solvant (éthanol). L'éthanol est ensuite remplacé par une résine chimique (epoxy ou acrylique) qui va solidifier l'échantillon en polymérisant, permettant ensuite de réaliser des coupes

ultrafines avec un ultramicrotome. Enfin, une étape de contraste avec des métaux lourds, avec une affinité pour les lipides des membranes (osmiophilie) et les protéines de la cellule, permet de densifier les atomes « légers » retrouvés dans les biomolécules. La congélation haute pression (HPF), mise au point en 1968, se base sur une congélation très rapide de l'échantillon et sous haute pression, afin d'inhiber la formation de cristaux de glace qui altérerait l'ultrastructure cellulaire. La glace est ensuite progressivement remplacée par un solvant organique avec une augmentation graduelle de la température, un processus appelé cryo-substitution (FS). L'HPF-FS est considérée comme la technique de référence pour l'observation en MET conventionnelle, car elle préserve bien mieux la morphologie cellulaire par rapport aux méthodes chimiques de fixation, ce qui est particulièrement visible pour les structures membranaires.

L'inconvénient inhérent à la résolution élevée de la ME par rapport à la MO, réside dans l'analyse d'une zone très limitée de l'échantillon, du fait de l'échelle submicrométrique de l'observation et de l'épaisseur nanométrique de la section observée. La MO à fluorescence, qui a bien plus de recul, est donc bien plus sensible pour la recherche rapide d'un évènement rare dans une cellule, qui est de surcroît possible sur une cellule vivante non fixée (live-cell imaging). La microscopie corrélative optique et électronique (CLEM) cumule les avantages des deux approches, en retrouvant et en imageant la même zone de l'échantillon, dans un premier temps en MO à fluorescence, puis en MET. La MO permet d'abord la localisation d'un évènement, qui peut être transitoire ou de taille limitée, dont l'ultrastructure est ensuite déterminée en MET.

Au-delà de la simple description morphologique d'une structure en MET, l'identification des protéines (ou plus largement d'une biomolécule) présentes dans cette structure est possible grâce à l'immunomarquage par microscopie électronique (IEM) en immunogold (**Figure 65**).

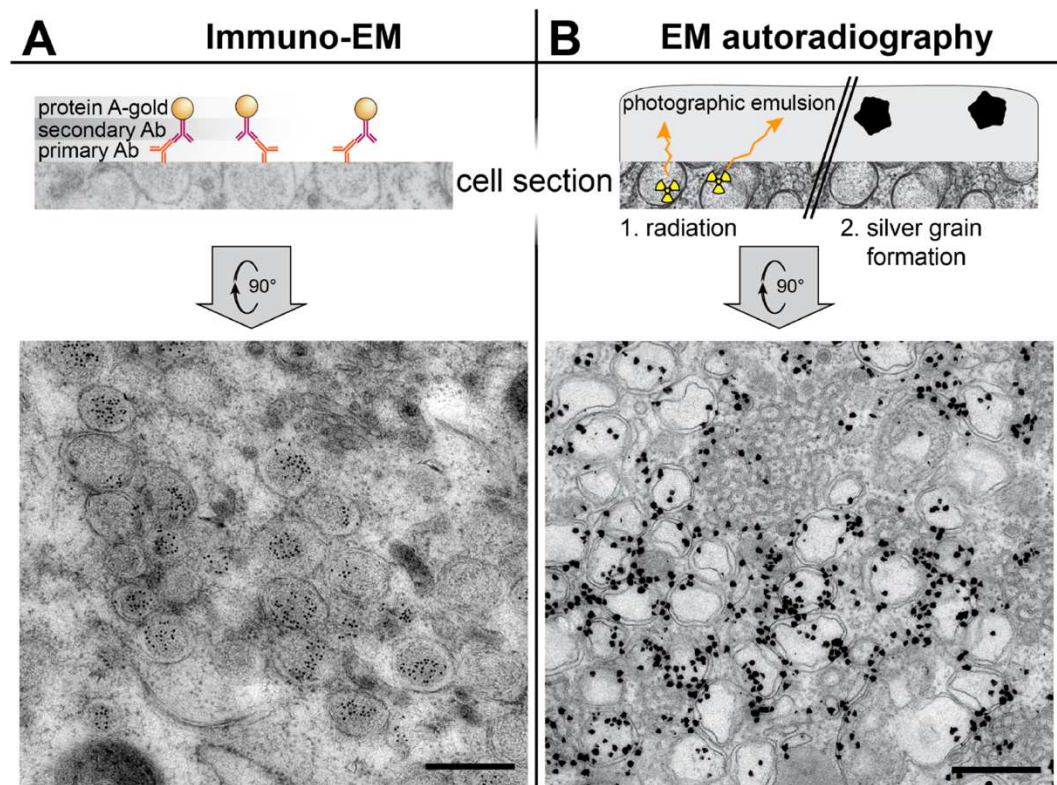


Figure 65 : Techniques de marquage en MET utilisables pour la détection d'ARN viraux dans les ROs

Ab : antibody

(Wolff, G, *Viruses* **2021**, 13, 197.)

De manière analogue à l'immunofluorescence en microscopie optique, qui a recours à des anticorps couplés à un fluorochrome, le marquage d'une protéine d'intérêt s'effectue par le biais d'anticorps secondaires couplés à une bille d'or colloïdal, d'un diamètre précis pour chaque protéine d'intérêt (6, 10 ou 15 nm). La coupe ultrafine est incubée avec les anticorps, qui sont observés une fois fixés sous la forme de sphères denses aux électrons dans la zone contenant la protéine. La préservation des épitopes de l'antigène d'intérêt est un facteur de réussite de l'IEM, l'utilisation de résines chimiques et de métaux contrastants pouvant les altérer significativement. Ainsi, la technique de Tokuyasu préserve mieux les épitopes, en réalisant l'IEM sur coupes congelées. Une limite du Tokuyasu réside dans le contraste très faible des structures cellulaires, qui permet cependant de mieux distinguer les billes d'or denses sur le fond de la coupe. L'IEM est donc soumise à un compromis entre un marquage efficace et l'observation d'éléments suffisamment contrastés pour être observables. Une méthode alternative de détection des ARN viraux a recours au radiomarquage avec un nucléotide radioactif, incorporé dans les acides nucléiques lors de la réplication. Le radioélément génère ensuite des précipités

denses aux électrons dans les ROs contenant les ARN néosynthétisés. L'autoradiographie en ME est complémentaire de l'IEM, avec une résolution spatiale plus faible que le marquage par un anticorps couplé à une bille d'or (15 - 30 nm vs 100 - 300 nm). En effet, la résolution de l'IEM dépend de la taille de l'anticorps (distance entre le paratope et la bille d'or), alors que les précipités denses se forment de manière aléatoire et dans un rayon plus large, autour de l'ARN radiomarqué. L'interprétation de l'autoradiographie en ME se base donc sur l'association de ces précipités avec une structure de morphologie compatible, plutôt que sur une localisation exacte de la source.

Initialement limitée à la morphologie en 2D d'une cellule, le développement de l'informatique et des algorithmes d'analyse d'images a permis la tomographie électronique. Elle consiste à réaliser une reconstruction 3D d'un objet par l'acquisition successive d'images en 2D sur plusieurs sections de l'échantillon, une avancée majeure pour l'observation des ROs (**Figure 66**).

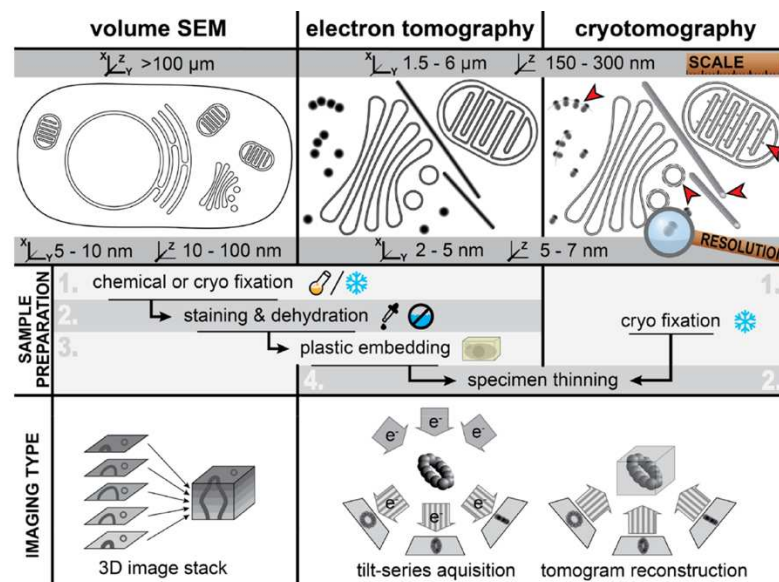


Figure 66 : Caractéristiques des méthodes de reconstruction 3D en microscopie électronique
(Wolff, G.; *Viruses* **2021**, *13*, 197.)

La plus simple de ces techniques est la méthode des coupes sériées, qui consiste à observer en MET des coupes ultrafines successives du bloc de résine d'une épaisseur constante, déposées en ruban sur la grille. Cette approche permet ainsi d'obtenir une approximation de la structure 3D d'un élément subcellulaire, en observant ses différents étages.

Récemment, deux nouvelles déclinaisons techniques de la MEB ont permis la reconstruction 3D de grands volumes cellulaires. Elles se basent toutes deux sur l'acquisition successive d'images « empilées », en progressant dans le bloc de résine contenant l'échantillon. On réalise pour cela des cycles répétés de balayage de la surface par le faisceau d'électron pour acquérir l'image, suivi de l'ablation de cette surface pour acquérir l'image de la surface sous-jacente. Cette ablation peut être réalisée par la coupe répétée d'un ultramicrotome (SBF-SEM), ou par un faisceau d'ion focalisé hautement énergétique (FIB-SEM) (**Figure 67**).

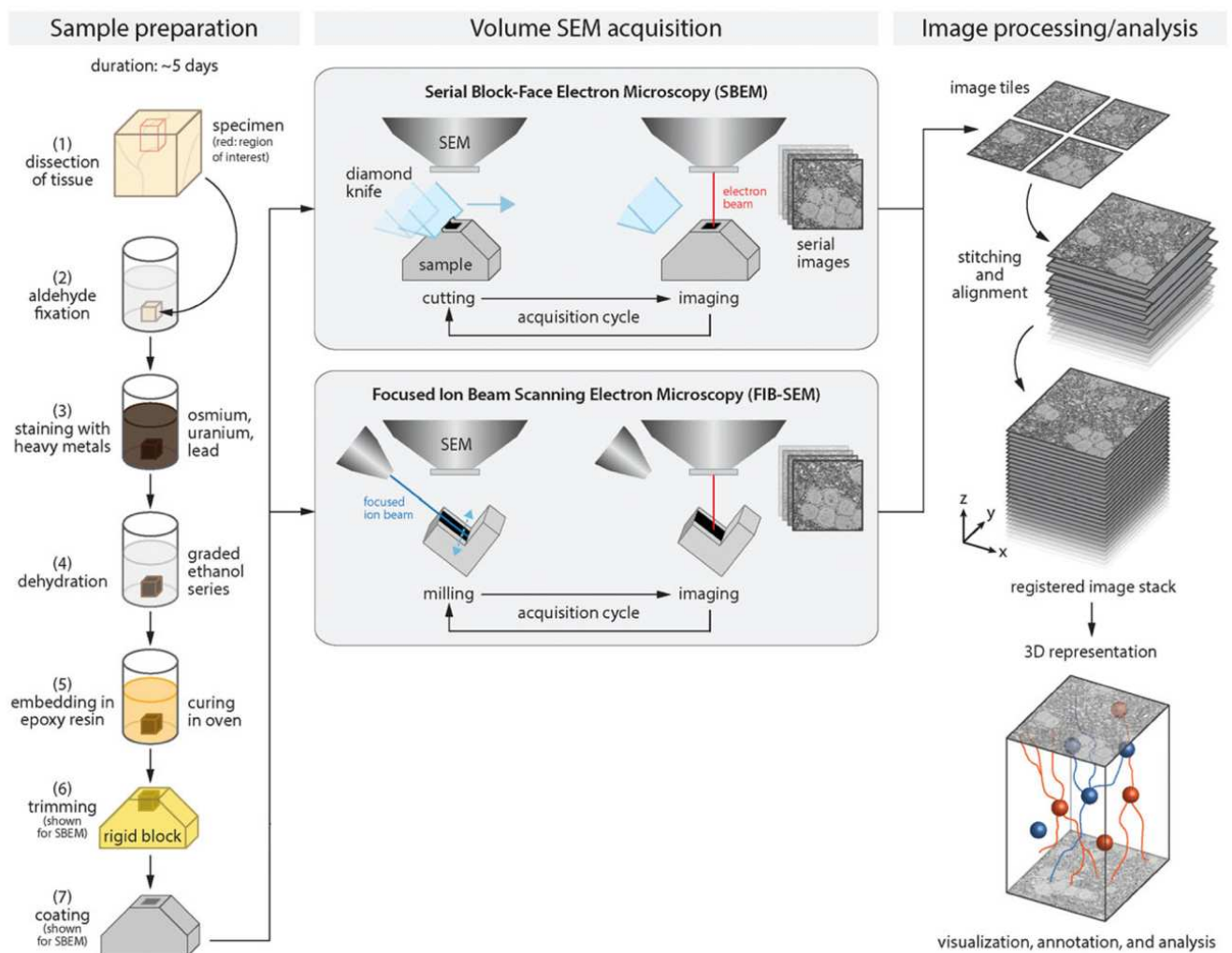


Figure 67 : Étapes de préparation des échantillons et principe comparé du SBF-SEM et du FIB-SEM

Les étapes de préparation des échantillons, de la fixation à l'obtention d'un bloc de résine contenant l'échantillon, sont identiques entre la ME conventionnelle et la SBF-SEM / FIB-SEM.

(Titze B, Biol Cell. 2016;108(11):307-23.)

La résolution de la reconstruction 3D est moins bonne que celle de la MET, principalement du fait de l'épaisseur limite de la couche retirée à chaque cycle : 25 nm pour la SBF-SEM, 5 nm pour la FIB-SEM. En contrepartie, ces techniques permettent d'imager des volumes de plusieurs centaines de micromètres dans chaque dimension, comprenant plusieurs cellules voire une large zone d'intérêt dans un tissu. Un avantage spécifique de la FIB-SEM est son application à des blocs congelés (cryo FIB-SEM) en plus de blocs de résine chimique, avec une ultrastructure plus proche de l'état natif.

La reconstruction 3D de très petits éléments, dans une cellule ou en suspension dans un liquide, repose sur l'utilisation de la cryomicroscopie électronique à transmission (cryo-TEM). L'échantillon n'est alors jamais inclus en résine chimique, afin de préserver l'environnement aqueux de la cellule ou de la protéine purifiée. Le plus souvent, une glace amorphe dépourvue de cristaux est formée en plongeant rapidement l'échantillon inclus dans un cryoprotecteur (sucrose), dans l'azote liquide. Le bloc de glace est ensuite coupé par un cryo-ultramicrotome qui maintient l'échantillon à froid grâce à l'azote liquide. Les coupes ultrafines sont ensuite déposées sur des grilles, puis observées au MET, toujours en maintenant les coupes en azote liquide dans le microscope afin d'éviter la fonte de la glace. De cette façon, le volume cellulaire est préservé et plus « dilaté » que celui d'une cellule incluse en résine, ce qui permet la révélation de petites éléments viraux mal visibles car comprimés dans une cellule « contractée » en technique conventionnelle. Les coupes observées en cryo-TEM ont un contraste très faible pour deux raisons : l'absence d'étape de contraste par les métaux lourds, et l'observation avec un faisceau d'électron très peu énergétique du fait de la sensibilité de la glace aux fortes radiations. La cryo-tomographie en MET peut-être utilisée sur des complexes macromoléculaires purifiés (comme une capsid ou un pore viral) (**Figure 68**). L'acquisition de milliers d'images de ce complexe puis leur sommation pour générer une seule image avec un rapport signal / bruit augmenté, permet d'obtenir la reconstruction 3D de ces éléments de taille nanométrique à infra-nanométrique.

Finalement, le choix de la technique de préparation de l'échantillon est déterminant pour la conservation de l'ultrastructure de l'élément d'intérêt, en évitant au maximum la formation d'artefacts liés à la technique (**Figure 69**). L'observation d'images artéfactuelles en microscopie électronique peut en effet conduire à une description et une interprétation erronée des ROs viraux et de leurs composants.

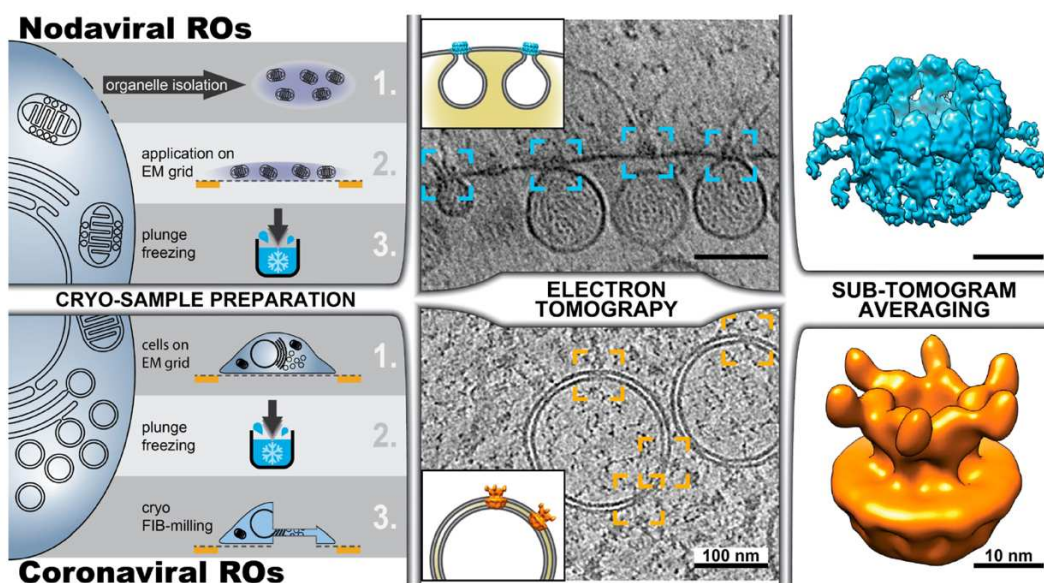


Figure 68 : Étapes de préparation des échantillons et principe de la cryo-tomographie en MET appliquée à l'étude des pores viraux

(Wolff, G.; *Viruses* **2021**, *13*, 197.)

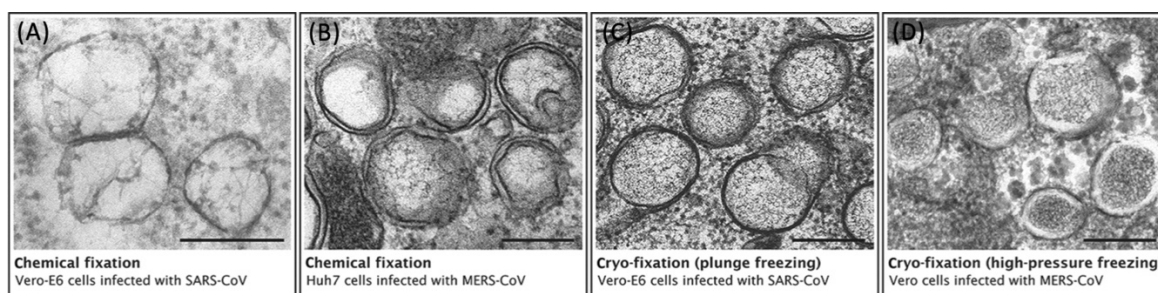


Figure 69 : Variabilité de l'ultrastructure des DMVs en fonction de la technique de préparation des échantillons pour la MET

(Wolff G, Trends Microbiol. 1 déc 2020;28(12):1022-33.)

E. Étapes tardives du cycle des coronavirus

Les virus enveloppés ont de longue date été utilisés comme modèle d'étude des processus de sécrétion cellulaire, de trafic membranaire, avec des considérations de polarité liées au type cellulaire infecté. En effet, les virions néoformés suivent les mêmes voies de sécrétion que les protéines cellulaires, en détournant la machinerie de transport intracellulaire et l'organisation des organites de la voie sécrétoire. La plupart du temps, les virus enveloppés voient leurs protéines structurales adressées à la membrane plasmique, à partir de laquelle ils vont bourgeonner et être directement libérés dans le

milieu extracellulaire. Pour des raisons qui ne sont pas complètement élucidées, certains virus enveloppés vont s'assembler et bourgeonner dans la lumière d'organites, à partir des endomembranes cellulaires. Cela nécessite forcément le passage par les voies de sécrétion de la cellule pour être libérés en extracellulaire par exocytose. Le principal organite au centre des voies de sécrétion est l'appareil de Golgi, ce qui implique pour le virus de traverser les différentes citernes d'un dictyosome, du *cis*-Golgi au *trans*-Golgi. Cependant, plusieurs virus (+)ssRNA, dont certains enveloppés comme les coronavirus, désorganisent à leur profit le Golgi dans les cellules qu'ils infectent. Chez les coronavirus, les dictyosomes golgiens laissent place à des vacuoles à simple membrane contenant des particules virales. Il est donc paradoxal que ces virus déstabilisent l'organisation d'un organite dont ils dépendraient pour leur sécrétion hors de la cellule. Cela amène à s'interroger sur des voies alternatives de sortie de ces virus hors de la cellule. De fait, les mécanismes de sortie des coronavirus sont encore largement méconnus, bien que certains indices aient été identifiés.

1. Assemblage et bourgeonnement

L'étude du cycle du MHV, un *Betacoronavirus* de mammifère logiquement assez proche des *Betacoronavirus* humains, a permis des avancées significatives dans la compréhension des étapes tardives du cycle des coronavirus. Les premières études en MET de cellules infectées par le MHV ont mis en évidence des particules virales au sein de vacuoles à membranes « lisses » non caractérisées, et l'absence d'image de bourgeonnement à la membrane plasmique (352). L'observation en ME de fibroblastes murins infectés a ensuite permis de localiser le bourgeonnement de ces particules dans des structures tubulo-vésiculaires situées à l'interface entre le RE et le Golgi, morphologiquement distinctes de ces deux compartiments (353). L'analyse de cellules AtT20 (adénome hypophysaire murin) infectées, a permis de localiser des particules virales précisément aux extrémités dilatées des citernes golgiennes (354). Le compartiment où ces virions bourgeonnent a ensuite été identifié comme le compartiment ERGIC, une plateforme de régulation du trafic bidirectionnel entre les RE et le Golgi, notamment caractérisé par la présence de la protéine récepteur de cargo p58/ERGIC-53 (**Figure 70**).

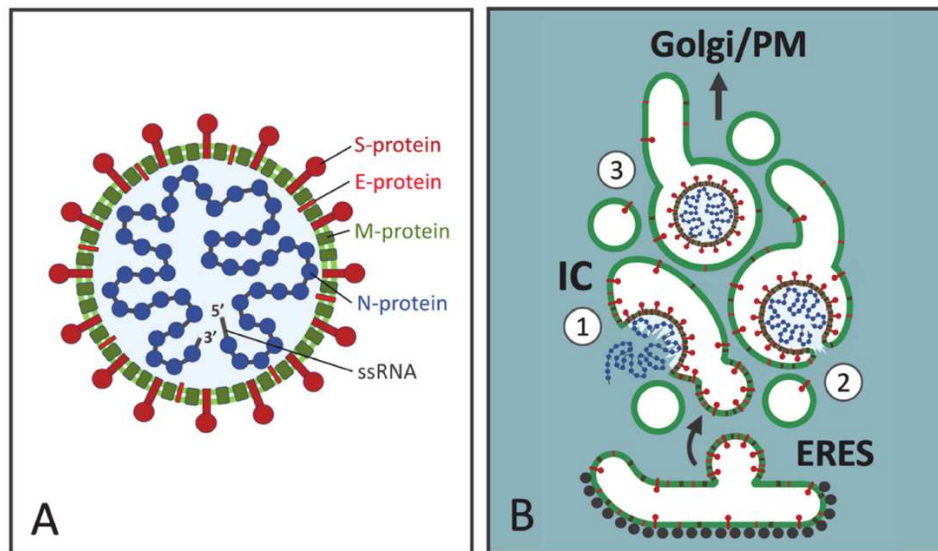


Figure 70 : Structure et compartiments d'assemblage et de bourgeonnement des particules virales des coronavirus

ERES : endoplasmic reticulum exit sites; IC : intermediate compartment; PM : plasma membrane

(Saraste J, Cells. mars 2021;10(3):503.)

Cette protéine est également retrouvée au niveau des compartiments de bourgeonnement du MHV et du TGEV en IEM, ce qui plaide en faveur d'une origine ERGIC de ces structures (355). La présence de la GTPase Rab1 dans ces compartiments, un autre marqueur spécifiquement impliqué dans le transport bidirectionnel RE-Golgi, est un argument supplémentaire en faveur de leur origine liée au ERGIC (356). L'utilisation du ERGIC comme compartiment d'assemblage et de bourgeonnement semble partagée par trois genres de coronavirus (α -, β -, γ -CoVs) (355), au sein desquels le SARS-CoV et le MERS-CoV apparus plus récemment (61). En revanche, aucun assemblage n'a été observé au niveau de l'appareil de Golgi.

La formation d'une nouvelle particule de coronavirus est principalement dépendante de la protéine de membrane M, qui s'homo-oligomérisse et interagit avec les protéines structurales S, N et E, ainsi que le génome viral (357). Bien qu'elle soit abondamment exprimée dans les membranes cellulaires, on retrouve peu d'exemplaires de la protéine d'enveloppe E dans la particule virale, malgré le fait qu'elle joue un rôle central pour l'assemblage des virions. En interagissant avec la protéine M, la protéine E peut induire une courbure membranaire pendant le bourgeonnement, et agir comme une protéine de scission pour finaliser la libération du virion dans la lumière du ERGIC (62). De plus, la protéine E peut s'homo-oligomériser en pentamère pour former un canal ionique qui va modifier les propriétés physico-chimique du ERGIC pour favoriser la

production de particules virales. Chez l'IBV, il a été montré l'existence de deux pools de protéine E : un pool oligomérique qui participe à l'assemblage, et un pool monomérique qui agit sur la modification des propriétés du ERGIC. Les protéines E du pool monomérique agissent donc comme des viroporines, qui neutralisent l'acidité lumenale des compartiments de la voie sécrétoire, favorisant notamment le désassemblage du Golgi. Après leur synthèse dans le RE, les protéines virales structurales sont incorporées dans des vésicules de transport au niveau des sites de sortie du RE (ERES), puis adressées vers le ERGIC par un mécanisme encore mal compris. De même, la localisation de l'interaction de la protéine N avec l'ARN viral génomique néosynthétisé reste inconnue, tout comme le mécanisme permettant l'adressage de l'ARN vers les sites d'assemblages. A l'image des bunyavirus, il est probable que le transport de la N vers les sites d'assemblage soit dépendant de protéines motrices associées aux microtubules. Il est important de noter que, à l'inverse de la plupart des virus enveloppés, l'assemblage d'une nucléocapside n'est pas nécessaire au bourgeonnement des coronavirus, la co-expression de M et E étant suffisante pour la formation de VLPs (358). La relation entre le site d'assemblage des coronavirus et les caractéristiques des protéines structurales a été mise en évidence par la génération de mutants de la protéine M de l'IBV. Cette étude a permis d'identifier des motifs situés dans la première portion transmembranaire de la protéine, qui induisent sa rétention dans le ERGIC et le *cis*-Golgi (359). Le domaine C-terminal de la protéine M de l'IBV semble également jouer ce rôle (360). Pour le MERS-CoV, la protéine M localise dans le TGN, à la fois du fait d'un signal d'export du RE dans sa séquence, mais aussi d'un motif de rétention dans le TGN situé dans le domaine C-terminal de la protéine (360). L'oligomérisation de la protéine M joue aussi probablement un rôle dans sa rétention dans ces compartiments (361). La protéine S de l'IBV contient un motif di-lysine, de retour vers le RE, qui en interagissant avec la protéine COPI du ERGIC et du *cis*-Golgi, conduit à sa concentration dans et autour des sites d'assemblage. A l'image de la protéine S, la protéine E du MHV n'est pas spécifiquement adressée vers le ERGIC, mais plutôt largement retrouvée dans tous les compartiments golgiens (362). De nombreux indices laissent à penser que la rétention des protéines structurales ne suffit pas à expliquer le site du bourgeonnement, mais que d'autres mécanismes sont à l'œuvre. Bien que la glycosylation des protéines de l'enveloppe virale semble facultative pour l'assemblage des coronavirus, d'autres modifications post-traductionnelles, comme la palmitoylation de la protéine E, jouent probablement un rôle complémentaire. Les protéines non structurales et accessoires des coronavirus peuvent aussi contribuer à

l'assemblage viral, en interagissant avec des facteurs de l'hôte (récepteur à cargo, machinerie de transport, métabolisme lipidique...). La composition en lipides, spécifique du ERGIC, participe aussi certainement à la détermination du site d'assemblage. Enfin, l'interaction de la protéine M avec les filaments d'actine peut suggérer une action mécanique du cytosquelette en participant au processus de bourgeonnement. Il est intéressant de noter que la nature pléomorphique des virions d'un même coronavirus, avec une taille pouvant varier de 100 à 160 nm, laisse penser à une participation de protéines cellulaires pour expliquer ces fluctuations.

2. Sécrétion et sortie

L'identification du ERGIC comme compartiment d'assemblage et de bourgeonnement pose la question des domaines de cet organite impliqués dans la sortie des virions néoformés de la cellule. Sur le plan ultrastructural, deux types d'éléments composent le ERGIC : des clusters vésiculo-tubulaires (VTCs), et des saccules (363). Les VTCs sont constitués d'un amas de petites vésicules et de tubules, des éléments plutôt statiques en termes de structure, qui présentent une mobilité dépendante des microtubules. A l'inverse, les saccules sont de taille très variable et ont la capacité de se dilater. En considérant la taille conséquente des virions des coronavirus (par comparaison avec la plupart des protéines sécrétées et solubles), les VTCs ont un espace luminal trop étroit pour permettre le bourgeonnement et l'accumulation des virions, sans possibilité d'agrandissement. Il est donc probable que la capacité de dilatation des saccules soit plus adaptée à cette fin, fournissant suffisamment de volume pour la formation des particules virales (364). Comme évoqué précédemment, la protéine E a la capacité d'augmenter le pH luminal des compartiments sécrétoires, ce qui favorise la dilatation des saccules du ERGIC. L'utilisation d'une Rab1 fluorescente en live cell-imaging a permis de montrer que ces saccules ont également la capacité de se déplacer dans la cellule vers le Golgi après leur changement de forme (365), ce qui en fait de bons candidats pour le transport des virions de grande taille des CoVs, de leurs sites de bourgeonnement vers le Golgi. Il est également possible que le transport antérograde des virions entre le ERGIC et le *cis*-Golgi s'effectue par le biais de transporteurs spécialisés, différents des saccules du compartiment intermédiaire.

Après leur bourgeonnement dans le ERGIC, une première hypothèse concernant la sortie des CoVs fait appel à la voie sécrétoire constitutive, de manière

« classique » en passant par le Golgi (366) (Figure 71). Dans cette hypothèse, les saccules du ERGIC s'éloignent des ERES où les protéines virales ont été synthétisées, en se déplaçant le long des microtubules, puis se dirigent vers le Golgi où ils se transforment en citernes du *cis*-Golgi (367). L'observation de particules virales de CoVs aux extrémités dilatées du Golgi, du fait de leur grande taille, incite à penser que leur passage au travers du Golgi s'effectue par une maturation progressive et un mouvement des citernes du *cis*-vers le *trans*-Golgi. Une alternative à ce modèle propose un transport par les extrémités des différentes citernes du Golgi, au sein de mégavésicules, qui restent en périphérie des dictyosomes, où elles fusionnent et bourgeonnent alternativement d'une citerne à l'autre (368). Ce mécanisme est supporté par une analogie avec le transport et la sécrétion de volumineux agrégats protéiques de 400 nm, qui transitent par le Golgi dans des mégavésicules périphériques (369). Ces deux hypothèses impliquent nécessairement que l'appareil de Golgi soit fonctionnel et préservé *a minima* sur le plan de l'ultrastructure. À titre d'exemple, le traitement des cellules à la monensine, une drogue inhibitrice du transport golgien des protéines, bloque la sortie des virions du TGEV (370). Une fois parvenus au TGN, les virions sont probablement pris en charge par des transporteurs spécialisés qui vont permettre leur adressage puis leur relargage par exocytose à la membrane plasmique (371).

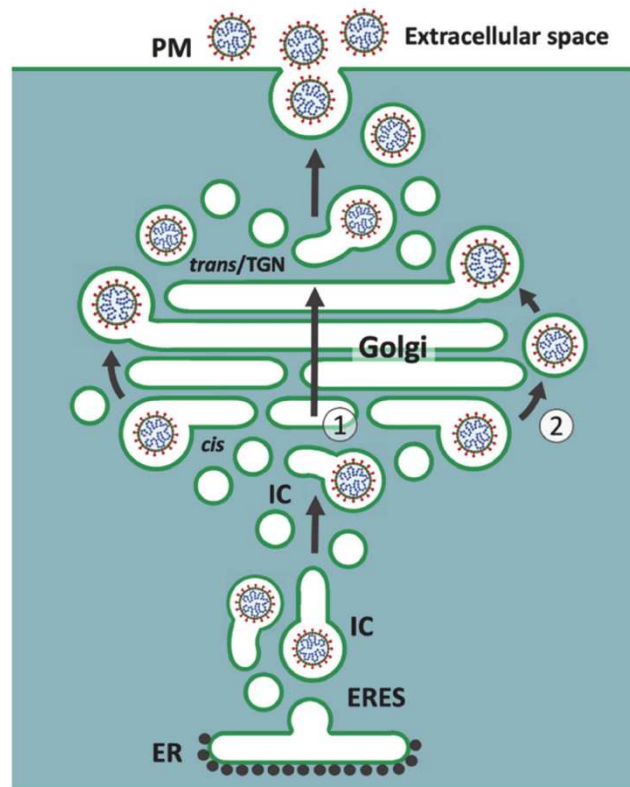


Figure 71 : Mécanismes hypothétiques de sortie des coronavirus par la voie sécrétoire constitutive

ER : endoplasmic reticulum; ERES : endoplasmic reticulum exit sites, IC : intermediate compartment, TGN : *trans*-Golgi network; PM : plasma membrane
(Saraste J, Cells. mars 2021;10(3):503.)

En parallèle d'une sortie par la voie sécrétoire constitutive, un certain nombre d'arguments plaident en faveur d'un mécanisme de sortie indépendant de l'appareil de Golgi (372). Le premier argument se base sur la désorganisation viro-induite du Golgi par les coronavirus dans les cellules infectées, n'empêchant pas la sortie de virions des cellules. Le deuxième argument se base sur l'utilisation de la BFA, une drogue qui désorganise le Golgi, et son absence d'effet sur la production et la sortie de particules virales des CoVs (373). Les connexions entre le RE et le ERGIC n'étant pas affectées par cette drogue, elles servent probablement de base à une sortie de la cellule par une voie non conventionnelle, qui court-circuiterait le ruban golgien. De plus, il a été montré que le ERGIC, défini comme un compartiment positif pour la p58/ERGIC-53, n'est pas seulement retrouvé entre le RE et le Golgi, mais également en zone péri-centriolaire (374) et en périphérie de la cellule proche de la membrane plasmique. Le ERGIC présente également des connexions avec le compartiment des endosomes de recyclage (REnds) positif à Rab11 (375), là encore non modifié par la BFA. Ces compartiments résistants à la BFA sont probablement connectés à la zone centrale non compacte du ruban golgien,

qui persisterait malgré cette drogue (376). Saraste *et al.* proposent plusieurs mécanismes de sortie non conventionnelle des CoVs (377) (**Figure 72**). Le premier mécanisme décrit un passage des virions du ERGIC au travers de la zone non compacte golgienne, directement vers les endosomes de recyclage, sans emprunter la voie des citernes du Golgi. Le transport des virions à la membrane plasmique serait donc ici assuré par le biais d'une maturation des endosomes, et non par le TGN. Le second mécanisme implique un transfert direct du ERGIC vers les endosomes de recyclage, puis vers la membrane plasmique. Les auteurs évoquent enfin un rôle hypothétique des endosomes de recyclage péri-centrosomaux, du fait de leur proximité avec le ERGIC.

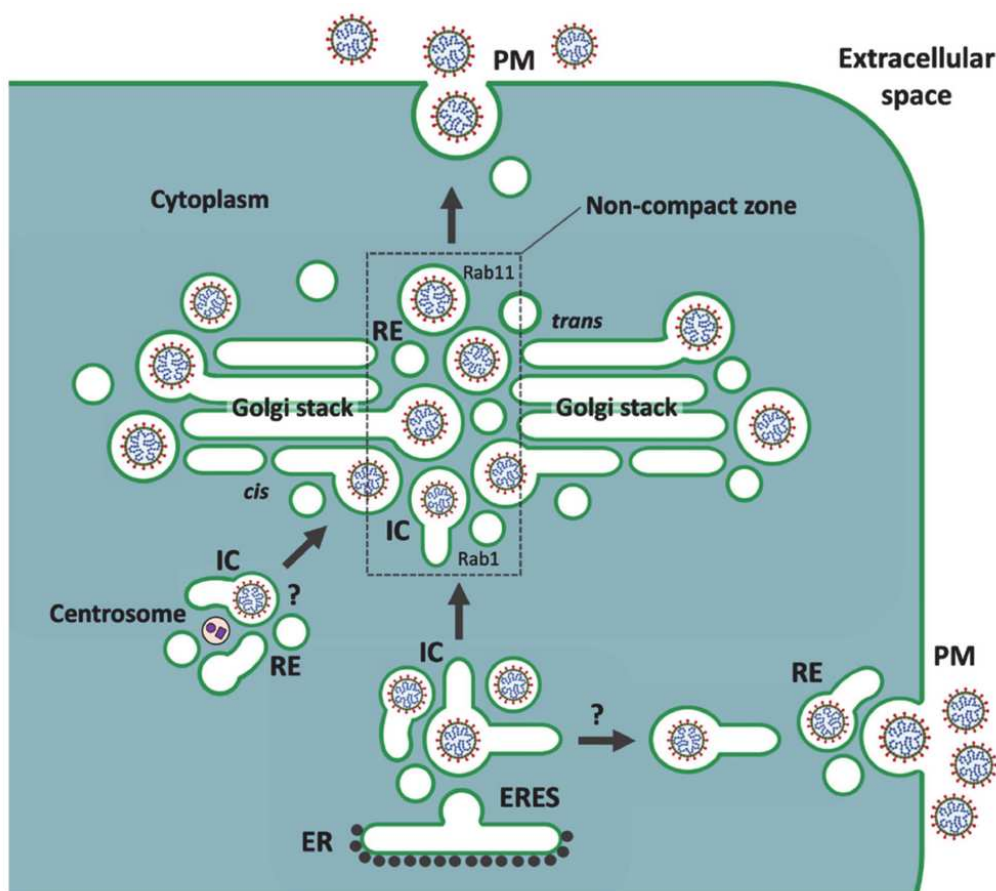


Figure 72 : Mécanismes hypothétiques de sortie des coronavirus par une voie sécrétoire non conventionnelle

ER : endoplasmic reticulum; ERES : endoplasmic reticulum exit sites, IC : intermediate compartment, TGN : *trans*-golgi network; PM : plasma membrane
(Saraste J, Cells. mars 2021;10(3):503.)

Dans une revue de la littérature récente, Bracquemond *et al.* (378) font l'état des connaissances concernant l'étape de sortie des coronavirus de la cellule. Ils présentent les arguments en faveur d'une sortie par la voie sécrétoire, par la voie exosomale ou par la voie endolysosomale. Ils citent notamment l'article de Siu *et al.* (379), qui a recours à l'analyse en microscopie confocale de cellules transfectées avec les composants du SARS-CoV, dont une protéine de fusion N-GFP. Cela leur a permis de visualiser trois types de vésicules : de grandes vésicules statiques près du noyau correspondant probablement aux sites d'assemblage, des vésicules plus petites très dynamiques, enfin de très petites vésicules contenant probablement des particules virales uniques. Ces éléments, obtenus en microscopie optique à fluorescence, vont plutôt dans le sens d'une sortie par de petites vésicules de sécrétion, qui pourraient être observées en MET. Une vaste cartographie des interactions entre les protéines de l'hôte et les protéines virales du SARS-CoV-2 (par spectrométrie de masse avec purification par affinité) a été effectuée par Gordon *et al.* (380). Elle a montré une association entre le marqueur de compartiment lysosomal Rab7 et la protéine NSP7, plutôt en faveur d'un détournement de la voie endolysosomale. En parallèle, la NSP8 semble interagir avec plusieurs protéines du complexe de l'exosome (EXOSC2, EXOSC3, EXOSC5, EXOSC8), en cohérence avec un détournement de la voie exosomale.

Plusieurs études vont également dans le sens d'une sortie du SARS-CoV-2 par le biais de lysosomes désacidifiés fusionnant à la membrane plasmique. Cette hypothèse est notamment soutenue par une étude montrant une colocalisation entre la protéine Spike et le marqueur lysosomal LAMP1 au sein de structures compatibles avec des vésicules de sécrétion (332). Une autre étude a mis en évidence l'augmentation significative de LAMP1 et LAMP2 à la membrane plasmique dans des cellules exprimant la protéine virale ORF3a, en faveur d'un rôle de cette protéine pour la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique (381). De même, l'expression d'ORF3a dans les cellules induit l'activation du canal calcique TRPML3, responsable de l'activation de la fusion lysosomale par un efflux du calcium du lysosome vers le cytosol. Enfin, ORF3a semble cibler le complexe BORC-ARL8b, ayant pour fonction de coupler les lysosomes à la kinésine, entraînant leur déplacement antérograde vers la membrane plasmique. L'ensemble de ces données est en faveur d'un rôle clef d'ORF3a pour la fusion des lysosomes à la membrane plasmique, qui pourrait être mise en jeu dans le cadre d'une sortie du virus par le lysosome désacidifié. Cette hypothèse est confortée par d'étude de patients infectés par des souches virales présentant une délétion d'ORF3a, associée à une

diminution du titre viral et à un meilleur pronostic du COVID-19. Il est intéressant de noter que la protéine ORF3a du SARS-CoV ne semble pas interagir avec le lysosome, un élément supplémentaire qui permettrait d'expliquer les différences de pathogénicité observée avec le SARS-CoV-2.

Enfin, *Koci et al.* ont constaté une augmentation significative de l'expression des gènes liés à l'autophagie et supposent que l'autophagosome pourrait être impliqué dans la sortie du virus, mais n'ont pas véritablement observé d'images de fusion de structures autophagiques avec la membrane plasmique en MET (382).

Bien que ces interactions soient le témoin d'un détournement de ces voies cellulaires par le virus, elles ne sont actuellement pas suffisantes pour présager de l'utilisation d'une voie particulière pour l'étape de sortie du SARS-CoV-2 de la cellule.

PROJET DE THÈSE

II. Projet de thèse

1. Objectifs

Les virus à ARN simple brin de polarité positive forment la classe de virus la plus représentée chez les organismes eucaryotes, les animaux, et parmi la totalité des virus impliqués en pathologie humaine. Ces virus ont pour point commun de modifier les membranes de la cellule hôte, afin de générer des organites dédiés à l'étape de réplication virale (ROs). La description morphologique de ces organites nécessite d'utiliser la microscopie électronique (ME), seule technique avec une résolution suffisante pour visualiser l'ultrastructure de ces éléments subcellulaires. La première mention de ROs en 1958 grâce à la ME, concerne des cellules infectées par le virus de la poliomyélite. De fait, les *Picornaviridae* demeurent à ce jour une des familles virales les mieux caractérisées concernant leurs organites de réplication, et ont très tôt servi de modèle de compréhension de leur morphogénèse. L'étude de la réplication des *Flaviviridae*, en particulier celle du virus de l'hépatite C (HCV), a également permis des avancées majeures dans l'élucidation de la structure et de la fonction des ROs. Ces dernières décennies, les techniques de ME se sont considérablement perfectionnées. La tomographie en cryo-MET ou le FIB-SEM permettent d'obtenir la structure 3D d'éléments subcellulaires, et sont donc des outils de premier plan dans ce contexte.

Au sein des virus à ARN simple brin de polarité positive, les *Coronaviridae* sont des virus fréquemment anthropozoonotiques, dont plusieurs membres ont franchi la barrière d'espèce pour infecter l'Homme. Les coronavirus humains (HCoV), comme le 229E ou le OC43, sont probablement passés de mammifères sauvages à l'être humain il y a plusieurs centaines d'années. Leur adaptation progressive au système immunitaire de l'hôte explique en partie la symptomatologie respiratoire bénigne observée chez les patients infectés. Plus récemment, deux *Betacoronavirus* émergents ont été à l'origine d'épidémies limitées, et responsables d'une symptomatologie respiratoire sévère chez les patients. Le premier est le SARS-CoV, identifié en Chine en 2002. Le second est le MERS-CoV, identifié au Moyen-Orient en 2012. L'analyse en ME de cellules infectées par ces virus a permis de décrire le réseau de réplication virale et ses composants. Ce réseau réticulo-vésiculaire, développé aux dépens du RE, contient principalement des vésicules à double membrane (DMVs). En 2020, la survenue de cas de pneumopathie

atypique en Chine a conduit à l'identification du SARS-CoV-2, un nouveau coronavirus émergent très proche du SARS-CoV sur le plan génomique. Le SARS-CoV-2 s'est rapidement diffusé à l'ensemble des pays du globe, menant à une pandémie mondiale, et saturant les systèmes de santé par la survenue de formes respiratoires sévères chez de nombreux patients. Face à ce nouvel agent infectieux, le monde de la recherche biomédicale s'est massivement mobilisé, afin de le caractériser finement en un minimum de temps. Dans ce contexte, il nous a semblé essentiel de contribuer précocement à cette caractérisation par ce travail de thèse, **en décrivant les modifications ultrastructurales induites par le SARS-CoV-2 dans les cellules infectées, en MET**. Nous nous sommes basés sur les connaissances déjà acquises pour des *Coronaviridae* infectant l'Homme, mais aussi des *Coronaviridae* comme le MHV ou l'IBV, qui infectent d'autres animaux.

La première étude a donc été consacrée à **l'analyse qualitative et quantitative des modifications cellulaires induites par le SARS-CoV-2, lors de son étape de réplication, et lors des étapes tardives d'assemblage et de sortie**. Cette étude est le fruit d'une collaboration avec l'équipe « Virologie moléculaire et cellulaire » de l'institut Pasteur de Lille du Pr Jean DUBUISSON. Elle a été réalisée au début de la pandémie de COVID-19, à un moment où la communauté scientifique disposait de peu de modèles d'étude cellulaires ou animaux. Ainsi, nous avons privilégié l'infection en cellules Vero, un modèle cellulaire déjà disponible car validé pour l'étude du SARS-CoV. L'accès à des prélèvements respiratoires des premiers patients infectés par le SARS-CoV-2, issus de l'activité hospitalière, a permis d'avoir accès rapidement et de produire *in vitro* la souche « sauvage » Wuhan. Les cellules infectées *in vitro* par les particules purifiées ont ensuite été préparées en technique de ME « conventionnelle ». **L'originalité de notre approche réside dans l'analyse cinétique, à différents temps post-infection, de la mise en place des organites de réplication et de la formation des virions.**

La deuxième étude s'inscrit dans le prolongement de la première, **en se focalisant sur l'étape de sortie du SARS-CoV-2 de la cellule**. En effet, cette étape est encore largement méconnue concernant les *Coronaviridae*. Les seuls éléments probants sont en faveur d'un passage par la voie sécrétoire biosynthétique « classique » et d'une sortie de la cellule par exocytose. L'émergence du SARS-CoV-2 a été une opportunité de documenter les mécanismes de sortie mis en jeu lors de son cycle. Une étude menée par Ghosh *et al.* a mis en évidence une sortie potentielle par le biais de lysosomes désacidifiés

(383). Dans leur étude, Mendonça *et al.* (384) suggèrent la présence de tunnels, reliant des compartiments intracellulaires chargés en particules virales au milieu extérieur, à l'image d'observations réalisées sur des macrophages infectés par HIV. Afin d'étayer ou non ces hypothèses, **les Vero infectées par le SARS-CoV-2 utilisées pour notre première étude, ont été observées en MET après réalisation de coupes sériées. Cette technique permet d'estimer la structure 3D d'un élément cellulaire, sans avoir recours à des techniques complexes de tomographie.**

Lors de notre première étude, nous avons observé aux temps précoces de l'infection, une plus forte proportion d'*annulate lamellae* dans les cellules infectées par le SARS-CoV-2, par rapport aux cellules non infectées. Cet organite est composé d'une accumulation de pores nucléaires au sein de membranes du RE. Bien que sa première description date de 1955, ses fonctions sont encore mal comprises. Ainsi, **nous avons effectué un travail de synthèse de l'ensemble des observations d'*annulate lamellae*, et des hypothèses concernant leurs rôle physiologique dans la cellule et leur implication dans les interactions virus-cellule.** Bien que l'observation d'*annulate lamellae* lors d'une infection par le SARS-CoV-2 soit tout à fait originale, ils sont également retrouvés associés à d'autres agents infectieux. De nouveau, le HCV est un modèle d'étude transposable dans ce contexte, du fait du rôle identifié des nucléoporines (retrouvées pour partie dans les *annulate lamellae*) au cours de son cycle viral.

Enfin, nous nous sommes focalisés sur les DMVs, élément principal du réseau de réplication du SARS-CoV-2. **Notre second travail de synthèse a donc consisté à décrire la structure, la morphogenèse, et les fonctions putatives des DMVs, en insistant tout particulièrement sur les similitudes entre les coronavirus et le HCV.** Cette synthèse replace les DMVs dans le contexte cellulaire, en décrivant les liens structuraux et fonctionnels entretenus avec les différents organites (RE, Golgi, mitochondries...).

a. Étude 1

Eymieux S, Rouillé Y, Terrier O, Seron K, Blanchard E, Rosa-Calatrava M, Dubuisson J, Belouzard S, Roingeard P. Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Apr;78(7):3565-3576. doi: 10.1007/s00018-020-03745-y. Epub 2021 Jan 15.



Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release

Sébastien Eymieux^{1,2} · Yves Rouillé³ · Olivier Terrier⁴ · Karin Seron³ · Emmanuelle Blanchard^{1,2} · Manuel Rosa-Calatrava⁴ · Jean Dubuisson³ · Sandrine Belouzard³ · Philippe Roingeard^{1,2}

Received: 19 August 2020 / Revised: 8 December 2020 / Accepted: 16 December 2020
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG part of Springer Nature 2021

Abstract

Many studies on SARS-CoV-2 have been performed over short-time scale, but few have focused on the ultrastructural characteristics of infected cells. We used TEM to perform kinetic analysis of the ultrastructure of SARS-CoV-2-infected cells. Early infection events were characterized by the presence of clusters of single-membrane vesicles and stacks of membrane containing nuclear pores called annulate lamellae (AL). A large network of host cell-derived organelles transformed into virus factories was subsequently observed in the cells. As previously described for other RNA viruses, these replication factories consisted of double-membrane vesicles (DMVs) located close to the nucleus. Viruses released at the cell surface by exocytosis harbored the typical crown of spike proteins, but viral particles without spikes were also observed in intracellular compartments, possibly reflecting incorrect assembly or a cell degradation process.

Keywords Covid-19 · SARS-CoV-2 · Virus/cell interactions · Electron microscopy

Introduction

Coronaviruses are infectious agents that infect many species of mammals and birds, and have high zoonotic potential. Some, such as HKU1, OC43, 229E, and NL63, circulate seasonally and cause benign respiratory illnesses in children or adults [1–3]. However, others, such as the severe acute

respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) in 2003 [4] and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in 2012 [5] have emerged more recently, through cross-species transmission between one or more mammals and humans. These emerging viruses can cause severe respiratory disease in adults. At the end of 2019, the identification, in China, of SARS-CoV-2 as the causal agent of atypical pneumopathies, provided the latest example of these emerging coronaviruses [6, 7]. SARS-CoV-2 is less virulent than SARS-CoV [8], and infected patients seem to be contagious before the onset of symptoms and even asymptomatic individuals appear to be able to transmit the disease [9]. This renders the identification of infected patients and chains of transmission much more complex and has resulted in the massive spread of this new virus worldwide, and the declaration of a pandemic by the WHO on March 11, 2020. The associated disease was named COVID-19 (coronavirus disease 2019). The pathophysiology of SARS-CoV-2 seems to differ in several ways from those of SARS-CoV and the benign human coronaviruses that generally circulate. However, it remains difficult to determine the exact contributions of viral and host factors to these differences.

Coronaviruses, with a single-stranded positive RNA genome of 26–32 kb, have the largest genomes of RNA

Sandrine Belouzard and Philippe Roingeard contributed equally to this work.

✉ Philippe Roingeard
philippe.roingeard@univ-tours.fr

¹ Inserm U1259 MAVIVH, Université de Tours and CHRU de Tours, Tours, France

² Plate-Forme IBiSA de Microscopie Electronique, Université de Tours and CHRU de Tours, Tours, France

³ Université Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 9017-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

⁴ Virologie Et Pathologie Humaine-VirPath Team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

viruses. The first two-thirds of the genome encodes two polyproteins that are subsequently cleaved by proteases to give rise to non-structural proteins involved in viral replication [10]. The last third of the genome encodes four structural proteins: spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N). Some coronavirus virions contain an additional membrane protein, a hemagglutinin esterase (HE). These proteins assemble to form enveloped virions of about 120 nm in diameter. The first stages of the viral cycle occur on virus-induced double-membrane structures derived from the endoplasmic reticulum (ER), commonly referred to as “double-membrane vesicles” (DMVs) [11]. These structures are mostly located in the perinuclear zone, and are also generated by other RNA viruses, such as arteriviruses, picornaviruses, and the flaviviruses of genus *Hepacivirus* [12, 13]. In coronaviruses, the nsp3 and nsp4 proteins appear to be sufficient to induce the formation of these structures. The viral genome replication complexes are anchored in the DMV membranes, and their fibrous content consists mostly of de novo synthesized double-stranded viral RNA. In SARS-CoV, these DMVs are not isolated, but integrated into an interconnected reticulovesicular network derived from the ER [14]. Later in the viral life cycle, DMVs fuse into larger cytoplasmic vacuoles containing numerous assembled virions that have budded, this budding probably occurring in the ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) [15].

There are many examples of the usefulness of electron microscopy for improving our understanding of the infectious cycle of viruses [16]. The Vero cell line has been shown to be a relevant model for studies of SARS-CoV-2/cell interactions [17]. We therefore used these cells for a kinetic study of virus-induced DMVs, viral morphogenesis and release for this new pathogen, based on immunofluorescence on confocal microscopy and transmission electron microscopy.

Materials and methods

Viral strain and cells

The SARS-CoV-2 strain used in this study was isolated with a nasal swab sample collected from one of the first COVID-19 cases confirmed in France—a 47 y-o female patient hospitalized in January 2020 in the Department of Infectious and Tropical Diseases, Bichat Claude Bernard Hospital, Paris [18]. This sample was collected according to the declaration of Helsinki and received approval from local ethics commission. The complete viral genome sequence obtained using Illumina MiSeq sequencing technology was then deposited after assembly on the GISAID EpiCoV platform (Accession ID EPI_ISL_411218) under the name Beta-CoV/France/IDF0571/2020. Vero-81 cells (ATCC, CCL-81)

were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C, under an atmosphere containing 5% CO₂. To generate virus stocks, we facilitated SARS-CoV-2 infection by transducing these cells with a lentiviral vector expressing transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2). TMPRSS2 was inserted into a pTRIP vector, and lentiviral vectors were produced by the transfection of HEK293T cells with pTRIP-TMPRSS2, phCMV-VSVG and HIV gag-pol in the presence of Turbofect (Life Technologies) according to the manufacturer's instruction. Supernatants containing lentiviral vectors were used to transduce cells twice, 48 h apart. SARS-CoV-2 was then propagated in these Vero-81 cells expressing TMPRSS2. The kinetic study following infection with this strain was performed on regular Vero-81 cells.

Kinetics of SARS-CoV-2 infection

Cells were plated in 24 wells plates (with or without glass coverslips) and infected the next day at a MOI of 0.25 for 1 h. Then the cells were rinsed twice with PBS and incubated at 37 °C. At various time point, post-infection cell supernatants were collected to quantify the secretion of virus and the cells were processed for different analyses (immunostaining, immunoblot, and qRT-PCR).

Immunofluorescence

Infected cells were fixed by incubation in 3% paraformaldehyde for 20 min, and stored in PBS at 4 °C until required for immunolabeling. Cells were permeabilized by incubation with 0.1% Triton X-100 for 5 min, and were then blocked by incubation for 30 min with 5% goat serum (GS) in PBS. Infected cells were labeled with a mixture of the mouse J2 monoclonal antibody against dsRNA (Scicons, diluted 1:1000) and a human monoclonal antibody directed against the spike protein (Sanyoubio #AHA003, diluted 1:250). The cells were incubated with primary antibodies in PBS supplemented with 5% GS for 30 min. They were washed three times with PBS and then incubated for 30 min with Alexa-488-conjugated goat anti-human IgG and cyanin-3-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) in 5% goat serum in PBS supplemented with 1 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Coverslips were then rinsed four times with PBS, once in water and mounted on microscope slides in Mowiol 4-88-containing medium. Images were acquired on an Evos M5000 imaging system (Thermo Fisher Scientific) equipped with light cubes for DAPI, GFP, and RFP, and a 10× objective. For each coverslip, six 8-bit images of each channel were acquired. The total number of cells was determined by counting the nuclei. Infected cells, defined as positive for dsRNA and S immunolabeling, were counted, and the percentage of infected cells was calculated. The experiment was performed three

times in duplicates. About 7,000–11,000 cells were counted per time point in each experiment using a homemade macro running in ImageJ.

Immunoblot

Infected cells were lysed in non-reducing Laemmli loading buffer. Lysates were incubated at 95 °C for 25 min before exit of the BSL3 facility. Then the samples were reduced by addition of 40 mM dithiothreitol and incubated for 10 min at 70 °C before separation of the proteins on a 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane (Amersham). Membrane-bound N and S proteins were detected using a rabbit polyclonal antibody to SARS nucleocapsid (Novus) and a mouse polyclonal antibody to SARS-CoV-2 S protein produced by Biotem, as primary antibodies, and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). Detection was carried out by chemoluminescence (Super-Signal™ West Pico PLUS, Thermo Scientific). The signals were recorded using a LAS 3000 apparatus (Fujifilm).

Genome quantification

Total RNA of infected cells was extracted using the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel) as recommended by the manufacturer. Reverse transcription was performed using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Then RNA were subjected to qRT-PCR using the SYBR green PCR master mix (Life Technologies) with primers (GTGARATGGTCATGTGTGGCGG and CAR ATGTTAAASACACTATTAGCATA) for RdRp fragment amplification. qRT-PCR was performed with a Quantstudio 3 (Life Technologie). A standard curve was generated with in vitro transcribed RNA corresponding to the RdRp fragment.

Viral secretion

The quantity of virus secreted in cell supernatant was assessed by the TCID50 method.

Transmission electron microscopy

Cells were infected at a MOI of 0.25 for 1 h. Infected and mock-infected cells were then fixed at various time points post-infection, by incubating for 24 h in 1% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, (Sigma, St-Louis, MO) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). Samples were then washed in phosphate-buffered saline (PBS) and post-fixed by incubation for 1 h with 2% osmium tetroxide (Agar Scientific, Stansted, UK). Cells were then fully dehydrated

in a graded series of ethanol solutions and propylene oxide. They were impregnated with a mixture of (1:1) propylene oxide/Epon resin (Sigma) and left overnight in pure resin. Samples were then embedded in Epon resin (Sigma), which was allowed to polymerize for 48 h at 60 °C. Ultra-thin sections (90 nm) of these blocks were obtained with a Leica EM UC7 ultramicrotome (Wetzlar, Germany). Sections were stained with 2% uranyl acetate (Agar Scientific), 5% lead citrate (Sigma), and observations were made with a transmission electron microscope (JEOL 1011, Tokyo, Japan). Infected cells were observed 4, 6, 8, 10, 12, and 24 h post-infection, and compared to mock-infected cells. For quantitative analysis, ultrastructural features were monitored in 100 cells (100 consecutive sections on the EM grid, except those with no nucleus section), for each cell pellet.

Results

Kinetics of SARS-CoV-2 infection in Vero cells

We analyzed the kinetics of SARS-CoV-2 infection. First, we quantified the number of infected cells based on the expression of the spike protein S and the presence of dsRNA, a replication complex marker, by evaluating immunofluorescence over time in infected Vero cells (Fig. 1a). At 4 h post-infection (hpi), a few cells displayed a weak dsRNA signal but no S staining. The first clear sign of infection was observed at 6 hpi, and a gradual increase in the number of infected cells and in the intensity of labeling was observed up to 8–10 hpi. At 12 hpi, the number of infected cells increased again, and groups of cells corresponding to infection foci appeared. These foci contained dsRNA-positive S-negative cells as observed in newly infected cells at 6 hpi, indicating that a new round of infection had occurred. We counted the number of dsRNA-positive cells and of S-positive cells, to measure the progression of the infection (Fig. 1b). Our results suggest that the replication cycle of SARS-CoV-2 has a periodicity of about 8 h in Vero cells. To further confirm this result, we measured the secretion of virus at each time point (Fig. 1c). Viral secretion was detectable at 8 h post-infection and increased over time. In parallel, we monitored viral replication by quantifying intracellular viral RNA (Fig. 1d). Viral replication was detected at 4hpi and increases until 10hpi to reach a plateau at 10–12 hpi. From 12 to 24 hpi, a 0.7 Log moderate increase of the quantity of viral RNA was observed. Finally, the gradual increase of N and S viral proteins in infected cells was confirmed by immunoblot (Fig. 1e).

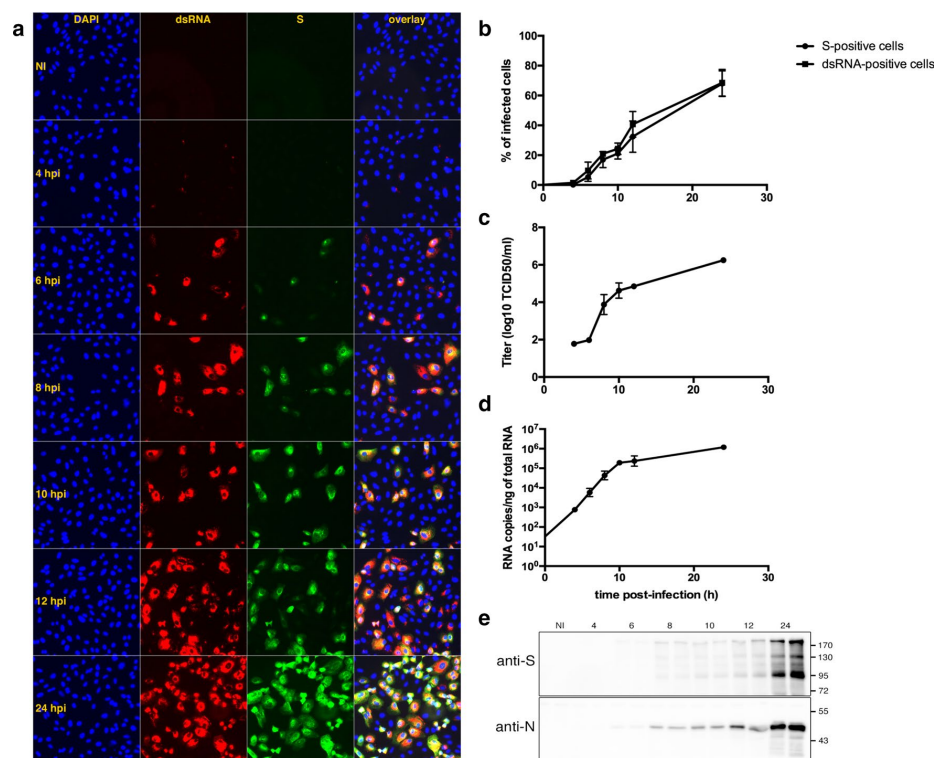


Fig. 1 Kinetics of infection analyzed by different methods. **(a)** Vero cells grown on glass coverslips were infected, fixed at the indicated time points and processed for immunofluorescence labeling of S (green) and dsRNA (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). **(b)** Cells positive for S and dsRNA were counted and the percentage

of infected cells was plotted against time. **(c)** The quantity of virus secreted in the cell supernatant was assessed by the TCID₅₀ method. **(d)** Intracellular genome quantification was performed by qRT-PCR. **(e)** Intracellular N and S viral proteins were detected by immunoblot

Ultrastructural features of SARS-CoV-2 infected cells

At 4 hpi, we observed no perceptible difference between infected and mock-infected cells (Fig. 2a). The first virus-induced modifications were observed at 6 hpi, when discrete clusters of single-membrane vesicles formed in the cytoplasm (Fig. 2b,c). Another change detectable as early as 6 hpi was the frequent presence of annulate lamellae (AL) in the cell sections (Fig. 2d,e). AL are a particular type of intracellular membrane, consisting of stacks of highly ordered ER-derived membranes, arranged in parallel, and containing nuclear pore complexes (NPCs) [19]. In these SARS-CoV-2-infected Vero cells, they appeared in continuity with the nuclear envelope (Fig. 2d) or within the cytoplasm (Fig. 2e).

At 8 hpi, massive changes were observed, with the presence of numerous DMVs forming a replication network, frequently surrounded by mitochondria (Fig. 3a,b). At this time point, the first virus particles assembled within the cells

were detected in intracellular vesicles probably related to the Golgi apparatus or ERGIC (Fig. 4a). In some sections, the budding of viruses toward the lumen of the ERGIC/Golgi vesicles could be seen (Fig. 4b–d). These budding viral particles or those fully assembled in the vesicle lumen (Fig. 4e) had prominent surface projections, or spikes. These intracellular spiky viruses were detected in small vesicles, each containing only a few particles, at 8 hpi. At 10 and 12 hpi, numerous extracellular particles could be seen at the cell surface (Fig. 5a). Images of virus-carrying vesicles that were presumably moving toward the plasma membrane (Fig. 5a), or merging with the plasma membrane (Fig. 5b–e), suggested that the virions were released by exocytosis mechanisms. The fact that these vesicles often contained several viral particles suggested that they represent viral exit rather than cellular entry.

At 24 hpi, viruses were still detectable at the cell surfaces and were present in high amount. Although these viruses

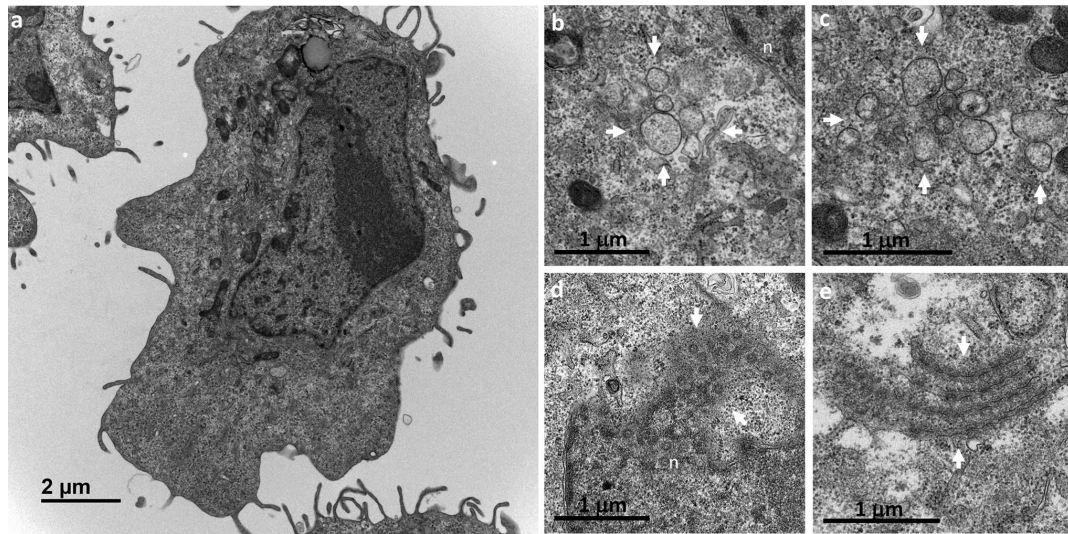


Fig. 2 Early ultrastructural changes encountered in Vero cells at 6 h post-infection with SARS-CoV-2. **(a)** At 4 hpi, no ultrastructural modifications relative to mock-infected cells, shown here, were visible. **(b,c)** At 6 hpi, the first discrete virus-induced structures appeared, consisting of clusters (delimited by the *white arrows*) of several single-membrane vesicles. These clusters contained 5–10 single-membrane vesicles per cell section, and were frequently observed in the perinuclear area (n, nucleus). **(d,e)** At 6 hpi, annulate lamellae

(AL) were frequently observed in infected cells, either as nuclear (n) expansions (**d**, *white arrows*) or isolated in the cytoplasm (**e**, *white arrows*), suggesting that the formation of these structures may have been promoted by virus infection. AL consist of stacks of highly ordered endoplasmic reticulum-derived membranes, arranged in parallel and containing nuclear pore complexes, that can be visualized in tangential (**e**) or cross (**d**) sections

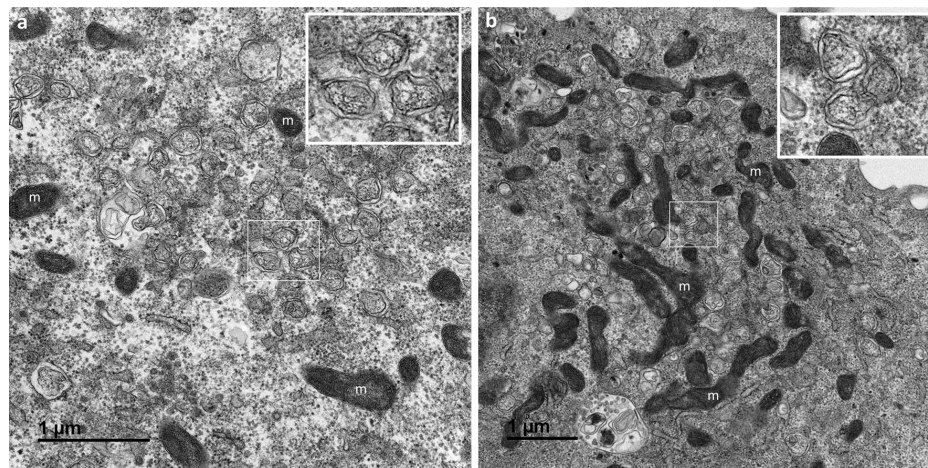


Fig. 3 Replication network established in Vero cells at 8 h post-infection with the SARS-CoV-2. **(a,b)** A massive replication network consisting of large clusters of numerous double-membrane vesicles

(DMVs, presented at high magnification in the insets) was observed. These clusters of DMVs were frequently surrounded by mitochondria (m)

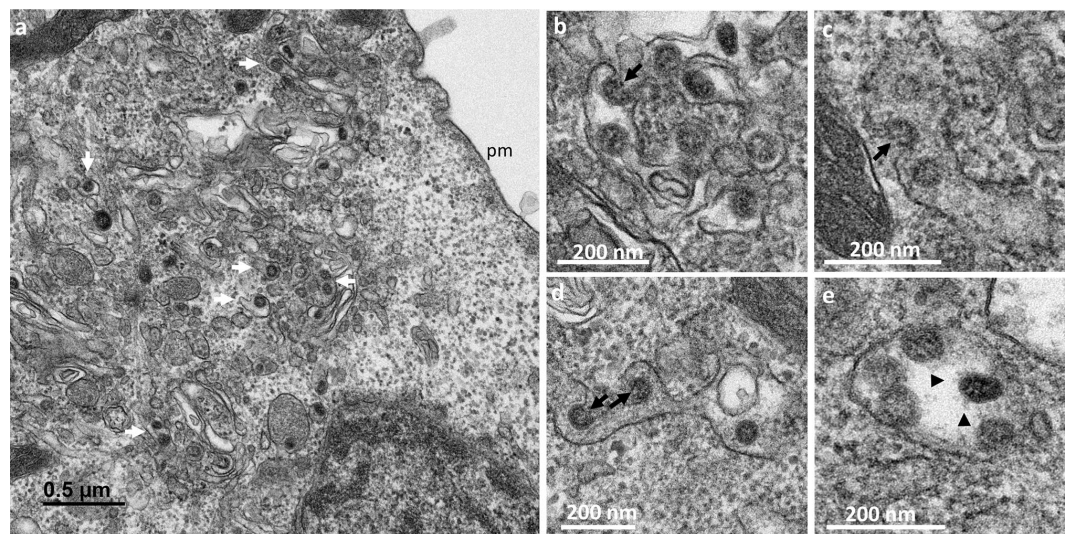


Fig. 4 Morphogenesis of intracellular SARS-CoV-2 virions in Vero cells at 8 h post-infection. **(a)** Virus particles (*white arrows*) were observed in intracellular vesicles related to the Golgi apparatus or the endoplasmic reticulum/Golgi intermediate compartment (ERGIC). No virus was released at the plasma membrane (pm) at this time point. **(b–d)** The budding of the viruses (*white arrows*) toward the

lumen of the ERGIC/Golgi vesicles was visualized in some cell sections. **(e)** At this time point, the intracellular viruses were detected in small vesicles, each containing only a few viral particles. These viral particles displayed prominent spikes, clearly visible at the surface (*black arrowhead*)

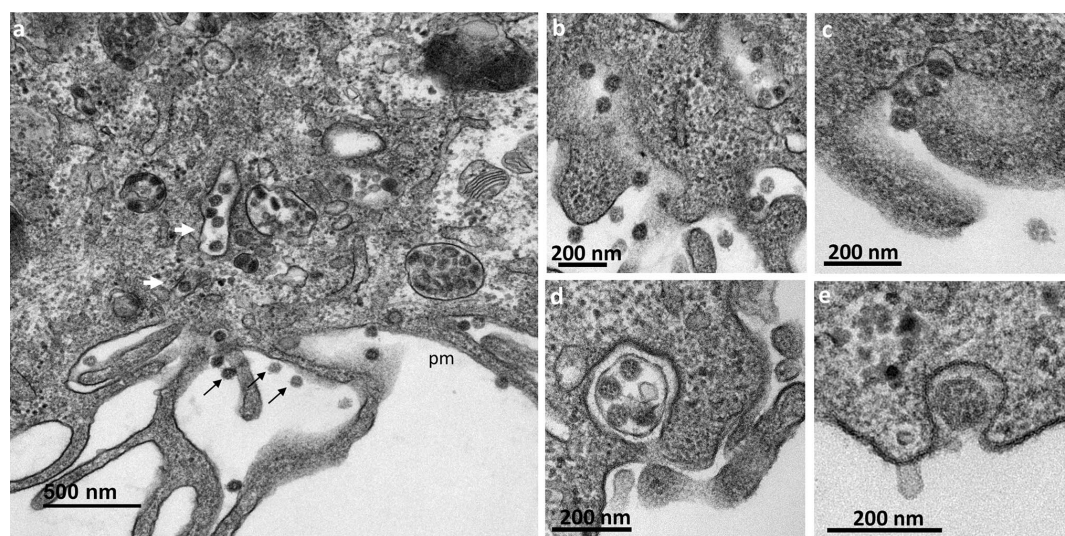


Fig. 5 Release of the SARS-CoV-2 virions by exocytosis from the Vero cells at 10 h post-infection. **(a)** Virions (*thin black arrows*) were frequently observed at the plasma membrane (pm). Numerous virus-carrying vesicles (*white arrows*) presumably in transit to the plasma

membrane were also visualized. **(b–e)** These virus-carrying vesicles fused with the plasma membrane to release their contents into the extracellular space by exocytosis. Similar ultrastructural events were observed at 12 hpi

could represent virions released by the imaged cells, we could not exclude that some of them originate from adjacent cells before to be trapped at the plasma membrane of these cells. Also, large numbers of viral particles were found to have accumulated in very large intracellular vacuoles (Fig. 6a,b). Surprisingly, the viral particles present in these large intracellular compartments had a smooth surface and bore no spikes (Fig. 7a,b). Their appearance was clearly different from that of viruses released at the cell surface, which carried many spikes (Fig. 8a,b). At these later stages of the infection, most of the Vero cells infected with SARS-CoV-2 contained an abundant reticulovesicular network of DMVs, occupying an entire pole of the cytoplasm, in which viral replication and the assembly of new virions occurred simultaneously (Fig. 9a). DMVs were still the main component of this network, sometimes associated with other virus-induced structures, such as myelin-like membrane whorls or autophagic-like packaged membranes (Fig. 9b). These membrane whorls were sometimes also associated with the spike-less viral particles in the large intracellular vacuoles (Figs. 6b, 7a).

The quantification of these ultrastructural features in 100 consecutive cell sections showed that AL were present in only 1% of mock-infected cells, but increased up to 7% at 6 hpi, before to slowly decrease until 10 hpi and finally stabilize around 3% at 12 hpi (Fig. 10). Clusters of single-membrane vesicles that appeared between 6 and 8 hpi were observed in 40% of the cells at 8 hpi, before reaching 60% at 12 hpi and then dropping to <20% at 24 hpi. DMVs were

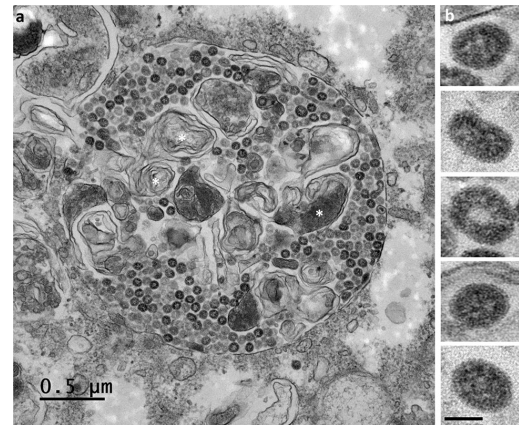


Fig. 7 The SARS-CoV-2 particles accumulating in large intracellular vacuoles in Vero cells at 24 hpi have no spikes. **(a)** The numerous viral particles accumulating in these large intracellular compartments were often electron-dense and presented a smooth surface. Membrane whorls (white asterisks) were sometimes also associated with the viral particles within these large intracellular vacuoles. **(b)** At high magnification, the viral particles present in these large intracellular vacuoles were clearly observed to have no spikes (bar = 50 nm)

observed in a constantly increasing number of cells between 4 and 24 hpi, reaching 80% of the cells at 24 hpi (Fig. 10). Membrane whorls and autophagic-like structures, observed in 7% of mock-infected cells, increased slowly during the

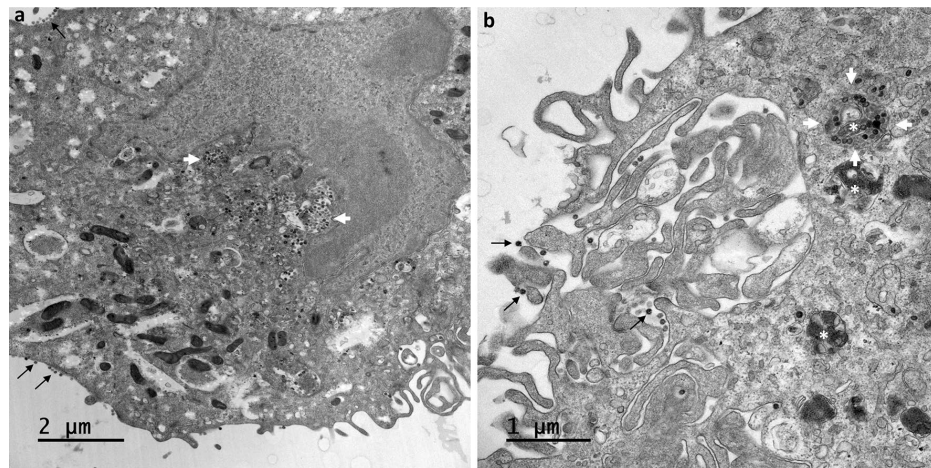


Fig. 6 Intracellular accumulation of SARS-CoV-2 particles in large vacuoles within Vero cells at 24 hpi. **(a,b)** Viruses were still detected at the cell surface (thin black arrows), but large numbers of viral particles were observed accumulated in very large intracellular vacuoles (white arrows) of various sizes, predominantly located in the perinu-

clear region. At this time point, an accumulation of myelin-like membrane whorls or autophagic-like packaged membranes (white asterisk in **b**) was also observed in the cells, separated from or associated with the viral particles

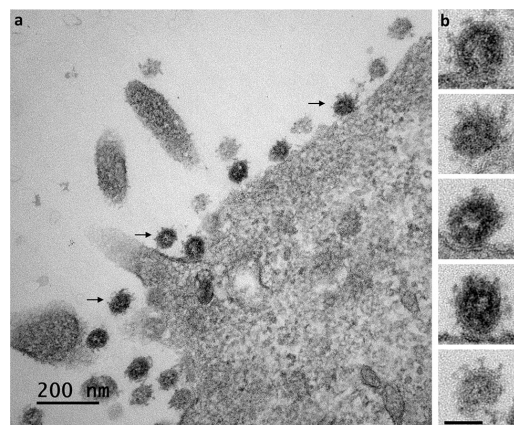


Fig. 8 The SARS-CoV-2 particles released from the Vero cells at 24 hpi carry spikes. **(a)** All the viral particles released at the cell surface (*thin black arrows*) were surrounded by characteristic, “club-shaped”, spikes. **(b)** This was confirmed by an analysis of these viral particles at high magnification, revealing their distinctive crown-like appearance (bar = 50 nm)

first 10 hpi and then more rapidly to reach almost 60% of the cells at 24 hpi. Concerning the viral particles, spiky virions found in golgian/ERGIC vesicles were first observed at 8 hpi, and the number of cells with this feature regularly increased to reach 48% at 24 hpi. Large vacuoles containing spike-less virions started to accumulate in cells from

10 hpi, and their number increased to also reach a maximum at 24 hpi, being present in about 60% of the cells. Finally, the number of cells surrounded by extracellular spiky virions increases exponentially from 10 hpi, to reach 80% of the cells at 24 hpi (Fig. 10).

Discussion

As previously reported for coronaviruses and, more recently, for SARS-CoV-2 [20–23], our findings confirm that the SARS-CoV-2 viral cycle is supported by a reticulovesicular network derived from endoplasmic reticulum (ER) membranes and consisting mostly of double-membrane vesicles (DMVs). After the budding of the virions, presumably in the Golgi apparatus stacks or the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC), the virus is released by exocytosis at the plasma membrane. The kinetics of appearance of the DMVs and virions inside and on the surface of the cells are globally similar to those observed in a recent study performed with human pulmonary epithelial Calu-3-infected cells [21]. Thus, our findings confirm previous results, but they also shed new light on early and late stages of the viral infectious cycle.

We show that, at early stages of infection, the cells contained only discrete single-membrane vesicle clusters (Fig. 2b,c), potentially acting as the precursors of DMVs, as previously suggested for other viral models. This hypothesis is consistent with our quantitative analysis (Fig. 10),

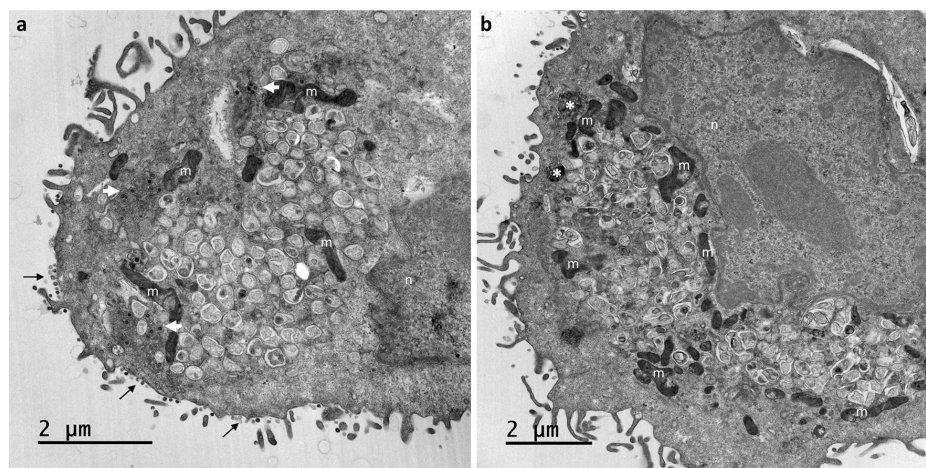


Fig. 9 Invasive replication network in Vero cells at 24 h post-infection with SARS-CoV-2. **(a,b)** At this time point, SARS-CoV-2-infected cells displayed an intense reticulovesicular network consisting mostly of large numbers of DMVs, which occupied almost all the cytoplasm and seemed to push against the nuclear compartment (n),

with many mitochondria (m) recruited at the edge of this network. Virion assembly continued next to this network (*white arrows* in **a**), leading to release at the plasma membrane (*thin black arrows* in **a**). DMVs were often associated with myelin-like membrane whorls or autophagic-like packaged membranes (*white asterisk* in **b**)

showing that the number of positive cells for these single-membrane vesicle clusters was decreasing in the late phase of the infection while the number of DMVs positive cells increased (Fig. 10). In hepatitis C virus (HCV), for example, it has been suggested that single-membrane vesicle clusters act as the precursors of the DMVs characterizing the membranous web induced by this virus [24, 25]. A similar process has also been described for poliovirus, for which early viral organelles are gradually transformed into double-membrane structures by the extension of membranous walls and/or the collapse of the luminal cavity of the single-membrane structure [26]. Recent investigations by high-resolution electron tomography analysis of SARS-CoV-2-infected Calu-3 cells have confirmed that DMVs are closely associated to the ER, being linked by smooth ER connectors or sometimes embedded into the rough ER such as the DMV outer membrane was contiguous to the ER membrane [21]. However, the mechanism underlying DMV biogenesis is still poorly understood and the potential role of these single-membrane vesicle clusters in their formation will certainly need further investigation.

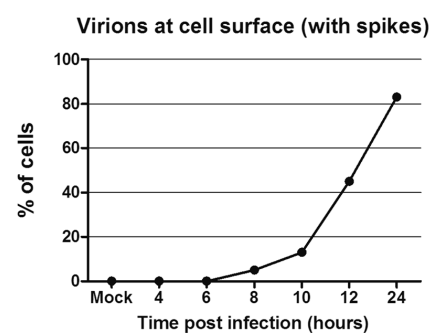
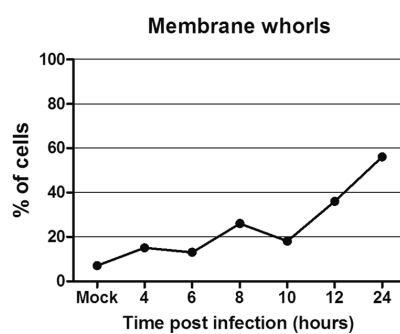
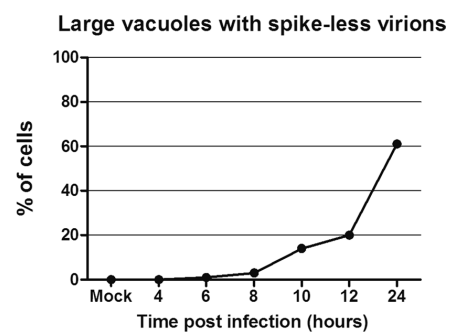
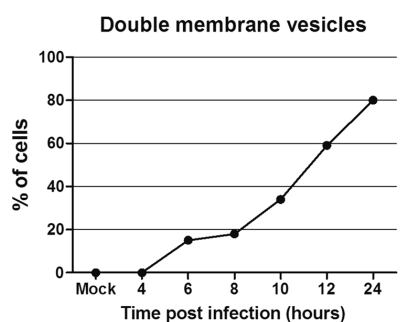
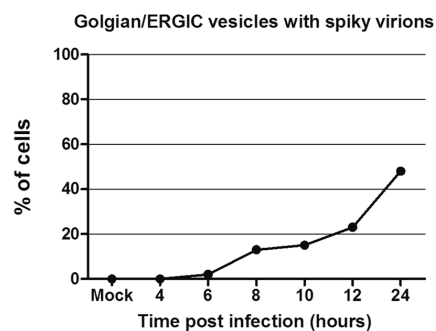
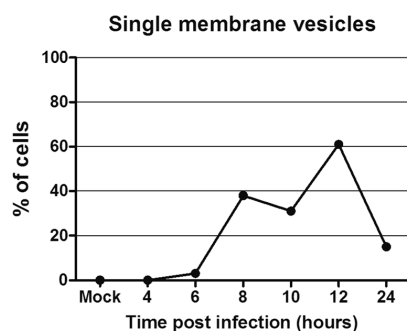
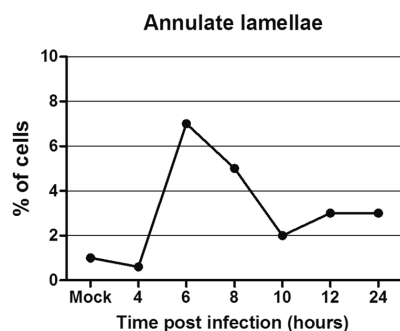
We also report the presence of annulate lamellae (AL) in Vero cells infected with SARS-CoV-2 (Fig. 2d,e). These structures are not specific of the viral infection as they were observed in mock-infected cells in few cells (around 1%), but their presence increased following infection (peak at 7% 6 hpi) (Fig. 10). Similar observations were reported by another group, but little comment was made on their possible meaning [27]. AL have no obvious function, other than as a reservoir of nuclear envelope components. AL were initially thought to be an ultrastructural feature characteristic of rapidly growing germ and tumor cells, but they have since been characterized as a marker of infection for various viruses, including hepatitis A virus [28], Japanese encephalitis virus [29], and human herpes virus 6 [30]. However, their role in the infection process is unknown. Interestingly, in the HCV model, infected cells display an increase in the amount of cytoplasmic nuclear pore complex proteins (Nups), which accumulate in or close to cytoplasmic membranes enriched in HCV proteins [31]. It has, therefore, been suggested that cytoplasmic nuclear pore complexes (NPCs), or potentially derivatives of these structures, such as AL, may facilitate establishment of the HCV-induced membranous web [31, 32]. It will be interesting to investigate, whether such a mechanism is also involved in the biogenesis of the SARS-CoV-2 replication network.

As for AL, membrane whorls and autophagic-like structures were not specific of the viral infection as they were observed in mock-infected cells. However, if they were detected in 7% of uninfected cells, the number of cells containing these structures is slowly increased during the first 10 hpi, and then more rapidly to reach almost 60% of the cells at 24 hpi (Fig. 10). Once again, these data are in favor

of virus-induced mechanisms stimulating the formation of these host cell membrane-derived structures.

At later stages of infection, we observed large intracellular vacuoles containing viral particles that appeared to be completely devoid of spikes. Such images have been reported by other groups, for SARS-CoV-2 propagated in cell culture [22, 23, 27, 33] or detected in the lung tissue of infected patients [34]. Similar findings were also reported in the very first electron microscopy investigations of SARS-CoV in cultured Vero cells [35, 36]. In the present study, a comparative analysis, at high EM magnifications, of the viral particles present on the cell surface and those present in these large intracellular vacuoles at these time points late in infection clearly showed differences in terms of the presence or absence of spikes (Figs. 7, 8). The reason for the absence of spikes on these intracellular viral particles is currently unknown. This does not seem to be related to a technical problem leading to a loss of the spikes of the intracellular viruses since spikes can be well visualized on the viruses present in the smaller vesicles of ERGIC or Golgi origin (Fig. 4). These large vacuoles containing spike-less viral particles may be intracellular compartments in which degradation through an autophagolysosomal process occurs. This hypothesis is supported by the presence of myelin-like membrane whorls in these compartments (Fig. 7a), as also previously reported for SARS-CoV [36]. However, these spike-less virions did not appear to be degraded in these compartments, although they were sometimes somewhat distorted (Fig. 7b), presenting a “doughnut shape” and a more pronounced electron-dense edge, as previously discussed by another group [27]. Alternatively, these spike-less viral particles may be formed by a defective virion assembly pathway, leading to immature and, thus, non-infectious particles. This would be consistent with previous findings showing that S protein is dispensable for the budding and assembly of coronaviruses [37, 38], whereas N protein seems to be essential for these mechanisms and to drive them [39]. Further investigations will be required to determine the potential role of these spike-free viral particles in the pathophysiology of SARS-CoV-2 infection, particularly given the huge numbers of such particles in infected cells.

A recent study by Ogando et al., in which Vero cells were also used to propagate SARS-CoV-2, suggested that this virus may carry fewer spikes than SARS-CoV [20]. We did not directly compare the two viruses in our study, but our EM images show that SARS-CoV-2 has many “club-shaped” projections at its surface (Fig. 8), as also previously reported for SARS-CoV. The underlying reasons for this remain unclear, but may reflect the ultimate release of spike-less viral particles from the intracellular vacuoles at very late stages of the infectious cycle in the study conducted by Ogando et al. [20], possibly due to cell lysis. This may explain why SARS-CoV-2 was found to be less



◀ **Fig. 10** Quantitative analysis of the ultrastructural features in infected Vero cells, compared to mock-infected cells. For each point of the kinetics, 100 cell sections have been analyzed. Identification of at least one element in a cell section counted as one in the total account. For the annulate lamellae graph, due to the rarity of these structures and therefore the low associated cell percentage, Y axis displays only a 10% value. * At 4 hpi, 170 cell sections have been analyzed to find one cell containing annulate lamellae, leading to a <1% result

infectious than SARS-CoV in this study, despite generating larger amounts of intracellular viral RNA.

It will certainly be important to continue this type of investigation with other relevant cellular models. Recent studies have shown the possibility of propagating the virus in polarized organoids of human airway epithelial [40]. Here also, although this has not been particularly commented by the authors, it seems that spike-free virus particles may accumulate intracellularly. In any case, our ultrastructural study provides new insight into the early and late steps of the SARS-CoV-2 infectious cycle, which merit further investigation in future studies of this important new pathogen.

Author contributions

SE: investigation, formal analysis, and writing original draft; YR: investigation, formal analysis, and writing original draft; OT: resources; EB: investigation and formal analysis; KS: investigation and formal analysis; MRC: resources; JD: conceptualization, formal analysis and manuscript editing; SB: conceptualization, investigation, formal analysis, writing original draft, manuscript editing and supervision; PR: conceptualization, investigation, formal analysis, writing original draft, manuscript editing and supervision.

Acknowledgments S. Eymieux, E. Blanchard and P. Roingeard were supported by INSERM and the University of Tours; O. Terrier and M. Rosa-Calatrava were supported by a special COVID-19 grants from the REACTing consortium (INSERM), the CNRS and the Institut Mérieux; Y. Rouillé, K. Seron, J. Dubuisson and S. Belouard were supported by a special COVID-19 grant from the CNRS. We thank Andr s Pizzorno, Adeline Danneels, Fabienne Arcanger and Christine Rey for technical assistance. Our data were obtained with the assistance of the IBiSA Electron Microscopy Facility of the University of Tours.

References

- van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B (2009) Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 10:368–773
- Woo PCY, Lau SKP, Tsoi H-W, Huang Y, Poon RWS, Chu C-M, Lee RA, Luk WK, Wong GK, Wong BH, Cheng VC, Tang BS, Wu AK, Yung RW, Chen H, Guan Y, Chan KH, Yuen KY (2005) Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 192:1898–1907
- Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Loens K, Jebbink MF, Matser A, Kinsella CM, Rueda P, Ieven M, Goossens H, Prins M, Sastre P, Deijs M, van der Hoek L (2020) Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med*. doi: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1083-1> (online ahead of print)
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Ong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ (2003) A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348:1953–1966
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM (2012) Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 367:1814–1820
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W (2019) A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. *N Engl J Med* 382:727–733
- Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Zhou P, Yang X-L, Wang X-G (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579:270–273
- Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, Cuomo-Dannenburg G, Thompson H, Walker PGT, Fu H, Dighe A, Griffin JT, Baguelin M, Bhatia S, Boonyasiri A, Cori A, Cucunub  Z, FitzJohn R, Gaythorpe K, Green W, Hamlet A, Hinsley W, Laydon D, Nedjati-Gilani G, Riley S, van Elsland S, Volz E, Wang H, Wang Y, Xi X, Donnelly CA, Ghani AC, Ferguson NM (2020) Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis* 20:669–677
- He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, Lau YC, Wong JY, Guan Y, Tan X, Mo X, Chen Y, Liao B, Chen W, Hu F, Zhang Q, Zhong M, Wu Y, Zhao L, Zhang F, Cowling BJ, Li F, Leung GM (2020) Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 26:672–675
- Chen Y, Liu Q, Guo D (2020) Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 92:418–423
- Maier HJ, Neuman BW, Bickerton E, Keep SM, Alrashedi H, Hall R, Britton P (2016) Extensive coronavirus-induced membrane rearrangements are not a determinant of pathogenicity. *Sci Rep* 6:1–12
- Netherton CL, Wileman T (2011) Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol* 1:381–387
- Blanchard E, Roingeard P (2015) Virus-induced double-membrane vesicles. *Cell Microbiol* 17:45–50
- Knoops K, Kikkert M, van den Worm SHE, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* 6:e226
- Stertz S, Reichelt M, Spiegel M, Kuri T, Martínez-Sobrido L, García-Sastre A, Weber F, Kochs G (2007) The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* 361:304–315
- Roingeard P (2008) Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biol Cell* 100:491–501
- Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M (2020) Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 117:7001–7003

18. Pizzorno A, Padey B, Julien T, Trouillet-Assant S, Traversier A, Errazuriz-Cerda E, Fouret J, Dubois J, Gaymard A, Lescure FX, Dulière V, Brun P, Constant S, Poissy J, Lina B, Yazdanpanah Y, Terrier O, Rosa-Calatrava M (2020) Characterization and treatment of SARS-CoV-2 in nasal and bronchial human airway epithelia. *Cell Rep Med* 1:100059
19. Walther TC, Askjaer P, Gentzel M, Habermann A, Griffiths G, Wilm M, Mattaj JW, Hetzer M (2003) RanGTP mediates nuclear pore complex assembly. *Nature* 424:689–694
20. Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, Limpens RW, van der Meer Y, Caly L, Druce J, de Vries JJC, Kikkert M, Bárcena M, Sidorov I, Snijder EJ (2020) SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J Gen Virol* 101:925–940
21. Cortese M, Lee JY, Cerikan B, Neufeldt CJ, Oorschot VMJ, Köhrer S, Hennies J, Schieber NL, Ronchi P, Mizzon G, Romero-Brey I, Santarella-Mellwig R, Schorb M, Boermeier M, Mocaer K, Beckwith MS, Templin RM, Gross V, Pape C, Tischer C, Frankish J, Horvat NK, Laketa V, Stanifer M, Boulant S, Ruggeri A, Chatel-Chaix L, Schwab Y, Bartenschlager R (2020) Integrative imaging reveals SARS-CoV-2-induced reshaping of subcellular morphologies. *Cell Host Microbe*, in press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.11.003>
22. Mendonça L, Howe A, Gilchrist JB, Sun D, Knight ML, Zanetti-Domingues LC, Bateman B, Krebs AS, Chen L, Radecke J, Sheng Y, Li VD, Ni T, Kounatidis I, Koronfel MA, Szykiewicz M, Harkiolaki M, Martin-Fernandez ML, James W, Zhang P (2020) SARS-CoV-2 assembly and egress pathway revealed by correlative multi-modal multi-scale Cryo-imaging. *BioRxiv*, preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.11.05.370239> Preprint
23. Neil D, Moran L, Horsfield C, Curtis E, Swann O, Barclay W, Hanley B, Hollinshead M, Roufosse C (2020) Ultrastructure of cell trafficking pathways and coronavirus: how to recognise the wolf amongst the sheep. *J Pathol*, in press. <https://doi.org/10.1002/path.5547>
24. Ferraris P, Blanchard E, Roingeard P (2010) Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* 91:2230–2237
25. Ferraris P, Beaumont E, Uzbekov R, Brand D, Gaillard J, Blanchard E, Roingeard P (2013) Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection. *Cell Mol Life Sci* 70:1297–1306
26. Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E (2012) Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol* 86:302–312
27. Braham Belhaouari D, Fontanini A, Baudoin J-P, Haddad G, Le Bideau M, Yaacoub Bou Khali J, Raoult D, La Scola B (2020) The strengths of scanning electron microscopy in deciphering SARS-CoV-2 infectious cycle. *Front Microbiol* 11:2014
28. Marshall JA, Borg J, Coulepis AG, Anderson DA (1996) Annulate lamellae and lytic HAV infection in vitro. *Tissue Cell* 28:205–214
29. Wang JJ, Liao CL, Chiou YW, Chiou CT, Huang YL, Chen LK (1997) Ultrastructure and localization of E proteins in cultured neuron cells infected with Japanese encephalitis virus. *Virology* 238:30–39
30. Cardinali G, Gentile M, Cirone M, Zompetta C, Frati L, Faggioni A, Torrisi MR (1998) Viral glycoproteins accumulate in newly formed annulate lamellae following infection of lymphoid cells by human herpesvirus 6. *J Virol* 72:9738–9746
31. Neufeldt CJ, Joyce MA, Levin A, Steenberg RH, Pang D, Shields J, Tyrrell DL, Wozniak RW (2013) Hepatitis C virus-induced cytoplasmic organelles use the nuclear transport machinery to establish an environment conducive to virus replication. *PLoS Pathog* 9:e1003744
32. Bonamassa B, Ciccarese F, Antonio VD, Contarini A, Palù G, Alvisi G (2015) Hepatitis C virus and host cell nuclear transport machinery: a clandestine affair. *Front Microbiol* 6:e619
33. Goldsmith CS, Miller SE, Martines RB, Bullock HA, Zaki SR (2020) Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task. *Lancet* 395:e99
34. Martines RB, Ritter JM, Matkovic E, Gary J, Bollweg BC, Bullock H, Goldsmith CS, Silva-Flannery L, Seixas JN, Reagan-Steiner S, Uyeki T, Denison A, Bhatnagar J, Shieh WJ, Zaki SR (2020) Pathology and pathogenesis of SARS-CoV-2 associated with fatal coronavirus disease, United States. *Emerg Infect Dis*, in press. doi: <https://doi.org/10.3201/eid2609.202095>
35. Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE, Ling AE (2003) Early events of SARS coronavirus infection in Vero cells. *J Med Virol* 71:323–331
36. Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE, Ling AE (2003) Proliferative growth of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J Gen Virol* 84:3291–3303
37. Rottier PJ, Horzinek MC, van der Zeijst BA (1981) Viral protein synthesis in mouse hepatitis virus strain A59-infected cells: effect of tunicamycin. *J Virol* 40:350–357
38. Ujike M, Taguchi F (2015) Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses* 7:1700–1725
39. McBride R, van Zyl M, Fielding BC (2014) The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 6:2991–3018
40. Zhu N, Wang W, Liu Z, Liang C, Wang W, Ye F, Huang B, Zhao L, Wang H, Zhou W, Deng Y, Mao L, Su C, Qiang G, Jiang T, Zhao J, Wu G, Song J, Tan W (2020) Morphogenesis and cytopathic effect of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelial cells. *Nat Commun* 11:3910

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

b. Étude 2

Eymieux S, Uzbekov R, Rouillé Y, Blanchard E, Hourieux C, Dubuisson J, Belouzard S, Roingeard P. Secretory Vesicles Are the Principal Means of SARS-CoV-2 Egress. *Cells*. 2021 Aug 10;10(8):2047. doi: 10.3390/cells10082047. Epub 2021, August 10.

Article

Secretory Vesicles Are the Principal Means of SARS-CoV-2 Egress

Sébastien Eymieux ^{1,2}, Rustem Uzbekov ^{2,3}, Yves Rouillé ⁴, Emmanuelle Blanchard ^{1,2}, Christophe Hourieux ^{1,2}, Jean Dubuisson ⁴, Sandrine Belouzard ⁴ and Philippe Roingeard ^{1,2,*}

- ¹ INSERM U1259 MAVIVH, Université de Tours and CHRU de Tours, 37032 Tours, France; sebastien.eymieux@univ-tours.fr (S.E.); emmanuelle.blanchard@univ-tours.fr (E.B.); christophe.hourieux@univ-tours.fr (C.H.)
 - ² Plate-Forme IBI-SA de Microscopie Electronique, Université de Tours and CHRU de Tours, 37032 Tours, France; rustem.uzbekov@univ-tours.fr
 - ³ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, 119992 Moscow, Russia
 - ⁴ U1019-UMR 9017-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, CNRS, INSERM, CHU de Lille, 59000 Lille, France; yves.rouille@ibl.cnrs.fr (Y.R.); jean.dubuisson@ibl.cnrs.fr (J.D.); sandrine.belouzard@ibl.cnrs.fr (S.B.)
- * Correspondence: philippe.roingeard@univ-tours.fr; Tel.: +33-2-34-37-96-46



Citation: Eymieux, S.; Uzbekov, R.; Rouillé, Y.; Blanchard, E.; Hourieux, C.; Dubuisson, J.; Belouzard, S.; Roingeard, P. Secretory Vesicles Are the Principal Means of SARS-CoV-2 Egress. *Cells* **2021**, *10*, 2047. <https://doi.org/10.3390/cells10082047>

Academic Editor: Mats W. Johansson

Received: 5 July 2021

Accepted: 8 August 2021

Published: 10 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The mechanisms of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) egress, similar to those of other coronaviruses, remain poorly understood. The virus buds in intracellular compartments and is therefore thought to be released by the biosynthetic secretory pathway. However, several studies have recently challenged this hypothesis. It has been suggested that coronaviruses, including SARS-CoV-2, use lysosomes for egress. In addition, a focused ion-beam scanning electron microscope (FIB/SEM) study suggested the existence of exit tunnels linking cellular compartments rich in viral particles to the extracellular space resembling those observed for the human immunodeficiency (HIV) in macrophages. Here, we analysed serial sections of Vero cells infected with SARS-CoV-2 by transmission electron microscopy (TEM). We found that SARS-CoV-2 was more likely to exit the cell in small secretory vesicles. Virus trafficking within the cells involves small vesicles, with each generally containing a single virus particle. These vesicles then fuse with the plasma membrane to release the virus into the extracellular space. This work sheds new light on the late stages of the SARS-CoV-2 infectious cycle of potential value for guiding the development of new antiviral strategies.

Keywords: SARS-CoV-2; coronavirus; COVID-19; virus egress; virus release; transmission electron microscopy; serial sections

1. Introduction

The world is currently in the grip of a pandemic of coronavirus disease 19 (COVID-19), a new transmissible infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). An analysis of the genome of this virus showed it to be phylogenetically close to SARS-CoV-1, which emerged in 2003, and suggested that it probably originated from a bat coronavirus transmitted to humans [1]. The role of an intermediate animal species in this transmission is suspected, but the species concerned has not been clearly identified, and the conditions in which this interspecies transmission occurred are unknown. Nonetheless, the very rapid spread of this new infectious agent in the world population demonstrates its highly infectious properties. This virus has already infected more than 160 million people worldwide and caused more than 3.3 million deaths [2].

SARS-CoV-2 enters cells by fusing directly with the plasma membrane or by exploiting endocytosis mechanisms and then fusing with an endosomal membrane [3]. After fusion,

the viral genome is released into the cytosol for translation and replication. Similar to other single-stranded positive-sense RNA viruses [4], coronaviruses modify host cell membranes to induce the formation of double-membrane vesicles (DMVs), in which intense viral RNA replication occurs [5]. The translation of the positive-sense sub-genomic viral RNA results in the synthesis of all viral proteins, including those necessary for the morphogenesis of progeny virions. These viral particles, similar to those of other coronaviruses, are predominantly spherical or ellipsoidal, with a mean diameter between 90 and 100 nm [6,7]. The main constituents of the viral particle are glycoprotein S, the transmembrane proteins M and E, and nucleoprotein N, which forms a viral ribonucleoprotein (vRNP) by complexing with the genomic viral RNA [8,9]. Viral assembly takes place on the cytoplasmic side of the intermediate compartment, between the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus (ERGIC), or in the Golgi apparatus [10].

As with other coronaviruses, the mechanism of viral egress is one of the least understood steps in the SARS-CoV-2 infectious cycle. Most enveloped RNA viruses are released by budding at the plasma membrane or by budding in internal host cell compartments; they then exit into the extracellular space via the biosynthetic secretory pathway. The budding of SARS-CoV-2 in the ERGIC compartment, or in the Golgi apparatus, suggests that this virus also exits the host cell via the secretory pathway. However, one recent study proposed a model in which coronaviruses, including SARS-CoV-2, use lysosomes for egress rather than the biosynthetic secretory pathway [11]. This study showed that brefeldin A (BFA), a fungal compound that disassembles the Golgi apparatus stacks, did not affect virions release. This unconventional release mechanism would require lysosome deacidification and the inactivation of lysosomal degradation enzymes to prevent the degradation of viral particles in this compartment [11]. Coronaviruses have previously been observed in lysosomal compartments on transmission electron microscopy (TEM), but the significance of these observations remained unexplored at the time [12]. However, it is unknown whether these intracellular compartments containing viral particles can fuse with the plasma membrane for virion release. A recent cryoFIB/SEM study (cryotechniques with a focused ion-beam scanning electron microscope) of SARS-CoV-2-infected cells suggested the presence of “exit tunnels”, linking virion-rich intracellular vacuoles to the extracellular space [13]. The authors suggested that SARS-CoV-2 could egress through these tunnels by a mechanism of exocytosis from these large intracellular cisterns.

Using conventional TEM, we recently described the ultrastructural characteristics of the complete infectious cycle of SARS-CoV-2 within the host cell [14]. In this new study, we added to these observations by analysing serial TEM sections of infected cells, focusing specifically on egress events. We show that SARS-CoV-2 viral particles seem to be released into the extracellular space principally via trafficking in small secretory vesicles, most of which contain a single viral particle. We did not observe any opening of intracellular virus-rich cisterns to the extracellular space. We conclude from these TEM observations that SARS-CoV-2 is probably released from its host cell in small secretory vesicles.

2. Materials and Methods

2.1. Cells and Virus

To generate virus stock, Vero-81 cells (kidney epithelial cells established from an African green monkey) were infected with the SARS-CoV-2 (strain BetaCoV/France/IDF0571/2020) as previously described [14]. Briefly, these cells (ATCC, CCL-81) were maintained in Dulbecco’s modified Eagles medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C under an atmosphere containing 5% CO₂. SARS-CoV-2 infection was facilitated by transducing these cells with a lentiviral vector expressing transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2). SARS-CoV-2 was then propagated in these Vero-81 cells expressing TMPRSS2. Ultrastructural analysis was then performed following infection with the produced viral particles on regular Vero-81 cells. Cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.25 for 1 h and were fixed at various time points post-infection. Our previous kinetic study of these infected cells showed that the first massive

viral exit events occurred at 10 h post-infection [14]. We therefore focused specifically on this time point in these investigations in order to avoid interference from possible concomitant viral re-entry and/or cell death events occurring at later points.

2.2. Electron Microscopy

Cells were fixed by incubation for 24 h in 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde (Sigma, St-Louis, MO, USA) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). They were then washed in phosphate-buffered saline (PBS) and post-fixed by incubation for 1 h with 2% osmium tetroxide (Agar Scientific, Stansted, UK) in 0.15 M phosphate buffer. They were dehydrated in a graded series of ethanol solutions and propylene oxide, impregnated with a mixture of (1:1) propylene oxide/Epon resin (Sigma), and then embedded in pure Epon resin, which was allowed to polymerise for 48 h at 60 °C. The Epon blocks were precisely resized for the cutting of a ribbon of serial ultrathin sections (80 nm thick) of individual cells with a Leica Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems GmbH, Wien, Austria). These serial sections were then placed on TEM nickel one-slot grids (Agar Scientific, Ltd., Stansted, UK) coated with Formvar film. The resulting TEM grids were stained for 20 min with 2% uranyl acetate (Merck, Darmstadt, Germany) and 5% Reynolds lead citrate for observation with a Jeol 1011 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) electron microscope. Electron micrographs of the sections were recorded with a digital camera driven by Digital Micrograph software (GMS 3, Gatan, Pleasanton, CA, USA) for the same region of cells in each of the series of sections.

3. Results

We investigated eight cells in which numerous viral particles were observed intracellularly and at the surface by serial section imaging. For five cells, we investigated two or three different areas, resulting in total section imaging for 16 different subcellular domains. For clarity, Table 1 below lists the serial sections corresponding to the cell regions shown in the manuscript figures and those shown in the Supplementary Materials.

Table 1. List of the different cells, cell regions, and corresponding serial sections analysed in this study.

Cell	Region	Figure	Supplementary Materials (High Resolution)
Cell A	Whole cell	Figure 1	
	Part 1	Figure 2 (sections 1 to 9)	Sections 1 to 11
	Part 2	Figure 3 (sections 1 to 6)	Sections 1 to 7
	Part 3	Figure 4 (sections 1 to 6)	Sections 1 to 6
Cell B	Whole cell	Figure 5	
	Part 1	Figure 6 (sections 1 to 15)	Sections 7 to 16

Figure 1 shows a typical cell and the three types of cellular organisations frequently encountered in the areas of virus release into the extracellular space: (i) areas in which the viral particles exit via a cavity formed by a large cytoplasm invagination and numerous microvilli of the plasma membrane (part 1); (ii) areas in which the viral particles exit at a portion of the plasma membrane without any particular protrusion (part 2); (iii) intermediate situations, in which the viral particles exit in areas displaying microvilli at the plasma membrane (part 3). For this cell (cell A on Figure 1), we examined each of these areas carefully through an analysis of serial sections: Figure 2 for part 1 (nine serial sections), Figure 3 for part 2 (six serial sections), and Figure 4 for part 3, (six serial sections). In Figures 2–4, large intracellular vesicles rich in viral particles (thin black arrows) and small vesicles each containing only one viral particle (large white arrows) were recorded. Comparisons of these observations of individual sections with observations of the preceding or following serial sections did not demonstrate the presence of tunnels connecting the plasma membrane to intracellular vesicles containing numerous viral

particles in any of the three virus release situations shown in Figure 1. Particular attention was paid to the situation shown in part 1 of cell A (Figure 2), as the long microvilli of the plasma membrane, often surrounded by viral particles, might potentially resemble “exit tunnels”. However, a meticulous analysis of the serial sections showed that these structures were simple microvilli of the plasma membrane and not tunnels.

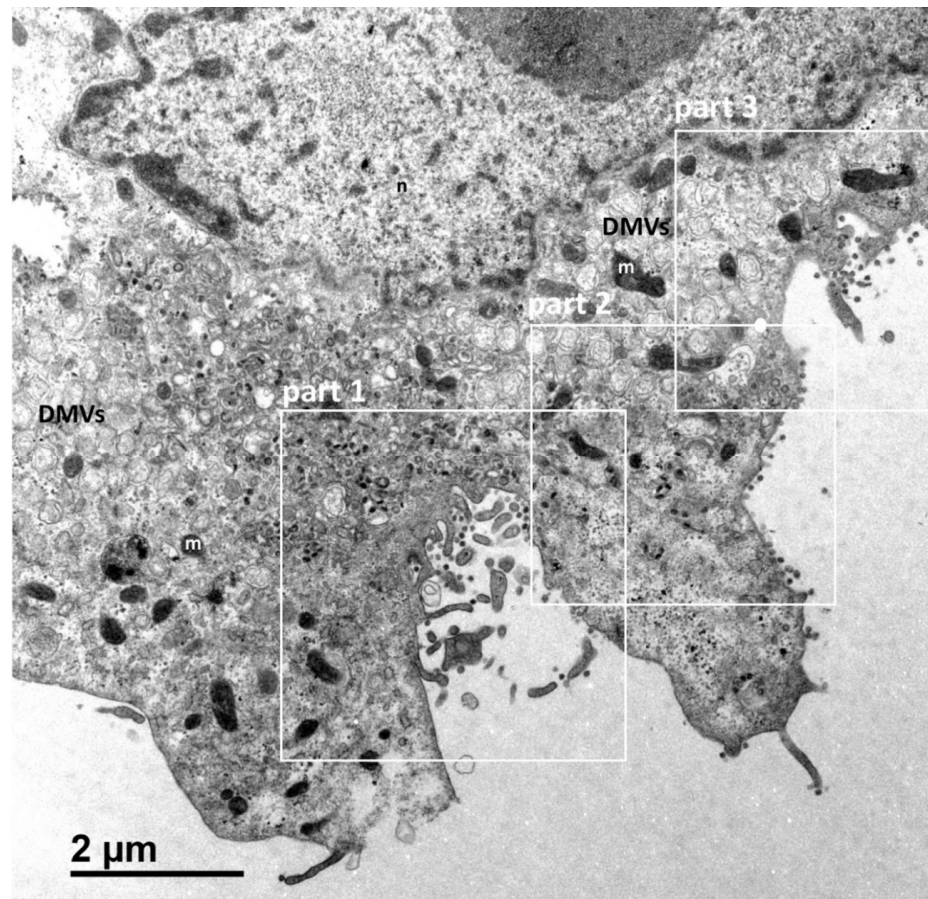


Figure 1. Vero cell at 10 h post-infection with SARS-CoV-2. This cell (cell A) is representative and shows the various virus release situations observed. The three areas delimited by white squares designate the regions of the cell analysed by the examination of serial sections in subsequent Figures 2–4: a region characterised by a large cytoplasm invagination rich in plasma membrane microvilli (part 1); a region in which the virus is released and the plasma membrane does not exhibit particular protrusion (part 2); and a region in which the situation is intermediate, with small plasma membrane microvilli at the cell surface (part 3). The cellular area between the cytoplasm invagination and the nucleus (n) contains a large number of viral particles. This area is flanked on both sides by numerous double-membrane vesicles (DMVs) and mitochondria (m).

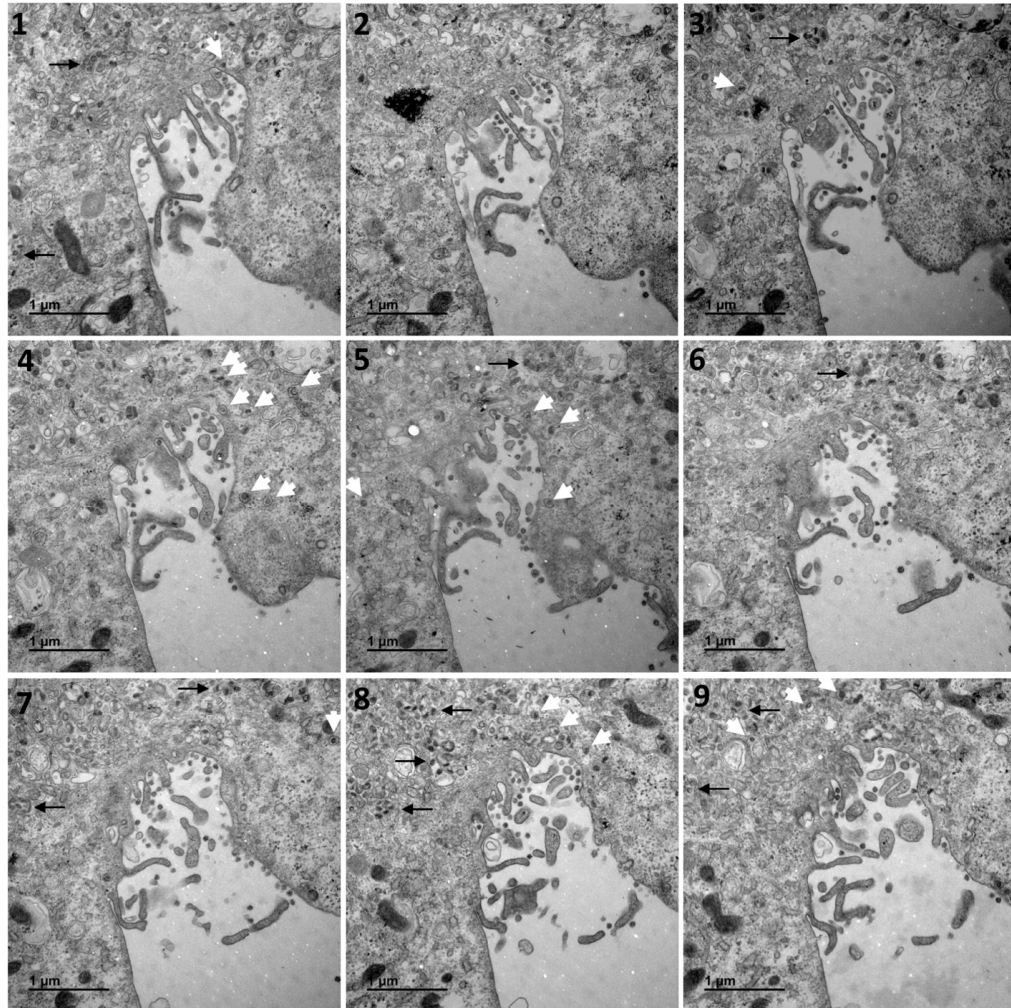


Figure 2. Serial TEM sections of cell A part 1, a region characterised by a large cytoplasm invagination rich in plasma membrane microvilli. Large intracellular vesicles rich in viral particles (thin black arrows) and small vesicles each containing a single viral particle (large white arrows) are shown on each serial section. These electron micrographs of a series of 9 TEM sections (1–9) are part of a larger series (11 sections) provided at high resolution in the Supplementary Materials. The numbers on the panels indicate the successive serial TEM sections.

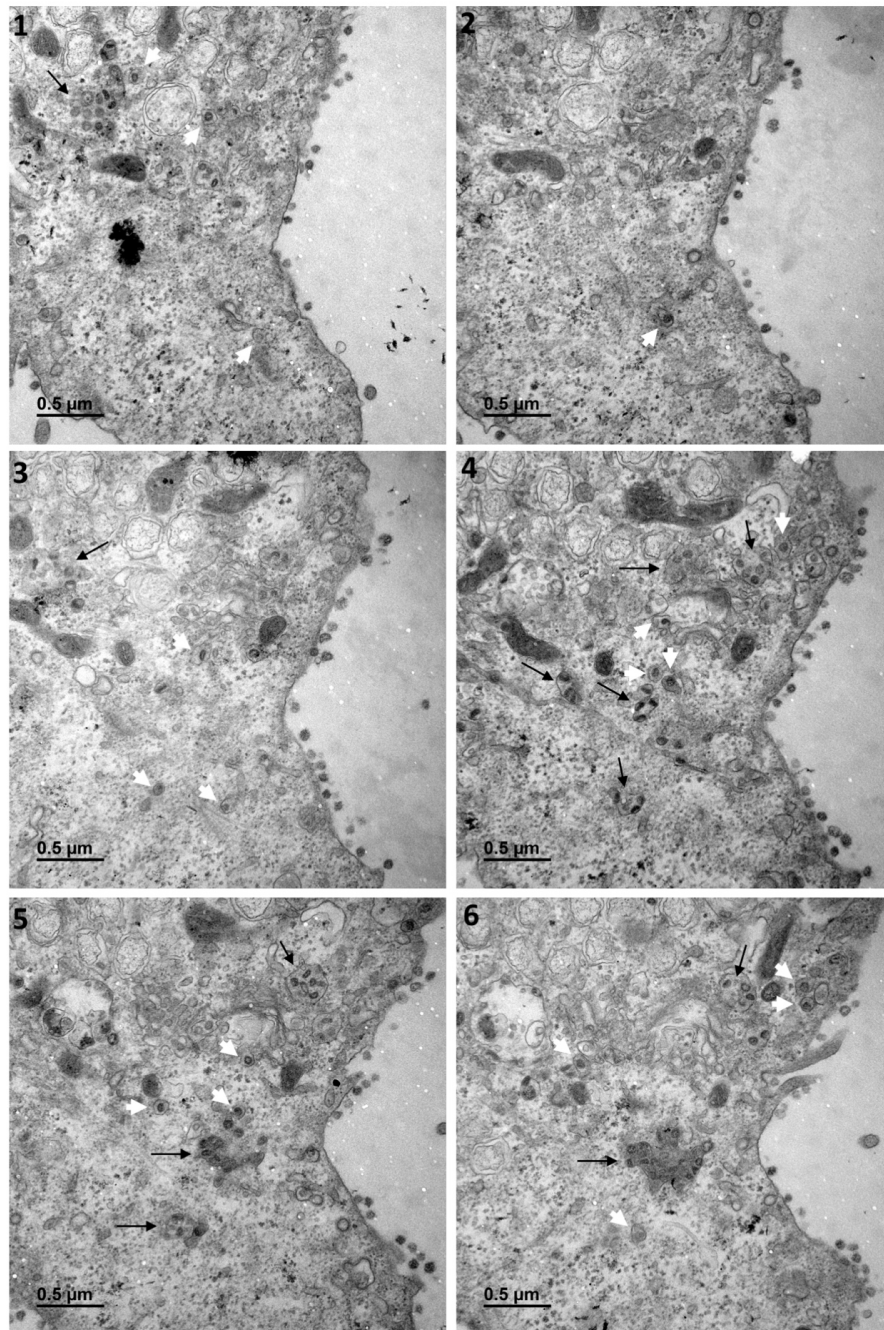


Figure 3. Serial TEM sections of cell A part 2, a region in which the virus is released at the plasma membrane without any particular protrusion. Large intracellular vesicles rich in viral particles (thin black arrows) and small vesicles each containing a single viral particle (large white arrows) are shown on each serial section. These electron micrographs of a series of 6 TEM sections (1–6) are part of a larger series (7 sections) provided at high resolution in the Supplementary Materials. The numbers on the panels indicate the successive serial TEM sections.

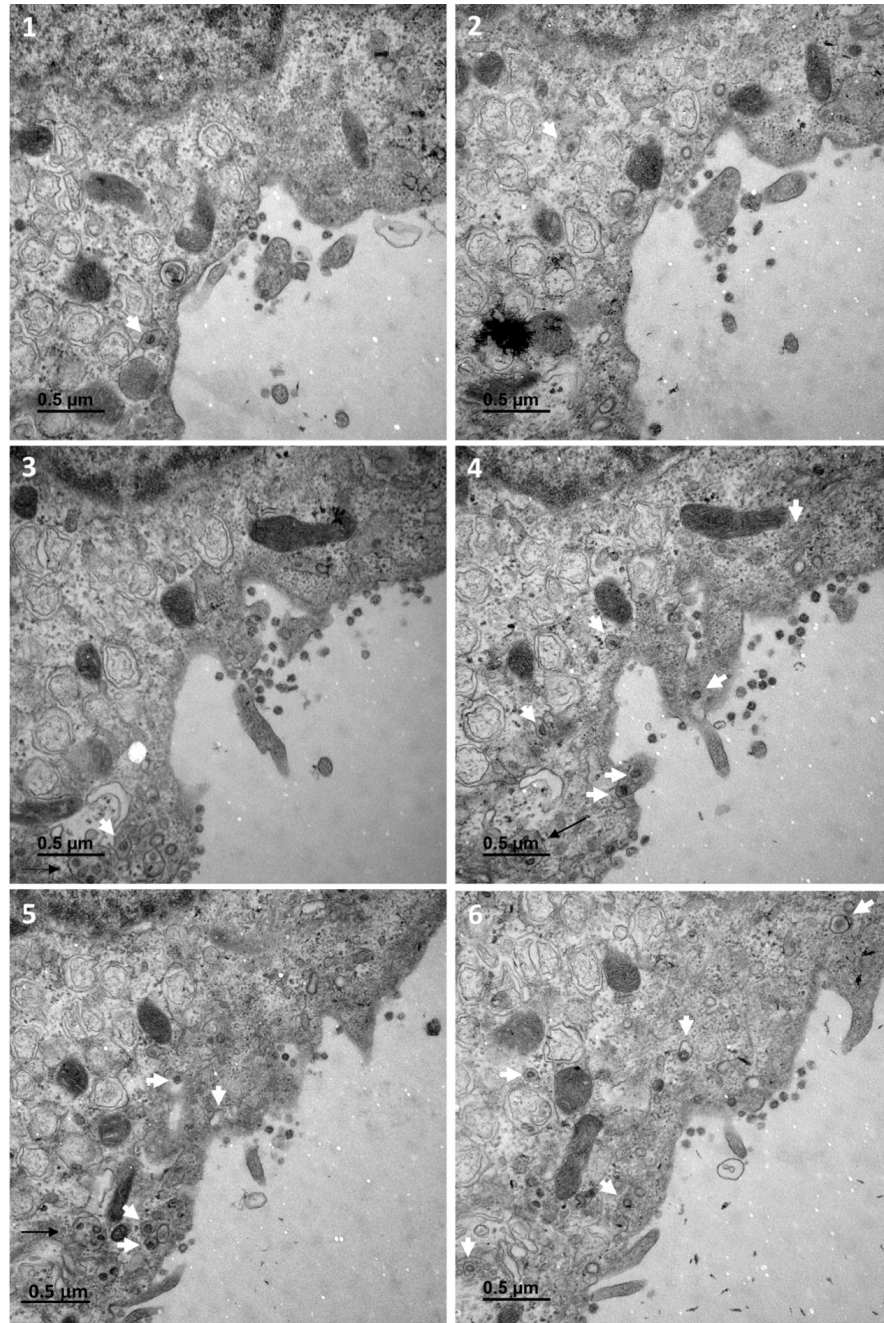


Figure 4. Serial TEM sections of cell A part 3, a region in which the situation is intermediate to those observed on part 1 and 2, with small plasma membrane microvilli at the cell surface. Large intracellular vesicles rich in viral particles (thin black arrows) and small vesicles each containing a single viral particle (large white arrows) are shown on each serial section. The high-resolution electron micrographs for this series can be consulted in the Supplementary Materials. The numbers on the panels (1–6) indicate the successive serial TEM sections.

The absence of tunnel was confirmed by examining several other cells presenting the same feature. Similar observations were made for cell B, presented in Figures 5 and 6. Figure 5 shows cell B at low magnification, and the area of this cell further studied by serial sections in Figure 6. This particular area presents a characteristic situation, with a cavity formed by a large cytoplasmic invagination accompanied by numerous microvilli of the plasma membrane and the active release of viral particles. Figure 6 shows an analysis of 12 serial sections in this particular region. A complete series of 24 consecutive electron micrographs of this region can be consulted in the Supplementary Materials. As for the previous figures, large intracellular vesicles rich in viral particles (thin black arrows) and small vesicles each containing only one viral particle (large white arrows) were recorded (Figure 6). Again, comparisons of an individual section with the preceding and following serial sections suggested that the virions were trafficked towards the plasma membrane in small vesicles. The structure identified in brackets from sections 4 to 12, which is suggestive of a tunnel, was found to be a simple invagination of the plasma membrane not connected to an intracellular compartment. Interestingly, our observations suggest that virions were released into the thin extracellular space formed by this invagination via small secretory vesicles, each containing a single virus particle (thin white boxes on sections 10 and 11, also shown in the inset on these sections). On section 10, another similar virus release event can be observed (thin white arrow in the upper part of the image, also shown in the inset).

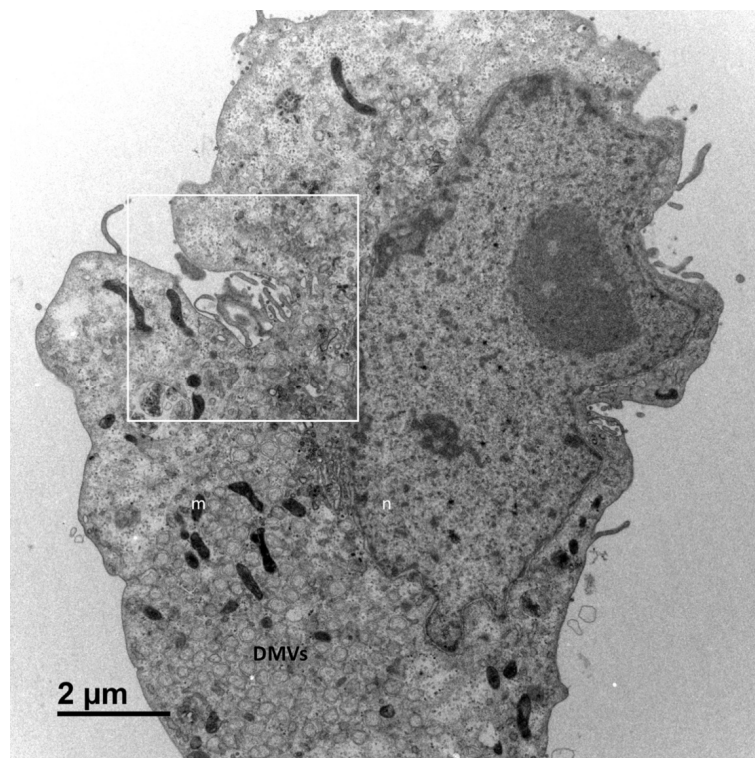


Figure 5. Vero cell at 10 h post-infection with SARS-CoV-2. This cell (cell B) is representative of a frequently observed viral release situation characterised by a large cytoplasm invagination rich in plasma membrane microvilli (area designated by the white square, analysed by the examination of serial TEM sections in Figure 6). The cellular area between the cytoplasm invagination and the nucleus (n) contains a large number of viral particles. This area is close to numerous double-membrane vesicles (DMVs) and mitochondria (m).

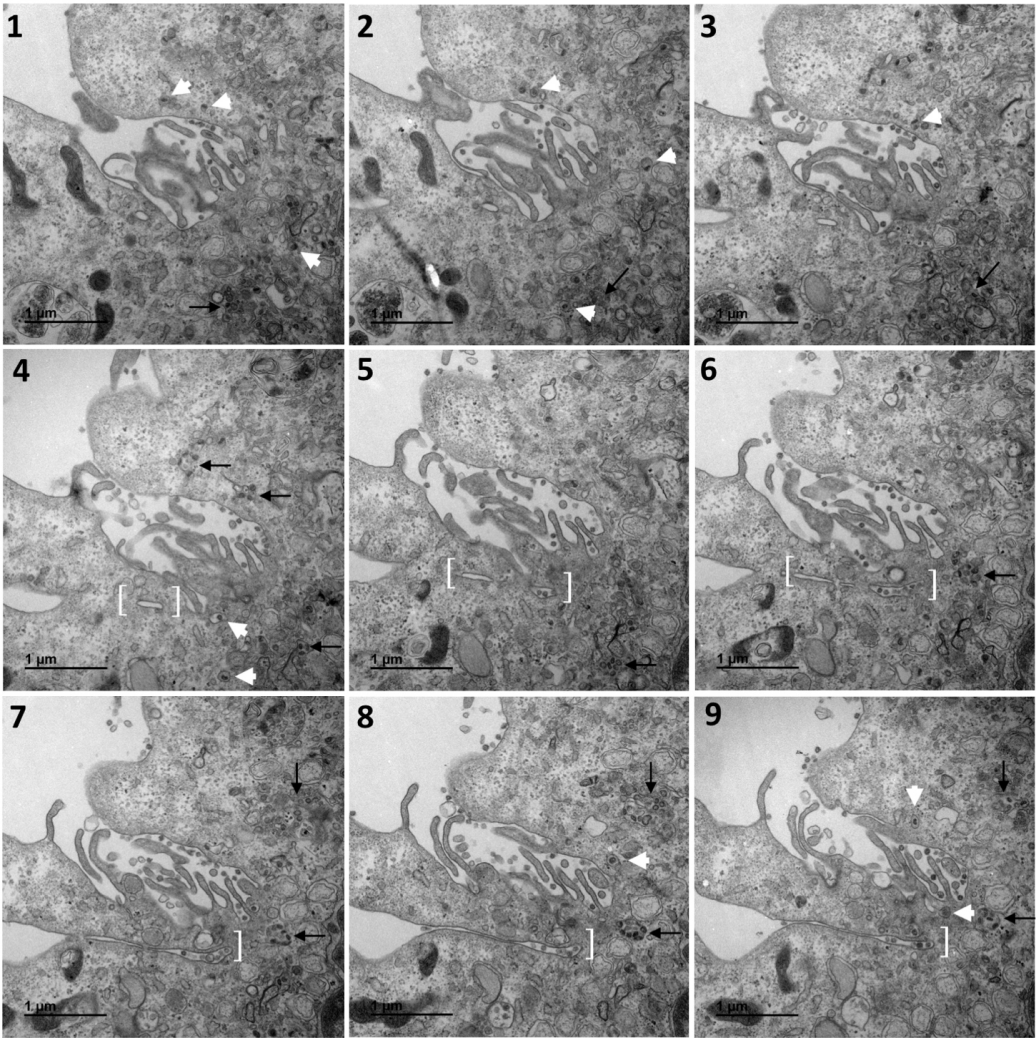


Figure 6. Cont.

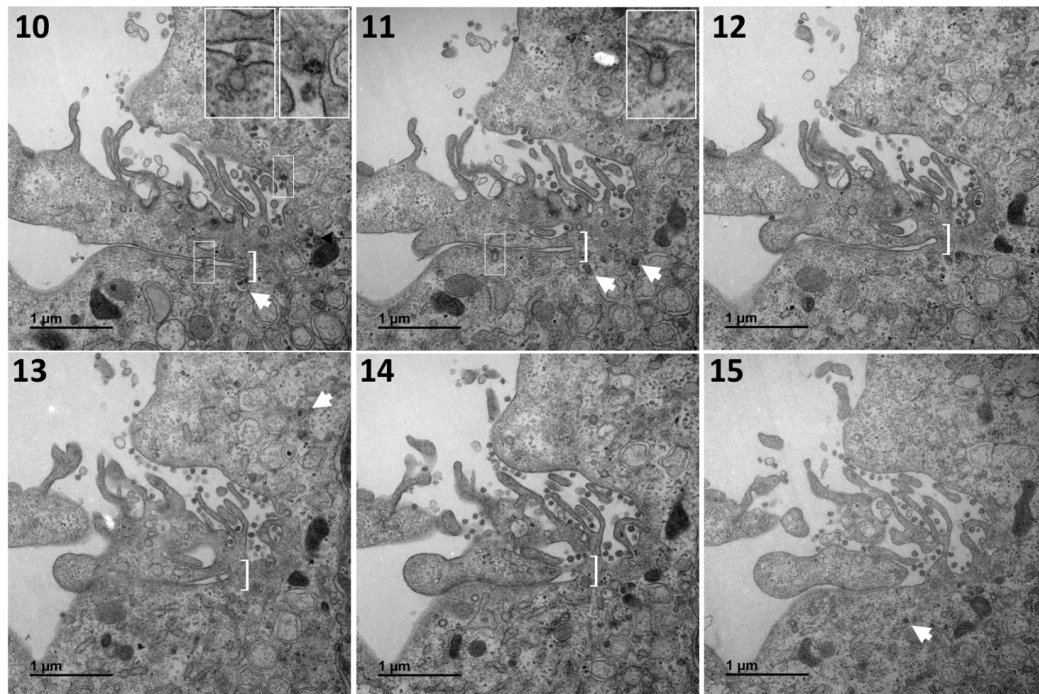


Figure 6. Serial TEM sections of the previous area of cell B, characterised by a large cytoplasm invagination rich in plasma membrane microvilli. Large intracellular vesicles rich in viral particles (thin black arrows) and small vesicles each containing a single viral particle (large white arrows) are shown on each serial section. The structure identified in white brackets from sections 4 to 12 appears to be an invagination of the plasma membrane, forming a very thin extracellular space between two cellular microvilli. These electron micrographs of a series of 12 TEM sections are part of a larger series (24 sections) provided at high resolution in the Supplementary Materials. Viral particles are released into the thin extra-cellular space between two cellular microvilli through small secretory vesicles each containing a single virus particle (thin white boxes in sections 10 and 11, also shown in insets). On section 10, another viral release event involving a small secretory vesicle containing a single viral particle can be visualised (thin white box in the upper part of the image, also shown in the inset). The numbers on the panels (1–15) indicate the successive serial TEM sections.

4. Discussion

Viral particle egress is one of the least well understood steps in the infectious cycle of SARS-CoV-2 in its host cell. To date, few data have been published on this topic for this and other coronaviruses. Viral morphogenesis is known to involve budding in intracellular compartments, so viral particles are generally thought to be released via the biosynthetic secretory pathway. However, one recent study suggested that coronaviruses, including, potentially, SARS-CoV-2, make use of lysosomal trafficking for egress rather than the common secretory pathway [11]. It has also recently been shown that flaviviruses (dengue and Zika viruses) use autophagosome-derived organelles for egress [15]. However, it is unknown whether these intracellular compartments containing coronaviruses or flaviviruses can fuse with the plasma membrane to release the large numbers of viral particles present in these compartments.

A recent cryoFIB/SEM imaging study of Vero cells infected with SARS-CoV-2 has suggested the presence of “exit tunnels” connecting large intracellular virus-containing vesicles to the plasma membrane [13]. The authors suggested that these tunnels resulted from the fusion of these large virus-containing vesicles with the cell membrane, allowing the release of numerous SARS-CoV-2 viral particles through an exocytosis-like mechanism.

Such a mechanism is conceivable, as a similar mechanism has previously been described for human immunodeficiency virus (HIV) in macrophages, in which HIV buds in dilated intracellular compartments [16,17]. Many of these intracellular compartments have been shown to be connected to the plasma membrane and have thus been named intracellular plasma membrane-connected compartments (IPMCs) [18]. Three-dimensional electron microscopy analyses have suggested that IPMCs represent portals through which HIV may be released into the extracellular space [17]. However, in the case of macrophages, similar compartments were previously found to exist in uninfected cells [17].

Our analysis of SARS-CoV-2-infected Vero cells based on serial TEM sections provided no evidence for the presence of such exit tunnels, as shown in the serial sections of the 4 cell subdomains presented in our figures but also in the 12 other cell subdomains analysed in 3D from 6 other different cells. On the contrary, our analysis suggested that the viral particles were individually trafficked in small secretory vesicles. Some of these secretion vesicles were presumably opened to the extracellular space, leading to a possible release of the virus (Figure 6, insets in sections 10 and 11). Viral particles were often released in areas of cytoplasmic invagination containing many microvilli of the plasma membrane. Similar observations have been reported in other recent studies of Vero cells infected with SARS-CoV-2 that were examined by scanning electron microscopy (SEM) [19] or coupled SEM and TEM [19,20]. The arrangement of parallel microvilli may resemble tunnels, but our observations show that they are never connected to virus-rich intracellular vesicles. Moreover, the virions can be released into very thin extracellular spaces between these microvilli. Further studies will be required to determine whether this situation enables the virus to hide from the immune system.

Further investigations, including functional studies, will also be necessary to determine the origin of these small secretory vesicles transporting the virions and the pathway used for their progression towards the plasma membrane. Early coronavirus studies performed with the mouse hepatitis virus model suggested that after budding into the ERGIC, the virus follows the classical secretory route to the cell surface [21,22]. However, as the coronaviruses egress has been recently shown to be BFA resistant [11], these vesicles may not belong to the classical secretion pathway and rather use an unconventional secretory pathway. The vesicles observed fusing with the cell surface to release the virus in the extracellular space may have different origins and use different pathways that by-passes the Golgi stacks, as recently suggested [23]. They could follow a pathway through the Golgi apparatus deviating to the lysosomes and/or a pathway from the non-compact zones of the Golgi ribbon constituted by the ERGIC and recycling endosomes [23].

The cryoFIB/SEM study cited above also reported the occurrence of plasma membrane discontinuities next to virus particles outside the cell, suggesting possible viral release through membrane lesions [13]. We observed no such discontinuities, with our electron micrographs instead suggesting viral release without plasma membrane rupture via the possible exocytosis of small vesicles, most of which contained a single viral particle. The reasons for these differences between these two studies are unknown but may be related to the timing of the analysis (10 h post-infection in our serial section study versus 24 h post-infection in the cryoFIB/SEM study). It is possible that cell lysis contributes to virion release into the extracellular space at 24 h but not 10 h post-infection. Further studies at different times post-infection will probably provide clearer insight into the various possible mechanisms of viral exit.

Nevertheless, our study suggests that small secretory vesicles carrying a single viral particle represent the main means of egress for SARS-CoV-2, at least at the early stage of infection. We cannot rule out the possibility that egress events involving large vesicles have been missed due to the limited number of cells analysed. However, these cells were fully analysed in 3D using this serial section approach, and none of them showed an egress event involving an opening of large intracellular vesicles to the outside, directly or via an exit channel. It will be certainly important to continue this type of investigation with other, more relevant, cellular models, such as human primary airway epithelial cells,

although these cells will most certainly be more difficult to handle for a serial TEM sections approach. This work sheds new light on late stages in the SARS-CoV-2 infectious cycle, which could be useful for the development of new antiviral strategies in a context in which few therapeutic approaches are currently available.

Supplementary Materials: Electron micrographs of the serial sections presented in this manuscript, and additional serial sections in the continuity of these series, are provided in the Supplementary Materials at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10082047/s1>.

Author Contributions: S.E. and R.U. contributed equally to this work. Conceptualisation: P.R.; methodology: S.E., R.U., Y.R. and S.B.; investigation: S.E., R.U., Y.R., S.B. and P.R.; formal analysis: S.E., R.U., Y.R., E.B., C.H., J.D., S.B. and P.R.; writing—original draft preparation: S.E. and P.R.; writing—review and editing: S.E., R.U., Y.R., E.B., C.H., J.D., S.B. and P.R.; supervision: P.R.; project administration: P.R.; funding acquisition: P.R., J.D. and S.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by INSERM, CNRS, the University of Tours, and the University of Lille.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All the electron micrographs of the serial sections of the two cells fully analysed in this manuscript, and additional serial sections in the continuity of these series, are provided in the Supplementary Materials. Electron micrographs of the serial sections of the other six cells analysed in this study (12 different subcellular domains) can be provided at high resolution upon request to the corresponding author.

Acknowledgments: We thank Olivier Terrier and Manuel Rosa-Calatrava for providing us with the viral strain, and Fabienne Arcanger and Juliette Rousseau for technical assistance.

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

References

1. Boni, M.F.; Lemey, P.; Jiang, X.; Lam, T.T.; Perry, B.W.; Castoe, T.A.; Rambaut, A.; Robertson, D.L. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 1408–1417. [\[CrossRef\]](#)
2. World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 17 May 2021).
3. Al-Horani, R.A.; Kar, S.; Aliter, K.F. Potential anti-COVID-19 therapeutics that block the early stage of the viral life cycle: Structures, mechanisms, and clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5224. [\[CrossRef\]](#)
4. Blanchard, E.; Roingeard, P. Virus-induced double-membrane vesicles. *Cell. Microbiol.* **2015**, *17*, 45–50. [\[CrossRef\]](#)
5. Snijder, E.J.; Limpens, R.W.A.L.; de Wilde, A.H.; de Jong, A.W.M.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Maier, H.J.; Faas, F.F.G.A.; Koster, A.J.; Bárcena, M. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000715. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Bárcena, M.; Oostergetel, G.T.; Bartelink, W.; Faas, F.G.; Verkleij, A.; Rottier, P.J.; Koster, A.J.; Bosch, B.J. Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 582–587. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Laue, M.; Kauter, A.; Hoffmann, T.; Möller, L.; Michel, J.; Nitsche, A. Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3515. [\[CrossRef\]](#)
8. Hsieh, P.K.; Chang, S.C.; Huang, C.C.; Lee, T.T.; Hsiao, C.W.; Kou, Y.H.; Chen, I.Y.; Chang, C.K.; Huang, T.H.; Chang, M.F. Assembly of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA packaging signal into virus-like particles is nucleocapsid-dependent. *J. Virol.* **2005**, *79*, 13848–13855. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Kumar, B.; Hawkins, G.M.; Kicmal, T.; Qing, E.; Timm, E.; Gallagher, T. Assembly and entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV2): Evaluation using virus-like particles. *Cells* **2021**, *10*, 853. [\[CrossRef\]](#)
10. Stertz, S.; Reichelt, M.; Spiegel, M.; Kuri, T.; Martínez-Sobrido, L.; García-Sastre, A.; Weber, F.; Kochs, G. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* **2007**, *361*, 304–315. [\[CrossRef\]](#)
11. Ghosh, S.; Dellibovi-Ragheb, T.A.; Kerviel, A.; Pak, E.; Qiu, Q.; Fisher, M.; Takvorian, P.M.; Bleck, C.; Hsu, V.W.; Fehr, A.R.; et al. Beta-Coronaviruses use lysosomes for egress instead of the biosynthetic secretory pathway. *Cell* **2020**, *183*, 1520–1535. [\[CrossRef\]](#)
12. Ducatelle, R.; Hoorens, J. Significance of lysosomes in the morphogenesis of coronaviruses. *Arch. Virol.* **1984**, *79*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

13. Zhang, P.; Mendonca, L.; Howe, A.; Gilchrist, J.; Sun, D.; Knight, M.; Zanetti-Domingues, L.; Bateman, B.; Krebs, A.S.; Chen, L.; et al. Correlative multi-scale cryo-imaging unveils SARS-CoV-2 assembly and egress. *Res. Sq.* **2021**. [[CrossRef](#)]
14. Eymieux, S.; Rouillé, Y.; Terrier, O.; Seron, K.; Blanchard, E.; Rosa-Calatrava, M.; Dubuisson, J.; Belouzard, S.; Roingeard, P. Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: A kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 3565–3576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Li, M.Y.; Naik, T.S.; Siu, L.Y.L.; Acuto, O.; Spooner, E.; Wang, P.; Yang, X.; Lin, Y.; Bruzzone, R.; Ashour, J.; et al. Lyn kinase regulates egress of flaviviruses in autophagosome-derived organelles. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5189. [[CrossRef](#)]
16. Bennett, A.E.; Narayan, K.; Shi, D.; Hartnell, L.M.; Gousset, K.; He, H.; Lowekamp, B.C.; Yoo, T.S.; Bliss, D.; Freed, E.O. Subramaniam Slon-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. *PLoS Pathog.* **2009**, *9*, e1000591.
17. Nkwe, D.O.; Pelchen-Matthews, A.; Burden, J.J.; Collinson, L.M.; Marsh, M. The intracellular plasma membrane-connected compartment in the assembly of HIV-1 in human macrophages. *BMC Biol.* **2016**, *14*, 50. [[CrossRef](#)]
18. Mlcochova, P.; Pelchen-Matthews, A.; Marsh, M. Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages. *BMC Biol.* **2013**, *11*, 89. [[CrossRef](#)]
19. Caldas, L.A.; Carneiro, F.A.; Higa, L.M.; Monteiro, F.L.; da Silva, G.P.; da Costa, L.J.; Durigon, E.L.; Tanuri, A.; de Souza, W. Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16099. [[CrossRef](#)]
20. Brahim Belhaouari, D.; Fontanini, A.; Baudoin, J.P.; Haddad, G.; Le Bideau, M.; Bou Khalil, J.Y.; Raoult, D.; La Scola, B. The strengths of scanning electron microscopy in deciphering SARS-CoV-2 infectious cycle. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Tooze, J.; Tooze, S.A.; Fuller, S.D. Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 1215–1226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tooze, S.A.; Tooze, J.; Warren, G. Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 1475–1487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Saraste, J.; Prydz, K. Assembly and cellular exit of coronaviruses: Hijacking an unconventional secretory pathway from the pre-Golgi intermediate compartment via the Golgi ribbon to the extracellular space. *Cells* **2021**, *10*, 503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

c. Travail de synthèse 1

Eymieux S, Blanchard E, Uzbekov R, Hourieux C, Roingeard P. Annulate lamellae and intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* 2021 Aug;23(8):e13328. doi: 10.1111/cmi.13328. Epub 2021 Mar 25

MICROREVIEW

WILEY

Annulate lamellae and intracellular pathogens

Sébastien Eymieux^{1,2} | Emmanuelle Blanchard^{1,2} | Rustem Uzbekov² |
 Christophe Hourieux^{1,2} | Philippe Roingeard^{1,2}

¹Inserm U1259 MAVIVH, Université de Tours
 and CHRU de Tours, Tours, France

²Plate-Forme IBISA de Microscopie
 Electronique, Université de Tours and CHRU
 de Tours, Tours, France

Correspondence

Philippe Roingeard, INSERM U1259, Faculté
 de Médecine, Université de Tours, 10 bld
 Tonnellé, 37032 Tours, Cedex France.
 Email: roingeard@med.univ-tours.fr

Funding information

Agence Nationale de Recherches sur le Sida et
 les Hépatites Virales

Abstract

Annulate lamellae (AL) have been observed many times over the years on electron micrographs of rapidly dividing cells, but little is known about these unusual organelles consisting of stacked sheets of endoplasmic reticulum-derived membranes with nuclear pore complexes (NPCs). Evidence is growing for a role of AL in viral infection. AL have been observed early in the life cycles of the hepatitis C virus (HCV) and, more recently, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), suggesting a specific induction of mechanisms potentially useful to these pathogens. Like other positive-strand RNA viruses, these viruses induce host cells membranes rearrangements. The NPCs of AL could potentially mediate exchanges between these partially sealed compartments and the cytoplasm. AL may also be involved in regulating Ca^{2+} homeostasis or cell cycle control. They were recently observed in cells infected with *Theileria annulata*, an intracellular protozoan parasite inducing cell proliferation. Further studies are required to clarify their role in intracellular pathogen/host-cell interactions.

KEYWORDS

annulate lamellae, electron microscopy, intracellular parasite, membranous web, virus

1 | INTRODUCTION

Annulate lamellae (AL) are stacks of flat cisternae continuous with the endoplasmic reticulum (ER) membranes, thought to act as storage compartments for the components of the nuclear pore complexes (NPCs) (Cordes, Reidenbach, & Franke, 1995; Daigle et al., 2001; Kessel, 1983; Spindler & Hemleben, 1982). Like the nuclear envelope, AL constitute a sub-domain of the ER. The nuclear envelope consists of two concentric membranes—the inner and the outer nuclear membranes—that are joined at NPCs (Figure 1a). These NPCs, which allow the regulated exchange of molecules between the nucleus and the cytoplasm, consist of about 500 individual proteins collectively known as nucleoporins (Nups). Nups are composed of a limited number (about 30) of different subunits. They are present in multiple copies in the assembled NPC, arranged in octagonal rotational symmetry around the central transport channel. Unlike the NPCs of the nuclear envelope, those of the AL face the cytoplasm on both sides. AL do not contain the nuclear envelope inner membrane proteins known to

interact specifically with the nuclear lamina, a fibrous meshwork providing the nuclear compartment with structural support (Chen & Merisko, 1998) (Figure 1a).

2 | DISCOVERY, ROLE AND BIOGENESIS OF ANNULATE LAMELLAE

Electron microscopy played a major role in the discovery of AL and continues to be an important technique for the study of these organelles, providing unequivocal evidence of their presence. AL were first observed in rat spermatids (Palade, 1955), sea urchin eggs, clam ovaries and salamander larvae (Swift, 1956). These early studies suggested that AL might be present principally in germ cells and embryos. They were sporadically observed in tumour cells (Binggeli, 1959), but seemed to be absent from most somatic cells. It has since become clear that AL are present in many cell types, in both animals and plants (Kessel, 1992), but that they are most abundant in

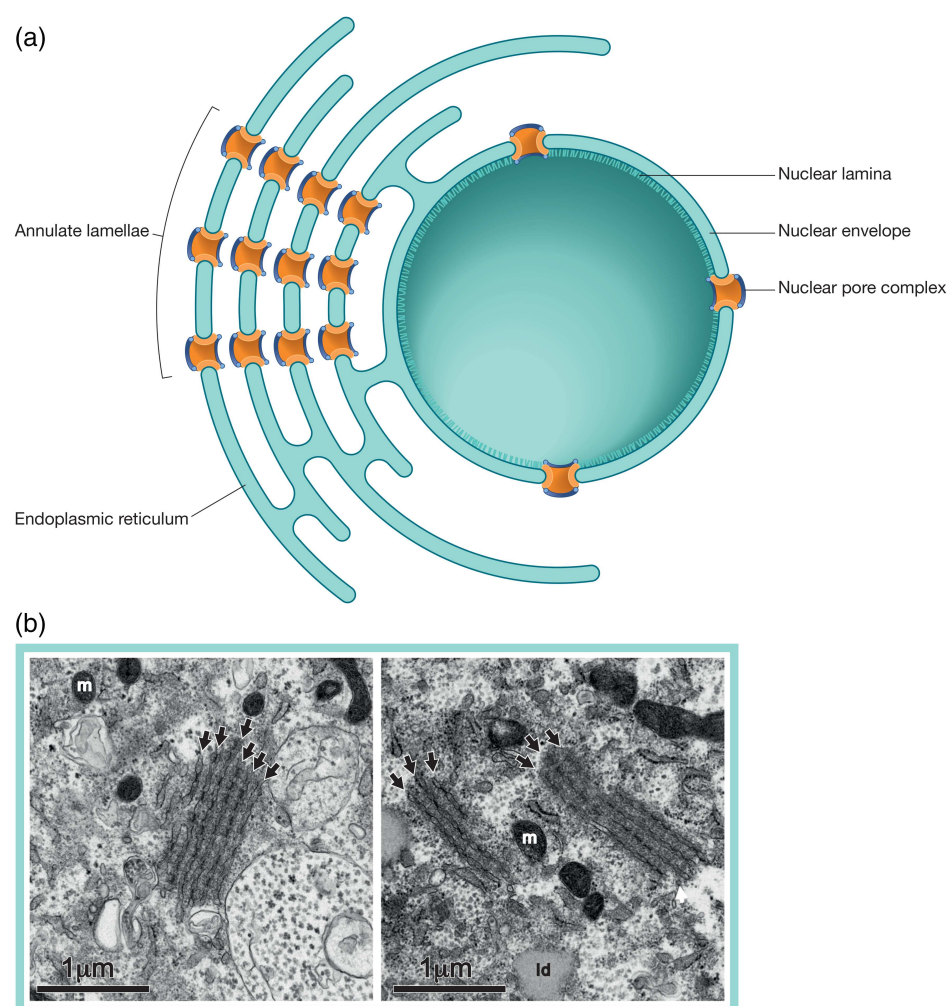


FIGURE 1 Schematic representation of annulate lamellae (a, adapted from the review by De Magistris & Antonin, 2018) and their observation by electron microscopy (arrows) in SARS-CoV-2-infected Vero cells, in the early phases of viral infection (b). m, mitochondria; ld, lipid droplet

rapidly dividing cells, such as germ cells, embryonic cells and cancer cells, suggesting a possible role for AL in the dynamics of nuclear disassembly and reassembly (Cordes, Reidenbach, & Franke, 1996; Daigle et al., 2001; Kessel, 1992). When a cell enters mitosis, the nuclear envelope detaches from the ER and is fragmented into vesicles, while the NPCs disassemble into soluble Nups (Güttinger, Laurell, & Kutay, 2009; Schooley, Vollmer, & Antonin, 2012). At the end of mitosis, these vesicles reassemble around the separated genetic material to form the two daughter cells (Schooley et al., 2012). During these mechanisms, the nuclear envelope must increase in volume and the number of NPCs must also increase to allow expansion of the nucleus (Good, 2015). This led to suggestions that the NPCs of

the AL act as a form of Nup storage that can be disassembled to provide Nups for use in the assembly of new NPCs in the nuclear envelope of mitotic cells (Lénárt & Ellenberg, 2003; Spindler & Hemleben, 1982; Stafstrom & Staehelin, 1984), or during the biogenesis of new nuclei in early development (Cordes et al., 1995). However, recent progress in live-cell imaging led to observations of the entire AL integrating directly into the nuclear envelope in the *Drosophila* syncytial blastoderm embryo model (Hampoelz et al., 2016). In this process, after retraction of the nuclear envelope, the AL double membrane is aligned with and connected to the nuclear envelope, and inserted *en bloc* into the nuclear envelope (reviewed by De Magistris & Antonin, 2018). This mechanism, which increases the number of NPCs

as the area of the nuclear envelope increases, occurs rapidly (within 1–2 min), due to the insertion of large portions of AL membranes rather than individual nuclear pores (De Magistris & Antonin, 2018; Hampoelz et al., 2016). This mechanism has also recently been observed in other cell types, suggesting that it may be common to all proliferating eukaryotic cells (Ren et al., 2019).

The mechanisms leading to AL biogenesis remain very poorly documented. In the *Drosophila* embryo model, it has been shown that precursor elements are constituted by condensation of Nups in cytoplasmic granules (Hampoelz et al., 2019). Nup358 (also known as Ran BP2) has been shown to play a key role in this mechanism, condensing the various Nups into these NPC assembly platforms while its mRNA localises to their surface of the platform in a translation-dependent manner. These Nups are then structured into NPCs, which are integrated into ER lamellae to form the future AL.

3 | PRESENCE OF ANNULATE LAMELLAE IN INFECTED CELLS

AL has been detected by electron microscopy in cells infected with various viruses, including mammalian cells infected with rubella virus (Kim & Boatman, 1967; Patrizi & Middelkamp, 1970), hepatitis A virus (Klinger, Kämmerer, Hornei, & Gauss-Müller, 2001; Marshall, Borg, Coulepis, & Anderson, 1996), human herpes virus 6 (Ahlgqvist et al., 2006; Cardinali et al., 1998; Torrisi et al., 1999), Japanese encephalitis virus (Wang et al., 1997), Zika virus (Caldas, Azevedo, da Silva, & de Souza, 2020) and, more recently, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2 (Eymieux et al., 2021). (Figure 1b). AL have also been observed in virus-infected plant cells (Steinkamp & Hoefert, 1977), and in cells infected with *Theileria annulata*, a tickborne intracellular protozoan parasite of wild and domestic Bovidae (Huber et al., 2020).

The number of AL may increase following cellular injury due to treatment with anti-tubulin drugs, a decrease in temperature, irradiation or starvation, for example (Kessel, 1992), and it is possible that their presence in infected cells simply reflects the occurrence of a cellular stress reaction following viral or parasitic infection. However, several lines of evidence are in favour of specific induction, potentially useful to the pathogen. In the case of SARS-CoV-2, AL are present in tiny amounts in uninfected cells, but their numbers increase significantly in very early phases of the infectious cycle, and the timing of this increase is incompatible with the development of virus-induced cellular stress (Eymieux et al., 2021). The role of this early induction of AL production remains unexplained, but it is thought that it might be a key viral mechanism by which the virus initiates its life cycle. For human herpes virus 6 (HHV6), it has been shown that the viral glycoproteins accumulate in the AL membranes and that virus envelopment can occur in this compartment, suggesting that AL provide a favourable environment for viral morphogenesis (Torrisi et al., 1999). In the case of *Theileria annulata*, AL are absent from uninfected cells, but surround the parasite and closely associated with its surface in infected cells (Huber et al., 2020).

4 | THE HEPATITIS C VIRUS MODEL

The hepatitis C virus (HCV)/host cell interaction is the model that has provided the most information about the potential role of AL during viral infection. In Huh7.5 cells, the virus induces the rearrangement of host cell membranes into a “membranous web” consisting essentially of ER-derived double-membrane vesicles (DMVs) (Ferraris, Blanchard, & Roingeard, 2010; Romero-Brey et al., 2012). It has been suggested that this membranous web is responsible for anchoring viral replication complexes, while concealing viral RNA from innate immunity sensors (Blanchard & Roingeard, 2015). In the Huh7.5 hepatoma cell line, HCV has been shown to induce a massive increase in the levels of cytoplasmic Nups, which accumulate in subcellular domains rich in viral proteins, a characteristic of the membranous web (Neufeldt et al., 2013). These Nups interact specifically with viral proteins, and their experimentally induced depletion inhibits the infectious cycle of the virus. Moreover, proteins normally targeted to the nucleus may be found in the membranous web, indicating that these Nups are functional and probably structured into NPCs, facilitating the targeting of cellular and viral proteins essential for viral replication to the membranous web (Neufeldt et al., 2013). Electron microscopy was not used in this work, so the authors' hypotheses concerning the structure of these cytoplasmic Nups into AL were not formally demonstrated. However, in the meantime, our group investigated the kinetics of membranous web formation in HCV-infected Huh7.5 cells by electron microscopy (Ferraris et al., 2013). We did not mention it in the manuscript, because the significance of the observation was unclear at the time, but we were able to document, by electron microscopy, the presence of AL in Huh7.5 cells infected with HCV (unpublished data). In these cells, AL were present at early stages of infection, frequently in close proximity to clusters of single-membrane vesicles acting as precursors of DMVs (Figure 2). As subsequently reported for SARS-CoV-2 (Eymieux et al., 2021), the induction of AL by HCV at early stages of infection may precede the establishment of virus-induced membrane rearrangements and be essential to the formation of the so-called “membranous web,” contributing to the compartmentalization of viral replication (Neufeldt et al., 2013).

5 | POTENTIAL ROLE OF ANNULATE LAMELLAE IN INFECTED CELLS

AL induction may, therefore, be a feature common to positive-strand RNA viruses, including HCV, hepatitis A virus, Japanese encephalitis virus, Zika virus, rubella virus and SARS-CoV-2, for which AL have been identified in infected cells. All of these viruses induce rearrangements of host cell membranes for the anchoring of their replication complexes (Romero-Brey & Bartenschlager, 2014). The membrane rearrangements induced by these viruses are of different natures, consisting of membrane invaginations towards the ER lumen or, conversely, the extrusion of ER membranes to form DMVs, depending on the viral model. However, they reflect a common viral strategy organising RNA genome replication in specialised

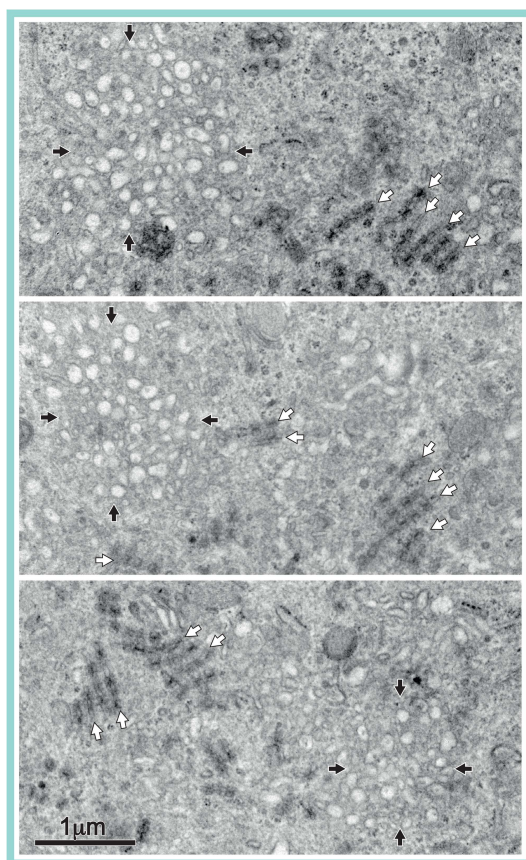


FIGURE 2 Three examples of electron microscopy observations showing annulate lamellae (white arrows) in close proximity to clusters of HCV-specific single-membrane vesicles (black arrows), which have been shown to precede the formation of the membranous web in HCV-infected cells

compartments (Romero-Brey & Bartenschlager, 2014). The role of the AL in these membrane rearrangements may be the provision of NPCs, to mediate exchanges between these partially sealed compartments, thereby protecting the viral RNA from innate immunity sensors, while allowing the transport of elements essential for viral replication. However, they are unlikely to play such a role in HHV6 infections, in which they have also been observed, as this DNA virus does not induce membrane rearrangements, with the AL instead appearing to be involved in the envelopment of the virus with its envelope glycoproteins. However, AL are probably not strictly necessary for this virus, as it also seems to be enveloped at Golgi membranes (Torrisi et al., 1999). Similarly, the role proposed for AL induced by RNA viruses may not account for the induction of AL by the intracellular parasite *Theileria annulata*, which does not induce similar important host cell membrane remodelling, instead surrounding itself with AL.

Nevertheless, AL may have functions extending beyond the simple provision of NPCs, including regulatory functions. For example, AL have been shown to be involved in Ca^{2+} signalling to support *Xenopus* oocyte fertilisation (Boulware & Marchant, 2005; Boulware & Marchant, 2008). In this mechanism, AL may regulate Ca^{2+} signalling by re-organising the subcellular distribution of the IP3 receptor. Interestingly, HCV and SARS-CoV-2 are both known to modify calcium fluxes at the ER level. The deregulation of Ca^{2+} flux between the ER and mitochondria at specialised contact sites, leading to a mitochondrial Ca^{2+} overload associated with mitochondrial dysfunction, seems to be a major event in cells infected with these viruses (Bojkova et al., 2020; Davies, Almay, McDonald, & Plate, 2020; Kuchay et al., 2018; Scrima, Piccoli, Moradpour, & Capitanio, 2018). Mitochondria are often associated with the membranous web in cells infected with HCV or SARS-CoV-2 (Eymieux et al., 2021; Romero-Brey et al., 2012). A role for AL or the resulting Nup-enriched membranes in these mechanisms therefore appears possible.

It is also possible that AL help to regulate the action of Nups by controlling their sequestration or release, as shown for Nup96, which controls the length of the cell cycle (Wozniak & Goldfarb, 2008). When Nup96 levels are high, the transition from G1 to S phase is delayed (Chakraborty et al., 2008). This may be of importance in host/pathogens interactions, as many pathogens have been shown to use diverse strategies to control the cell cycle of their host cell. This is the case, in particular, for *Theileria annulata*, for which the induction of proliferation in infected cells is a key aspect of pathogenesis (Tretina, Gotia, Mann, & Silva, 2015). Huber et al recently showed that the presence of AL in cells infected with *Theileria annulata* is very specific to infection with this intracellular pathogen, as bovine tumour cells of the same genetic background were found to contain few, if any, AL in the absence of parasite infection. Indeed, the authors of this study considered the possibility that the interactions occurring at the tight interface between *Theileria annulata* and AL might play a role in the induction of cell proliferation by this parasite (Huber et al., 2020).

6 | CONCLUSION AND FUTURE DIRECTIONS

Important data have recently been obtained concerning the dynamics and functions of AL in embryonic or proliferating cells. Moreover, the involvement of these structures in the infectious cycles of several intracellular pathogens is becoming increasingly evident, as their induction and/or accumulation is frequently detected in infected cells. However, their role, which remains largely elusive, may be of a different nature in different infections, depending on the type of pathogen. Their involvement in the host-cell membrane rearrangements induced by many viruses and in cell cycle manipulation by certain pathogens requires confirmation and further investigation. Given their potential role in some of the regulatory mechanisms in cells, they may also be involved in other types of host/pathogen interactions, which require further study with molecular and cell imaging approaches. In these

future studies, it will be important to use electron microscopy, the gold standard method for visualising AL in infected cells.

ACKNOWLEDGEMENT

Our work on viral hepatitis and emerging infectious diseases is supported by grants from Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales-Maladies Infectieuses Emergentes, France. We thank Elodie Beaumont and Pauline Ferraris for their assistance in the HCV infection experiments performed several years ago. We thank Sandrine Belouard and co-workers for our recent collaborative project on SARS-CoV-2/host cell interactions.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Sébastien Eymieux performed EM observations and wrote the manuscript; Emmanuelle Blanchard performed EM observations and revised the manuscript; Rustem Uzbekov performed EM observations and revised the manuscript; Christophe Hourieux drafted the figure and revised the manuscript; Philippe Roingeard designed the study, performed EM observations and wrote the manuscript. All authors approved the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed in this review.

ORCID

Sébastien Eymieux  <https://orcid.org/0000-0002-4738-510X>

Emmanuelle Blanchard  <https://orcid.org/0000-0002-9541-5190>

Philippe Roingeard  <https://orcid.org/0000-0001-9131-3341>

REFERENCES

- Ahlqvist, J., Donati, D., Martinelli, E., Akhyani, N., Hou, J., Major, E. O., ... Fogdell-Hahn, A. (2006). Complete replication cycle and acquisition of tegument in nucleus of human herpesvirus 6A in astrocytes and in T-cells. *Journal of Medical Virology*, 78, 1542–1553.
- Binggeli, M. F. (1959). Abnormal intranuclear and cytoplasmic formations associated with a chemically induced, transplantable chicken sarcoma. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 5, 143–152.
- Blanchard, E., & Roingeard, P. (2015). Virus-induced double-membrane vesicles. *Cellular Microbiology*, 17, 45–50.
- Bojkova, D., Klann, K., Koch, B., Widera, M., Krause, D., Ciesek, S., ... Münch, C. (2020). Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature*, 583, 469–472.
- Boulware, M. J., & Marchant, J. S. (2005). IP3 receptor activity is differentially regulated in endoplasmic reticulum subdomains during oocyte maturation. *Current Biology*, 15, 765–770.
- Boulware, M. J., & Marchant, J. S. (2008). Nuclear pore disassembly from endoplasmic reticulum membranes promotes Ca^{2+} signalling competency. *The Journal of Physiology*, 586, 2873–2888.
- Caldas, L. A., Azevedo, R. C., da Silva, J. L., & de Souza, W. (2020). Microscopy analysis of Zika virus morphogenesis in mammalian cells. *Scientific Reports*, 10, e8370.
- Cardinali, G., Gentile, M., Cirone, M., Zompetta, C., Frati, L., Faggioni, A., & Torrisi, M. R. (1998). Viral glycoproteins accumulate in newly formed annulate lamellae following infection of lymphoid cells by human herpesvirus 6. *Journal of Virology*, 72, 9738–9746.
- Chakraborty, P., Wang, Y., Wei, J. H., van Deursen, J., Yu, H., Malureanu, L., ... Fontoura, B. M. (2008). Nucleoporin levels regulate cell cycle progression and phase-specific gene expression. *Developmental Cell*, 15, 657–667.
- Chen, T. Y., & Merisko, E. M. (1998). Annulate lamellae: Comparison of antigenic epitopes of annulate lamellae membranes with the nuclear envelope. *The Journal of Cell Biology*, 107, 1299–1306.
- Cordes, V. C., Reidenbach, S., & Franke, W. W. (1995). High content of a nuclear pore complex protein in cytoplasmic annulate lamellae of *Xenopus* oocytes. *European Journal of Cell Biology*, 68, 240–255.
- Cordes, V. C., Reidenbach, S., & Franke, W. W. (1996). Cytoplasmic annulate lamellae in cultured cells: Composition, distribution, and mitotic behavior. *Cell and Tissue Research*, 284, 177–191.
- Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., & Ellenberg, J. (2001). Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 154, 71–84.
- Davies, J. P., Almasy, K. M., McDonald, E. F., & Plate, L. (2020). Comparative multiplexed interactomics of SARS-CoV-2 and homologous coronavirus nonstructural proteins identifies unique and shared host-cell dependencies. *ACS Infectious Diseases*, 6, 3174–3189.
- De Magistris, P., & Antonin, W. (2018). The dynamic nature of the nuclear envelope. *Current Biology*, 28, R487–R497.
- Eymieux, S., Rouillé, Y., Terrier, O., Seron, K., Blanchard, E., Rosa-Calatrava, M., ... Roingeard, P. (2021). Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: A kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03745-y>. Online ahead of print.
- Ferraris, P., Beaumont, E., Uzbekov, R., Brand, D., Gaillard, J., Blanchard, E., & Roingeard, P. (2013). Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 1297–1306.
- Ferraris, P., Blanchard, E., & Roingeard, P. (2010). Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *The Journal of General Virology*, 91, 2230–2237.
- Good, M. C. (2015). Turn up the volume: Uncovering nucleus size control mechanisms. *Developmental Cell*, 33, 496–497.
- Güttinger, S., Laurell, E., & Kutay, U. (2009). Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10, 178–191.
- Hampoelz, B., Mackmul, M. T., Machado, P., Ronchi, P., Bui, K. H., Schieber, N., ... Beck, M. (2016). Pre-assembled nuclear pores insert into the nuclear envelope during early development. *Cell*, 166, 664–678.
- Hampoelz, B., Schwarz, A., Ronchi, P., Bragulat-Teixidor, H., Tischer, C., Gaspar, I., ... Beck, M. (2019). Nuclear pores assemble from nucleoporin condensates during oogenesis. *Cell*, 179, 671–686.e17.
- Huber, S., Bär, A., Epp, S., Schmuckli-Maurer, J., Eberhard, N., Humbel, B. M., ... Woods, K. (2020). Recruitment of host nuclear pore components to the vicinity of *Theileria* Schizonts. *mSphere*, 5, e00709–e00719.
- Kessel, R. G. (1983). The structure and function of annulate lamellae: Porous cytoplasmic and intranuclear membranes. *International Review of Cytology*, 82, 181–303.
- Kessel, R. G. (1992). Annulate lamellae: a last frontier in cellular organelles. *International Review of Cytology*, 133, 43–120.
- Kim, K. S., & Boatman, E. S. (1967). Electron microscopy of monkey kidney cell cultures infected with rubella virus. *Journal of Virology*, 1, 205–214.
- Klinger, M. H., Kämmerer, R., Hornei, B., & Gauss-Müller, V. (2001). Perinuclear accumulation of hepatitis A virus proteins, RNA, and particles and ultrastructural alterations in infected cells. *Archives of Virology*, 146, 2291–2307.

- Kuchay, S., Saeed, M., Giorgi, C., Li, J., Hoffmann, H. H., Pinton, P., ... Pagano, M. (2018). NS5A promotes constitutive degradation of IP3R3 to counteract apoptosis induced by hepatitis C virus. *Cell Reports*, 25, 833–840.
- Lénárt, P., & Ellenberg, J. (2003). Nuclear envelope dynamics in oocytes: From germinal vesicle breakdown to mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 88–95.
- Marshall, J. A., Borg, J., Coulepis, A. G., & Anderson, D. A. (1996). Annulate lamellae and lytic HAV infection in vitro. *Tissue & Cell*, 28, 205–214.
- Neufeldt, C. J., Joyce, M. A., Levin, A., Steenbergen, R. H., Pang, D., Shields, J., ... Wozniak, R. W. (2013). Hepatitis C virus-induced cytoplasmic organelles use the nuclear transport machinery to establish an environment conducive to virus replication. *PLoS Pathogens*, 9, e1003744.
- Palade, G. E. (1955). Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells *in situ*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1, 567–582.
- Patrizi, G., & Middelkamp, J. N. (1970). Development and changes of annulate lamellae complexes in rubella virus-infected RK-13 cells. *Journal of Ultrastructure Research*, 31, 407–423.
- Ren, H., Xin, G., Jia, M., Zhu, S., Lin, Q., Wang, X., ... Zhang, C. (2019). Postmitotic annulate lamellae assembly contributes to nuclear envelope reconstitution in daughter cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 294, 10383–10391.
- Romero-Brey, I., & Bartenschlager, R. (2014). Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses*, 6, 2826–2857.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J. Y., Chlanda, P., Haselman, U., ... Bartenschlager, R. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathogens*, 8, e1003056.
- Schooley, A., Vollmer, B., & Antonin, W. (2012). Building a nuclear envelope at the end of mitosis: Coordinating membrane reorganization, nuclear pore complex assembly, and chromatin de-condensation. *Chromosoma*, 121, 539–554.
- Scrima, R., Piccoli, C., Moradpour, D., & Capitanio, N. (2018). Targeting endoplasmic reticulum and/or mitochondrial Ca^{2+} fluxes as therapeutic strategy for HCV infection. *Frontiers in Chemistry*, 6, 73.
- Spindler, M., & Hemleben, C. (1982). Formation and possible function of annulate lamellae in a planktic foraminifer. *Journal of Ultrastructure Research*, 81, 341–350.
- Stafstrom, J. P., & Staehelin, L. A. (1984). Are annulate lamellae in the *Drosophila* embryo the result of overproduction of nuclear pore components? *The Journal of Cell Biology*, 98, 699–708.
- Steinkamp, M. P., & Hoefert, L. L. (1977). Annulate lamellae in phloem cells of virus-infected *Sonchus* plants. *The Journal of Cell Biology*, 74, 111–118.
- Swift, H. (1956). The fine structure of annulate lamellae. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2, 415–418.
- Torresi, M. R., Gentile, M., Cardinali, G., Cirone, M., Zompetta, C., Lotti, L. V., ... Faggioni, A. (1999). Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology*, 257, 460–471.
- Tretina, K., Gotia, H. W., Mann, D. J., & Silva, J. C. (2015). *Theileria*-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks. *Trends Parasitology*, 31, 8.
- Wang, J. J., Liao, C. L., Chiou, Y. W., Chiou, C. T., Huang, Y. L., & Chen, L. K. (1997). Ultrastructure and localization of E proteins in cultured neuron cells infected with Japanese encephalitis virus. *Virology*, 238, 30–39.
- Wozniak, R. W., & Goldfarb, D. S. (2008). Cyclin-like oscillations in levels of the nucleoporin Nup96 control G1/S progression. *Developmental Cell*, 15, 643–634.

How to cite this article: Eymieux S, Blanchard E, Uzbekov R, Hourieux C, Roingeard P. Annulate lamellae and intracellular pathogens. *Cellular Microbiology*. 2021;23:e13328. <https://doi.org/10.1111/cmi.13328>

d. Travail de synthèse 2

Roingeard P, **Eymieux S**, Burlaud-Gaillard J, Hourieux C, Patient R, Blanchard E. The double-membrane vesicle (DMV): a virus-induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive-sense single-stranded RNA viruses.

Cell Mol Life Sci. 2022 Jul 16;79(8):425. doi: 10.1007/s00018-022-04469-x. Epub 2022 Jul 16.

REVIEW



The double-membrane vesicle (DMV): a virus-induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive-sense single-stranded RNA viruses

Philippe Roingeard^{1,2} · Sébastien Eymieux^{1,2} · Julien Burlaud-Gaillard^{1,2} · Christophe Hourieux^{1,2} · Romuald Patient^{1,2} · Emmanuelle Blanchard^{1,2}

Received: 16 May 2022 / Revised: 16 May 2022 / Accepted: 30 June 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

Abstract

Positive single-strand RNA (+ RNA) viruses can remodel host cell membranes to induce a replication organelle (RO) isolating the replication of their genome from innate immunity mechanisms. Some of these viruses, including severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2), induce double-membrane vesicles (DMVs) for this purpose. Viral non-structural proteins are essential for DMV biogenesis, but they cannot form without an original membrane from a host cell organelle and a significant supply of lipids. The endoplasmic reticulum (ER) and the initial mechanisms of autophagic processes have been shown to be essential for the biogenesis of SARS-CoV-2 DMVs. However, by analogy with other DMV-inducing viruses, it seems likely that the Golgi apparatus, mitochondria and lipid droplets are also involved. As for hepatitis C virus (HCV), pores crossing both membranes of SARS-CoV-2-induced DMVs have been identified. These pores presumably allow the supply of metabolites essential for viral replication within the DMV, together with the export of the newly synthesized viral RNA to form the genome of future virions. It remains unknown whether, as for HCV, DMVs with open pores can coexist with the fully sealed DMVs required for the storage of large amounts of viral RNA. Interestingly, recent studies have revealed many similarities in the mechanisms of DMV biogenesis and morphology between these two phylogenetically distant viruses. An understanding of the mechanisms of DMV formation and their role in the infectious cycle of SARS-CoV-2 may be essential for the development of new antiviral approaches against this pathogen or other coronaviruses that may emerge in the future.

Keywords COVID-19 · SARS-CoV-2 · Positive-sense single-stranded RNA virus · Virus/cell interactions · Double-membrane vesicle · Replication organelle

Introduction

Positive single-strand RNA (+ RNA) viruses use their genomes directly as messenger RNA, producing a polyprotein from which the various viral proteins required for replication are derived. One of these proteins is the RNA-dependent RNA polymerase, which copies the + RNA genome to

form a double-stranded (dsRNA) replicative template that is used to generate more + RNA for the translation of viral proteins and to constitute the genome of newly synthesized virions. The replication of + RNA viruses takes place in the cytoplasm, potentially exposing the viral RNA, and the replication intermediate constituted by a dsRNA in particular, to mechanisms of innate immunity engaged by the host cell [1, 2]. However, + RNA viruses have developed clever strategies for protecting themselves from such host cell defense mechanisms. The assembly of viral replication complexes involves associations with the cytoplasmic membranes of the host cell, with the virus manipulating host cell factors to induce the extensive remodeling of these membranes, thereby isolating viral replication from cell sensors. Virus-induced cellular organelles called replication organelles (ROs) are produced to concentrate the viral proteins and certain host

✉ Philippe Roingeard
philippe.roingeard@univ-tours.fr

¹ INSERM U1259, Faculté de Médecine, Université François Rabelais de Tours and CHRU de Tours, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France

² Plate-Forme IBiSA de Microscopie Electronique, Université de Tours and CHRU de Tours, Tours, France

cell factors essential for viral replication together in the same specific compartment, while isolating them from the rest of the cytoplasm. Some + RNA viruses, such as coronaviruses [3, 4], picornaviruses, including poliovirus, which is the most studied member of this family [5, 6], arteriviruses [7, 8], and noroviruses [9], induce a typical organelle called a double-membrane vesicle (DMV). This is also the case for the hepatitis C virus (HCV), which is, curiously, the only member of the Flaviviridae family known to induce DMVs, all other members of this family instead inducing single-membrane spherules generated by membrane invagination [10, 11]. Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2), the causal agent responsible for the

COVID-19 pandemic, was recently shown to induce such DMVs, like other members of the coronavirus family [12, 13]. DMVs are vesicles delimited by two closely associated concentric membranes. They are easily identifiable by electron microscopy (EM) in SARS-CoV-2-infected cells and are frequently observed in very large numbers, occupying a large portion of the cytoplasm (Fig. 1).

Morphogenesis and spatial organization of DMVs

All the DMVs induced by these different viruses are relatively similar in size (100–300 nm in diameter), but they display significant variations of spatial organization with

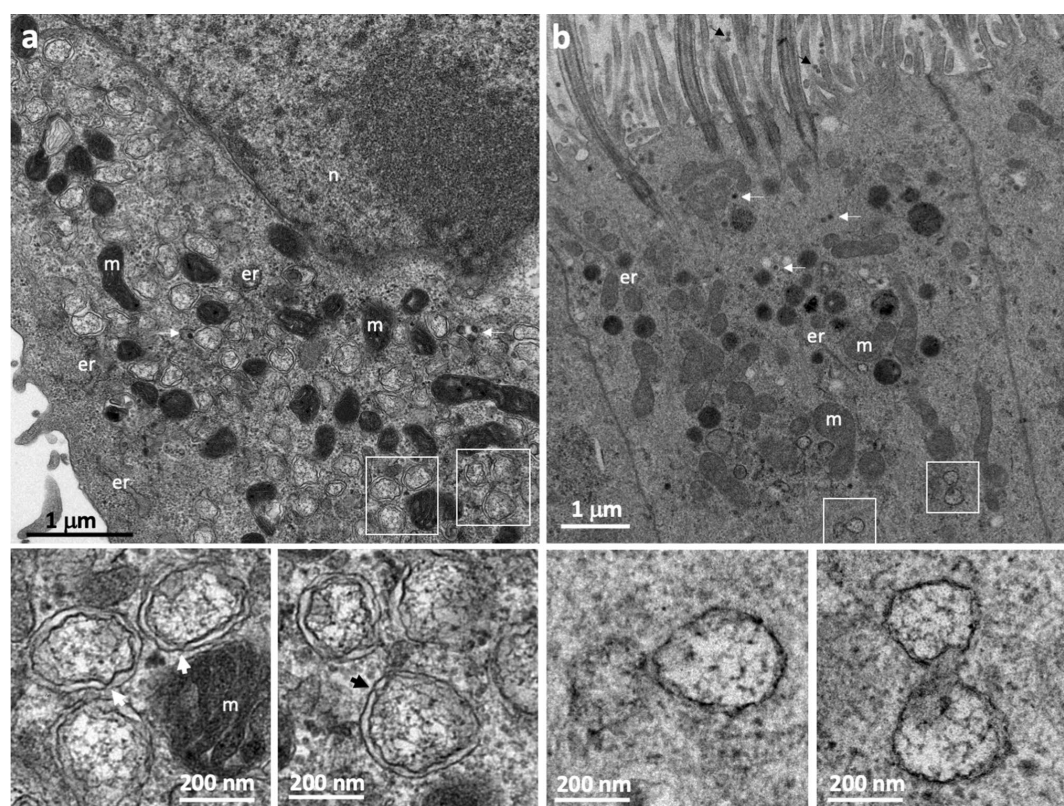


Fig. 1 Morphology of the DMVs induced by SARS-CoV-2 (Wuhan strain) in Vero E6 cells (**a**) and cultured primary respiratory epithelium (**b**). The areas outlined by the white squares in **a** and **b** are shown at higher magnification in the lower panels. In both cases, the double membrane delineating the interior of the vesicle is visible. However, these two concentric membranes are separated by a wider space in Vero cells than in primary cultures of respiratory epithelium. The wider spacing of the two membranes in Vero cells makes it possible to identify the points of contact between the two membranes (large arrows on the high magnification images shown in the lower

panels of **a**), probably corresponding to pores crossing the two membranes and allowing exchanges with the cytoplasm. These ultrastructural differences cannot be attributed to technical artifacts, as these two cell preparations were fixed and prepared for EM with the same protocol (described in detail in [13]). The small white arrows in **a** and **b** indicate the presence of virus particles, formed in the ERGIC compartment (intermediate between the ER and the Golgi apparatus). Some viruses secreted at the apical pole of the primary respiratory epithelium cells are also identified by small black arrows in **b**. *m* mitochondria; *er* endoplasmic reticulum; *n* nucleus

the cytoplasm. The DMVs induced by arteriviruses appear to be closed compartments with outer membranes that are frequently connected to other virus-induced membrane structures or to the endoplasmic reticulum (ER), leading to the establishment of large reticulovesicular membrane networks [7, 8]. By contrast, picornavirus-induced DMVs are disconnected structures often observed in an open vase-like configuration [5, 6]. The DMVs induced by HCV [11] and noroviruses [9] seem to be organized in an intermediate manner. Furthermore, these viruses often induce other membrane structures that may appear at different stages of infection and probably correspond to precursor forms of DMVs. Thus, the morphology of picornavirus membrane rearrangements gradually changes during the course of viral infection, suggesting that this morphology is dynamic and undergoes a form of maturation. For poliovirus and coxsackie virus, another member of the picornavirus family, membrane remodeling begins with the formation of single-membrane structures, which are progressively transformed into DMVs [5, 6]. It has been suggested that these single-membrane structures initially form flattened cisternae that then curve to form DMVs. The presence of single-membrane vesicle clusters early in infection has also been observed for HCV, suggesting the possibility of a similar mechanism for the morphogenesis of the DMVs induced by this virus [14]. It is difficult to determine in which of these elements viral RNA replication actually occurs. The subcellular distribution of major viral components does not always provide a clear answer to this question, as only a small fraction of the structures in place may be engaged in active replication at a given time. Thus, experiments involving the metabolic labeling of newly synthesized viral RNA have shown that DMVs are, indeed, active sites of viral RNA synthesis for HCV [15], but there are probably differences between DMV-inducing viruses. For picornaviruses, the single-membrane structures seem to constitute the site of active replication, as these structures predominate at the peak of viral replication [6, 16, 17].

For SARS-CoV-2, discreet single-membrane vesicle clusters present at the very start of infection may serve as the precursors of DMVs [13]. However, for both coronaviruses and HCV, DMVs are clearly the site of active viral RNA synthesis, as suggested by experiments based on the metabolic labeling of newly synthesized viral RNA within the DMVs [12], and the correlation between the number of intracellular DMVs and viral replication rates [13]. Nevertheless, these experiments involving metabolic labelling have not demonstrated unequivocally whether replication takes place inside the DMVs, as newly synthesized RNA was observed both inside and outside the DMVs. The first DMVs are formed within 4 h of infection in SARS-CoV-2-infected cells [13, 18]. DMVs then rapidly become observable over large areas of the cytoplasm and are sometimes connected to the ER

membrane, suggesting that the ER is probably the main source of membranes for DMVs, at least at the beginning of the infection [13, 18]. The primary targets of SARS-CoV-2 infection are nasal and respiratory epithelial cells, which form polarized monolayers with distinct apical and basolateral domains. Cultured primary respiratory epithelial cells are the closest model to the target tissues of SARS-CoV-2, but the Vero cell line, a monkey kidney epithelial cell line that is very easy to grow in the laboratory, has proved extremely valuable for improving our understanding of the cell biology of coronaviruses [3, 4, 12, 13]. The influence of cell type on the biogenesis of membrane rearrangements has not been studied, but minor morphological differences have been observed between these rearrangements in the two cell types (Fig. 1).

Role of viral proteins in DMV formation

The molecular composition of SARS-CoV-2 DMVs has yet to be determined, but studies on other coronaviruses, such as SARS-CoV and the Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus, have shown that viral non-structural proteins play a key role in DMV formation. Coronaviruses have one of the largest known genomes among RNA viruses, ranging from 27 to 32 kb in length, and encode for 22–29 proteins, including at least 16 non-structural proteins (nsp). For the SARS-CoV, two of these nsp (nsp3 and nsp4) are particularly involved in DMV formation, as the interaction between the luminal loops of nsp3 and nsp4 has been shown to be important for initiating host cell membrane rearrangements [19]. Moreover, the expression of nsp3 and nsp4 is sufficient to induce DMV formation [20, 21]. Nsp3 is a multidomain protein with a papain-like activity and nsp4 is thought to anchor into a host-cell membrane the viral replication complex (or replisome) made of at least 9 other non-structural proteins [22]. Similarly, their functional equivalents in arteriviruses, the non-structural proteins nsp2 and nsp3, have also been shown to be necessary and sufficient for DMV formation [23]. This is also the case for two non-structural proteins of the poliovirus, 2BC and 3A [24]. For some viruses, the expression of a single non-structural protein seems to be sufficient for DMV formation. For HCV, whose genome encodes for a more limited number of non-structural proteins, the HCV RNA-dependent RNA polymerase (NS5A) is the sole viral protein required for this phenomenon [11]. Nevertheless, the DMVs observed following the expression of the minimal set of proteins required for vesicle formation are not entirely the same as those observed during a viral infection, indicating that additional factors may have a strong influence on DMV biogenesis. For example, other non-structural proteins, such as NS4B [25] and NS5B [11], participate in the formation of HCV-induced DMVs. This is also the case for the nsp6

protein of SARS-CoV [20], the NS1-2 and NS3 proteins of noroviruses [9] and the nsp5 protein of arteriviruses [26]. Moreover, other models of +RNA viruses have shown that replicating viral RNA is also a major player in the biogenesis of virus-induced membrane rearrangements [27].

Origin of the host cell membranes used for DMV formation

Studies on SARS-CoV-infected Vero cells have revealed that the DMVs are sometimes seen to be continuous with the ER, suggesting that DMVs are derived from the host ER membrane [14], as reported for HCV [11] and norovirus [9]. Recent studies with various cell types, including Vero cells and lung epithelial cells, have reported similar observations for SARS-CoV-2 [18]. However, markers of other organelles, including the Golgi apparatus, have also been identified in poliovirus DMVs [28]. Cocksackie viruses, which, like poliovirus, are picornaviruses, induce a remodeling of both ER and Golgi apparatus membranes [29]. Interestingly, one study based on computational analysis suggested that SARS-CoV-2 viral RNA may also localize to mitochondria [30], raising the possibility that SARS-CoV-2 may also remodel mitochondrial membranes to generate mitochondrion-derived DMVs. This possibility was further analyzed in a functional analysis of host cell proteins binding to SARS-CoV-2 RNA, which confirmed a physical and functional connection between SARS-CoV-2 and mitochondria [31]. EM images, such as that shown in Fig. 1a, in which large numbers of mitochondria are observed in close proximity to DMVs, support this hypothesis, which nevertheless remains to be confirmed, as a potential role for mitochondria in DMV biogenesis is to date based on indirect experiments.

Like mitochondria, autophagosomes are surrounded by a double membrane and a role for these organelles in the biogenesis of coronavirus membrane remodeling has been suggested [32]. Autophagy is part of the endogenous cell substrates recycling machinery and innate immunity strategies by targeting intracellular pathogens to lysosomes for degradation. Although many viruses have developed strategies to counteract the antiviral functions of the autophagy pathway, some of them on the contrary have acquired mechanisms to exploit specific functions of the host cell factors involved in this process, to promote viral replication [33]. Thus, the biogenesis of virus-induced DMVs is probably dependent on cellular factors essential for autophagosome formation. In the murine hepatitis virus (MHV), another coronavirus, and SARS-CoV-infected Vero cells, the viral replicase protein, nsp8, colocalizes with the autophagosome marker LC3 [34, 35]. LC3 also colocalizes with the viral replicases of many other DMV-inducing viruses, including arteriviruses [36] and HCV [37]. The isolation of HCV DMVs by cell fractionation and biochemical analysis showed that LC3 was

present in the membranes of these vesicles [10]. In MHV-infected cells, two viral proteins that localize to the replication complex (p22 and N) were also found to be colocalized with LC3, and with ATG12, which, together with ATG5, promotes LC3 lipidation, an important step in autophagosome formation. However, while this study on MHV showed that LC3 was essential for viral replication, it also demonstrated that LC3 lipidation was not strictly necessary [35]. This finding suggests that DMV biogenesis is facilitated by the mechanisms underlying autophagosome formation, but not to the extent of lysosomal targeting and fusion. A recent study confirmed that an incomplete autophagy response is a feature of SARS-CoV-2 infection [38]. The expression of SARS-CoV-2 ORF3a was sufficient to trigger incomplete autophagy, in which autophagosome formation was induced but autophagosome maturation was impaired. It has also been shown that the lipid phosphatidic acid (PA) produced by acylglycerol phosphate acyltransferase (AGPAT) 1 and 2 activity in the ER is essential not only for autophagic vesicle formation, but also for the biogenesis of HCV- and SARS-CoV-2-induced DMVs [39]. Both these viruses also exploit other common factors involved in autophagosome formation, including class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), but without activating conventional autophagy pathways [40]. All these results suggest that SARS-CoV-2 and HCV can exploit autophagosome formation mechanisms to support DMV biogenesis, while blocking lysosome fusion to escape complete autophagy-mediated degradation. These observations reinforce the link between autophagy and DMV formation, revealing unexpected similarities in the mode of operation of two phylogenetically very different viruses [39, 40].

Lipid synthesis and redistribution for DMV biogenesis

The induction of host lipid synthesis by DMV-inducing viruses is required to provide the lipids necessary for these major membrane rearrangements [41]. Sharp differences in lipid composition have been found between the membranes of DMV and the ER membrane from which they are derived. For example, HCV-induced DMVs contain nine times more cholesterol than host cell ER membranes [15], and they are also enriched in phosphatidylinositol-4-phosphate, PI4P [42]. An enrichment in phosphatidylcholine [43] and sphingomyelin [44] has also been observed in the membranes of HCV-induced DMVs. A lipidomic study on cells infected with a benign human coronavirus, coronavirus 229E, revealed global alterations to total intracellular lipid composition, with an increase in the levels of fatty acids and glycerophospholipid [45]. A recent functional analysis of a SARS-CoV-2/host protein interactome demonstrated a dependence of SARS-CoV-2 on host factors involved in cholesterol biosynthesis [46].

In addition to regulating lipogenesis, viral infection can also redistribute host cell lipids from other organelles. Connections between DMVs and host organelles have been observed at membrane contact sites (MCSs) [41]. MCSs are formed when the membranes of different organelles are in close proximity, but not close enough to achieve membrane fusion. Specific protein complexes act on these closely apposed membranes to regulate these MCSs. These complexes include lipid transport proteins (LTPs), which facilitate non-vesicular lipid transport between the two membranes [41]. For example, the Golgi-localized oxysterol-binding protein (OSBP) transports newly synthesized cholesterol from the ER to the Golgi apparatus at MCSs in a counter-exchange mechanism in which the phospholipid PI4P is transferred from the Golgi apparatus to the ER. This PI4P-cholesterol counterflow mechanism can be hijacked for the benefit of viral replication. Poliovirus [47] and HCV [48] hijack OSBP by recruiting PI4-kinase (PI4K) within their DMVs. The viral recruitment of PI4K thus leads to an enrichment of DMVs in PI4P, increasing OSBP recruitment, with PI4P-cholesterol counterexchange at ER contacts then providing cholesterol for the new membranes. There are four PI4K isoforms in human cells. Picornaviruses, such as coxsackieviruses, recruit PI4KIII β [49] to generate PI4P for the recruitment of OSBP. This exploitation of the MCS machinery to provide OSBP/PI4P-dependent cholesterol transport from the ER to DMVs is essential for viral replication [50]. Other picornaviruses and HCV recruit OSBP via PI4KIII α [51]. The HCV NS5A protein binds to and activates PI4KIII α , increasing PI4P levels on DMVs [42]. The structure of HCV DMVs is strongly altered by OSBP/PI4K depletion, suggesting that the action of OSBP is important for the structural characteristics of DMVs. The SARS-CoV-2 protein nsp4 was recently shown to interact with OSBP and PI4KIII β [52], suggesting that SARS-CoV-2 may also use OSBP-mediated lipid exchange to enrich its DMVs in cholesterol.

The exploitation of cellular lipid stores is another strategy of viruses that hijack host lipid transport mechanisms. Cholesterol is esterified in the ER transport to lipid droplets (LDs), dynamic organelles in which neutral lipids are stored, synthesized and mobilized according to cellular needs. Picornaviruses inhibit cholesterol esterification, preventing its transport to LDs, thereby increasing the availability of cellular cholesterol for use in DMVs [53]. They also induce the formation of MCSs between DMVs and existing LDs, providing platforms for fatty acid transport to DMVs. EM studies have shown that poliovirus and coxsackievirus DMVs form MCSs with LDs [29]. The inhibition of LD lipolysis disrupts both DMV formation and picornavirus replication, suggesting an important role for LDs in providing essential lipids for DMV biogenesis [54, 55]. HCV infection causes a subcellular redistribution of LDs [54], and DMVs

are frequently observed in close proximity to LDs [56, 57]. However, for HCV, LDs have a role beyond contributing to lipid flow for DMV formation, as they also constitute an assembly platform for virus particle morphogenesis [58, 59]. Recent studies have suggested a possible role for LDs in the infectious cycle of SARS-CoV-2, as the viral capsid protein drives diacylglycerol acyltransferase (DGAT) gene expression to facilitate LD formation and associates with the adipocyte differentiation-related protein (ADRP) on the LD surface [60]. Another study has suggested that, like HCV, SARS-CoV-2 may also use LDs as assembly platforms [61]. However, our EM observations, and those of other groups, did not confirm a preferential juxtaposition of DMVs with LDs or the presence of SARS-CoV-2 virus particles close to LDs (Fig. 1). Further studies will be required to clarify the role of LDs in the various steps of the SARS-CoV-2 infectious cycle.

DMV functions

DMVs have a protective function, by concealing viral replication intermediates from cellular sensors. This was demonstrated with the HCV model, in which immune sensors for dsRNA, such as RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) and MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5), were found to have a limited effect when dsRNA was present in DMVs [62]. In the poliovirus model, virus-induced membrane rearrangements have also been shown to have a vital function in protecting viral RNA from immune sensors [63]. However, it is unclear whether the presence of a double membrane is truly necessary for this protection, as several + RNA viruses induce membrane remodeling to generate single-membrane spherules through invagination, with similar effects [64]. DMVs also have large outer membrane surfaces to which replication complexes could potentially be anchored, but it seems more likely that replication occurs in association with the inner membrane facing the cytosolic interior of the DMV. This would clearly provide an isolated environment, which would be ideal for viral replication. A recent 3D tomographic cryo-EM study of SARS-CoV-2 infected cells showed that the interior of DMVs contained branched filamentous structures resembling dsRNAs [65]. However, such a compartment would need to remain capable of exchanging material with the cytosol, for the import of metabolites and the export of viral RNA for translation and encapsidation into newly synthesized virions. Closed DMVs with no apparent opening to the surrounding cytosol have regularly been observed in infected cells. In the case of picornaviruses, completely sealed DMVs coexist with open DMVs, which are probably their precursors. Completely sealed DMVs may represent the final stage, with which large amounts of viral RNA isolated in these structures to prevent contact with cellular sensors.

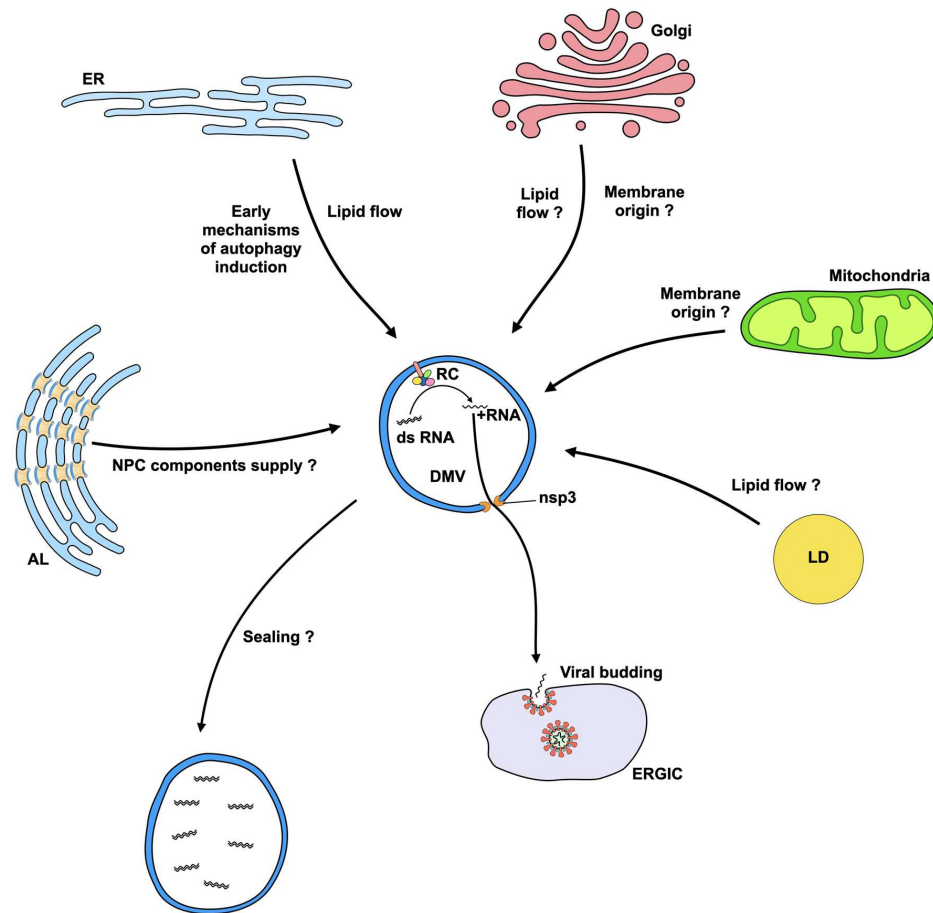


Fig. 2 Model for SARS-CoV-2 DMV biogenesis and role of this virus-induced organelle in the viral life cycle. *AL* annulate lamella; *ER* endoplasmic reticulum; *ERGIC* ER-Golgi intermediate compart-

ment; *LD* lipid droplet; *NPC* nuclear pore complex; *nsp3* non-structural protein 3; *RC* replication complex

In the HCV model, in which only DMVs are encountered at peak viral replication, sealed DMVs seem to coexist with pore-containing DMVs (about 10% of the total) capable of exchanges with the cytoplasm [11]. It is, therefore, conceivable that productive viral RNA synthesis occurs within DMVs containing pores that eventually become sealed to isolate and store the excess viral RNA accumulated during infection. Cryo-EM experiments have recently shown that MHV- and SARS-CoV-2-induced DMVs, like those of HCV, have pores that span the double membrane, allowing the transport of newly synthesized viral RNA out of the DMV for translation and packaging into viral particles [66]. The nsp3 protein has been shown to be a major constituent of

these pores, but the possibility of host cell factors also contributing to the formation of these pores cannot be excluded [66]. Despite having a lower resolution than cryo-EM, conventional EM studies have suggested that pores are present in SARS-CoV-2-induced DMVs (lower panels of Fig. 1a). Interestingly, components of the host cell nuclear transport machinery associated with DMVs have been shown to play a key role in protecting HCV-infected cells from innate immune sensors [62]. No such mechanism has yet been demonstrated for SARS-CoV-2, but the presence of annulate lamellae—storage forms of nuclear pore complexes (NPC) anchored in host cell membranes—has been shown to be an ultrastructural feature of infected cells for both these

viruses [13, 67, 68]. This finding suggests a potential role for annulate lamellae, via the NPC components they contain, in the biogenesis of HCV- and SARS-CoV-2-induced DMVs or in the establishment of the pores crossing the DMV membranes. Interestingly, the potential involvement of NPC components in the DMV pores could suggest that these pores may also have a dynamic opening and closing function, as for NPCs.

Conclusion

SARS-CoV-2, like other + RNA viruses, hijacks the organization and biogenesis of host cell membranes to form DMVs, in which its replication complexes are anchored. Figure 2 summarizes the mechanisms demonstrated or suspected to contribute to the biogenesis of SARS-CoV-2 DMVs and their potential role. Despite SARS-CoV-2 and HCV are phylogenetically unrelated, the DMVs of these two viruses are very similar. It will be interesting to determine in future studies whether the original observations made with the HCV model, such as the co-existence of pore-containing and sealed DMVs or the role of host cell NPC components in the biogenesis and/or function of DMVs, also apply to SARS-CoV-2. The anchoring of viral replication complexes to the inner membrane of DMVs and their direction toward the lumen of these DMVs are strongly suspected but have never been strictly demonstrated. Further studies of these aspects are therefore required. It will also be important to study the initial formation of these DMVs, at the beginning of the infection, and the transport of the newly synthesized viral RNA through the pores of the DMVs for constitution of the genome of future viral particles. These investigations could help to drive the design of new antiviral strategies against SARS-CoV-2 and other coronaviruses that might emerge in the future based on the inhibition of this replication organelle. In addition, molecular dynamics simulations by computational approaches that have been recently used to model the formation of a double membrane [69] could also help to reach this objective.

Author contributions PR designed the manuscript. PR, SE, JBG and EB were involved in electron microscopy observations. PR wrote the first draft. SE, JBG, CH, RP and EB reviewed and edited the paper. CH designed the model. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Our research is supported by the University of Tours and INSERM, France.

Availability of data and material Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors have no relevant financial and non-financial interests to disclose.

Ethical approval and consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

References

- Blanchard E, Roingeard P (2015) Virus-induced double-membrane vesicles. *Cell Microbiol* 17:45–50
- Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, Bárcena M (2020) Double-membrane vesicles as platforms for viral replication. *Trends Microbiol* 28:1022–1033
- Knoops K, Kikkert M, Worm SH, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* 6:e226
- de Wilde AH, Raj VS, Oudshoorn D, Bestebroer TM, van Nieuwkoop S, Limpens RWAL, Posthuma CC, van der Meer Y, Bárcena M, Haagmans BL, Snijder EJ, van den Hoogen BG (2013) MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- α treatment. *J Gen Virol* 94:1749–1760
- Limpens RW, van der Schaar HM, Kumar D, Koster AJ, Snijder EJ, van Kuppeveld FJ, Bárcena M (2011) The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *MBio* 2:e00166-11
- Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E (2012) Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol* 86:302–312
- Knoops K, Bárcena M, Limpens RW, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ (2012) Ultrastructural characterization of arterivirus replication structures: reshaping the endoplasmic reticulum to accommodate viral RNA synthesis. *J Virol* 86:2474–2487
- Zhang W, Chen K, Zhang X, Guo C, Chen Y, Liu X (2018) An integrated analysis of membrane remodeling during porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and assembly. *PLoS ONE* 13:e0200919
- Doerflinger SY, Cortese M, Romero-Brey I, Menne Z, Tubiana T, Schenk C, White PA, Bartenschlager R, Bressanelli S, Hansman GS, Lohmann V (2017) Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLoS Pathog* 13:e1006705
- Ferraris P, Blanchard E, Roingeard P (2010) Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* 91:2230–2237
- Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R (2012) Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 8:e1003056
- Snijder EJ, Limpens RWAL, de Wilde AH, de Jong AWM, Zevenhoven-Dobbe JC, Maier HJ, Faas FFGA, Koster AJ, Bárcena M (2020) A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol* 18:e3000715
- Eymieux S, Rouillé Y, Terrier O, Seron K, Blanchard E, Rosa-Calatrava M, Dubuisson J, Belouzard S, Roingeard P (2021)

- Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. *Cell Mol Life Sci* 78:3565–3576
14. Ferraris P, Beaumont E, Uzbekov R, Brand D, Gaillard J, Blanchard E, Roingeard P (2013) Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection. *Cell Mol Life Sci* 70:1297–1306
 15. Paul D, Hoppe S, Saher G, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R (2013) Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *J Virol* 87:10612–10627
 16. Melia CE, van der Schaar HM, de Jong AWM, Lyoo HR, Snijder EJ, Koster AJ, van Kuppeveld FJM, Bárcena M (2018) The origin, dynamic morphology, and PI4P-independent formation of encephalomyocarditis virus replication organelles. *MBio* 9:e00420-18
 17. Melia CE, van der Schaar HM, Lyoo H, Limpens RWAL, Feng Q, Wahedi M, Overheul GJ, van Rij RP, Snijder EJ, Koster AJ, Bárcena M, van Kuppeveld FJM (2017) Escaping host factor PI4KB inhibition: enterovirus genomic RNA replication in the absence of replication organelles. *Cell Rep* 21:587–599
 18. Cortese M, Lee JY, Cerikan B, Neufeldt CJ, Oorschot VMJ, Köhrer S, Hennies J, Schieber NL, Ronchi P, Mizzon G, Romero-Brey I, Santarella-Mellwig R, Schorb M, Boermel M, Mocaer K, Beckwith MS, Templin RM, Gross V, Pape C, Tischer C, Frankish J, Horvat NK, Laketa V, Stanifer M, Boulant S, Ruggieri A, Chatel-Chaix L, Schwab Y, Bartenschlager R (2020) Integrative imaging reveals SARS-CoV-2-induced reshaping of subcellular morphologies. *Cell Host Microbe* 28:853–866.e5
 19. Hagemeijer MC, Monastyrska I, Griffith J, van der Sluijs P, Voortman J, van Bergen en Henegouwen PM, Vonk AM, Rottier PJ, Reggiori F, de Haan CA (2014) Membrane rearrangements mediated by coronavirus nonstructural proteins 3 and 4. *Virology* 458–459:125–135
 20. Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ (2013) Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *MBio* 4:e00524-13
 21. Oudshoorn D, Rijs K, Limpens RWAL, Groen K, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Bárcena M (2017) Expression and cleavage of Middle East respiratory syndrome coronavirus nsp3–4 polyprotein induce the formation of double-membrane vesicles that mimic those associated with coronaviral RNA replication. *MBio* 8:e01658-17
 22. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA (2020) The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem* 295:12910–12934
 23. Snijder EJ, van Tol H, Roos N, Pedersen KW (2001) Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. *J Gen Virol* 82:985–994
 24. Suhay DA, Giddings TH Jr, Kirkegaard K (2000) Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol* 74:8953–8965
 25. Paul D, Madan V, Ramirez O, Bencun M, Stoeck IK, Jirasko V, Bartenschlager R (2018) Glycine zipper motifs in hepatitis C virus nonstructural protein 4B are required for the establishment of viral replication organelles. *J Virol* 92:e01890-e1917
 26. van der Hoeven B, Oudshoorn D, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Bárcena M (2016) Biogenesis and architecture of arterivirus replication organelles. *Virus Res* 220:70–90
 27. Kopek BG, Settles EW, Friesen PD, Ahlquist P (2010) Nodavirus-induced membrane rearrangement in replication complex assembly requires replicase protein a, RNA templates, and polymerase activity. *J Virol* 84:12492–12503
 28. Schlegel A, Giddings TH Jr, Ladinsky MS, Kirkegaard K (1996) Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* 70:6576–6588
 29. Melia CE, Peddie CJ, de Jong AWM, Snijder EJ, Collinson LM, Koster AJ, van der Schaar HM, van Kuppeveld FJM, Bárcena M (2019) Origins of enterovirus replication organelles established by whole-cell electron microscopy. *MBio* 10:e00951-19
 30. Wu KE, Fazal FM, Parker KR, Zou J, Chang HY (2020) RNA-GPS predicts SARS-CoV-2 RNA residency to host mitochondria and nucleolus. *Cell Syst* 11:102–108.e3
 31. Flynn RA, Belk JA, Qi Y, Yasumoto Y, Wei J, Alfajaro MM, Shi Q, Mumbach MR, Limaye A, DeWeirdt PC, Schmitz CO, Parker KR, Woo E, Chang HY, Horvath TL, Carette JE, Bertozzi CR, Wilen CB, Satpathy AT (2021) Discovery and functional interrogation of SARS-CoV-2 RNA-host protein interactions. *Cell* 184:2394–2411.e16
 32. Zhao Z, Lu K, Mao B, Liu S, Trilling M, Huang A, Lu M, Lin Y (2021) The interplay between emerging human coronavirus infections and autophagy. *Emerg Microbes Infect* 10:196–205
 33. Dinesh Kumar N, Smit JM, Reggiori F (2020) Strategies employed by viruses to manipulate autophagy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 172:203–237
 34. Prentice E, Jerome WG, Yoshimori T, Mizushima N, Denison MR (2004) Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem* 279:10136–10141
 35. Reggiori F, Monastyrska I, Verheije MH, Cali T, Ulasli M, Bianchi S, Bernasconi R, de Haan CA, Molinari M (2010) Coronaviruses hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe* 7:500–508
 36. Monastyrska I, Ulasli M, Rottier PJ, Guan JL, Reggiori F, de Haan CA (2013) An autophagy-independent role for LC3 in equine arteritis virus replication. *Autophagy* 9:164–174
 37. Wang L, Kim JY, Liu HM, Lai MMC, Ou JJ (2017) HCV-induced autophagosomes are generated via homotypic fusion of phagophores that mediate HCV RNA replication. *PLoS Pathog* 13:e1006609
 38. Qu Y, Wang X, Zhu Y, Wang W, Wang Y, Hu G, Liu C, Li J, Ren S, Xiao MZX, Liu Z, Wang C, Fu J, Zhang Y, Li P, Zhang R, Liang Q (2021) ORF3a-mediated incomplete autophagy facilitates severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 replication. *Front Cell Dev Biol* 9:716208
 39. Tabata K, Prasad V, Paul D, Lee JY, Pham MT, Twu WI, Neufeldt CJ, Cortese M, Cerikan B, Stahl Y, Joecks S, Tran CS, Lichtenborg C, Vovski P, Hörmann K, Müller AC, Zitzmann C, Haselmann U, Beneke J, Kaderali L, Erfle H, Thiel V, Lohmann V, Superti-Furga G, Brügger B, Bartenschlager R (2021) Convergent use of phosphatidic acid for hepatitis C virus and SARS-CoV-2 replication organelle formation. *Nat Commun* 12:276
 40. Twu WI, Lee JY, Kim H, Prasad V, Cerikan B, Haselmann U, Tabata K, Bartenschlager R (2021) Contribution of autophagy machinery factors to HCV and SARS-CoV-2 replication organelle formation. *Cell Rep* 37:110049
 41. Wong LH, Edgar JR, Martello A, Ferguson BJ, Eden ER (2021) Exploiting connections for viral replication. *Front Cell Dev Biol* 9:640456
 42. Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, Poenisch M, Blankenburg H, Hiet MS, Longereich T, Diehl S, Ramirez F, Balla T, Rohr K, Kaul A, Bühler S, Pepperkok R, Lengauer T, Albrecht M, Eils R, Schirmacher P, Lohmann V, Bartenschlager R (2011) Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 9:32–45
 43. Zhang J, Zhang Z, Chukkapalli V, Nchoutmboue JA, Li J, Randall G, Belov GA, Wang X (2016) Positive-strand RNA viruses

- stimulate host phosphatidylcholine synthesis at viral replication sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:e1064–e1073
44. Gewaid H, Aoyagi H, Arita M, Watashi K, Suzuki R, Sakai S, Kumagai K, Yamaji T, Fukasawa M, Kato F, Hishiki T, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Hanada K, Muramatsu M, Wakita T, Aizaki H (2020) Sphingomyelin is essential for the structure and function of the double-membrane vesicles in hepatitis C virus RNA replication factories. *J Virol* 94:e01080–e1120
 45. Yan B, Chu H, Yang D, Sze KH, Lai PM, Yuan S, Shuai H, Wang Y, Kao RY, Chan JF, Yuen KY (2019) Characterization of the lipidomic profile of human coronavirus-infected cells: implications for lipid metabolism remodeling upon coronavirus replication. *Viruses* 11:73
 46. Hoffmann HH, Sánchez-Rivera FJ, Schneider WM, Luna JM, Soto-Feliciano YM, Ashbrook AW, Le Pen J, Leal AA, Ricardo-Lax I, Michailidis E, Hao Y, Stenzel AF, Peace A, Zuber J, Allis CD, Lowe SW, MacDonald MR, Poirier JT, Rice CM (2021) Functional interrogation of a SARS-CoV-2 host protein interactome identifies unique and shared coronavirus host factors. *Cell Host Microbe* 29:267–280.e5
 47. Arita M (2014) Phosphatidylinositol-4 kinase III beta and oxysterol-binding protein accumulate unesterified cholesterol on poliovirus-induced membrane structure. *Microbiol Immunol* 58:239–256
 48. Wang H, Perry JW, Luring AS, Neddermann P, De Francesco R, Tai AW (2014) Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology* 146:1373–1385
 49. Hsu NY, Ilytska O, Belov G, Santiana M, Chen YH, Takvorian PM, Pau C, van der Schaar H, Kaushik-Basu N, Balla T, Cameron CE, Ehrenfeld E, van Kuppeveld FJ, Altan-Bonnet N (2010) Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 141:799–811
 50. Altan-Bonnet N (2017) Lipid tales of viral replication and transmission. *Trends Cell Biol* 27:201–213
 51. Dorobantu CM, Albulescu L, Harak C, Feng Q, van Kampen M, Strating JR, Gorbalenya AE, Lohmann V, van der Schaar HM, van Kuppeveld FJ (2015) Modulation of the host lipid landscape to promote RNA virus replication: the picornavirus encephalomyocarditis virus converges on the pathway used by hepatitis C virus. *PLoS Pathog* 11:e1005185
 52. St-Germain JR, Astori A, Samavarchi-Tehrani P, Abdouni H, Macwan V, Kim D-K, Knapp JJ, Roth FP, Gingras A-C, Raught B (2020) A SARS-CoV-2 BioID-based virus-host membrane protein interactome and virus peptide compendium: new proteomics resources for COVID-19 research. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.269175>
 53. Ilytska O, Santiana M, Hsu NY, Du WL, Chen YH, Viktorova EG, Belov G, Brinker A, Storch J, Moore C, Dixon JL, Altan-Bonnet N (2013) Enteroviruses harness the cellular endocytic machinery to remodel the host cell cholesterol landscape for effective viral replication. *Cell Host Microbe* 14:281–293
 54. Viktorova EG, Nchoutmboube JA, Ford-Siltz LA, Iverson E, Belov GA (2018) Phospholipid synthesis fueled by lipid droplets drives the structural development of poliovirus replication organelles. *PLoS Pathog* 14:e1007280
 55. Laufman O, Perrino J, Andino R (2019) Viral generated inter-organelle contacts redirect lipid flux for genome replication. *Cell* 178:275–289.e16
 56. Depla M, Uzbekov R, Hourieux C, Blanchard E, Le Gouge A, Gillet L, Roingeard P (2010) Ultrastructural and quantitative analysis of the lipid droplet clustering induced by hepatitis C virus core protein. *Cell Mol Life Sci* 67:3151–3161
 57. Lee JY, Cortese M, Haselmann U, Tabata K, Romero-Brey I, Funaya C, Schieber NL, Qiang Y, Bartenschlager M, Kallis S, Ritter C, Rohr K, Schwab Y, Ruggieri A, Bartenschlager R (2019) Spatiotemporal coupling of the hepatitis C virus replication cycle by creating a lipid droplet-proximal membranous replication compartment. *Cell Rep* 27:3602–3617.e5
 58. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9:1089–1097
 59. Roingeard P, Melo RC (2017) Lipid droplet hijacking by intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 19:e12688
 60. Yuan S, Yan B, Cao J, Ye ZW, Liang R, Tang K, Luo C, Cai J, Chu H, Chung TW, To KK, Hung IF, Jin DY, Chan JF, Yuen KY (2021) SARS-CoV-2 exploits host DGAT and ADRP for efficient replication. *Cell Discov* 7:100
 61. Dias SSG, Soares VC, Ferreira AC, Sacramento CQ, Fintelman-Rodrigues N, Temerozo JR, Teixeira L, Nunes da Silva MA, Barreto E, Mattos M, de Freitas CS, Azevedo-Quintanilha IG, Manso PPA, Miranda MD, Siqueira MM, Hottz ED, Pão CRR, Bou-Habib DC, Barreto-Vieira DF, Bozza FA, Souza TML, Bozza PT (2020) Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog* 16:e1009127
 62. Neufeldt CJ, Joyce MA, Van Buuren N, Levin A, Kirkegaard K, Gale M Jr, Tyrrell DL, Wozniak RW (2016) The hepatitis C virus-induced membranous web and associated nuclear transport machinery limit access of pattern recognition receptors to viral replication sites. *PLoS Pathog* 12:e1005428
 63. Du X, Zhang Y, Zou J, Yuan Z, Yi Z (2018) Replicase-mediated shielding of the poliovirus replicative double-stranded RNA to avoid recognition by MDA5. *J Gen Virol* 99:1199–1209
 64. Romero-Brey I, Bartenschlager R (2016) Endoplasmic reticulum: the favorite intracellular niche for viral replication and assembly. *Viruses* 8:160
 65. Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, Stanifer ML, Boulant S, Bartenschlager R, Chlanda P (2020) SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun* 11:5885
 66. Wolff G, Limpens RWAL, Zevenhoven-Dobbe JC, Laugks U, Zheng S, de Jong AWM, Koning RI, Agard DA, Grünwald K, Koster AJ, Snijder EJ, Bárcena M (2020) A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science* 369:1395–1398
 67. Eymieux S, Blanchard E, Uzbekov R, Hourieux C, Roingeard P (2021) Annulate lamellae and intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 23:e13328
 68. Boson B, Mialon C, Schichl K, Denolly S, Cosset FL (2022) Nup98 is subverted from annulate lamellae by hepatitis C virus core protein to foster viral assembly. *MBio* 8:92321
 69. Bolmatov D, Carrillo JY, Sumpter BG, Katsaras J, Lavrentovich MO (2020) Double membrane formation in heterogeneous vesicles. *Soft Matter* 16:8806–8817

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

2. Discussion générale et perspectives

a. Introduction

En 2020, l'identification du SARS-CoV-2 a été un événement majeur dans le domaine de la recherche biomédicale, en particulier pour les unités de recherche en virologie. Pour la première fois dans l'Histoire, l'humanité était confrontée à un agent infectieux émergent à l'origine d'une pandémie mondiale, mais avec cette fois à sa disposition un vaste panel de techniques pour le caractériser sous tous ses aspects, en un minimum de temps. La mise au point de vaccins efficaces pour prévenir l'infection par le SARS-CoV-2, seulement un an après le début de la pandémie, illustre bien les prouesses qui ont été permises grâce aux progrès de la recherche scientifique. De fait, un grand nombre d'études sur la virulence, la contagiosité, le tropisme et le cycle viral du SARS-CoV-2, ont été publiées depuis 2020. Bien que les thématiques historiques de notre unité de recherche INSERM U1259 MAVIVH soient l'étude du VIH et des virus des hépatites, certains flavivirus émergents ou endémiques comme le virus de la dengue ou le virus Zika ont déjà fait l'objet de projets de recherche. Il était donc tout naturel pour notre laboratoire de travailler sur un virus émergent comme le SARS-CoV-2, dès les prémices de la pandémie, d'autant plus que notre unité possède un laboratoire P3. Une autre force de notre unité vient de son interconnexion avec la plateforme de microscopie, située dans les locaux du CHU de Tours. L'accès aux microscopes électroniques à transmission permet d'analyser l'ultrastructure de cellules infectées, et de décrire la morphologie des organites et des virions. De plus, plusieurs membres de notre équipe de recherche travaillent au laboratoire de virologie hospitalière du CHU, ce qui a permis d'obtenir des prélèvements respiratoires de patients infectés pour l'isolement et l'amplification du virus et de ses variants. Nous disposons donc des locaux et des outils nécessaires à l'exploration du cycle viral du SARS-CoV-2. Nous avons initié une collaboration avec l'équipe « Virologie moléculaire et cellulaire des coronavirus » (Dr Sandrine BELOUZARD) du Centre d'infection et d'immunité de l'Institut Pasteur de Lille, qui possède une grande expérience concernant les coronavirus émergents. La propagation de la souche sauvage du virus dans leur laboratoire, isolée très tôt par le groupe du Dr Manuel Rosa-Calatrava (CIRI, Lyon) à partir du prélèvement d'un des premiers patients français infectés, nous a permis de commencer nos travaux le plus rapidement possible. Il est également important de mentionner que notre équipe travaille de longue date sur la morphogénèse du virus de

l'hépatite C, et notamment la description ultrastructurale de ses organites de réplication virale. La formation de DMVs, tout à fait originale pour HCV par rapport aux autres *Flaviviridae*, est une caractéristique partagée avec les *Coronaviridae*. Nous avons ainsi pu nous appuyer sur cette expérience pour analyser le cycle du SARS-CoV-2. En tant qu'enseignants en biologie cellulaire, il est fondamental pour nous d'explorer la morphogénèse virale par le biais des interactions entre le virus et la cellule hôte, sur le plan fonctionnel mais également sur le plan structural, en décrivant les modifications des compartiments cellulaires induites par le virus. C'est dans ce contexte et par cet abord que j'ai pu initier mes travaux de thèse, dans un premier temps par une analyse globale du cycle du SARS-CoV-2, puis en se focalisant sur l'étape de sortie de la cellule hôte.

b. Cinétique de la réplication virale

Concernant notre première étude, les éléments ultrastructuraux identifiés en cellules infectées par le SARS-CoV-2 sont conformes et cohérents avec ceux décrits antérieurement pour le SARS-CoV et le MERS-CoV. Pour ces deux agents infectieux, les organites de réplication sont également structurés sous la forme d'un réseau réticulo-vésiculaire mêlant des DMVs et des CMs, et dérivés du RE. En revanche, la cinétique d'apparition des éléments du RVN semble différente entre le SARS-CoV-2 et le SARS-CoV. Dans notre étude portant sur le SARS-CoV-2, les premières DMVs isolées sont observables à partir de 6 h p.i., bien que de grands clusters de SMVs soient déjà visualisés. Dans l'étude de Knoop *et al.* de 2008 (256) sur le SARS-CoV, et bien que le modèle cellulaire soit également des Vero, les premières DMVs sont observables dès 2 h p.i., avec plusieurs centaines de DMVs dès 7 h p.i. . Cette différence de cinétique, bien que minime, est peut-être le témoin de disparités dans les interactions virus-cellule hôte entre ces deux *Sarbecovirus*, pourtant très proches phylogénétiquement. Cela est cohérent avec l'existence d'autres dissemblances concernant leurs contagiosités, leurs virulences ou la cinétique d'apparition des symptômes. Pour le MERS-CoV, l'étude de De Wilde *et al.* de 2013 (258) observe les Vero infectées à 8 h p.i. uniquement, temps pour lequel il est observé de petits clusters de DMVs, ce qui ne permet pas de conclure mais serait plus conforme avec la cinétique du SARS-CoV-2. Plus globalement et pour d'autres infections virales, il serait intéressant de comparer la vitesse de formation des ROs viraux dans les cellules, et le caractère aigu ou chronique de l'infection chez les patients. Pour le TBEV, c'est aussi la composition du réseau de réplication qui évolue, avec l'apparition de tubules

dans les cellules « chroniquement » infectées depuis 90 jours, absents des cellules infectées depuis seulement 24 h (226).

c. Réseau de réplication et mitochondries

Une fois le RVN du SARS-CoV-2 bien développé, nous avons systématiquement observé une association et un enchevêtrement avec le réseau mitochondrial des cellules infectées. Cette association a également été observée par Cortese *et al.* (385) grâce à des reconstructions tomographiques du réseau de réplication. En microscopie confocale, les mitochondries sont retrouvées accumulées en périphérie de régions riches en dsRNA. Leur ultrastructure semble altérée, avec un amincissement global, associé à un élargissement et une densification de la matrice mitochondriale. Si plusieurs études ont objectivé les relations existantes entre le SARS-CoV-2 et la mitochondrie, notamment par le biais de l'interaction de la protéine ORF9b avec TOM70 (386), celles-ci relèvent plus de mécanismes de suppression de la réponse immunitaire ou de déclenchement de l'apoptose. En revanche, il existe peu de données sur le détournement de la machinerie métabolique mitochondriale, qui pourrait être mis à profit par le virus pour favoriser sa réplication. Cette association entre réseau de réplication viral et mitochondrie est également retrouvée pour le virus de la rubéole, comme composant associé aux CPVs (240), bien qu'à la différence du RER, aucun contact physique entre les ROs et les mitochondries n'ait été visualisé.

d. Autophagie et cycle viral

A l'heure actuelle, beaucoup d'études ont montré l'importance du processus d'autophagie pour le cycle des *Coronaviridae*, et en particulier le SARS-CoV-2 (387). Comme pour d'autres modèles viraux, cette relation entre autophagie et cycle viral est ambivalente, soit comme un mécanisme de défense de la cellule pour dégrader les composants viraux, soit comme un facteur promoteur de la réplication qui va notamment permettre au virus de capter des membranes et des métabolites. Dans notre étude, nous avons mis en évidence l'accumulation progressive de structures de morphologie compatible avec de l'autophagie, sous la forme de corps multilamellaires convolutés (membrane whorls), présents en grand nombre dans près de 60 % des sections cellulaires observées à 24 h p.i. . Aux temps tardifs, ces structures membranaires évocatrices

d'autophagie sont souvent retrouvées au sein de grandes vacuoles, associées aux dizaines de particules qui sont contenues à l'intérieur (LVCV). Cette localisation plaide probablement en faveur d'un mécanisme de dégradation par l'autophagie des virions accumulés dans le cytoplasme par la cellule. L'augmentation du nombre des structures autophagiques aux temps précoces s'expliquerait potentiellement par une activation viro-induite, afin de favoriser la formation des ROs. Bien que les similarités morphologiques entre les omégasomes et les DMVs ne soient pas suffisantes pour les considérer comme précurseurs de ces dernières, des marqueurs de l'autophagie comme LC3 sont retrouvés dans les DMVs du MHV (388), indiquant *a minima* des mécanismes communs de morphogenèse et/ou l'utilisation de composants des autophagosomes pour la formation des DMVs. Dans cette optique, la stimulation de l'autophagie pourrait permettre d'amplifier la quantité de membranes dans la cellule, afin de constituer un « stock » mobilisable par le virus pour former ses ROs. Pour le SARS-CoV-2, il a récemment été montré que la protéine ORF3a bloque la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, entraînant l'accumulation d'amphisomes, forme intermédiaire entre ces deux organites (389).

e. Virions non spiculés

Dans notre étude, il était aisé aux temps tardifs de l'infection de constater une différence morphologique entre les particules du SARS-CoV-2 libérées à la membrane plasmique et celles accumulées dans les LVCV. Là où les premières apparaissent bien spiculées, les secondes sont clairement dépourvues de Spike à leur surface. En revanche, dans les cellules que nous avons observé, les particules non spiculées ont une densité électronique compatible avec la présence de la ribonucléoprotéine à l'intérieur (aspect granuleux et sombre). Par rapport aux virions spiculés, les virions non spiculés dans les vacuoles présentent une certaine hétérogénéité de forme, avec des particules virales aplaties en « forme de donut ». Ces virions non spiculés avaient déjà été observés dans les premiers articles d'analyse du cycle du SARS-CoV en microscopie électronique, dès 2003 (390). Les deux hypothèses permettant d'expliquer ces virions sont : soit une voie d'assemblage défective du fait du caractère facultatif de la protéine Spike pour l'assemblage et le bourgeonnement, soit un mécanisme de dégradation protéolytique qui décaperait les spicules. Une étude très récente de Bergner *et al.* (391) a réalisé l'observation de cellules Vero infectées par le SARS-CoV-2, grâce à la technique de la

substitution à froid avec HPF (HPF-FS), qui permet d'observer des échantillons biologiques proches de l'état natif sans les inconvénients de la cryomicroscopie. Des virions non spiculés accumulés dans des LVCV ont également été observés dans cette étude. Les auteurs se prononcent en faveur d'un mécanisme de dégradation partielle des particules virales en avançant plusieurs arguments : l'aspect moins dense de la ribonucléoprotéine des virions des LVCV par rapport aux virions extracellulaires, la densité électronique « grise » de la lumière des vacuoles se rapprochant plus de celle de lysosomes que de la lumière « blanche » des compartiments d'assemblage, l'hétérogénéité de forme des virions, l'absence d'image de bourgeonnement à la membrane des vacuoles, et l'association avec des structures membranaires dégradées. L'excellente conservation de l'ultrastructure par HPF-FS renforce sans nul doute la validité de ces observations. Nous disposons également sur notre plateforme de microscopie du matériel nécessaire pour réaliser cette technique, qui pourrait donc être utilisée pour de futures observations, afin de se rapprocher de l'état natif.

f. Annulate lamellae

La présence d'*annulate lamellae* aux temps précoces de l'infection, en quantités plus importantes dans les cellules infectées par le SARS-CoV-2 en comparaison des cellules non infectées, est un élément déjà décrit pour d'autres agents infectieux, comme nous avons pu le discuter dans notre premier travail de synthèse. Bien que cela soit possiblement en faveur d'un rôle promoteur précoce des *annulate lamellae* pour la formation du réseau viral de réplication, il n'existe pas encore d'éléments permettant d'en comprendre les mécanismes. Le HCV est le seul modèle viral pour lequel une relation directe entre son cycle et les composants physiologiques du pore nucléaire a été mise en évidence (392). Les trois nucléoporines identifiées dans ce contexte sont : la Nup98 présente dans la partie centrale du pore, la Nup153 présente dans le panier nucléaire, et la Nup155 présente dans l'anneau interne du pore (au contact avec l'enveloppe nucléaire). La déplétion en Nup98 et Nup153 conduit à une diminution des niveaux d'ARN viraux intracellulaires et au nombre de virus sécrétés, là où la déplétion en Nup155 influe uniquement en diminuant le nombre de virus sécrétés sans modification de la production d'ARN viraux. Cela indique un rôle précoce de Nup98 et Nup153 concomitamment avec la réplication virale, et un rôle plus tardif de Nup155 au moment de l'étape d'assemblage et/ou de bourgeonnement des virions. Cela est cohérent avec les fonctions de Nup98 et

Nup153, associées à la maintenance de la chromatine et de régulation du transport de ARNm au travers du pore, et avec la capacité à déformer les membranes de la Nup155. Concernant les *annulate lamellae* et leurs pores, il est important de mentionner que certaines nucléoporines retrouvées dans le pore nucléaire sont absentes des *annulate lamellae* : les composants du panier nucléaire (Nup50, Nup153 et TPR) et les nucléoporines phénylalanine-glycine du centre du pore (Nup54, Nup58, Nup62) (393). À l'image du HCV, il est possible que le SARS-CoV-2 mobilise des nucléoporines des *annulate lamellae* impliquées dans le transport nucléo-cytoplasmique des ARN et des métabolites, pour réguler les échanges entre l'intérieur des DMVs et le cytoplasme. Dans ce contexte, ces nucléoporines seraient peut-être associées aux pores moléculaires viraux composés de NSP3, pour servir par exemple de régulateur du transit des ARN *via* le pore viral. Le SARS-CoV-2 pourrait aussi détourner une nucléoporine déformant les membranes (comme la Nup155), pour faciliter la biogenèse des vésicules de réplication et/ou le bourgeonnement des virions néoformés. Au-delà des *annulate lamellae*, plusieurs interactions entre les *Sarbecovirus* et certaines nucléoporines ont été identifiées. Concernant le SARS-CoV, il a été montré que NSP1 modifie la localisation subcellulaire de Nup93, présente dans l'anneau interne et associée à la maintenance de la chromatine et la régulation du transport de ARNm (394). Concernant le SARS-CoV et le SARS-CoV-2, la protéine ORF6 bloque l'import nucléaire de facteurs de l'hôte comme STAT (associés à la réponse interféron) en interagissant avec la Nup98 (395). De la même manière, NSP9 interagit avec la Nup62, présente au centre des pores nucléaires mais absente des *annulate lamellae*, pour modifier les transports nucléo-cytoplasmiques (396). Enfin, il a été montré que les *annulate lamellae* constituent un pool de pores et de membranes du RE, mobilisable lors de la mitose pour expandre l'enveloppe nucléaire quand elle se reforme. Les coronavirus ayant la capacité d'arrêter le cycle cellulaire en interagissant avec la p53 et les cyclines (397), il est possible que ces accumulations d'*annulate lamellae* soient une conséquence indirecte du dérèglement du cycle cellulaire par le SARS-CoV-2, *a fortiori* dans une lignée transformée à prolifération rapide comme les Vero.

g. Polarisation du réseau de réplication

Lors de nos observations et aux temps tardifs, nous avons fréquemment constaté que les DMVs des réseaux de réplication viraux occupent préférentiellement un

pôle de la cellule, tout en repoussant le noyau vers un autre pôle. De même, l'assemblage des virions dans le ERGIC et la sortie par exocytose semblaient s'effectuer vers le pôle de la cellule occupé par les DMVs, entre le réseau de réplication et la membrane plasmique. Dans notre deuxième étude focalisée sur la sortie des virus, nous avons montré que celle-ci se situait dans une région bien localisée de la membrane plasmique, souvent invaginée et riche en microvillosités. Il serait intéressant d'étudier la mise en place de cette polarisation, qui a lieu ici dans des cellules Vero cultivées en 2D pas (ou peu) polarisées. Dans l'organisme, le SARS-CoV-2 infecte quasi exclusivement des cellules épithéliales polarisées, dans lesquelles la sortie des virions s'effectue au pôle apical, vers la lumière de l'organe. Cela a notamment été montré par l'observation d'épithélium respiratoire polarisé en ME, avec des DMVs au contact du noyau au pôle basal, et une sortie des virions au pôle apical cilié des cellules (181). Ainsi, il est possible que les interactions entre le virus, et une cellule hôte non polarisée initialement, conduisent à la formation d'une réplication virale polarisée, sans que cela présente un avantage pour le virus. Cependant, il est également possible que l'invagination et les microvillosités forment une protection des virions en cours de sortie vis-à-vis du système immunitaire. Il est également intéressant de noter que dans ces régions riches en microvillosités, il n'a pas été vu d'autres structures membranaires, par exemple des filopodes ou des blebs. Quoiqu'il en soit, il est presque certain que le cytosquelette d'actine joue un rôle pour la formation des microvillosités associées aux régions de sortie du virus de la cellule. Il reste aussi à déterminer si la formation de microvillosité est stimulée dans les cellules infectées, ou si les microvillosités déjà présentes dans la cellule sont simplement redistribuées à un pôle cellulaire.

h. Mécanismes et voies de sorties

Dans notre deuxième étude, nous avons montré que la sortie des particules virales du SARS-CoV-2 s'effectue par le biais de petites vésicules de sécrétion contenant généralement un seul virion. Nos observations ne sont donc pas en accord avec la description faite dans l'étude de Mendonça *et al.* (384) de tunnels permettant la sortie du virus, en connectant de grands compartiments intracellulaires à la membrane plasmique. Ces "tunnels" correspondent d'ailleurs possiblement aux espaces extracellulaires fins situés entre les microvillosités. L'autre étude réalisée par Ghosh *et al.* présente des arguments en faveur d'une sortie des *Betacoronavirus*, dont le SARS-CoV-2, par

l'exocytose du contenu de lysosomes désacidifiés. Cela est cohérent avec la résistance à la BFA de la sortie des virions de cette famille virale. Dans cet article, les clichés de MET montrent des particules virales au sein de compartiments denses aux électrons, présentant en immunomarquage des protéines lysosomales dont LAMP1. Sur le plan de l'ultrastructure, ces compartiments sont tout à fait compatibles avec des lysosomes. En outre, ils contiennent des éléments membranaires convolutés caractéristiques de compartiments de dégradation, et des particules virales de forme très hétérogène, là encore compatibles avec un mécanisme de dégradation à l'image de ce qui est observé dans les LVCV. Si cela est effectivement le cas, cette dégradation serait en revanche peu compatible avec la libération de virions infectieux dans le milieu extérieur. De plus, bien qu'il soit présenté une image d'un lysosome contenant des virions proches de la membrane plasmique, il n'est pas montré de réelle image d'exocytose des lysosomes dans le milieu extérieur. Dans la limite des cellules observées lors de notre étude, il n'a pas été vu de structures ou d'images compatibles avec la sortie de particules virales par l'exocytose de lysosomes. Il est cependant important de mentionner que les observations de Ghosh *et al.* ont été réalisées en cellules HeLa et non en cellules Vero.

La sortie de particules virales au sein de petites vésicules d'exocytose que nous avons observé, est compatible avec un passage par les endosomes de recyclage, comme cela a été suggéré par Saraste *et al.* (377). En effet, ce compartiment forme des tubules s'individualisant en petites vésicules qui fusionnent ensuite à la membrane plasmique (398). Il a été montré que l'inhibition de l'expression des deux isoformes de Rab11 (par knockdown ou siRNA) entraîne l'accumulation périphérique de vésicules, et stabilise les structures tubulaires au niveau du RE qui ne se fragmentent plus en vésicules (399). Il serait intéressant d'observer des cellules infectées après traitement avec un siRNA dirigé contre Rab11, afin d'étudier l'effet de cette déstructuration du compartiment des endosomes de recyclage sur la sortie du SARS-CoV-2. Le passage éventuel par la voie des endosomes de recyclage reste cohérent avec l'absence d'effet de la BFA sur la libération du virus, dans la mesure où ce compartiment n'est pas altéré par cette drogue, à l'inverse du Golgi. Il serait intéressant de répéter l'observation en coupes sériées de cellule Vero infectées par le SARS-CoV-2, après traitement de nos cellules à la BFA, pour s'assurer que le mode de sortie du virus par ces vésicules ne soit pas modifié.

Enfin, il reste difficile à l'heure actuelle de déterminer avec certitude le mécanisme de sortie du SARS-CoV-2 de la cellule, les deux principales hypothèses étant : une sortie par la voie sécrétoire constitutive en empruntant l'appareil de Golgi, ou une

sortie par une voie sécrétoire « non conventionnelle » par le biais de lysosomes désacidifiés / d'autophagosomes. Ces hypothèses, ainsi que le passage par la voie des endosomes de recyclage, sont résumées dans la figure suivante :

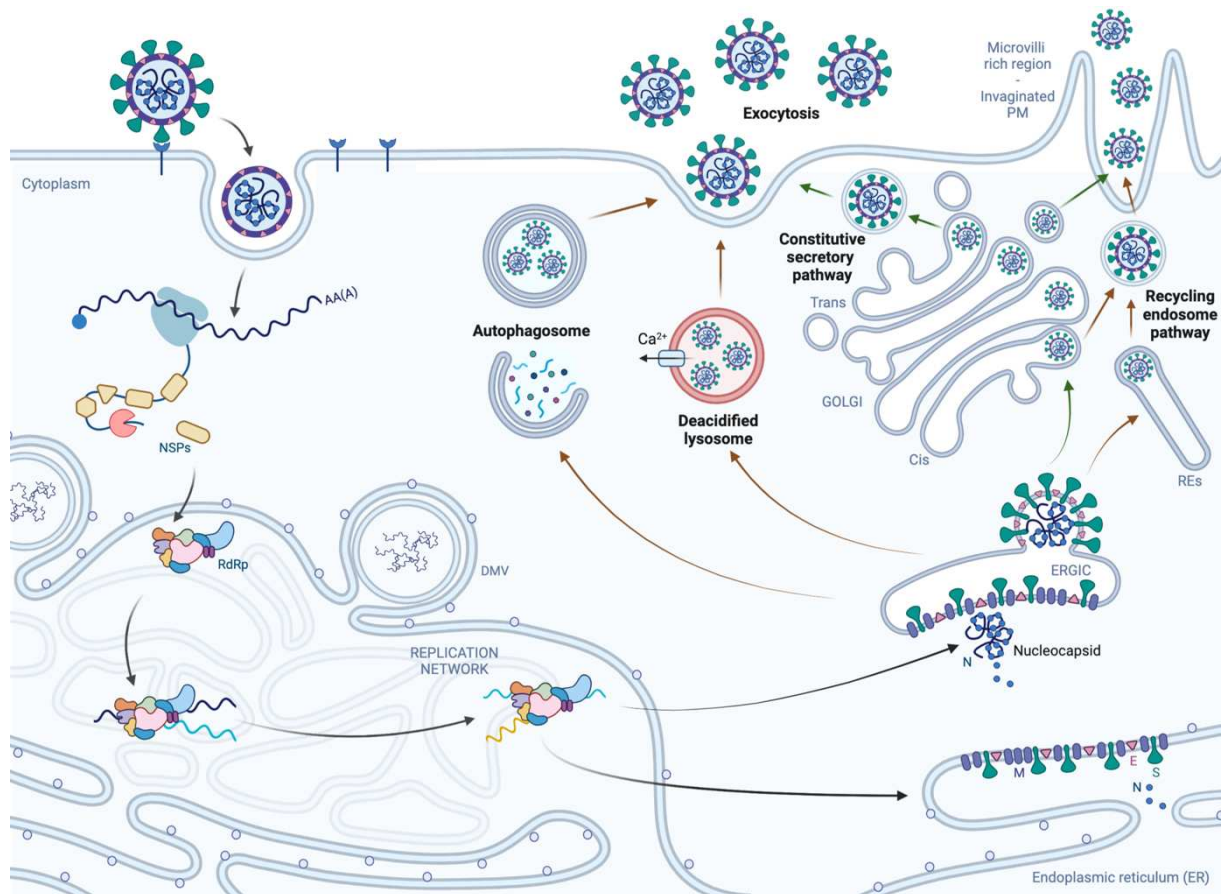


Figure 73 : Schéma de synthèse des mécanismes potentiels de sortie du SARS-CoV-2 de la cellule

Le passage par la voie sécrétoire constitutive est représenté par les flèches vertes, et le passage par des voies de sécrétion non conventionnelles par les flèches orange. PM : Plasma membrane, REs : Recycling endosomes

i. Limites de l'étude

Nos deux études présentent un abord essentiellement morphologique du cycle viral, avec des hypothèses sur les aspects fonctionnels. C'est finalement le cas de bon nombre d'études portant sur les organites de réplication virale, qui se basent toujours sur une description ultrastructurale des modifications cellulaires induites par le virus, avec initialement peu d'éléments de compréhension de leur biogenèse, avant d'explorer les mécanismes en jeu. Une des forces de notre première étude est d'avoir réalisé une

description détaillée de la mise en place des ROs du SARS-CoV-2, en prenant en compte la dimension temporelle de leur développement. Même si une analyse cinétique permet d'avoir une idée de l'apparition séquentielle des éléments du réseau de réplication, elle ne permet cependant pas toujours de confirmer si un élément est précurseur d'un autre élément, comme c'est le cas concernant les SMVs observés aux temps précoces et les DMVs apparaissant ultérieurement. Là où certains articles comportent des clichés de ME à fort grossissement de certaines régions cellulaires, nous nous sommes attachés à réaliser des clichés à faible grossissement de l'ensemble d'une section cellulaire permettant une vue d'ensemble, avec les détails à fort grossissement fournis en parallèle. Plusieurs études analysant le cycle du SARS-CoV-2 en ME ont eu recours à des techniques tomographiques de pointe, comme la cryo FIB-SEM. Bien que ces techniques permettent des reconstructions 3D de haute résolution, elles demeurent très coûteuses, chronophages, et nécessitent une grande expertise, les rendant difficilement accessibles pour les plateformes de ME plus « modestes ». De fait, les clichés que nous avons obtenus en ME conventionnelle pourront être utilisés dans le cadre de travaux d'autres équipes de recherche qui ont recours aux techniques « classiques » de MET, probablement plus fréquemment utilisées que les techniques de ME de pointe. En tenant compte de nos compétences, une reconstruction tomographique en MET, par acquisition successive d'images en changeant l'axe d'inclinaison de l'échantillon (méthode du « tilt »), que nous maîtrisons sur notre plateforme, pourrait permettre de déterminer avec plus de précision les compartiments d'origine des petites vésicules de sécrétion que nous avons observées. L'utilisation du MEB pourrait aussi permettre d'étudier plus finement les structures membranaires associées au pôle de sortie des virions des cellules Vero infectées.

Le choix du modèle d'étude, cellulaire voire tissulaire, est un facteur d'importance à prendre en compte lors de l'analyse de critères ultrastructuraux. Le choix de la lignée Vero pour notre étude se justifie par une volonté de travailler au plus vite sur ce nouveau virus, avec une lignée déjà validée pour les autres *Betacoronavirus*. De plus et d'après la littérature, la formation de DMVs ou l'assemblage dans le ERGIC sont des éléments constitutifs du cycle de cette famille virale, retrouvés de manière similaire quel que soit le type cellulaire. En revanche, il est probable que la lignée de la cellule hôte et sa différenciation influe sur la répartition subcellulaire, la morphologie ou la quantité de DMVs, mais également sur la production virale. Il serait intéressant d'étudier les mécanismes de sortie dans un modèle plus relevant. Dans cette optique et dans le cadre d'un projet de recherche portant sur l'influence des PI4KIII sur le cycle viral, nous avons

récemment mené une analyse en MET de cellules A549 (adénocarcinome bronchique) infectées par la souche Delta du SARS-CoV-2, dans lesquelles nous avons observé de légères différences avec le modèle Vero. Dans le cadre d'un autre projet de recherche, nous mettons actuellement au point un modèle tissulaire d'infection par le SARS-CoV-2, par la réalisation de coupes micrométriques pulmonaires humaines (PCLS) cultivées *ex vivo*, à partir de fragments d'exérèse carcinologique d'adénocarcinome bronchique de patients. Ce modèle est aussi transposable à d'autres agents infectieux respiratoires, comme les mycobactéries anthropozoonotiques du complexe de la tuberculose, permettant par exemple de comparer leurs interactions avec les macrophages alvéolaires, entre le modèle bovin et humain. Concernant le SARS-CoV-2, il semble que ce modèle soit difficile à infecter et non adapté à une forte réplication virale, probablement car le site primaire de l'infection est le nasopharynx, avant sa diffusion à l'ensemble de l'arbre bronchique, en terminant par l'alvéole. Par comparaison, l'infection d'épithéliums polarisés composés de cellules proximales génère une réplication bien plus efficace, ce qui facilite l'observation du virus en MET. Les PCLS ont cependant l'avantage de conserver l'architecture alvéolaire (tissu conjonctif, barrière alvéolo-capillaire) et l'ensemble des types cellulaires du poumon distal. Les cellules inflammatoires résidentes, dont les macrophages alvéolaires, sont également conservées, ce qui en fait un modèle d'étude pertinent pour l'analyse de la réponse immunitaire locale dirigée contre le SARS-CoV-2. Une fois l'infection optimisée, nous avons aussi pour objectif d'observer et de décrire les ROs induites par le virus dans ce modèle reproduisant des conditions très proches de celles rencontrées *in vivo*. Il serait intéressant de visualiser dans quels types cellulaires le réseau de réplication s'est développé, et quelles sont les différences qualitatives et quantitatives de ce réseau par rapport aux cellules Vero.

Un autre élément à prendre en compte, absent lors de l'initiation de notre étude, est la diversification génomique du SARS-CoV-2 avec l'apparition de nombreux variants. S'il semble qu'il n'y ait pas de différences significatives des modifications viro-induites entre la souche sauvage Wuhan et le variant Delta, nous n'avons pas évalué le variant Omicron sur ce critère. Or, il est plus éloigné phylogénétiquement de la souche Wuhan que les précédents variants, et présente un tropisme cellulaire modifié, majoré pour les voies respiratoires hautes et diminué pour le poumon distal (400). Il existe à l'heure actuelle très peu de données détaillées concernant l'analyse en ME de cellules infectées par le variant Omicron. À noter malgré tout l'étude de Hui *et al.* (401) réalisée sur fragments de poumons humains cultivés *ex vivo*, qui présente un seul cliché de ME à

fort grossissement d'une cellule ciliée infectée. Ainsi, il serait intéressant d'effectuer une analyse quantitative et qualitative sur plusieurs sections cellulaires, de la réplication virale pour ce variant. Nous pouvons nous procurer le variant Omicron auprès du laboratoire de virologie hospitalière de notre CHU, qui l'a isolé et amplifié à partir de prélèvements respiratoires de patients infectés. En allant plus loin, l'étude de cellules infectées en MET avec notre approche mais par un autre modèle viral, comme le MHV ou un HCoV, pourrait être riche d'enseignements.

j. Conclusion

Les progrès majeurs de la ME ces vingt dernières années, avec l'amélioration des techniques de reconstructions tomographiques, ont permis une meilleure compréhension de la biogenèse et de la structure des organites de réplication virale. Ces progrès ont notamment permis de découvrir la présence, et d'élucider la structure de véritables pores viraux associés aux ROs des virus (+)ssRNA, et composés de protéines non structurales. En parallèle, les progrès de la lipidomique ont apporté des informations biochimiques et fonctionnelles sur les ROs, complémentaires de l'approche morphologique, bien que de telles études soit encore peu nombreuses. Des études très récentes mettent également à profit les progrès de la bio-informatique pour modéliser *in silico* et de manière dynamique les étapes de courbure membranaire en fonction notamment de leur composition en lipides (402). Malgré tous ces progrès, il reste essentiel pour les observateurs utilisant la ME de bien connaître l'ultrastructure « normale » de la cellule et de ses organites, dans différents types cellulaires, ceci afin de ne pas identifier à tort des éléments cellulaires (ex : MVB, pores nucléaires, vésicules à clathrine) comme des éléments viraux ou viro-induits. Ainsi, les revues de Bullock / Goldsmith *et al.* (137) et de Hopfer *et al.* (403), ont rapporté que de nombreuses études en ME portant sur le SARS-CoV-2 comportent des identifications erronées, principalement dans des tissus extra-pulmonaires prélevés par biopsie chez des patient présentant un COVID-19 (cf. partie I.B.4.).

Finalement, et au regard d'études récentes basées sur les homologies de séquence de la polymérase virale, les virus à ARN simple brin de polarité positive semblent tous liés phylogénétiquement, au sein du règne des *Orthonavirae* (cf. partie I.D.1.), et auraient divergés sur plusieurs millions d'années en co-évoluant avec le vivant (219,220,404,405). Bien que liés phylogénétiquement, ces virus infectent un large spectre

d'espèces eucaryotes : plantes, arthropodes ou mammifères. Ces virus, dont le SARS-CoV-2, ont tous pour point commun de générer des organites membranaires de réplication virale, en remaniant les membranes de la cellule hôte. D'un point de vue évolutif, cela pose la question de savoir si cette similarité est liée à une origine commune, et serait dans ce cas déjà présente chez un ancêtre commun viral théorique. Alternativement, elle pourrait relever d'une évolution convergente, les virus ayant finalement des possibilités limitées pour générer une réplication virale efficace à partir des composants cellulaires, sous la pression du système immunitaire inné. Quoi qu'il en soit, l'émergence du SARS-CoV-2 a constitué une véritable opportunité de mieux comprendre les interactions entre le virus et la cellule, qui permettent la mise en place d'une réplication virale. La mise au point de molécules antivirales à large spectre, ciblant tous les virus à ARN simple brin de polarité positive, pourrait s'appuyer sur un mécanisme ciblant spécifiquement les organites de réplication virale, en épargnant les organites cellulaires. Ces outils thérapeutiques seraient particulièrement pertinents pour anticiper l'apparition de futurs virus anthropozoonotiques, les virus à ARN étant la classe virale comportant le plus de virus émergents. Dans ce contexte, le développement de ces molécules passera nécessairement par une meilleure compréhension de la morphogenèse des ROs viraux, notamment grâce à la microscopie électronique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

III. Références bibliographiques

1. Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. janv 1966;121(1):190-3.
2. Almeida JD, Tyrrell DAJY 1967. The Morphology of Three Previously Uncharacterized Human Respiratory Viruses that Grow in Organ Culture. *J Gen Virol*. 1(2):175-8.
3. Tyrrell D a. J, Almeida JD, Cunningham CH, Dowdle WR, Hofstad MS, McIntosh K, et al. Coronaviridae. *Intervirol*. 1975;5(1-2):76-82.
4. Bourns MEG, Brown TDK, Foulds IJ, Green PF, Tomley FM, Binns MMY 1987. Completion of the Sequence of the Genome of the Coronavirus Avian Infectious Bronchitis Virus. *J Gen Virol*. 68(1):57-77.
5. Sawicki SG, Sawicki DL. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol*. 1995;380:499-506.
6. Gosert R, Kanjanahaluethai A, Egger D, Bienz K, Baker SC. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol*. avr 2002;76(8):3697-708.
7. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon null, Xie ZH, Chan KH, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet Lond Engl*. 25 oct 2003;362(9393):1353-8.
8. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki P SR, T E, S. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. mai 2003;15;348(20):1953–66.
9. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*. avr 2004;10(4):368-73.
10. Woo PCY, Lau SKP, Chu C ming, Chan K hung, Tsoi H wah, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*. janv 2005;79(2):884-95.
11. Zaki AM, Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. nov 2012;8;367(19):1814–20.
12. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. mars 2020;579(7798):270-3.
13. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;20;382(8):727–33.

14. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 15 févr 2020;395(10223):497-506.
15. Nidovirales - Positive Sense RNA Viruses - Positive Sense RNA Viruses (2011) - ICTV [Internet]. [cité 24 déc 2021]. Disponible sur: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/219/nidovirales
16. Robson F, Khan KS, Le TK, Paris C, Demirbag S, Barfuss P, et al. Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting. *Mol Cell*. 3 sept 2020;79(5):710-27.
17. Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses. *RNA Biol*. 1 mars 2011;8(2):270-9.
18. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol*. 1 juin 2016;24(6):490-502.
19. Graham RL, Baric RS. Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission. *J Virol* [Internet]. avr 2010 [cité 24 déc 2021]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.01394-09>
20. Zeng Q, Langereis MA, Vliet ALW van, Huizinga EG, Groot RJ de. Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution. *Proc Natl Acad Sci*. 1 juill 2008;105(26):9065-9.
21. Decaro N, Lorusso A. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Vet Microbiol*. 1 mai 2020;244:108693.
22. Wong ACP, Li X, Lau SKP, Woo PCY. Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. *Viruses*. févr 2019;11(2):174.
23. Wille M, Holmes EC. Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. *FEMS Microbiol Rev*. 1 sept 2020;44(5):631-44.
24. Corman VM, Baldwin HJ, Tateno AF, Zerbinati RM, Annan A, Owusu M, et al. Evidence for an Ancestral Association of Human Coronavirus 229E with Bats. *J Virol*. déc 2015;89(23):11858-70.
25. Crossley BM, Mock RE, Callison SA, Hietala SK. Identification and Characterization of a Novel Alpaca Respiratory Coronavirus Most Closely Related to the Human Coronavirus 229E. *Viruses*. 12 déc 2012;4(12):3689-700.
26. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol*. 1 janv 2017;25(1):35-48.
27. Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Thoelen I, Wollants E, Lemey P, et al. Complete Genomic Sequence of Human Coronavirus OC43: Molecular Clock Analysis Suggests a

- Relatively Recent Zoonotic Coronavirus Transmission Event. *J Virol* [Internet]. 1 févr 2005 [cité 4 janv 2022]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.79.3.1595-1604.2005>
28. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. août 2016;14(8):523-34.
 29. Zhang Z, Shen L, Gu X. Evolutionary Dynamics of MERS-CoV: Potential Recombination, Positive Selection and Transmission. *Sci Rep*. 4 mai 2016;6(1):25049.
 30. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci*. 15 févr 2005;102(7):2430-5.
 31. THE CHINESE SARS MOLECULAR EPIDEMIOLOGY CONSORTIUM. Molecular Evolution of the SARS Coronavirus During the Course of the SARS Epidemic in China. *Science*. 12 mars 2004;303(5664):1666-9.
 32. Lam TTY, Jia N, Zhang YW, Shum MHH, Jiang JF, Zhu HC, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. juill 2020;583(7815):282-5.
 33. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev*. 1 juin 2020;7(6):1012-23.
 34. Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, Robertson DL, Crits-Christoph A, Wertheim JO, et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*. 16 sept 2021;184(19):4848-56.
 35. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*. 11 mars 2020;27(3):325-8.
 36. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*. avr 2021;54(2):159-63.
 37. Lei J, Kusov Y, Hilgenfeld R. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res*. 1 janv 2018;149:58-74.
 38. Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles. *mBio* [Internet]. 13 août 2013 [cité 13 janv 2022]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mBio.00524-13>
 39. Hagemeijer MC, Monastyrska I, Griffith J, van der Sluijs P, Voortman J, van Bergen en Henegouwen PM, et al. Membrane rearrangements mediated by coronavirus nonstructural

proteins 3 and 4. *Virology*. 1 juin 2014;458-459:125-35.

40. Subissi L, Posthuma CC, Collet A, Zevenhoven-Dobbe JC, Gorbalenya AE, Decroly E, et al. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 sept 2014;111(37):E3900-3909.
41. Kirchdoerfer RN, Ward AB. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun*. 28 mai 2019;10(1):2342.
42. de Velthuis AJW, van den Worm SHE, Snijder EJ. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res*. 1 févr 2012;40(4):1737-47.
43. Seybert A, Posthuma CC, van Dinten LC, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. A Complex Zinc Finger Controls the Enzymatic Activities of Nidovirus Helicases. *J Virol*. janv 2005;79(2):696-704.
44. Jang KJ, Jeong S, Kang DY, Sp N, Yang YM, Kim DE. A high ATP concentration enhances the cooperative translocation of the SARS coronavirus helicase nsP13 in the unwinding of duplex RNA. *Sci Rep*. 11 mars 2020;10(1):4481.
45. Wang YN, Yu CY, Jin HZ. RNA N6-Methyladenosine Modifications and the Immune Response. *J Immunol Res*. 21 janv 2020;2020:e6327614.
46. Chen Y, Cai H, Pan J, Xiang N, Tien P, Ahola T, et al. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci*. 3 mars 2009;106(9):3484-9.
47. Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, et al. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog*. 6 mai 2010;6(5):e1000896.
48. Chen Y, Su C, Ke M, Jin X, Xu L, Zhang Z, et al. Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathog*. oct 2011;7(10):e1002294.
49. Rosas-Lemus M, Minasov G, Shuvalova L, Inniss NL, Kiryukhina O, Wiersum G, et al. The crystal structure of nsp10-nsp16 heterodimer from SARS-CoV-2 in complex with S-adenosylmethionine. *BioRxiv Prepr Serv Biol*. 26 avr 2020;2020.04.17.047498.
50. Bouvet M, Lugari A, Posthuma CC, Zevenhoven JC, Bernard S, Betzi S, et al. Coronavirus Nsp10, a Critical Co-factor for Activation of Multiple Replicative Enzymes*. *J Biol Chem*. 12 sept 2014;289(37):25783-96.
51. Kamitani W, Huang C, Narayanan K, Lokugamage KG, Makino S. A two-pronged

strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nat Struct Mol Biol.* nov 2009;16(11):1134-40.

52. Lokugamage KG, Narayanan K, Huang C, Makino S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein nsp1 is a novel eukaryotic translation inhibitor that represses multiple steps of translation initiation. *J Virol.* déc 2012;86(24):13598-608.

53. Thoms M, Buschauer R, Ameisemeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, et al. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science.* 4 sept 2020;369(6508):1249-55.

54. Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. SARS Coronavirus nsp1 Protein Induces Template-Dependent Endonucleolytic Cleavage of mRNAs: Viral mRNAs Are Resistant to nsp1-Induced RNA Cleavage. *PLOS Pathog.* 8 déc 2011;7(12):e1002433.

55. Cornillez-Ty CT, Liao L, YatesIII JR, Kuhn P, Buchmeier MJ. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Protein 2 Interacts with a Host Protein Complex Involved in Mitochondrial Biogenesis and Intracellular Signaling. *J Virol* [Internet]. oct 2009 [cité 19 janv 2022]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.00842-09>

56. Wrapp Daniel, Wang Nianshuang, Corbett Kizzmekia S., Goldsmith Jory A., Hsieh Ching-Lin, Abiona Olubukola, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 13 mars 2020;367(6483):1260-3.

57. Ke Z, Oton J, Qu K, Cortese M, Zila V, McKeane L, et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature.* déc 2020;588(7838):498-502.

58. McBride R, Zyl M, Fielding BC. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses.* août 2014;7;6(8):2991–3018.

59. Cong Y, Ulasli M, Schepers H, Mauthe M, V'kovski P, Kriegenburg F, et al. Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle. *J Virol* [Internet]. 31 janv 2020 [cité 31 janv 2022]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.01925-19>

60. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol.* 1 avr 2011;174(1):11-22.

61. Stertz S, Reichelt M, Spiegel M, Kuri T, Martínez-Sobrido L, García-Sastre A. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology.* mai 2007;10;361(2):304–15.

62. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology*. 27 mai 2019;16(1):69.
63. Pervushin K, Tan E, Parthasarathy K, Lin X, Jiang FL, Yu D, et al. Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel. *PLOS Pathog.* 10 juill 2009;5(7):e1000511.
64. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdiá-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein Ion Channel Activity Promotes Virus Fitness and Pathogenesis. *PLOS Pathog.* 1 mai 2014;10(5):e1004077.
65. Teoh KT, Siu YL, Chan WL, Schlüter MA, Liu CJ, Peiris JSM, et al. The SARS Coronavirus E Protein Interacts with PALS1 and Alters Tight Junction Formation and Epithelial Morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 15 nov 2010;21(22):3838-52.
66. Shepley-McTaggart A, Sagum CA, Oliva I, Rybakovsky E, DiGuilio K, Liang J, et al. SARS-CoV-2 Envelope (E) protein interacts with PDZ-domain-2 of host tight junction protein ZO1. *PLOS ONE.* 9 juin 2021;16(6):e0251955.
67. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [cité 2 févr 2022];12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.708264>
68. Ribero MS, Jouvenet N, Dreux M, Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLOS Pathog.* 29 juill 2020;16(7):e1008737.
69. Jouvenet N, Goujon C, Banerjee A. Clash of the titans: interferons and SARS-CoV-2. *Trends Immunol.* 1 déc 2021;42(12):1069-72.
70. Ren Y, Shu T, Wu D, Mu J, Wang C, Huang M, et al. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. *Cell Mol Immunol.* août 2020;17(8):881-3.
71. Miao G, Zhao H, Li Y, Ji M, Chen Y, Shi Y, et al. ORF3a of the COVID-19 virus SARS-CoV-2 blocks HOPS complex-mediated assembly of the SNARE complex required for autolysosome formation. *Dev Cell.* 22 févr 2021;56(4):427-442.e5.
72. Siu KL, Yuen KS, Castano-Rodriguez C, Ye ZW, Yeung ML, Fung SY, et al. Severe acute respiratory syndrome Coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC. *FASEB J.* 2019;33(8):8865-77.
73. Konno Y, Kimura I, Uriu K, Fukushi M, Irie T, Koyanagi Y, et al. SARS-CoV-2 ORF3b Is a Potent Interferon Antagonist Whose Activity Is Increased by a Naturally Occurring Elongation Variant. *Cell Rep.* 22 sept 2020;32(12):108185.

74. Nelson CW, Arden Z, Goldberg TL, Meng C, Kuo CH, Ludwig C, et al. Dynamically evolving novel overlapping gene as a factor in the SARS-CoV-2 pandemic. Rokas A, Wittkopp PJ, Piontkivska H, éditeurs. *eLife*. 1 oct 2020;9:e59633.
75. Miorin L, Kehrer T, Sanchez-Aparicio MT, Zhang K, Cohen P, Patel RS, et al. SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci*. 10 nov 2020;117(45):28344-54.
76. Cao Z, Xia H, Rajsbaum R, Xia X, Wang H, Shi PY. Ubiquitination of SARS-CoV-2 ORF7a promotes antagonism of interferon response. *Cell Mol Immunol*. mars 2021;18(3):746-8.
77. Pereira F. Evolutionary dynamics of the SARS-CoV-2 ORF8 accessory gene. *Infect Genet Evol*. 1 nov 2020;85:104525.
78. Wang X, Lam JY, Wong WM, Yuen CK, Cai JP, Au SWN, et al. Accurate Diagnosis of COVID-19 by a Novel Immunogenic Secreted SARS-CoV-2 orf8 Protein. *mBio* [Internet]. 20 oct 2020 [cité 3 févr 2022]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mBio.02431-20>
79. Young BE, Fong SW, Chan YH, Mak TM, Ang LW, Anderson DE, et al. Effects of a major deletion in the SARS-CoV-2 genome on the severity of infection and the inflammatory response: an observational cohort study. *The Lancet*. 29 août 2020;396(10251):603-11.
80. Zhang Y, Chen Y, Li Y, Huang F, Luo B, Yuan Y, et al. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 8 juin 2021 [cité 3 févr 2022];118(23). Disponible sur: <https://www.pnas.org/content/118/23/e2024202118>
81. Kreimendahl S, Rassow J. The Mitochondrial Outer Membrane Protein Tom70-Mediator in Protein Traffic, Membrane Contact Sites and Innate Immunity. *Int J Mol Sci*. janv 2020;21(19):7262.
82. Evans JP, Liu SL. Role of host factors in SARS-CoV-2 entry. *J Biol Chem*. 1 juill 2021;297(1):100847.
83. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. janv 2022;23(1):3-20.
84. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci*. 7 avr 2009;106(14):5871-6.
85. Murgolo N, Therien AG, Howell B, Klein D, Koeplinger K, Lieberman LA, et al. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery

and development. *PLOS Pathog.* 17 févr 2021;17(2):e1009225.

86. Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature.* janv 2021;589(7840):125-30.
87. Oudshoorn D, Rijs K, Limpens RWAL, Groen K, Koster AJ, Snijder EJ, et al. Expression and Cleavage of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp3-4 Polyprotein Induce the Formation of Double-Membrane Vesicles That Mimic Those Associated with Coronaviral RNA Replication. *mBio.* 21 nov 2017;8(6):e01658-17.
88. Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, Maga G, Berisio R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells.* mai 2020;9(5):1267.
89. Wolff G, Limpens RWAL, Zevenhoven-Dobbe JC, Laugks U, Zheng S, de Jong AWM, et al. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science.* 11 sept 2020;369(6509):1395-8.
90. Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol.* janv 2022;23(1):21-39.
91. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* mars 2021;19(3):155-70.
92. Galloway SE, Paul P, MacCannell DR, Johansson MA, Brooks JT, MacNeil A, et al. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 22 janv 2021;70(3):95-9.
93. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science.* 9 avr 2021;372(6538):eabg3055.
94. Veeramachaneni GK, Thunuguntla VBSC, Bobbillaipati J, Bondili JS. Structural and simulation analysis of hotspot residues interactions of SARS-CoV 2 with human ACE2 receptor. *J Biomol Struct Dyn.* 24 juill 2021;39(11):4015-25.
95. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature.* avr 2021;592(7854):438-43.
96. Wang P, Casner RG, Nair MS, Wang M, Yu J, Cerutti G, et al. Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization. *BioRxiv Prepr Serv Biol.* 9 avr 2021;2021.03.01.433466.
97. Srivastava S, Banu S, Singh P, Sowpati DT, Mishra RK. SARS-CoV-2 genomics: An

Indian perspective on sequencing viral variants. *J Biosci.* 20 févr 2021;46(1):22.

98. Isabel S, Graña-Miraglia L, Gutierrez JM, Bundalovic-Torma C, Groves HE, Isabel MR, et al. Evolutionary and structural analyses of SARS-CoV-2 D614G spike protein mutation now documented worldwide. *Sci Rep.* 20 août 2020;10(1):14031.

99. Raghav S, Ghosh A, Turuk J, Kumar S, Jha A, Madhulika S, et al. Analysis of Indian SARS-CoV-2 Genomes Reveals Prevalence of D614G Mutation in Spike Protein Predicting an Increase in Interaction With TMPRSS2 and Virus Infectivity. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 [cité 27 juill 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.594928>

100. Dejnirattisai W, Huo J, Zhou D, Zahradnik J, Supasa P, Liu C, et al. SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *Cell.* 3 févr 2022;185(3):467-484.e15.

101. Chen J, Wang R, Gilby NB, Wei GW. Omicron Variant (B.1.1.529): Infectivity, Vaccine Breakthrough, and Antibody Resistance. *J Chem Inf Model.* 24 janv 2022;62(2):412-22.

102. Rothberg MB, Kim P, Shrestha NK, Kojima L, Tereshchenko LG. Protection Against the Omicron Variant Offered by Previous SARS-CoV-2 Infection: A Retrospective Cohort Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 22 juill 2022;ciac604.

103. Tuekprakhon A, Nutalai R, Djokaite-Guraliuc A, Zhou D, Ginn HM, Selvaraj M, et al. Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum. *Cell.* 7 juill 2022;185(14):2422-2433.e13.

104. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 1 déc 2020;41(12):1100-15.

105. Ong SWX, Tan YK, Chia PY, Lee TH, Ng OT, Wong MSY, et al. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA.* 28 avr 2020;323(16):1610-2.

106. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* mai 2020;158(6):1831-1833.e3.

107. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 16 avr 2020;382(16):1564-7.

108. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19 [Internet]. Disponible sur:

<http://www.nature.com/articles/s41591-020-0869-5>

109. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, Marder EP, Raz KM, El Burai Felix S, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance - United States, January 22-May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 19 juin 2020;69(24):759-65.
110. Jin JM, Bai P, He W, Wu F, Liu XF, Han DM, et al. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. *Front Public Health*. 2020;8:152.
111. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 24 févr 2020;12(1):1-5.
112. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet*. 2 mai 2020;395(10234):1417-8.
113. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 9 juill 2020;383(2):120-8.
114. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* [Internet]. 4 juin 2020 [cité 10 août 2022];5(11). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/138999>
115. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brügger M, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. juill 2020;75(7):1564-81.
116. Ahn JH, Kim J, Hong SP, Choi SY, Yang MJ, Ju YS, et al. Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. *J Clin Invest*. 1 juill 2021;131(13):148517.
117. Streicher F, Jouvenet N. Stimulation of Innate Immunity by Host and Viral RNAs. *Trends Immunol*. 1 déc 2019;40(12):1134-48.
118. Sampaio NG, Chauveau L, Hertzog J, Bridgeman A, Fowler G, Moonen JP, et al. The RNA sensor MDA5 detects SARS-CoV-2 infection. *Sci Rep*. 1 juill 2021;11(1):13638.
119. Khanmohammadi S, Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *J Med Virol*. mai 2021;93(5):2735-9.
120. Robinot R, Hubert M, de Melo GD, Lazarini F, Bruel T, Smith N, et al. SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nat Commun*. 16 juill 2021;12(1):4354.
121. Lamers MM, van der Vaart J, Knoops K, Riesebosch S, Breugem TI, Mykytyn AZ, et al. An organoid-derived bronchioalveolar model for SARS-CoV-2 infection of human alveolar

type II-like cells. *EMBO J.* mars 2021;40(5):e105912.

122. Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost JTH.* sept 2020;18(9):2103-9.

123. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 16 avr 2020;181(2):271-280.e8.

124. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol.* juill 2020;20(7):389-91.

125. Zhang J, Wu H, Yao X, Zhang D, Zhou Y, Fu B, et al. Pyroptotic macrophages stimulate the SARS-CoV-2-associated cytokine storm. *Cell Mol Immunol.* mai 2021;18(5):1305-7.

126. Ferreira AC, Soares VC, de Azevedo-Quintanilha IG, Dias S da SG, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, et al. SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. *Cell Death Discov.* 1 mars 2021;7(1):1-12.

127. Grant RA, Morales-Nebreda L, Markov NS, Swaminathan S, Querrey M, Guzman ER, et al. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature.* févr 2021;590(7847):635-41.

128. Melms JC, Biermann J, Huang H, Wang Y, Nair A, Tagore S, et al. A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19. *Nature.* juill 2021;595(7865):114-9.

129. Zhang Z, Newton K, Kummerfeld SK, Webster J, Kirkpatrick DS, Phu L, et al. Transcription factor Etv5 is essential for the maintenance of alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci.* 11 avr 2017;114(15):3903-8.

130. Wendisch D, Dietrich O, Mari T, von Stillfried S, Ibarra IL, Mittermaier M, et al. SARS-CoV-2 infection triggers profibrotic macrophage responses and lung fibrosis. *Cell.* 22 déc 2021;184(26):6243-6261.e27.

131. Naicker S, Yang CW, Hwang SJ, Liu BC, Chen JH, Jha V. The Novel Coronavirus 2019 epidemic and kidneys. *Kidney Int.* 1 mai 2020;97(5):824-8.

132. Fanelli V, Fiorentino M, Cantaluppi V, Gesualdo L, Stallone G, Ronco C, et al. Acute kidney injury in SARS-CoV-2 infected patients. *Crit Care.* 16 avr 2020;24(1):155.

133. Kissling S, Rotman S, Gerber C, Halfon M, Lamoth F, Comte D, et al. Collapsing glomerulopathy in a COVID-19 patient. *Kidney Int.* avr 2020;S0085253820303951.

134. Pan X wu, Xu D, Zhang H, Zhou W, Wang L hui, Cui X gang. Identification of a potential mechanism of acute kidney injury during the COVID-19 outbreak: a study based on single-cell transcriptome analysis. *Intensive Care Med.* 1 juin 2020;46(6):1114-6.

135. Chu H, Chan JFW, Yuen TTT, Shuai H, Yuan S, Wang Y, et al. Comparative tropism,

replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe*. 1 mai 2020;1(1):e14-23.

136. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int*. avr 2020;S0085253820303690.

137. Bullock HA, Goldsmith CS, Zaki SR, Martines RB, Miller SE. Difficulties in Differentiating Coronaviruses from Subcellular Structures in Human Tissues by Electron Microscopy - Volume 27, Number 4—April 2021 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. [cité 26 oct 2022]; Disponible sur: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/4/20-4337_article

138. S P, Cl MC, H G, Ja K. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int* [Internet]. nov 2019 [cité 26 oct 2022];96(5). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31443997/>

139. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med*. juill 2020;26(7):1017-32.

140. Clerkin KJ, Fried JA, Raikhelkar J, Sayer G, Griffin JM, Masoumi A, et al. COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 19 mai 2020;141(20):1648-55.

141. Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol*. 1 juill 2020;5(7):811-8.

142. Gallagher PE, Ferrario CM, Tallant EA. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. déc 2008;295(6):H2373-2379.

143. Chen L, Li X, Chen M, Feng Y, Xiong C. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovasc Res*. 1 mai 2020;116(6):1097-100.

144. Lindner D, Fitzek A, Bräuninger H, Aleshcheva G, Edler C, Meissner K, et al. Association of Cardiac Infection With SARS-CoV-2 in Confirmed COVID-19 Autopsy Cases. *JAMA Cardiol*. 1 nov 2020;5(11):1281-5.

145. Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet Lond Engl*. 9 mai 2020;395(10235):1517-20.

146. Mao R, Qiu Y, He JS, Tan JY, Li XH, Liang J, et al. Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 1 juill 2020;5(7):667-78.

147. Stanifer ML, Kee C, Cortese M, Zumaran CM, Triana S, Mukenhirn M, et al. Critical Role of Type III Interferon in Controlling SARS-CoV-2 Infection in Human Intestinal Epithelial Cells. *Cell Rep.* 7 juill 2020;32(1):107863.
148. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 3 juill 2020;369(6499):50-4.
149. Krasemann S, Haferkamp U, Pfefferle S, Woo MS, Heinrich F, Schweizer M, et al. The blood-brain barrier is dysregulated in COVID-19 and serves as a CNS entry route for SARS-CoV-2. *Stem Cell Rep.* 8 févr 2022;17(2):307-20.
150. Zubair AS, McAlpine LS, Gardin T, Farhadian S, Kuruvilla DE, Spudich S. Neuropathogenesis and Neurologic Manifestations of the Coronaviruses in the Age of Coronavirus Disease 2019: A Review. *JAMA Neurol.* 1 août 2020;77(8):1018-27.
151. Alsuliman T, Sulaiman R, Ismail S, Srouf M, Alrstom A. COVID-19 paraclinical diagnostic tools: Updates and future trends. *Curr Res Transl Med.* août 2020;68(3):83-91.
152. van Kasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol.* 1 juill 2020;128:104412.
153. Sakanashi D, Asai N, Nakamura A, Miyazaki N, Kawamoto Y, Ohno T, et al. Comparative evaluation of nasopharyngeal swab and saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 RNA in Japanese patients with COVID-19. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* janv 2021;27(1):126-9.
154. Martinez RM. Clinical Samples for SARS-CoV-2 Detection: Review of the Early Literature. *Clin Microbiol Newsl.* 1 août 2020;42(15):121-7.
155. Mardian Y, Kosasih H, Karyana M, Neal A, Lau CY. Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. *Front Med [Internet].* 2021 [cité 28 oct 2022];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.615099>
156. Winter AK, Hegde ST. The important role of serology for COVID-19 control. *Lancet Infect Dis.* 1 juill 2020;20(7):758-9.
157. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol.* 26 mai 2020;58(6):e00461-20.
158. National Institutes of Health. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines.
159. Levin MJ, Ustianowski A, De Wit S, Launay O, Avila M, Templeton A, et al.

Intramuscular AZD7442 (Tixagevimab-Cilgavimab) for Prevention of Covid-19. *N Engl J Med*. 9 juin 2022;386(23):2188-200.

160. Mahase E. Covid-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. *BMJ*. 8 nov 2021;375:n2713.

161. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med*. 5 nov 2020;383(19):1813-26.

162. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med*. 10 févr 2022;386(6):509-20.

163. Westendorf K, Žentelis S, Wang L, Foster D, Vaillancourt P, Wiggin M, et al. LY-CoV1404 (bebtelovimab) potentially neutralizes SARS-CoV-2 variants. *BioRxiv Prepr Serv Biol*. 24 mars 2022;2021.04.30.442182.

164. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 25 févr 2021;384(8):693-704.

165. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet Lond Engl*. 15 févr 2020;395(10223):e30-1.

166. Rosas IO, Bräu N, Waters M, Go RC, Hunter BD, Bhagani S, et al. Tocilizumab in Hospitalized Patients with Severe Covid-19 Pneumonia. *N Engl J Med*. 22 avr 2021;384(16):1503-16.

167. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 17 déc 2020;383(25):2451-60.

168. Cook TM, El-Boghdadly K, McGuire B, McNarry AF, Patel A, Higgs A. Consensus guidelines for managing the airway in patients with COVID-19: Guidelines from the Difficult Airway Society, the Association of Anaesthetists the Intensive Care Society, the Faculty of Intensive Care Medicine and the Royal College of Anaesthetists. *Anaesthesia*. juin 2020;75(6):785-99.

169. Grieco DL, Menga LS, Cesarano M, Rosà T, Spadaro S, Bitondo MM, et al. Effect of Helmet Noninvasive Ventilation vs High-Flow Nasal Oxygen on Days Free of Respiratory Support in Patients With COVID-19 and Moderate to Severe Hypoxemic Respiratory Failure: The HENIVOT Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 4 mai 2021;325(17):1731-43.

170. Schulman S, Sholzberg M, Spyropoulos AC, Zarychanski R, Resnick HE, Bradbury

CA, et al. ISTH guidelines for antithrombotic treatment in COVID-19. *J Thromb Haemost JTH*. oct 2022;20(10):2214-25.

171. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Curr Protoc Microbiol*. 2008;11(1):A.4E.1-A.4E.7.

172. Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T, et al. The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. *DNA Res*. 1 déc 2014;21(6):673-83.

173. Essaidi-Laziosi M, Perez Rodriguez FJ, Hulo N, Jacquerioz F, Kaiser L, Eckerle I. Estimating clinical SARS-CoV-2 infectiousness in Vero E6 and primary airway epithelial cells. *Lancet Microbe*. 1 nov 2021;2(11):e571.

174. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2020;31;117(13):7001–3.

175. Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamili S, Sakthivel SK, Murray J, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with Coronavirus Disease, United States. *Emerg Infect Dis*. juin 2020;26(6):1266-73.

176. Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis*. 1 févr 2021;21(2):181-92.

177. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. nov 2003;426(6965):450-4.

178. Chu H, Chan JFW, Yuen TTT, Shuai H, Yuan S, Wang Y, et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe*. 1 mai 2020;1(1):e14-23.

179. S. Banach B, Orenstein JM, Fox LM, Randell SH, Rowley AH, Baker SC. Human airway epithelial cell culture to identify new respiratory viruses: Coronavirus NL63 as a model. *J Virol Methods*. 1 mars 2009;156(1):19-26.

180. Jazaeri Farsani SM, Deijis M, Dijkman R, Molenkamp R, Jeeninga RE, Ieven M, et al. Culturing of respiratory viruses in well-differentiated pseudostratified human airway epithelium as a tool to detect unknown viruses. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015;9(1):51-7.

181. Zhu N, Wang W, Liu Z, Liang C, Wang W, Ye F, et al. Morphogenesis and cytopathic

effect of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelial cells. *Nat Commun.* 6 août 2020;11(1):3910.

182. Pruijssers AJ, George AS, Schäfer A, Leist SR, Gralinski LE, Dinno KH, et al. Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARS-CoV Expressing the SARS-CoV-2 RNA Polymerase in Mice. *Cell Rep.* 21 juill 2020;32(3):107940.

183. Maisonnasse P, Guedj J, Contreras V, Behillil S, Solas C, Marlin R, et al. Hydroxychloroquine use against SARS-CoV-2 infection in non-human primates. *Nature.* sept 2020;585(7826):584-7.

184. Monteil V, Kwon H, Prado P, Hagelkrüys A, Wimmer RA, Stahl M, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell.* 14 mai 2020;181(4):905-913.e7.

185. Yang L, Han Y, Nilsson-Payant BE, Gupta V, Wang P, Duan X, et al. A Human Pluripotent Stem Cell-based Platform to Study SARS-CoV-2 Tropism and Model Virus Infection in Human Cells and Organoids. *Cell Stem Cell.* 2 juill 2020;27(1):125-136.e7.

186. Youk J, Kim T, Evans KV, Jeong YI, Hur Y, Hong SP, et al. Three-Dimensional Human Alveolar Stem Cell Culture Models Reveal Infection Response to SARS-CoV-2. *Cell Stem Cell.* 3 déc 2020;27(6):905-919.e10.

187. Ramani A, Müller L, Ostermann PN, Gabriel E, Abida-Islam P, Müller-Schiffmann A, et al. SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids. *EMBO J.* 15 oct 2020;39(20):e106230.

188. Makovoz B, Moeller R, Zebitz Eriksen A, tenOever BR, Blenkinsop TA. SARS-CoV-2 Infection of Ocular Cells from Human Adult Donor Eyes and hESC-Derived Eye Organoids. *SSRN.* 15 juill 2020;3650574.

189. Gerhards NM, Cornelissen JBWJ, van Keulen LJM, Harders-Westerveen J, Vloet R, Smid B, et al. Predictive Value of Precision-Cut Lung Slices for the Susceptibility of Three Animal Species for SARS-CoV-2 and Validation in a Refined Hamster Model. *Pathogens.* juill 2021;10(7):824.

190. Magnen M, You R, Rao AA, Davis RT, Rodriguez L, Simoneau CR, et al. Immediate myeloid depot for SARS-CoV-2 in the human lung [Internet]. *bioRxiv*; 2022 [cité 29 nov 2022]. p. 2022.04.28.489942. Disponible sur:

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.28.489942v2>

191. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol.* 17 mars 2020;94(7):e00127-20.

192. Yang XH, Deng W, Tong Z, Liu YX, Zhang LF, Zhu H, et al. Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection. *Comp Med.* oct 2007;57(5):450-9.
193. McCray PB, Pewe L, Wohlford-Lenane C, Hickey M, Manzel L, Shi L, et al. Lethal Infection of K18-hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol.* 15 janv 2007;81(2):813-21.
194. Menachery VD, Yount BL, Sims AC, Debbink K, Agnihothram SS, Gralinski LE, et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc Natl Acad Sci.* 15 mars 2016;113(11):3048-53.
195. Hassan AO, Case JB, Winkler ES, Thackray LB, Kafai NM, Bailey AL, et al. A SARS-CoV-2 Infection Model in Mice Demonstrates Protection by Neutralizing Antibodies. *Cell.* 6 août 2020;182(3):744-753.e4.
196. Sun SH, Chen Q, Gu HJ, Yang G, Wang YX, Huang XY, et al. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 8 juill 2020;28(1):124-133.e4.
197. Dinnon KH, Leist SR, Schäfer A, Edwards CE, Martinez DR, Montgomery SA, et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature.* oct 2020;586(7830):560-6.
198. Gu H, Chen Q, Yang G, He L, Fan H, Deng YQ, et al. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science.* 25 sept 2020;369(6511):1603-7.
199. Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* juill 2020;583(7818):834-8.
200. Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Loeber S, Halfmann PJ, Nakajima N, et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc Natl Acad Sci.* 14 juill 2020;117(28):16587-95.
201. Chan JFW, Yuan S, Zhang AJ, Poon VKM, Chan CCS, Lee ACY, et al. Surgical Mask Partition Reduces the Risk of Noncontact Transmission in a Golden Syrian Hamster Model for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis.* 19 nov 2020;71(16):2139-49.
202. Mok BWY, Liu H, Deng S, Liu J, Zhang AJ, Lau SY, et al. Low dose inocula of SARS-CoV-2 Alpha variant transmits more efficiently than earlier variants in hamsters. *Commun Biol.* 20 sept 2021;4(1):1-8.
203. Osterrieder N, Bertzbach LD, Dietert K, Abdelgawad A, Vladimirova D, Kunec D, et al. Age-Dependent Progression of SARS-CoV-2 Infection in Syrian Hamsters. *Viruses.* juill 2020;12(7):779.
204. Maher JA, DeStefano J. The Ferret: An Animal Model to Study Influenza Virus. *Lab*

Anim. oct 2004;33(9):50-3.

205. Enkirch T, von Messling V. Ferret models of viral pathogenesis. *Virology*. 1 mai 2015;479-480:259-70.

206. Baker AN, Richards SJ, Guy CS, Congdon TR, Hasan M, Zwetsloot AJ, et al. The SARS-CoV-2 Spike Protein Binds Sialic Acids and Enables Rapid Detection in a Lateral Flow Point of Care Diagnostic Device. *ACS Cent Sci*. 25 nov 2020;6(11):2046-52.

207. Richard M, Kok A, de Meulder D, Bestebroer TM, Lamers MM, Okba NMA, et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat Commun*. 8 juill 2020;11(1):3496.

208. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Möller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. 28 mai 2020;181(5):1036-1045.e9.

209. Rockx B, Kuiken T, Herfst S, Bestebroer T, Lamers MM, Oude Munnink BB, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*. 29 mai 2020;368(6494):1012-5.

210. Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, van Doremalen N, Pérez-Pérez L, Schulz J, et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature*. sept 2020;585(7824):268-72.

211. Yu P, Qi F, Xu Y, Li F, Liu P, Liu J, et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19. *Anim Models Exp Med*. 2020;3(1):93-7.

212. Deng W, Bao L, Liu J, Xiao C, Liu J, Xue J, et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science*. 14 août 2020;369(6505):818-23.

213. van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, Belij-Rammerstorfer S, Purushotham JN, Port JR, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature*. oct 2020;586(7830):578-82.

214. Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, Loos C, Chandrashekar A, Yu J, et al. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. oct 2020;586(7830):583-8.

215. Williamson BN, Feldmann F, Schwarz B, Meade-White K, Porter DP, Schulz J, et al. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *Nature*. sept 2020;585(7824):273-6.

216. Hartman AL, Nambulli S, McMillen CM, White AG, Tilston-Lunel NL, Albe JR, et al. SARS-CoV-2 infection of African green monkeys results in mild respiratory disease discernible by PET/CT imaging and shedding of infectious virus from both respiratory and gastrointestinal

tracts. *PLOS Pathog.* 18 sept 2020;16(9):e1008903.

217. Nevers Q, Albertini AA, Lagaudrière-Gesbert C, Gaudin Y. Negri bodies and other virus membrane-less replication compartments. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 déc 2020;1867(12):118831.

218. Dolnik O, Gerresheim GK, Biedenkopf N. New Perspectives on the Biogenesis of Viral Inclusion Bodies in Negative-Sense RNA Virus Infections. *Cells.* juin 2021;10(6):1460.

219. Koonin EV, Krupovic M, Agol VI. The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution? *Microbiol Mol Biol Rev.* 14 juill 2021;85(3):e00053-21.

220. Wolf YI, Kazlauskas D, Iranzo J, Lucía-Sanz A, Kuhn JH, Krupovic M, et al. Origins and Evolution of the Global RNA Virome. *mBio.* 27 nov 2018;9(6):e02329-18.

221. Romero-Brey I, Bartenschlager R. Endoplasmic Reticulum: The Favorite Intracellular Niche for Viral Replication and Assembly. *Viruses.* 7 juin 2016;8(6):160.

222. Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, Bárcena M. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends Microbiol.* 1 déc 2020;28(12):1022-33.

223. Matsumura T, Stollar V, Schlesinger RW. Studies on the nature of dengue viruses: V. Structure and development of dengue virus in vero cells. *Virology.* 1 nov 1971;46(2):344-55.

224. Stohlman SA, Wisseman CL, Eylar OR, Silverman DJ. Dengue virus-induced modifications of host cell membranes. *J Virol.* oct 1975;16(4):1017-26.

225. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe.* 23 avr 2009;5(4):365-75.

226. Offerdahl DK, Dorward DW, Hansen BT, Bloom ME. A Three-Dimensional Comparison of Tick-Borne Flavivirus Infection in Mammalian and Tick Cell Lines. *PLOS ONE.* 24 oct 2012;7(10):e47912.

227. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol.* sept 1997;71(9):6650-61.

228. Mackenzie JM, Jones MK, Westaway EG. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J Virol.* nov 1999;73(11):9555-67.

229. Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J Virol.* oct 2010;84(20):10438-47.

230. Överby AK, Popov VL, Niedrig M, Weber F. Tick-Borne Encephalitis Virus Delays Interferon Induction and Hides Its Double-Stranded RNA in Intracellular Membrane Vesicles. *J Virol.* sept 2010;84(17):8470-83.
231. Mackenzie JM, Westaway EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol.* nov 2001;75(22):10787-99.
232. Miorin L, Romero-Brey I, Maiuri P, Hoppe S, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R, et al. Three-Dimensional Architecture of Tick-Borne Encephalitis Virus Replication Sites and Trafficking of the Replicated RNA. *J Virol.* juin 2013;87(11):6469-81.
233. Hoenninger VM, Rouha H, Orlinger KK, Miorin L, Marcello A, Kofler RM, et al. Analysis of the effects of alterations in the tick-borne encephalitis virus 3'-noncoding region on translation and RNA replication using reporter replicons. *Virology.* 1 août 2008;377(2):419-30.
234. Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol.* juin 2002;76(12):5974-84.
235. Ferraris P, Blanchard E, Roingard P. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol.* 1 sept 2010;91(9):2230-7.
236. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* 2012;8(12):e1003056.
237. Ferraris P, Beaumont E, Uzbekov R, Brand D, Gaillard J, Blanchard E, et al. Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection. *Cell Mol Life Sci.* avr 2013;70(7):1297-306.
238. Magliano D, Marshall JA, Bowden DS, Vardaxis N, Meanger J, Lee JY. Rubella virus replication complexes are virus-modified lysosomes. *Virology.* 5 janv 1998;240(1):57-63.
239. Fontana J, Tzeng WP, Calderita G, Fraile-Ramos A, Frey TK, Risco C. Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cell Microbiol.* avr 2007;9(4):875-90.
240. Fontana J, López-Iglesias C, Tzeng WP, Frey TK, Fernández JJ, Risco C. Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology.* 30 sept 2010;405(2):579-91.
241. Froshauer S, Kartenbeck J, Helenius A. Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J Cell Biol.* 1 déc 1988;107(6):2075-86.
242. Kujala P, Ikäheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kääriäinen L. Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *J Virol.* avr 2001;75(8):3873-84.

243. Friedman RM, Levin JG, Grimley PM, Berezsky IK. Membrane-Associated Replication Complex in Arbovirus Infection 1. *J Virol.* sept 1972;10(3):504-15.
244. Grimley PM, Levin JG, Berezsky IK, Friedman RM. Specific Membranous Structures Associated with the Replication of Group A Arboviruses. *J Virol.* sept 1972;10(3):492-503.
245. Spuul P, Balistreri G, Kääriäinen L, Ahola T. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol.* août 2010;84(15):7543-57.
246. Kopeck BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P. Three-Dimensional Analysis of a Viral RNA Replication Complex Reveals a Virus-Induced Mini-Organelle. *PLOS Biol.* 14 août 2007;5(9):e220.
247. Lanman J, Crum J, Deerinck TJ, Gaietta GM, Schneemann A, Sosinsky GE, et al. Visualizing flock house virus infection in *Drosophila* cells with correlated fluorescence and electron microscopy. *J Struct Biol.* 1 mars 2008;161(3):439-46.
248. Kallman F, Williams RC, Dulbecco R, Vogt M. Fine Structure of Changes Produced in Cultured Cells Sampled at Specified Intervals During a Single Growth Cycle of Polio Virus. *J Biophys Biochem Cytol.* 25 mai 1958;4(3):301-8.
249. Hsu NY, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen YH, Takvorian PM, et al. Viral Reorganization of the Secretory Pathway Generates Distinct Organelles for RNA Replication. *Cell.* 28 mai 2010;141(5):799-811.
250. Schlegel A, Giddings TH, Ladinsky MS, Kirkegaard K. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol.* oct 1996;70(10):6576-88.
251. Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E. Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol.* janv 2012;86(1):302-12.
252. Limpens RWAL, van der Schaar HM, Kumar D, Koster AJ, Snijder EJ, van Kuppeveld FJM, et al. The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *mBio.* 2011;2(5):e00166-11.
253. Monaghan P, Cook H, Jackson T, Ryan M, Wileman T 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J Gen Virol.* 85(4):933-46.
254. Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLOS Biol.* 30 nov 2004;2(12):e432.

255. Hyde JL, Sosnovtsev SV, Green KY, Wobus C, Virgin HW, Mackenzie JM. Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J Virol.* oct 2009;83(19):9709-19.
256. Knoops K, Kikkert M, den WSHE, Zevenhoven-Dobbe JC, Meer Y, Koster AJ. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* sept 2008;16;6(9):e226.
257. Ulasli M, Verheije MH, de Haan CAM, Reggiori F. Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus. *Cell Microbiol.* 2010;12(6):844-61.
258. de Wilde AH, Raj VS, Oudshoorn D, Bestebroer TM, van Nieuwkoop S, Limpens RWAL, et al. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- α treatment. *J Gen Virol.* 94(8):1749-60.
259. Maier HJ, Hawes PC, Cottam EM, Mantell J, Verkade P, Monaghan P, et al. Infectious Bronchitis Virus Generates Spherules from Zippered Endoplasmic Reticulum Membranes. *mBio.* 22 oct 2013;4(5):e00801-13.
260. Pedersen KW, van der Meer Y, Roos N, Snijder EJ. Open Reading Frame 1a-Encoded Subunits of the Arterivirus Replicase Induce Endoplasmic Reticulum-Derived Double-Membrane Vesicles Which Carry the Viral Replication Complex. *J Virol.* mars 1999;73(3):2016-26.
261. Knoops K, Bárcena M, Limpens RWAL, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ. Ultrastructural Characterization of Arterivirus Replication Structures: Reshaping the Endoplasmic Reticulum To Accommodate Viral RNA Synthesis. *J Virol.* mars 2012;86(5):2474-87.
262. Más P, Beachy RN. Replication of Tobacco Mosaic Virus on Endoplasmic Reticulum and Role of the Cytoskeleton and Virus Movement Protein in Intracellular Distribution of Viral RNA. *J Cell Biol.* 29 nov 1999;147(5):945-58.
263. Restrepo-Hartwig MA, Ahlquist P. Brome mosaic virus helicase- and polymerase-like proteins colocalize on the endoplasmic reticulum at sites of viral RNA synthesis. *J Virol.* déc 1996;70(12):8908-16.
264. Gushchin V, Solovyev A, Erokhina T, Morozov S, Agranovsky A. Beet yellows virus replicase and replicative compartments: parallels with other RNA viruses. *Front Microbiol* [Internet]. 2013 [cité 21 déc 2022];4. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00038>
265. Hayes RJ, Buck KW. Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a

purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell*. 19 oct 1990;63(2):363-8.

266. Panavas T, Hawkins CM, Panaviene Z, Nagy PD. The role of the p33:p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of Cucumber necrosis tomosvirus. *Virology*. 1 juill 2005;338(1):81-95.

267. Rust RC, Landmann L, Gosert R, Tang BL, Hong W, Hauri HP, et al. Cellular COPII Proteins Are Involved in Production of the Vesicles That Form the Poliovirus Replication Complex. *J Virol*. 15 oct 2001;75(20):9808-18.

268. Trahey M, Oh HS, Cameron CE, Hay JC. Poliovirus Infection Transiently Increases COPII Vesicle Budding. *J Virol*. sept 2012;86(18):9675-82.

269. Belov GA, Altan-Bonnet N, Kovtunovych G, Jackson CL, Lippincott-Schwartz J, Ehrenfeld E. Hijacking Components of the Cellular Secretory Pathway for Replication of Poliovirus RNA. *J Virol*. 15 janv 2007;81(2):558-67.

270. Wang J, Wu Z, Jin Q. COPI Is Required for Enterovirus 71 Replication. *PLOS ONE*. 25 mai 2012;7(5):e38035.

271. Gazina EV, Mackenzie JM, Gorrell RJ, Anderson DA. Differential Requirements for COPI Coats in Formation of Replication Complexes among Three Genera of Picornaviridae. *J Virol*. nov 2002;76(21):11113-22.

272. Li H, Yang X, Yang G, Hong Z, Zhou L, Yin P, et al. Hepatitis C Virus NS5A Hijacks ARFGAP1 To Maintain a Phosphatidylinositol 4-Phosphate-Enriched Microenvironment. *J Virol*. juin 2014;88(11):5956-66.

273. Knoops K, Swett-Tapia C, van den Worm SHE, te Velthuis AJW, Koster AJ, Mommaas AM, et al. Integrity of the Early Secretory Pathway Promotes, but Is Not Required for, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus RNA Synthesis and Virus-Induced Remodeling of Endoplasmic Reticulum Membranes. *J Virol*. 15 janv 2010;84(2):833-46.

274. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, et al. Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B. *J Virol*. nov 2005;79(21):13473-82.

275. Amarilio R, Ramachandran S, Sabanay H, Lev S. Differential Regulation of Endoplasmic Reticulum Structure through VAP-Nir Protein Interaction *. *J Biol Chem*. 18 févr 2005;280(7):5934-44.

276. Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci*. 18 août 2009;106(33):14046-51.

277. Guévin C, Manna D, Bélanger C, Konan KV, Mak P, Labonté P. Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during

infection. *Virology*. 15 sept 2010;405(1):1-7.

278. Dales S, Eggers HJ, Tamm I, Palade GE. Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology*. 1 juill 1965;26(3):379-89.

279. Suhy DA, Giddings TH, Kirkegaard K. Remodeling the Endoplasmic Reticulum by Poliovirus Infection and by Individual Viral Proteins: an Autophagy-Like Origin for Virus-Induced Vesicles. *J Virol*. oct 2000;74(19):8953-65.

280. Jackson WT, Jr THG, Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, et al. Subversion of Cellular Autophagosomal Machinery by RNA Viruses. *PLOS Biol*. 26 avr 2005;3(5):e156.

281. Prentice E, Jerome WG, Yoshimori T, Mizushima N, Denison MR. Coronavirus Replication Complex Formation Utilizes Components of Cellular Autophagy *. *J Biol Chem*. 12 mars 2004;279(11):10136-41.

282. Tai AW, Salloum S. The Role of the Phosphatidylinositol 4-Kinase PI4KA in Hepatitis C Virus-Induced Host Membrane Rearrangement. *PLOS ONE*. 12 oct 2011;6(10):e26300.

283. Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, et al. Recruitment and Activation of a Lipid Kinase by Hepatitis C Virus NS5A Is Essential for Integrity of the Membranous Replication Compartment. *Cell Host Microbe*. 20 janv 2011;9(1):32-45.

284. Berger KL, Kelly SM, Jordan TX, Tartell MA, Randall G. Hepatitis C Virus Stimulates the Phosphatidylinositol 4-Kinase III Alpha-Dependent Phosphatidylinositol 4-Phosphate Production That Is Essential for Its Replication. *J Virol*. sept 2011;85(17):8870-83.

285. Reiss S, Harak C, Romero-Brey I, Radujkovic D, Klein R, Ruggieri A, et al. The Lipid Kinase Phosphatidylinositol-4 Kinase III Alpha Regulates the Phosphorylation Status of Hepatitis C Virus NS5A. *PLOS Pathog*. 9 mai 2013;9(5):e1003359.

286. Wang H, Perry JW, Lauring AS, Neddermann P, De Francesco R, Tai AW. Oxysterol-Binding Protein Is a Phosphatidylinositol 4-Kinase Effector Required for HCV Replication Membrane Integrity and Cholesterol Trafficking. *Gastroenterology*. 1 mai 2014;146(5):1373-1385.e11.

287. Furse S, Brooks NJ, Seddon AM, Woscholski R, Templer RH, Tate EW, et al. Lipid membrane curvature induced by distearoyl phosphatidylinositol 4-phosphate. *Soft Matter*. 22 févr 2012;8(11):3090-3.

288. Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J, Lacas-Gervais S, Drin G, Antonny B. A Four-Step Cycle Driven by PI(4)P Hydrolysis Directs Sterol/PI(4)P Exchange by the ER-Golgi Tether OSBP. *Cell*. 7 nov 2013;155(4):830-43.

289. Bishé B, Syed GH, Field SJ, Siddiqui A. Role of Phosphatidylinositol 4-Phosphate

- (PI4P) and Its Binding Protein GOLPH3 in Hepatitis C Virus Secretion*. *J Biol Chem.* 10 août 2012;287(33):27637-47.
290. Amako Y, Syed GH, Siddiqui A. Protein Kinase D Negatively Regulates Hepatitis C Virus Secretion through Phosphorylation of Oxysterol-binding Protein and Ceramide Transfer Protein*. *J Biol Chem.* 1 avr 2011;286(13):11265-74.
291. Khan I, Katikaneni DS, Han Q, Sanchez-Felipe L, Hanada K, Ambrose RL, et al. Modulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Glycosphingolipids and Four-Phosphate Adaptor Protein 2. *J Virol.* nov 2014;88(21):12276-95.
292. Greninger AL, Knudsen GM, Betegon M, Burlingame AL, DeRisi JL. The 3A Protein from Multiple Picornaviruses Utilizes the Golgi Adaptor Protein ACBD3 To Recruit PI4KIII β . *J Virol.* avr 2012;86(7):3605-16.
293. Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for antipoliavirus activity. *J Virol.* mars 2011;85(5):2364-72.
294. Arita M. Phosphatidylinositol-4 kinase III beta and oxysterol-binding protein accumulate unesterified cholesterol on poliovirus-induced membrane structure. *Microbiol Immunol.* 2014;58(4):239-56.
295. Lee WM, Ahlquist P. Membrane Synthesis, Specific Lipid Requirements, and Localized Lipid Composition Changes Associated with a Positive-Strand RNA Virus RNA Replication Protein. *J Virol.* déc 2003;77(23):12819-28.
296. Xu K, Nagy PD. RNA virus replication depends on enrichment of phosphatidylethanolamine at replication sites in subcellular membranes. *Proc Natl Acad Sci.* 7 avr 2015;112(14):E1782-91.
297. Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C Virus Nonstructural 4B Protein Modulates Sterol Regulatory Element-binding Protein Signaling via the AKT Pathway*. *J Biol Chem.* 3 avr 2009;284(14):9237-46.
298. Huang JT, Tseng CP, Liao MH, Lu SC, Yeh WZ, Sakamoto N, et al. Hepatitis C virus replication is modulated by the interaction of nonstructural protein NS5B and fatty acid synthase. *J Virol.* mai 2013;87(9):4994-5004.
299. Heaton NS, Randall G. Dengue Virus-Induced Autophagy Regulates Lipid Metabolism. *Cell Host Microbe.* 18 nov 2010;8(5):422-32.
300. Martín-Acebes MA, Blázquez AB, Oya NJ de, Escribano-Romero E, Saiz JC. West Nile Virus Replication Requires Fatty Acid Synthesis but Is Independent on Phosphatidylinositol-4-Phosphate Lipids. *PLOS ONE.* 20 sept 2011;6(9):e24970.

301. Mackenzie JM, Khromykh AA, Parton RG. Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response. *Cell Host Microbe*. 11 oct 2007;2(4):229-39.
302. Ilnytska O, Santiana M, Hsu NY, Du WL, Chen YH, Viktorova EG, et al. Enteroviruses Harness the Cellular Endocytic Machinery to Remodel the Host Cell Cholesterol Landscape for Effective Viral Replication. *Cell Host Microbe*. 11 sept 2013;14(3):281-93.
303. Williams LL, Lew HM, Davidorf FH, Pelok SG, Singley CT, Wolinsky JS. Altered membrane fatty acids of cultured human retinal pigment epithelium persistently infected with rubella virus may affect secondary cellular function. *Arch Virol*. 1 sept 1994;134(3):379-92.
304. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner*. *J Biol Chem*. 23 mars 2007;282(12):8873-82.
305. Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM. Regulated Cleavages at the West Nile Virus NS4A-2K-NS4B Junctions Play a Major Role in Rearranging Cytoplasmic Membranes and Golgi Trafficking of the NS4A Protein. *J Virol*. mai 2006;80(9):4623-32.
306. Stern O, Hung YF, Valdau O, Yaffe Y, Harris E, Hoffmann S, et al. An N-Terminal Amphipathic Helix in Dengue Virus Nonstructural Protein 4A Mediates Oligomerization and Is Essential for Replication. *J Virol*. avr 2013;87(7):4080-5.
307. Bailey D, Kaiser WJ, Hollinshead M, Moffat K, Chaudhry Y, Wileman T, et al. Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J Gen Virol*. mars 2010;91(Pt 3):739-49.
308. Lampio A, Kilpeläinen I, Pesonen S, Karhi K, Auvinen P, Somerharju P, et al. Membrane Binding Mechanism of an RNA Virus-capping Enzyme*. *J Biol Chem*. 1 déc 2000;275(48):37853-9.
309. Salonen A, Vasiljeva L, Merits A, Magden J, Jokitalo E, Kääriäinen L. Properly Folded Nonstructural Polyprotein Directs the Semliki Forest Virus Replication Complex to the Endosomal Compartment. *J Virol*. févr 2003;77(3):1691-702.
310. Kallio K, Hellström K, Balistreri G, Spuul P, Jokitalo E, Ahola T. Template RNA Length Determines the Size of Replication Complex Spherules for Semliki Forest Virus. *J Virol*. août 2013;87(16):9125-34.
311. Kopek BG, Settles EW, Friesen PD, Ahlquist P. Nodavirus-Induced Membrane Rearrangement in Replication Complex Assembly Requires Replicase Protein A, RNA Templates, and Polymerase Activity. *J Virol*. déc 2010;84(24):12492-503.
312. Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P. A Positive-Strand RNA Virus Replication Complex Parallels Form and Function of Retrovirus Capsids. *Mol Cell*.

1 mars 2002;9(3):505-14.

313. Gouttenoire J, Roingeard P, Penin F, Moradpour D. Amphipathic α -Helix AH2 Is a Major Determinant for the Oligomerization of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *J Virol* [Internet]. déc 2010 [cité 10 janv 2023]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01798-10>
314. Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, Moradpour D, et al. NS4B Self-Interaction through Conserved C-Terminal Elements Is Required for the Establishment of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *J Virol*. 15 juill 2011;85(14):6963-76.
315. Echeverri AC, Dasgupta A. Amino Terminal Regions of Poliovirus 2C Protein Mediate Membrane Binding. *Virology*. 20 avr 1995;208(2):540-53.
316. Van kuppeveld FJM, Melchers WJG, Kirkegaard K, Doedens JR. Structure–Function Analysis of Coxsackie B3 Virus Protein 2B. *Virology*. 6 janv 1997;227(1):111-8.
317. Moffat K, Knox C, Howell G, Clark SJ, Yang H, Belsham GJ, et al. Inhibition of the Secretory Pathway by Foot-and-Mouth Disease Virus 2BC Protein Is Reproduced by Coexpression of 2B with 2C, and the Site of Inhibition Is Determined by the Subcellular Location of 2C. *J Virol*. févr 2007;81(3):1129-39.
318. Snijder EJ, van Tol H, Roos N, Pedersen K W Y 2001. Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. *J Gen Virol*. 82(5):985-94.
319. Posthuma CC, Pedersen KW, Lu Z, Joosten RG, Roos N, Zevenhoven-Dobbe JC, et al. Formation of the Arterivirus Replication/Transcription Complex: a Key Role for Nonstructural Protein 3 in the Remodeling of Intracellular Membranes. *J Virol*. mai 2008;82(9):4480-91.
320. Angelini MM, Neuman BW, Buchmeier MJ. Untangling Membrane Rearrangement in the Nidovirales. *DNA Cell Biol*. mars 2014;33(3):122-7.
321. McMahon HT, Gallop JL. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. déc 2005;438(7068):590-6.
322. Shibata Y, Hu J, Kozlov MM, Rapoport TA. Mechanisms Shaping the Membranes of Cellular Organelles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25(1):329-54.
323. Brunn A von, Teepe C, Simpson JC, Pepperkok R, Friedel CC, Zimmer R, et al. Analysis of Intraviral Protein-Protein Interactions of the SARS Coronavirus ORFeome. *PLOS ONE*. 23 mai 2007;2(5):e459.
324. Kutay U, Hartmann E, Rapoport TA. A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol*. 1 mars 1993;3(3):72-5.

325. Appel N, Herian U, Bartenschlager R. Efficient Rescue of Hepatitis C Virus RNA Replication by trans-Complementation with Nonstructural Protein 5A. *J Virol* [Internet]. 15 janv 2005 [cité 11 janv 2023]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.79.2.896-909.2005>
326. Ahola T, Kujala P, Tuittila M, Blom T, Laakkonen P, Hinkkanen A, et al. Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection. *J Virol* [Internet]. 1 août 2000 [cité 11 janv 2023]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.74.15.6725-6733.2000>
327. Egger D, Bienz K. Intracellular location and translocation of silent and active poliovirus replication complexes. *J Gen Virol*. mars 2005;86(Pt 3):707-18.
328. Quinkert D, Bartenschlager R, Lohmann V. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol*. nov 2005;79(21):13594-605.
329. Ertel KJ, Benefield D, Castaño-Diez D, Pennington JG, Horswill M, den Boon JA, et al. Cryo-electron tomography reveals novel features of a viral RNA replication compartment. Sundquist WI, éditeur. *eLife*. 27 juin 2017;6:e25940.
330. Zhang K, Law YS, Law MCY, Tan YB, Wirawan M, Luo D. Structural insights into viral RNA capping and plasma membrane targeting by Chikungunya virus nonstructural protein 1. *Cell Host Microbe*. 12 mai 2021;29(5):757-764.e3.
331. Papageorgiou N, Coutard B, Lantéz V, Gautron E, Chauvet O, Baronti C, et al. The 2C putative helicase of echovirus 30 adopts a hexameric ring-shaped structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1 oct 2010;66(10):1116-20.
332. Scherer KM, Mascheroni L, Carnell GW, Wunderlich LCS, Makarchuk S, Brockhoff M, et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein adheres to replication organelles before viral assembly at the Golgi/ERGIC and lysosome-mediated egress. *Sci Adv*. 7 janv 2022;8(1):eabl4895.
333. Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, et al. Structural and Functional Studies of Nonstructural Protein 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly. *PLOS Pathog*. 16 déc 2010;6(12):e1001233.
334. Venter PA, Marshall D, Schneemann A. Dual Roles for an Arginine-Rich Motif in Specific Genome Recognition and Localization of Viral Coat Protein to RNA Replication Sites in Flock House Virus-Infected Cells. *J Virol*. avr 2009;83(7):2872-82.
335. Uchil PD, Satchidanandam V. Architecture of the Flaviviral Replication Complex: PROTEASE, NUCLEASE, AND DETERGENTS REVEAL ENCASEMENT WITHIN DOUBLE-LAYERED MEMBRANE COMPARTMENTS*. *J Biol Chem*. 4 juill

2003;278(27):24388-98.

336. Uchida L, Espada-Murao LA, Takamatsu Y, Okamoto K, Hayasaka D, Yu F, et al. The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. *Sci Rep*. 1 déc 2014;4:7395.

337. Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*. nov 2010;468(7322):452-6.

338. Kindler E, Gil-Cruz C, Spanier J, Li Y, Wilhelm J, Rabouw HH, et al. Early endonuclease-mediated evasion of RNA sensing ensures efficient coronavirus replication. *PLOS Pathog*. 3 févr 2017;13(2):e1006195.

339. Coers J, Bernstein-Hanley I, Grotzky D, Parvanova I, Howard JC, Taylor GA, et al. *Chlamydia muridarum* Evades Growth Restriction by the IFN- γ -Inducible Host Resistance Factor Irgb101. *J Immunol*. 1 mai 2008;180(9):6237-45.

340. Choi J, Park S, Biering SB, Selleck E, Liu CY, Zhang X, et al. The Parasitophorous Vacuole Membrane of *Toxoplasma gondii* Is Targeted for Disruption by Ubiquitin-like Conjugation Systems of Autophagy. *Immunity*. 19 juin 2014;40(6):924-35.

341. Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Bradfield CJ, MacMicking JD. IFN-Inducible GTPases in Host Cell Defense. *Cell Host Microbe*. 18 oct 2012;12(4):432-44.

342. Halder AK, Saka HA, Piro AS, Dunn JD, Henry SC, Taylor GA, et al. IRG and GBP Host Resistance Factors Target Aberrant, “Non-self” Vacuoles Characterized by the Missing of “Self” IRGM Proteins. *PLOS Pathog*. 13 juin 2013;9(6):e1003414.

343. Park S, Choi J, Biering SB, Dominici E, Williams LE, Hwang S. Targeting by Autophagy proteins (TAG): Targeting of IFN γ -inducible GTPases to membranes by the LC3 conjugation system of autophagy. *Autophagy*. 2 juill 2016;12(7):1153-67.

344. Halder AK, Foltz C, Finethy R, Piro AS, Feeley EM, Pilla-Moffett DM, et al. Ubiquitin systems mark pathogen-containing vacuoles as targets for host defense by guanylate binding proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 13 oct 2015;112(41):E5628-37.

345. Oudshoorn D, van der Hoeven B, Limpens RWAL, Beugeling C, Snijder EJ, Bárcena M, et al. Antiviral Innate Immune Response Interferes with the Formation of Replication-Associated Membrane Structures Induced by a Positive-Strand RNA Virus. *mBio*. 6 déc 2016;7(6):e01991-16.

346. Helbig KJ, Eyre NS, Yip E, Narayana S, Li K, Fiches G, et al. The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology*. nov 2011;54(5):1506-17.

347. Hornung V, Hartmann R, Ablasser A, Hopfner KP. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat Rev Immunol.* août 2014;14(8):521-8.
348. Richardson RB, Ohlson MB, Eitson JL, Kumar A, McDougal MB, Boys IN, et al. A CRISPR screen identifies IFI6 as an ER-resident interferon effector that blocks flavivirus replication. *Nat Microbiol.* nov 2018;3(11):1214-23.
349. Taylor RT, Lubick KJ, Robertson SJ, Broughton JP, Bloom ME, Bresnahan WA, et al. TRIM79 α , an Interferon-Stimulated Gene Product, Restricts Tick-Borne Encephalitis Virus Replication by Degrading the Viral RNA Polymerase. *Cell Host Microbe.* 15 sept 2011;10(3):185-96.
350. Suzuki Y, Chin WX, Han Q, Ichiyama K, Lee CH, Eyo ZW, et al. Characterization of RyDEN (C19orf66) as an Interferon-Stimulated Cellular Inhibitor against Dengue Virus Replication. *PLOS Pathog.* 6 janv 2016;12(1):e1005357.
351. Balinsky CA, Schmeisser H, Wells AI, Ganesan S, Jin T, Singh K, et al. IRAV (FLJ11286), an Interferon-Stimulated Gene with Antiviral Activity against Dengue Virus, Interacts with MOV10. *J Virol.* 14 févr 2017;91(5):e01606-16.
352. Sturman LS, Holmes KV. The Molecular Biology of Coronaviruses. In: Lauffer MA, Maramorosch K, éditeurs. *Advances in Virus Research* [Internet]. Academic Press; 1983 [cité 16 janv 2023]. p. 35-112. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352708607216>
353. Tooze J, Tooze S, Warren G. Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur J Cell Biol.* mars 1984;33(2):281-93.
354. Tooze J, Tooze SA. Infection of AtT20 murine pituitary tumour cells by mouse hepatitis virus strain A59: virus budding is restricted to the Golgi region. *Eur J Cell Biol.* 1 mai 1985;37:203-12.
355. Klumperman J, Locker JK, Meijer A, Horzinek MC, Geuze HJ, Rottier PJ. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J Virol.* oct 1994;68(10):6523-34.
356. Krijnse-Locker J, Ericsson M, Rottier P, Griffiths G. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J Cell Biol.* 1 janv 1994;124(1):55-70.
357. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem.* 11 sept 2020;295(37):12910-34.

358. Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* avr 1996;15(8):2020-8.
359. Machamer CE, Rose JK. A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J Cell Biol.* 1 sept 1987;105(3):1205-14.
360. Perrier A, Bonnin A, Desmarests L, Danneels A, Goffard A, Rouillé Y, et al. The C-terminal domain of the MERS coronavirus M protein contains a trans-Golgi network localization signal. *J Biol Chem.* 27 sept 2019;294(39):14406-21.
361. Weisz O, Swift A, Machamer C. Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J Cell Biol.* 15 sept 1993;122(6):1185-96.
362. Raamsman MJB, Locker JK, de Hooge A, de Vries AAF, Griffiths G, Vennema H, et al. Characterization of the Coronavirus Mouse Hepatitis Virus Strain A59 Small Membrane Protein E. *J Virol.* mars 2000;74(5):2333-42.
363. Saraste J, Marie M. Intermediate compartment (IC): from pre-Golgi vacuoles to a semi-autonomous membrane system. *Histochem Cell Biol.* 2018;150(5):407-30.
364. Tooze SA, Tooze J, Warren G. Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J Cell Biol.* 1 mai 1988;106(5):1475-87.
365. Sannerud R, Marie M, Nizak C, Dale HA, Pernet-Gallay K, Perez F, et al. Rab1 Defines a Novel Pathway Connecting the Pre-Golgi Intermediate Compartment with the Cell Periphery. *Mol Biol Cell.* avr 2006;17(4):1514-26.
366. Upadhyay M, Gupta S. Endoplasmic reticulum secretory pathway: Potential target against SARS-CoV-2. *Virus Res.* 15 oct 2022;320:198897.
367. Glick BS, Luini A. Models for Golgi Traffic: A Critical Assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 11 janv 2011;3(11):a005215.
368. Volchuk A, Amherdt M, Ravazzola M, Brügger B, Rivera VM, Clackson T, et al. Megavesicles Implicated in the Rapid Transport of Intracisternal Aggregates across the Golgi Stack. *Cell.* 4 août 2000;102(3):335-48.
369. Lavieu G, Zheng H, Rothman JE. Stapled Golgi cisternae remain in place as cargo passes through the stack. *Pfeffer S, éditeur. eLife.* 4 juin 2013;2:e00558.
370. Salanueva IJ, Carrascosa JL, Risco C. Structural Maturation of the Transmissible Gastroenteritis Coronavirus. *J Virol.* oct 1999;73(10):7952-64.
371. Tooze J, Tooze SA, Fuller SD. Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. *J Cell Biol.* 1 sept

1987;105(3):1215-26.

372. Prydz K, Saraste J. The life cycle and enigmatic egress of coronaviruses. *Mol Microbiol.* 2022;117(6):1308-16.

373. Prydz K, Tveit H, Vedeler A, Saraste J. Arrivals and departures at the plasma membrane: direct and indirect transport routes. *Cell Tissue Res.* 1 avr 2013;352(1):5-20.

374. Marie M, Dale HA, Sannerud R, Saraste J. The Function of the Intermediate Compartment in Pre-Golgi Trafficking Involves its Stable Connection with the Centrosome. *Mol Biol Cell.* 15 oct 2009;20(20):4458-70.

375. Wilcke M, Johannes L, Galli T, Mayau V, Goud B, Salamero J. Rab11 Regulates the Compartmentalization of Early Endosomes Required for Efficient Transport from Early Endosomes to the Trans-Golgi Network. *J Cell Biol.* 11 déc 2000;151(6):1207-20.

376. Saraste J, Prydz K. A New Look at the Functional Organization of the Golgi Ribbon. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2019 [cité 18 janv 2023];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00171>

377. Saraste J, Prydz K. Assembly and Cellular Exit of Coronaviruses: Hijacking an Unconventional Secretory Pathway from the Pre-Golgi Intermediate Compartment via the Golgi Ribbon to the Extracellular Space. *Cells.* mars 2021;10(3):503.

378. Bracquemond D, Muriaux D. Betacoronavirus Assembly: Clues and Perspectives for Elucidating SARS-CoV-2 Particle Formation and Egress. *mBio.* 28 sept 2021;12(5):e02371-21.

379. Siu YL, Teoh KT, Lo J, Chan CM, Kien F, Escriou N, et al. The M, E, and N Structural Proteins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Are Required for Efficient Assembly, Trafficking, and Release of Virus-Like Particles. *J Virol.* 15 nov 2008;82(22):11318-30.

380. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* juill 2020;583(7816):459-68.

381. Chen D, Zheng Q, Sun L, Ji M, Li Y, Deng H, et al. ORF3a of SARS-CoV-2 promotes lysosomal exocytosis-mediated viral egress. *Dev Cell.* 6 déc 2021;56(23):3250-3263.e5.

382. Koči J, Novotová M, Sláviková M, Klempa B, Zahradník I. SARS-CoV-2 Exploits Non-Canonical Autophagic Processes to Replicate, Mature, and Egress the Infected Vero E6 Cells. *Pathogens.* déc 2022;11(12):1535.

383. Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, Pak E, Qiu Q, Fisher M, et al. β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell.*

10 déc 2020;183(6):1520-1535.e14.

384. Mendonça L, Howe A, Gilchrist JB, Sheng Y, Sun D, Knight ML, et al. Correlative multi-scale cryo-imaging unveils SARS-CoV-2 assembly and egress. *Nat Commun.* 30 juill 2021;12(1):4629.

385. Cortese M, Lee JY, Cerikan B, Neufeldt CJ, Oorschot VMJ, Köhrer S, et al. Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host Microbe.* 9 déc 2020;28(6):853-866.e5.

386. Zhang R, Chen J, Wang D, Fu ZQ. Hijacking of host mitochondria by *Toxoplasma gondii* and SARS-CoV-2. *Trends Parasitol.* 1 avr 2022;38(4):269-71.

387. Chen D, Zhang H. Autophagy in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Curr Opin Physiol.* 1 oct 2022;29:100596.

388. Reggiori F, Monastyrska I, Verheije MH, Cali T, Ulasli M, Bianchi S, et al. Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe.* 25 juin 2010;7(6):500-8.

389. Miao G, Zhao H, Li Y, Ji M, Chen Y, Shi Y, et al. ORF3a of the COVID-19 virus SARS-CoV-2 blocks HOPS complex-mediated assembly of the SNARE complex required for autolysosome formation. *Dev Cell.* 22 févr 2021;56(4):427-442.e5.

390. Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE, Ling AE. Proliferative growth of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J Gen Virol.* 2003;84(12):3291-303.

391. Bergner T, Zech F, Hirschenberger M, Stenger S, Sparrer KMJ, Kirchhoff F, et al. Near-Native Visualization of SARS-CoV-2 Induced Membrane Remodeling and Virion Morphogenesis. *Viruses.* déc 2022;14(12):2786.

392. Neufeldt CJ, Joyce MA, Levin A, Steenberg RH, Pang D, Shields J, et al. Hepatitis C virus-induced cytoplasmic organelles use the nuclear transport machinery to establish an environment conducive to virus replication. *PLoS Pathog.* oct 2013;9(10):e1003744.

393. Hampoelz B, Mackmull MT, Machado P, Ronchi P, Bui KH, Schieber N, et al. Pre-assembled Nuclear Pores Insert into the Nuclear Envelope during Early Development. *Cell.* 28 juill 2016;166(3):664-78.

394. Gomez GN, Abrar F, Dodhia MP, Gonzalez FG, Nag A. SARS coronavirus protein nsp1 disrupts localization of Nup93 from the nuclear pore complex. *Biochem Cell Biol.* déc 2019;97(6):758-66.

395. Addetia A, Lieberman NAP, Phung Q, Hsiang TY, Xie H, Roychoudhury P, et al. SARS-CoV-2 ORF6 Disrupts Bidirectional Nucleocytoplasmic Transport through Interactions with Rae1 and Nup98. *mBio.* 13 avr 2021;12(2):e00065-21.

396. Makiyama K, Hazawa M, Kobayashi A, Lim K, Voon DC, Wong RW. NSP9 of SARS-CoV-2 attenuates nuclear transport by hampering nucleoporin 62 dynamics and functions in host cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1 janv 2022;586:137-42.
397. Su M, Chen Y, Qi S, Shi D, Feng L, Sun D. A Mini-Review on Cell Cycle Regulation of Coronavirus Infection. *Front Vet Sci*. 5 nov 2020;7:586826.
398. Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2009;10(9):597-608.
399. Takahashi S, Kubo K, Waguri S, Yabashi A, Shin HW, Katoh Y, et al. Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci*. 1 sept 2012;125(17):4049-57.
400. Hui KPY, Ng KC, Ho JCW, Yeung HW, Ching RHH, Gu H, et al. Replication of SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant in ex vivo cultures of the human upper and lower respiratory tract. *eBioMedicine* [Internet]. 1 sept 2022 [cité 14 févr 2023];83. Disponible sur: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(22\)00414-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(22)00414-5/fulltext)
401. Hui KPY, Ho JCW, Cheung M chun, Ng K chun, Ching RHH, Lai K ling, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant replication in human bronchus and lung ex vivo. *Nature*. mars 2022;603(7902):715-20.
402. Larsen AH. Molecular Dynamics Simulations of Curved Lipid Membranes. *Int J Mol Sci*. janv 2022;23(15):8098.
403. Hopfer H, Herzig MC, Gosert R, Menter T, Hench J, Tzankov A, et al. Hunting coronavirus by transmission electron microscopy – a guide to SARS-CoV-2-associated ultrastructural pathology in COVID-19 tissues. *Histopathology*. 2021;78(3):358-70.
404. Koonin EV, Dolja VV, Krupovic M, Varsani A, Wolf YI, Yutin N, et al. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiol Mol Biol Rev*. 4 mars 2020;84(2):e00061-19.
405. Gorbalenya AE, Krupovic M, Mushegian A, Kropinski AM, Siddell SG, Varsani A, et al. The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nat Microbiol*. mai 2020;5(5):668-74.

ANNEXES

IV. Annexes

Productions scientifiques

Au cours de ma thèse portant sur un sujet de recherche fondamentale, j'ai eu l'opportunité de participer à plusieurs projets de recherche translationnelle en rapport avec le SARS-CoV-2, à l'interface entre le laboratoire et les patients hospitalisés au CHU de Tours ou au CHU d'Amiens, dans le cadre de collaborations scientifiques. L'expertise acquise dans notre étude par microscopie électronique de cellules infectées *in vitro* par le SARS-CoV-2, a été notamment mise à profit pour rechercher la présence de particules virales dans divers tissus de patients infectés, avec un COVID-19 sévère ou critique. Lors de cette étude, des virions mais aussi des DMVs ont pu être observés dans certains tissus. Une étude menée pendant le confinement, à une période où la communauté hospitalière manquait de masques, a aussi porté sur la possibilité de recycler des masques chirurgicaux après lavage et séchage. Dans cette étude, la microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour vérifier l'intégrité des fibres de polypropylène des masques, après ces protocoles de lavage et séchage.

Tous ces travaux ont été valorisés par des publications dans des revues à comité de lecture.

Zerbib, Y ; Guilain, N ; **Eymieux, S** ; Uzbekov, R ; Castelain, S ; Blanchard, E ; François, C ; Chatelain, D ; Brault, C ; Maizel, J ; Roingeard, P ; Slama, M. Pathology Assessments of Multiple Organs in Fatal COVID-19 in Intensive Care Unit vs. Non-intensive Care Unit Patients., **Front Med** (Lausanne), 2022, 9, 837258

Herrscher, C, **Eymieux, S**, Gaborit, C, Blasco, H, Marlet, J, Stefic, K, Roingeard, P, Grammatico-Guillon, L, Hourieux, C. ELISA-Based Analysis Reveals an Anti-SARS-CoV-2 Protein Immune Response Profile Associated with Disease Severity. **J. Clin. Med.** 2022 Jan, 11, 405.

Marlet J, Gatault P, Maakaroun Z, Longuet H, Stefic K, Handala L, **Eymieux S**, Gyan E, Dartigeas C, Gaudy-Graffin C. Antibody Responses after a Third Dose of COVID-19 Vaccine in Kidney Transplant Recipients and Patients Treated for Chronic Lymphocytic Leukemia. **Vaccines** 2021 Sept, 9, 1055.

Bal A, Destras G, Gaymard A, Stefic K, Marlet J, **Eymieux S**, Regue H, Semanas Q, D'aubarede C, Billaud G, Laurent F, Gonzalez C, Mekki Y, Valette M, Bouscambert M, Gaudy-Graffin C, Lina B, Morfin F, Josset L, The Covid-Diagnosis Hcl Study Group. Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69–V70, France, August to December 2020. **Eurosurveillance**. 2021;26(3):pii=2100008

Bernard L, Desoubreaux G, Bodier-Montagutelli E, Pardessus J, Brea D, Allimonnier L, **Eymieux S**, Raynal Pi, Vasseur V, Vecellio L, Mathé L, Guillon A, Lanotte P, Pourchez J, Verhoeven Po, Esnouf S, Ferry M, Eterradosi N, Blanchard Y, Brown P, Roingeard P, Alcaraz Jp, Cinquin P, Si-Tahar M, Heuzé-Vourc'h N. Controlled Heat and Humidity-Based Treatment for the Reuse of Personal Protective Equipment: A Pragmatic Proof-of-Concept to Address the Mass Shortage of Surgical Masks and N95/FFP2 Respirators and to Prevent the SARS-CoV2 Transmission. **Front Med** (Lausanne). 2020 Oct 20;7:584036.

Présentation des travaux lors de congrès

Communication affichée

10 Décembre 2021 Journée de recherche Tours - Angers, « Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells : a kinetic analysis of viral morphogenesis and virion release mechanisms in TEM », Angers, France

Communication orale

20 octobre 2022 34ème Colloque de Biotechnocentre « Analyse en MET des modifications ultrastructurales viro-induites, et des mécanismes de sortie du SARS-CoV-2 en cellules Vero » Nouan-le-Fuzelier, France



Pathology Assessments of Multiple Organs in Fatal COVID-19 in Intensive Care Unit vs. Non-intensive Care Unit Patients

Yoann Zerbib^{1*}, Nelly Guilain², Sébastien Eymieux^{3,4}, Rustem Uzbekov^{4,5}, Sandrine Castelain^{6,7}, Emmanuelle Blanchard^{3,4}, Catherine François^{6,7}, Denis Chatelain², Clément Brault¹, Julien Maizel¹, Philippe Roingeard^{3,4} and Michel Slama¹

¹ Intensive Care Unit, Amiens Picardie University Hospital, Amiens, France, ² Department of Pathology, Amiens Picardie University Hospital, Amiens, France, ³ INSERM U1259 MAVIVH, Université de Tours and CHRU de Tours, Tours, France, ⁴ Plate-Forme IBiSA de Microscopie Electronique, Université de Tours and CHRU de Tours, Tours, France, ⁵ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, Russia, ⁶ Department of Virology, Amiens Picardie University Hospital, Amiens, France, ⁷ Agents Infectieux, Résistance et Chimiothérapie, Research Unit, AGIR UR4294, University of Picardie Jules Verne, Amiens, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Leland Shapiro,
University of Colorado Anschutz
Medical Campus, United States

Reviewed by:

Ashraf Roshdy,
Alexandria University, Egypt
Hua Su,
Huazhong University of Science
and Technology, China

*Correspondence:

Yoann Zerbib
zerbib.yoann@chu-amiens.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Intensive Care Medicine
and Anesthesiology,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 16 December 2021

Accepted: 29 March 2022

Published: 25 April 2022

Citation:

Zerbib Y, Guilain N, Eymieux S,
Uzbekov R, Castelain S, Blanchard E,
François C, Chatelain D, Brault C,
Maizel J, Roingeard P and Slama M
(2022) Pathology Assessments
of Multiple Organs in Fatal COVID-19
in Intensive Care Unit vs.
Non-intensive Care Unit Patients.
Front. Med. 9:837258.
doi: 10.3389/fmed.2022.837258

Purpose: The objective of the present study was to provide a detailed histopathological description of fatal coronavirus disease 2019 (COVID 19), and compare the lesions in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU patients.

Methods: In this prospective study we included adult patients who died in hospital after presenting with confirmed COVID-19. Multiorgan biopsies were performed. Data generated with light microscopy, transmission electron microscopy (TEM) and RT-PCR assays were reviewed.

Results: 20 patients were enrolled in the study and the main pulmonary finding was alveolar damage, which was focal in 11 patients and diffuse in 8 patients. Chronic fibrotic and inflammatory lesions were observed in 18 cases, with acute inflammatory lesions in 12 cases. Diffuse lesions, collapsed alveoli and dystrophic pneumocytes were more frequent in the ICU group (62.5%, vs. 25%; 63%, vs. 55%; 87.5%, vs. 54%). Acute lesions (82%, vs. 37.5%; $p = 0.07$) with neutrophilic alveolitis (63.6% vs. 0%, respectively; $p = 0.01$) were observed more frequently in the non-ICU group. Viral RNA was detected in 12 lung biopsies (60%) up to 56 days after disease onset. TEM detected viral particles in the lung and kidney biopsy samples up to 27 days after disease onset. Furthermore, abundant networks of double-membrane vesicles (DMVs, a hallmark of viral replication) were observed in proximal tubular epithelial cells.

Conclusion: Lung injury was different in ICU and non-ICU patients. Extrapulmonary damage consisting in kidney and myocardial injury were more frequent in ICU patients. Our TEM experiments provided the first description of SARS-CoV-2-induced DMVs in kidney biopsy samples—a sign of intense viral replication in this organ.

Keywords: lung pathology, ARDS, ICU, SARS-CoV-2, COVID-19

INTRODUCTION

In December 2019, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) emerged in Wuhan, China. It is now responsible for an ongoing pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19) (1, 2). The scientific community responded rapidly by determining the virus's characteristics, understanding its mode of transmission, identifying clinical presentations, and testing possible treatments. The literature data now provide a precise overview of the SARS-CoV-2 infection and its clinical consequences (3). The main clinical manifestation of symptomatic and severe form is acute respiratory failure, which can require admission to an intensive care unit (ICU) and then mechanical ventilation (4–6). Computed tomographic imaging typically shows a “ground glass” pattern in the peripheral areas of the lung. The overall clinical and radiographic presentation meets the Berlin criteria for acute respiratory distress syndrome (ARDS), of which diffuse alveolar damage (DAD) is a classical but non-specific sign (7–9). Large vessel thrombosis and vascular changes are also important features of COVID-19 (8, 10). A growing body of evidence indicates that SARS-CoV-2 can affect organs other than the lungs—leading to multiple organ failure and death (11). However, histological data and autopsy findings on this topic are scarce. Although several histological studies of COVID-19 have been published, few of these looked at biopsies from a large number of organs and sought to detect SARS-CoV-2 virions in the tissues (11, 12).

Hence, the objective of the present study was to provide a detailed histological description of fatal COVID 19 and compare the lesions in patients admitted to ICU with those not admitted to ICU.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Population

We performed a prospective, single-center study in a teaching hospital (Amiens Picardie University Hospital, Amiens, France). From March to May 2020, adult patients who died in hospital after presenting with confirmed COVID-19 were screened for inclusion in the study. Cases of COVID-19 were defined according to the World Health Organization classification. After having received verbal consent from family members and checked the French national register of organ donation refusals, we performed surgical biopsies of the lungs, heart, and muscle tissue and needle biopsies of the kidneys and liver. The study was approved by the French Ministry of Health (reference number: PFS 20-010).

Data Collection

We collected data on demographics (including age and gender), the main comorbidities, the initial clinical presentation, the date of symptom onset, and standard laboratory test results on admission. The timeline of organ failure was determined from the clinical signs and biomarker assay results.

Procedure for Surgical and Needle Biopsies

A two-centimeter incision was made in the fourth intercostal space on the midaxillary line. After removal of the pectoral muscle, we incised the pleura and the pericardium and took surgical biopsies of the lungs and the myocardium. If the lungs were not homogeneously affected, we sampled the most obviously diseased area. We then used a 14-gauge biopsy needle to perform ultrasound-guided percutaneous liver and kidney biopsies. All samples were prepared for pathological assessment and a RT-PCR assay for SARS-CoV-2. For some samples, the tissue ultrastructure was analyzed using transmission electron microscopy (TEM).

Pathology Assessments

The post-mortem biopsy samples were fixed in buffered 4% formaldehyde for 24–48 h and embedded in paraffin. Sections (thickness: 3 μ m) were prepared with a microtome and then stained with hematoxylin-eosin-saffron reagent. Furthermore, liver sections were stained with Masson's trichrome and Perls Prussian Blue, kidney sections were stained with Masson's trichrome, periodic acid Schiff (PAS), Gomori and Congo Red, and lung sections were stained with PAS, Grocott silver stain, and Gram stain.

All lung biopsies were immunohistochemically stained with antibodies against CD3 (Dako, Glostrup, Denmark 1/50), CD4 (Ventana, Tucson Arizona United States, prediluted), CD8 (Novocastra, Newcastle, United Kingdom, 1/20), CD163 (Ventana, Tucson Arizona United States, prediluted), and factor VIII (Dako, Glostrup, Denmark 1/100) and cytomegalovirus (Dako, Glostrup, Denmark, prediluted). The slides were reviewed by two pathologists, both of whom were unaware of the patients' clinical status. On the basis of these findings, the pathologists suggested the most likely cause of death. The suggested cause was then compared with the clinical data.

Molecular Detection of SARS-CoV-2 RNA

RNA was extracted from nasopharyngeal swabs and post-mortem biopsies, using the NucliSENS® easyMAC® technique (bioMérieux, Craponne, France) (13). Prior to extraction, 10 mg of biopsy tissue were lysed in 200 μ l of lysis buffer and incubated for 30 min at 56°C. As described previously, the 25 μ l reaction volume comprised 5 μ l of RNA, 12.5 μ l of the 2x reaction buffer provided with the Superscript III one-step RT-PCR system with Platinum Taq polymerase (Invitrogen), 1 μ l of reverse transcriptase/Taq mixture from the kit, 0.4 μ l of a 50 mM magnesium sulfate solution, the pair of primers and the probe for the IP2 and IP4 regions of the RdRp gene (14). Incubation at 55°C for 20 min (for reverse transcription) and then at 95°C for 3 min was followed by 50 thermal cycles of 95°C for 15 s and 58°C for 30 s.

Ultrastructural Analysis, Using Transmission Electron Microscopy

When both lung and kidney biopsies were available for a given patient, we performed an ultrastructure analysis of each

organ with TEM. The post-mortem lung and kidney biopsies were fixed by incubation for 24 h in 1% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde (Sigma, St Louis, MO, United States) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). The samples were washed in phosphate-buffered saline, post-fixed by incubation with 2% osmium tetroxide (Agar Scientific, Stansted, United Kingdom) for 1 h, fully dehydrated (using a graded series of ethanol solutions and propylene oxide), impregnated with a 1:1 mixture of propylene oxide/Epon resin (Sigma) and left overnight in pure resin. The samples were then embedded in Epon resin, which was allowed to polymerize for 48 h at 60°C. Ultrathin (90 nm) sections were prepared with a Leica EM UC7 ultramicrotome (Wetzlar, Germany), stained with 2% uranyl acetate (Agar Scientific) and 5% lead citrate (Sigma), and observed with TEM (JEOL 1400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as median and interquartile range (25th and 75th percentiles) and were compared by using the Mann–Whitney *U* test. Categorical variables were expressed as numbers and percentages and were compared by the chi-square test or the Fisher exact test as appropriate. In order to analyze differences in pathology as a function of disease duration, we divided the cohort into 2 subgroups based on median disease duration.

RESULTS

Clinical Data

During the 3-month study period, post-mortem biopsies of at least two organs were obtained from 20 non-consecutive patients [median age [interquartile range (IQR)] age: 75.5 (66.8–84.3)]. Given the patients' age, major comorbidities (and especially cardiovascular comorbidities) were highly prevalent (Table 1). The signs and symptoms most frequently encountered at admission were dyspnea, cough and fever. Neurological symptoms (confusion and anosmia) and gastrointestinal signs and symptoms (nausea, vomiting, and diarrhea) were less frequent. Laboratory tests revealed profound lymphopenia in 7 patients (35%). Patients had high serum levels of the inflammatory marker C-reactive protein [mean (IQR): 150 (65.5–214.5) mg/l]. Ten patients (50%) developed acute kidney failure, as evidenced by an elevated blood creatinine level. Seven patients (35%) had elevated troponins. Bacterial co-infection was suspected in 10 patients (50%). Eight patients (40%) were admitted to the ICU and required mechanical ventilation (Tables 1, 2).

Pathology Assessments

Post-mortem biopsies were taken from the following organs: the heart (*n* = 20 patients), lungs (*n* = 20), liver (*n* = 20), kidneys (*n* = 17), striated muscle (*n* = 16), thyroid (*n* = 8), and adipose tissue (*n* = 4).

TABLE 1 | Patient characteristics, comorbidities, and outcomes.

Variable	Value
Sex: male/female ratio	14/6
Age, years [median (IQR)]	75.5 [66.8–84.3]
Comorbidities, <i>n</i> (%):	
Active smoking	5 (25%)
Chronic obstructive pulmonary disease	4 (20%)
Hypertension	14 (70%)
Cardiovascular disease	8 (40%)
diabetes	8 (40%)
Chronic kidney disease	7 (35%)
Chronic liver disease	1 (5%)
Cancer	5
Body mass index (kg/m ²)	26.4 [24.5–29.4]
Time between disease onset and hospital admission (d)	3 [0.75–10.25]
Disease duration (time between disease onset and death) (d)	18 [10–32]
Specific treatments received:	
Lopinavir	2 (10%)
Steroids	5 (25%)
Hydroxychloroquine	3 (15%)
Azithromycin	9 (45%)
Outcomes:	
Length of hospital stay	13.5 [6–24]
Admission to the ICU	8 (40%)
Respiratory support	8 (40%)

Lung Biopsies

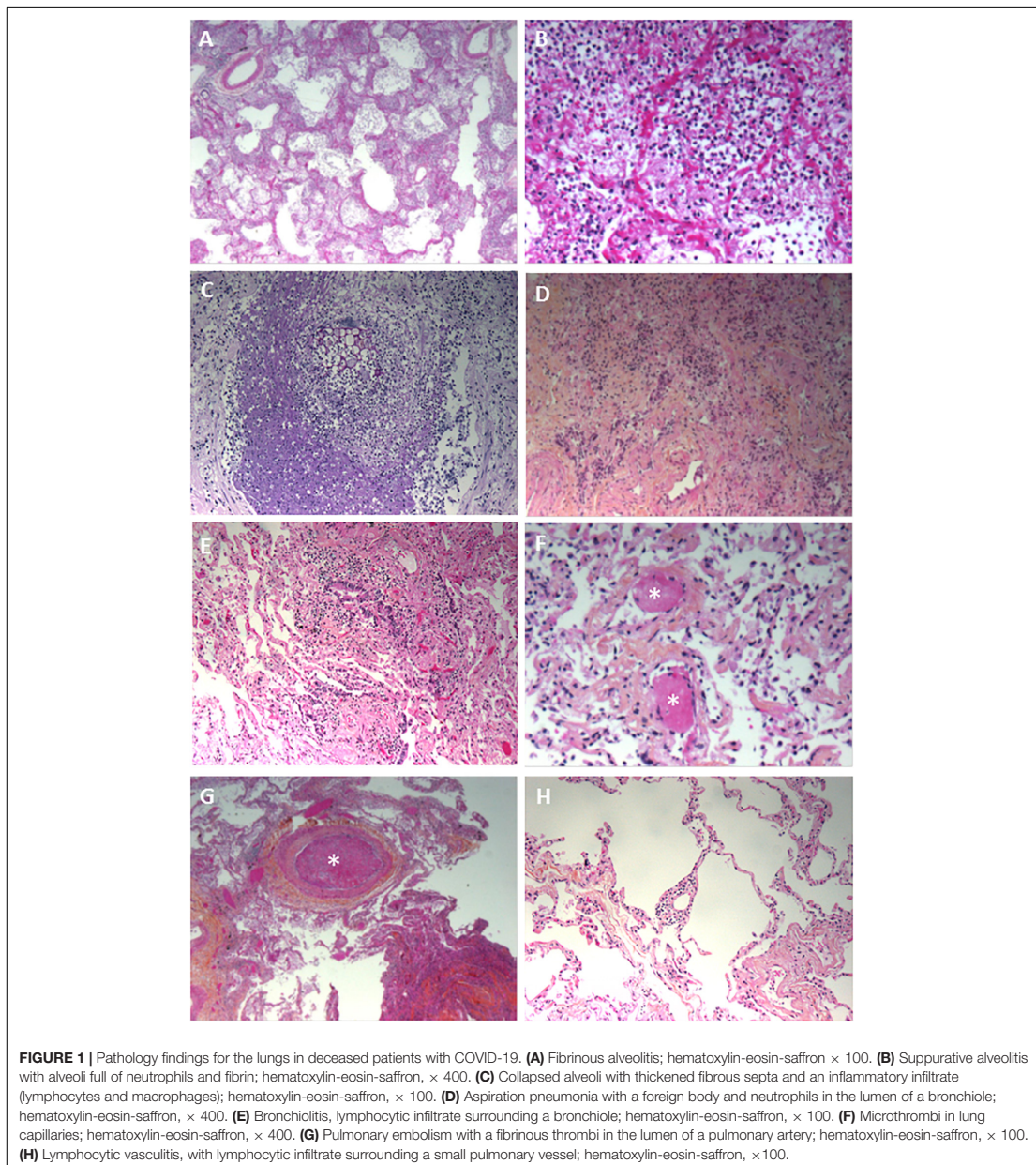
Nineteen of the 20 lung biopsies (95%) were informative. The lung damage was focal in 11 cases and diffuse in 8 cases. Chronic fibro-inflammatory lesions were present in 18 cases, with acute inflammatory lesions seen in 12 cases (Figures 1A,B). Aspiration pneumonitis was seen in 2 cases, with fibrin, neutrophils and macrophages in numerous alveoli and with foreign bodies in some bronchioles and alveoli (Figure 1C). Interstitial organized pneumopathy was seen in 18 cases, with enlarged septa containing a few mononuclear cells and muscle bundles. Intra-alveolar buds of granulation tissue (consisting of fibroblasts, myofibroblasts and fibrous or loose connective tissue) were observed in 12 cases (Figure 1D). A few fibrin deposits in some alveoli were seen in 5 cases. Foci of CD3-, CD8- and CD4-positive T lymphocytes and foci of CD163-positive macrophages were seen in enlarged intra-alveolar septa in 18 cases. In 2 cases, we observed bronchiolitis with a dense inflammatory infiltrate (small T lymphocytes and macrophages) around the bronchioles (Figure 1E). The epithelial cells lining the bronchioles were normal. Foci of CD163-positive macrophages in some alveoli were found in all 19 cases. There were a few multinuclear macrophages in 5 cases. No factor-VIII-positive megakaryocytes were observed. Dystrophic pneumocytes with enlarged nuclei were seen in 16 cases. Nuclear eosinophilic inclusions in the pneumocytes were found in only one case and were negative when stained for cytomegalovirus. Fibrinous thrombi in small vessels were seen in 12 cases (Figures 1F,G). Lymphocytic infiltrates around vessels were seen in 8 cases (Figure 1H). Endothelial cell

TABLE 2 | Patient characteristics, symptoms, organ failure and outcomes.

	Age Years	Sex	Comorbidities	Presenting symptoms	Time between symptom onset and hospital admission	Disease duration	Kidney damage	Myocardial damage	Admission to the ICU	Post-mortem SARS-CoV-2 RNA detection (PCR)
1	66	Female	Smoker, COPD, lung cancer	Fever, dyspnea, cough, chest pain, fatigue	1	10	No	No	No	Lung
2	73	Male	None	Fever, dyspnea, confusion	24	36	Yes	No	No	Unknown
3	83	Male	COPD, diffuse interstitial lung disease, hypertension, atrial fibrillation, ischemic cardiomyopathy	Nausea and vomiting,	0	15	No	Yes	No	Lung
4	93	Male	Hypertension, chronic kidney disease	Fever, dyspnea, diarrhea	14	18	Yes	No	No	Lung
5	78	Female	Hypertension, ischemic cardiomyopathy, cancer	Dyspnea, cough	11	25	No	No	No	No
6	87	Female	Pulmonary embolism, restrictive lung disease, hypertension, ischemic cardiomyopathy, diabetes, cancer	Dyspnea, cough, diarrhea, confusion, anosmia, dysgeusia	3	9	No	Yes	No	No
7	90	Female	Hypertension, chronic kidney disease, diabetes	Dyspnea	3	9	Yes	No	No	No
8	62	Male	Hypertension, chronic kidney disease,	Fever, dyspnea	12	39	Yes	Yes	Yes	Lung
9	71	Male	Smoker, hypertension, ischemic cardiomyopathy, chronic kidney disease, diabetes	Dyspnea, cough, confusion,	3	8	Yes	Yes	No	Lung
10	59	Male	Diabetes, chronic liver disease	Fever, dyspnea	0	17	No	No	Yes	Lung
11	72	Male	Cardiovascular disease,	Fever,	1	2	-	-	No	Lung
12	67	Male	Hypertension, chronic kidney disease, diabetes	Dyspnea	0	27	Yes	No	Yes	Lung
13	82	Male	Smoker, hypertension, ischemic cardiomyopathy, chronic kidney disease,	Dyspnea	14	30	Yes	No	Yes	Lung
14	84	Male	Hypertension, ischemic cardiomyopathy, restrictive lung disease, diabetes	Dyspnea	4	10	Yes	Yes	Yes	Lung
15	85	Male	Ischemic cardiomyopathy, chronic kidney disease,	Dyspnea, cough, chest pain	0	23	Yes	No	No	Lung, Kidney
16	64	Male	Cancer,	Fever, cough,	10	52	Yes	Yes	Yes	Lung, Heart
17	93	Male	Hypertension, diabetes		1	1	No	No	No	No
18	61	Male	Hypertension, diabetes	Dyspnea, nausea and vomiting,	4	56	Yes	Yes	Yes	Unknown
19	80	Female	Hypertension,	Fever	7	55	No	No	No	Lung
20	73	Female	Hypertension, ischemic and rhythmic cardiomyopathy, pulmonary embolism	Fever, dyspnea	3	16	No	Yes	Yes	No

desquamation was seen in one case, although the tissue had been somewhat altered by post-mortem autolysis. Dystrophic vessels with enlarged fibrous intima and media were observed in 12 cases. Amyloid deposits were present in the small lung vessel walls in 2 cases and bone marrow embolism was present in 2 cases. Viral RNA was detected in 12 lung biopsies (60%). No fungi or bacteria were detected (using special stains) in any of the cases.

Transmission electron microscopy ultrastructure analysis was performed on samples from 6 patients (patients 3, 5, 10, 12 and 14). In all cases, the lung parenchyma showed alveolar damage, with detached and lytic pneumocytes in the lumen. Enveloped particles harboring spike projections (similar to those observed in cells cultured *in vitro* with SARS-CoV-2) were observed in 3 biopsies (patients 10, 11 and 12) where disease duration were 17, 2 and 27 days respectively (**Figures 2A,B**)



(15). These viral particles were quite homogeneous in size and shape. They measured 80–90 nm without their spikes (110–120 nm with spikes) and presented round to oval shapes. Cross-section through their nucleocapsid showed an electron dense black dot inside the particle. When particle morphology was

sufficiently preserved, they harbored five to ten spikes visible on the outside on one section. Viral particles were detected mostly in type I pneumocytes (**Figure 2C**) and very rarely in type II pneumocytes. The particles formed small aggregates in the cytosol and (although less frequently) in large intracellular

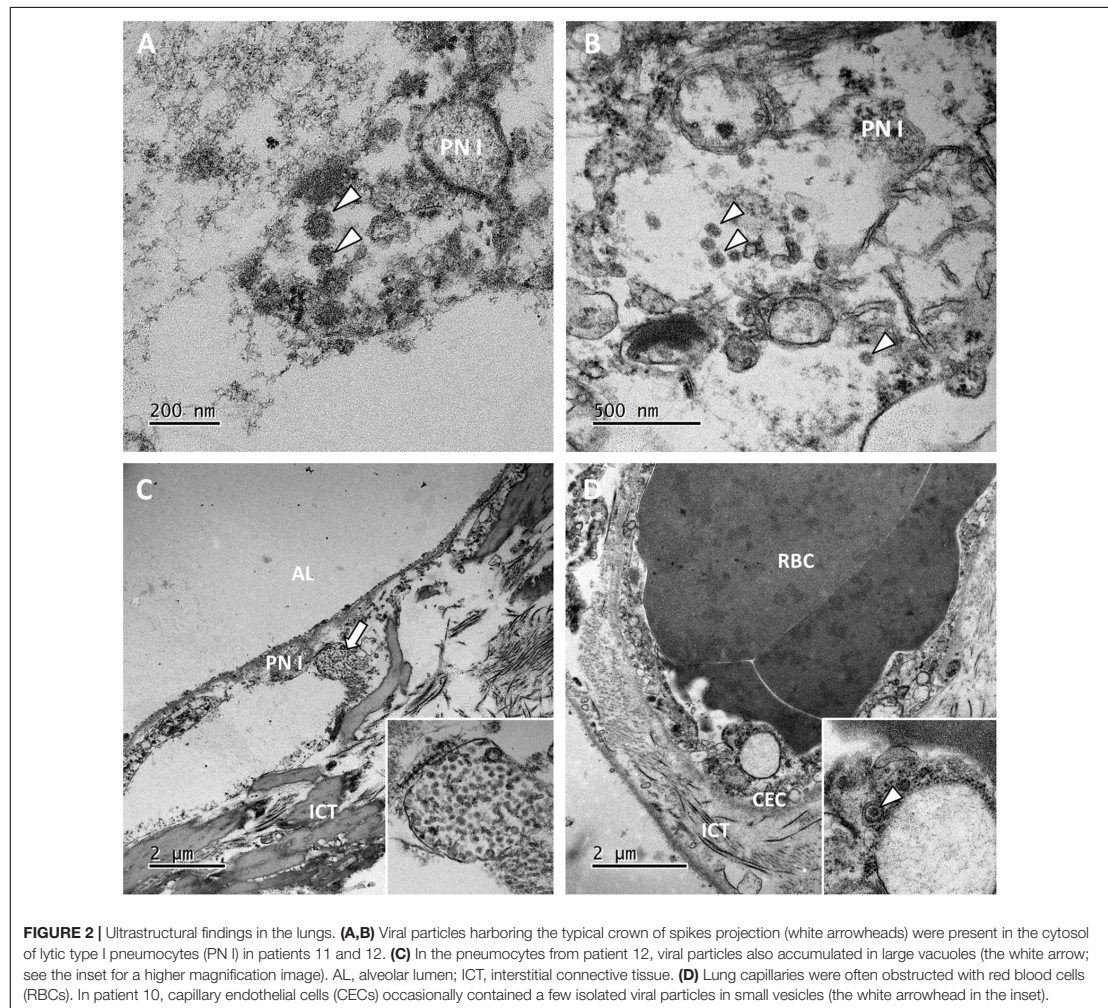


FIGURE 2 | Ultrastructural findings in the lungs. **(A,B)** Viral particles harboring the typical crown of spikes projection (white arrowheads) were present in the cytosol of lytic type I pneumocytes (PN I) in patients 11 and 12. **(C)** In the pneumocytes from patient 12, viral particles also accumulated in large vacuoles (the white arrow; see the inset for a higher magnification image). AL, alveolar lumen; ICT, interstitial connective tissue. **(D)** Lung capillaries were often obstructed with red blood cells (RBCs). In patient 10, capillary endothelial cells (CECs) occasionally contained a few isolated viral particles in small vesicles (the white arrowhead in the inset).

vacuoles. Some of these large vacuoles included a very large number of viral particles. The lung capillary lumens were obstructed with erythrocytes; this was consistent with the blood stasis lesions observed in COVID-19. For one patient, a small number of viral particles were observed in the cytoplasm of capillary endothelial cells (**Figure 2D**). No viral particles were found in samples from the remaining 3 patients.

Kidney Biopsies

Only 12 kidney biopsies (70%) were informative. The renal tissue was normal in 4 cases; post-mortem necrosis of the epithelial cells lining the proximal and distal tubules was considered to be normal. In 5 cases, the small renal arteries showed severe arteriosclerotic lesions, with thickened, fibrosed intima and media. In 6 cases, we observed small foci of lymphocytes in the interstitium but

considered these to be non-specific signs of interstitial nephritis. In 3 cases, collagen deposits in a few glomeruli (consistent with a diagnosis of focal and segmental hyalinosis) were seen. In one case, we found a large number of neutrophilic micro-abscesses in the interstitium around the tubules and glomeruli; this was consistent with a diagnosis of acute pyelonephritis. Neither amyloid deposits nor crescentic glomerulopathies were seen in any of the cases.

Viral particles were revealed by TEM in 2 patients. In the glomeruli, the particles were present mainly in the podocytes (**Figure 3A**) and more rarely in capillary endothelial cells (**Figure 3B**). Viral particles were also found in proximal tubular epithelial cells. These particles shared the same characteristics with those previously described in the lung biopsies (16). As seen in the lung capillaries, signs of blood stasis were also present in

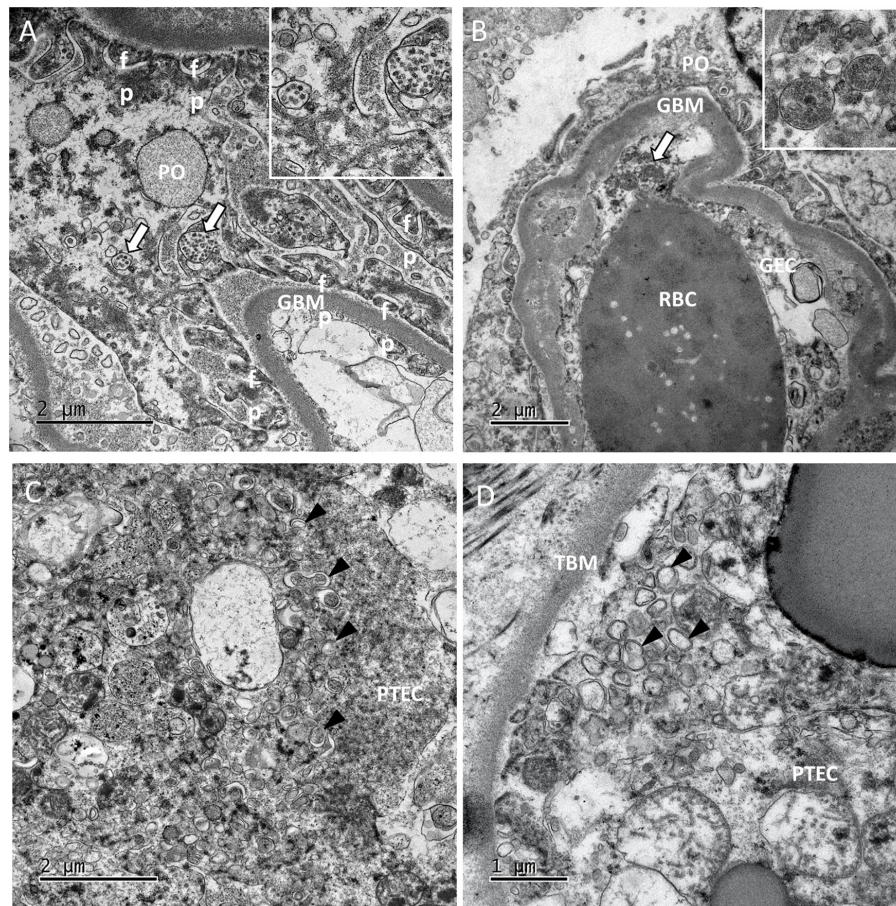


FIGURE 3 | Ultrastructural findings in the kidneys. **(A)** In glomeruli of patient 5, large numbers of viral particles in intracellular vacuoles (white arrows; see the inset for a higher magnification image) were found in podocytes (PO). GBM, glomerular basement membrane; fp, foot process. **(B)** In patient 10, glomerular capillaries showed signs of blood stasis. We also noticed vacuoles filled with smooth viral particles (white arrow) in the cytoplasm of glomerular endothelial cells (GECs). **(C,D)** In the tubules of patient 10 and 11, proximal tubular epithelial cells (PTECs) contained an abundant network of double-membrane vesicles (DMVs; black arrowheads), a marker of SARS-CoV-2 replication. TBM, tubular basement membrane. The DMVs are easily recognizable, with an inner membrane and an outer membrane [white arrowheads in the insets in panels **(C,D)**].

the glomerular capillaries. In one case in which viral particles were not found, some proximal tubular epithelial cells contained an abundant network of double-membrane vesicles (DMVs, an ultrastructural characteristic of SARS-CoV-2 infected cells) (15) (Figure 3C). These double-membrane organelles are compatible in size (200–300 nm) and structures with those observed in SARS-CoV-2 infected cell lines (15, 17). Contrary to cellular autophagosomes, which are often very heterogeneous in size and contain cellular structures such as membrane whorls, these elements were quite homogenous in size and morphology. It has been suggested that in poliovirus and hepatitis C virus, these DMVs anchor the viral replication complexes and thus

conceal viral RNA from innate immune sensors (18). Although cytoplasmic structures can sometimes be misinterpreted as viral particles, the presence of large numbers of these distinctive DMVs suggested strongly that SARS-CoV-2 had replicated in the patients' proximal tubular epithelial cells *in vivo* (19–21). Smaller number of DMVs were also observed in tubular cells from one patient in whom viral particles had also been found (Figure 3D) even after a prolonged disease duration (17 days). No viral particles or DMVs were detected in the kidney biopsies from the other 3 patients. Two of the three patients with viral particles and/or DMVs in the kidney also had viral particles in the lung biopsies.

Myocardial Biopsies

All the myocardial biopsies (100%) were informative. The myocardial tissue was normal in 9 cases (45%); interstitial edema and post-mortem dystrophic cytoplasmic or nuclear alterations of the myocytes were considered to be normal. In 9 cases (45%), fibrotic deposits of varying abundance were observed in the interstitial tissue. The deposits included macrophages in one case (consistent with a diagnosis of chronic ischemic cardiopathy) and a few neutrophils in another case (consistent with a diagnosis of acute ischemic cardiopathy) (Figure 4A). In one case (5%), abundant eosinophilic amyloid deposits were found in the interstitial tissue; positivity for Congo Red stain and an anti-transferrin antibody (1/50, Quartett, Germany) was consistent with a diagnosis of senile amyloidosis (Figure 4B). In one case (5%), small foci of lymphocytes and macrophages were located close to myocardial fibers; this was consistent with a diagnosis of myocarditis (Figure 4C). Lastly, SARS-CoV-2 RNA was detected in 1 of the 6 patients tested; the patient's myocardial tissue was normal, with no signs of myocarditis.

Liver Biopsies

All the liver biopsies (100%) were informative. Micronodular cirrhosis was diagnosed in 4 cases (20%) (Figure 4D). Hepatic blood vessel lesions were noted in 13 cases, with dilated

centrilobular veins (13 cases), dilated sinusoids (13 cases), and fibrosis of perisinusoidal spaces (4 cases). Necrosis in the pericentrilobular spaces was seen in 2 cases. Mild steatosis (< 30%) was observed in 2 cases. Portal inflammation (with the presence of lymphocytes and macrophages) was seen in 6 cases. Lobular inflammation was seen in one case; it featured small granulomas comprising macrophages, lymphocytes, and a few eosinophils. A polymorphic inflammatory infiltrate was seen in the sinusoids in a few cases, and a large number of small lymphocytes were seen in one case. Vessel wall amyloid deposits were present in one case. Viral RNA was not detected in liver biopsies.

Muscle Biopsies

All the muscle biopsies (100%) were informative. The muscle tissue was normal, except for a few atrophic muscle fibers in some cases. No myositis was observed.

Admission to the Intensive Care Unit

Compared with patients not admitted to the ICU, patients admitted to the ICU were younger (81.5 vs. 65.5 years of age, respectively; $p = 0.01$) and (because of life support provision) had a longer disease duration (16.5 vs. 33 days, respectively; $p = 0.09$) (Table 3). The time interval between disease onset and

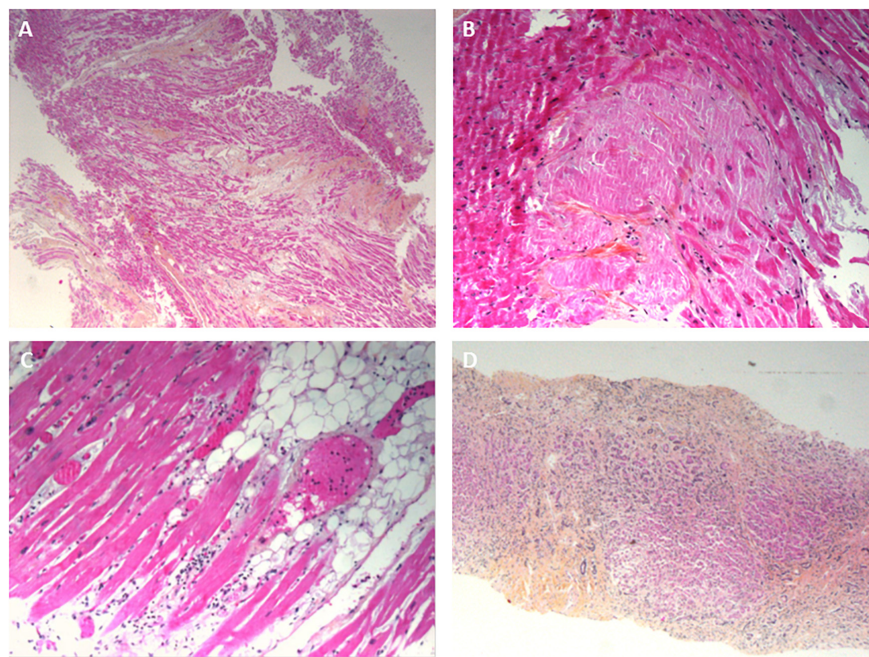


FIGURE 4 | Pathology findings for other organs in deceased patients with COVID-19. (A) Ischemic cardiomyopathy, with a fibrous scar in the myocardium; hematoxylin-eosin-saffron, $\times 100$. (B) Cardiac amyloidosis, with eosinophilic deposits of amyloidosis around the myocytes; hematoxylin-eosin-saffron, $\times 400$. (C) A myocardial biopsy showing a mild inflammatory infiltrate around the myocytes. (D) Liver cirrhosis: extensive fibrosis surrounding micronodules composed of small hepatocytes. Numerous cholangioles and mononuclear inflammatory infiltrates in the fibrous bands; hematoxylin-eosin-saffron, $\times 100$.

TABLE 3 | Patient characteristics as a function of ICU admission.

	Admitted to the ICU (<i>n</i> = 8)	Not admitted to the ICU (<i>n</i> = 12)	<i>p</i> value
Age	65.5 [61.8–75.3]	81.5 [72.8–87.8]	0.01
Sex: male/female ratio	7/1	7/5	0.32
Number of comorbidities, <i>n</i>	2 [1–2.25]	3 [2–4.5]	
Body mass index (kg/m ²)	27.6 [25.8–29.9]	26.4 [23.2–29.1]	0.26
Time between disease onset and hospital admission (d)	3.5 [0.75–8.5]	3 [1.5–10]	0.82
Disease duration (time between disease onset and death) (d)	33 [19.5–48.8]	16.5 [9.3–24.5]	0.09
Time between death and biopsies (h)	20 [15–36]	20 [15.5–33.5]	0.89
Organ dysfunction			
Kidney damage	6 (75%)	5 (41%)	0.19
Myocardial damage	5 (62.5%)	3 (25%)	0.16
SARS-CoV-2 detected in the lung biopsy	4 (57.1%)	8 (72.7%)	0.62
Lung histopathological examination			
Diffuse/focal inflammatory lesions	5/3	3/8	0.18
Acute lesions	3 (37.5%)	9 (82%)	0.07
Sub-acute lesions	8 (100%)	10 (91%)	1
Fibrinous alveolitis	3 (37.5%)	2 (18.2%)	0.6
Macrophagic alveolitis	8 (100%)	11 (100%)	1
Neutrophilic alveolitis	0	7 (63.6%)	0.01
Organizing pneumonia with fibrous buds in the alveoli	6 (75%)	6 (54%)	0.69
Collapsed alveoli	6 (75%)	7 (63%)	0.35
Thrombosis	4 (50%)	6 (54%)	1
Dystrophic pneumocytes	7 (87.5%)	6 (54%)	0.17
Macrophages in the interalveolar septa	8 (100%)	9 (82%)	0.48
Lymphocytes in the interalveolar septa	5 (62.5%)	9 (82%)	0.60
Lymphocytic vasculitis	2 (25%)	6 (54%)	0.35

hospital admission was similar in the ICU and non-ICU groups (3.5 vs. 3 days, respectively; $p = 0.82$), as was the time interval between death and biopsy (20 h in both groups; $p = 0.89$). Patients admitted to the ICU had a greater prevalence of acute kidney damage [6 (75%), vs. 5 (41%) in the non-ICU group; $p = 0.19$] and myocardial damage; [5 (62.5%) vs. 3 (25%), respectively; $p = 0.16$].

A pathology assessment of the lungs revealed greater prevalence of diffuse lesions, collapsed alveoli and dystrophic pneumocytes in the ICU group. Interestingly, acute lesions with neutrophilic alveolitis were observed more frequently in the non-ICU group (82%, vs. 37.5% in the ICU group for acute lesions; $p = 0.07$; 63.6% vs. 0%, respectively; $p = 0.01$, for neutrophilic alveolitis). In contrast, the ICU and non-ICU groups did not differ significantly with regard to the prevalence of sub-acute lesions (100% vs. 91%, respectively; $p = 1$), fibrinous alveolitis (37.5% vs. 18.5%, respectively; $p = 0.6$) and microvascular thrombosis. Lymphocytic infiltration and lymphocytic vasculitis were more prevalent in the non-ICU group, but the differences were not statistically significant.

Differences in Pathology as a Function of the Disease Duration

We divided the cohort into 2 subgroups as a function of the median disease duration (Table 4). There were no intergroup differences in the proportion of patients admitted to the ICU (30% vs. 50% in the “early death” and “late death” groups, respectively; $p = 0.65$) or the proportion with viral RNA. The

patients in the “early death” group had shorter disease duration and more focal inflammatory lesions in lungs. Conversely, patients in the “late death” group had a disease duration and a

TABLE 4 | Pathology findings in the lung, by disease duration (early vs. late death).

	Early death (<i>n</i> = 10)	Late death (<i>n</i> = 10)	<i>p</i> value
Admission to the ICU	3 (30%)	5 (50%)	0.65
SARS-CoV-2 detected in the lung biopsy	6 (60%)	7 (70%)	1
Histopathological assessment of the lungs:	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9	
Diffuse/focal inflammatory lesions	1/9	7/2	0.01
Acute lesions	6 (60%)	6 (66.7%)	1
Subacute lesions	10 (100%)	8 (88.9%)	0.47
Fibrinous alveolitis	2 (20%)	3 (33.4%)	0.63
Macrophagic alveolitis	10 (100%)	9 (100%)	1
Neutrophilic alveolitis	4 (40%)	3 (33.4%)	1
Organizing pneumonia with fibrous buds in the alveoli	5 (50%)	7 (77.8%)	0.35
Collapsed alveoli	7 (70%)	6 (66.7%)	1
Dystrophic pneumocytes	6 (60%)	7 (77.8%)	0.63
Macrophages in interalveolar septa	7 (70%)	5 (55.6%)	0.65
Lymphocytes in interalveolar septa	10 (100%)	8 (88.9%)	0.47
Lymphocytic vasculitis	6 (60%)	2 (22.3%)	0.17
Thrombosis	5 (50%)	7 (77.8%)	0.35

greater proportion of diffuse lesions (diffuse:focal ratio = 7:2, v. 1:9 in the “early death” group; $p = 0.01$). However, the groups did not differ with regard to the type of lesion (acute vs. sub-acute), the prevalence of neutrophilic, macrophagic and fibrinous alveolitis associated with collapsed alveoli, or the prevalence of macrophagic and lymphocytic infiltration in the interalveolar septa. Lymphocytic vasculitis was more prevalent in the “early death” group (60%, vs. 22.3% in the “late death” group but this difference was not statistically significant ($p = 0.17$).

Causes of Death, Based on the Pathology Findings

Based on the pathology findings, a cause of death was determined in 19 cases (95%). Pneumonitis was found in all 19 patients (100%), with aspiration pneumonitis in 2 patients (10.5%) and acute bronchopneumonia (due to a clinically suspected bacterial infection) in one (5.2%). Cardiac decompensation was diagnosed in 11 cases (58%) and was variously related to ischemic cardiomyopathy ($n = 9$; 47%), cardiac amyloidosis ($n = 1$; 5.2%), and myocarditis ($n = 1$; 5.2%). Pulmonary embolism was the suspected cause of death in 1 patient (5.2%). Acute pyelonephritis (due to a suspected bacterial infection but in the absence of microbiological test data) was found in 1 patient (5.2%).

Acute decompensation of chronic disease was diagnosed for 14 patients (73.7%), with cardiac decompensation in 10 (52.6%) and acute on Chronic Liver Failure in 4 (21%).

Correlation between clinical data with organ failure and pathological findings are resumed in the **Supplementary Table**.

DISCUSSION

We described post-mortem multi-organ biopsies in fatal cases of COVID-19. Our results not only confirmed the major role of lung damage but also highlighted the potential involvement of extra pulmonary disease.

The main histological findings in lung biopsies from patients who died after a confirmed SARS-CoV-2 infection were focal, patchy, organizing pneumonia with collapsed alveoli, thickened alveolar walls (containing lymphocytic infiltrates and a few macrophages), and fibrous buds in the bronchiolar and alveolar spaces. These observations were in line with the literature data. Macrophage and multinuclear cell infiltration in alveolar spaces and desquamated hyperplastic pneumocytes with enlarged nuclei have also been described previously.

Conversely, (i) diffuse alveolar damage with hyaline membranes in all the alveoli and (ii) fibrin balls (as seen in acute fibrinous organizing pneumonia) were rarely observed; this contrasts with the literature data (22–25). Although endothelial injury with cytoplasmic vacuolization and cell detachment in pulmonary arteries or megakaryocytes in alveolar capillaries has been described previously, we did not observe any such patterns in the present study (23, 25). It is important to notice that viral RNA was detected in ICU patients even after long disease duration. The TEM ultrastructure analysis showed viral particles after 17 and 27 days of illness. This illustrates a prolonged active viral replication in lungs. Interestingly, the prolonged

viral shedding was not associated with prior immunodeficiency or immunosuppressive treatment in our cohort. It has been shown that patients with severe COVID-19 impaired the ability to contain viral replication by an insufficient humoral anti SARS-CoV-2 response and/or insufficient type 1 interferon amplification (26, 27).

Interestingly, these COVID-19-associated histopathological profiles are not specific and are seen in the ARDS induced by H1N1 influenza and other viruses. However, the proportion of our cases with DAD was lower than in other histopathological studies of COVID-19 and the same as in a large study of cases of ARDS (28). Diffuse alveolar damage was more prevalent in our ICU group than in our non-ICU group.

There are several possible explanations for these differences. Firstly, life support in the ICU was associated with longer disease duration; this may have given more time for lesions to spread. Indeed, we often observe in the most severe cases, an extension of the lesions on computed tomographic imaging reassessment. Secondly, all the patients in the ICU group received mechanical ventilation while non-ICU patients only received standard oxygen therapy. Therefore, ICU patients might have developed ventilator-induced lung injuries (VILI). VILI is ascribed to volutrauma, barotrauma and atelectrauma and contribute to mortality in patients with ARDS. These phenomenon can be associated with self-inflicted lung injury in ventilated patients (29). In addition, ventilator-associated pneumonia can occur in these patients and contribute to lung inflammation. These mechanisms are likely to aggravate lung damage in COVID-19 and might explain the differences observed in our study. The observed differences were unlikely to be related to the time interval between death and biopsy, which was similar in the ICU and non-ICU groups.

The biopsies of organs other than the lungs were also informative. Myocardial damage is reportedly common in COVID-19, but we did not find specific evidence of this in our cohort. Most patients displayed cardiac decompensation associated with chronic ischemic cardiomyopathy or cardiac amyloidosis. Myocarditis was found in one patient only, and SARS-CoV-2 RNA was detected in another patient. These findings suggest that comorbidities have an important influence on the clinical outcome in patients with an acute SARS-CoV-2 infection. Interestingly, hepatic blood vessel lesions were prevalent among our cases, with dilatation of centrilobular veins, dilatation of sinusoids, and fibrosis of perisinusoidal spaces. The liver damage might therefore have been related to decompensated heart failure, rather than COVID-19 *per se*.

In our TEM ultrastructural analysis of lung biopsies, viral particles were observed in only 3 of the 6 patients—despite our careful examination of lung cells and the presence of the viral genome in an RT-PCR assay. This finding emphasized the low sensitivity of TEM-based SARS-CoV-2 particle detection for post-mortem diagnosis. Ultrathin (100 nm) sections do not give an overview of the cellular and tissue volumes. Delayed post-mortem fixation might also change the enveloped particles' structure and thus make them hard to identify. The levels of viral particle replication and assembly change over the course of COVID-19 and (in late-stage infections) depend on the

host response. Furthermore, the recently described potential for misidentifying clathrin-coated vesicles or nuclear pores as viral particles means that the TEM-based identification of coronaviruses should be considered with caution (19–21).

However, one of our study's major findings was the TEM-based identification of host-cell membrane rearrangements (DMVs) characteristic of SARS-CoV-2 infection in kidney tissues in two patients. Furthermore, the presence of DMVs in tubular epithelial cells evidenced intense viral replication in the kidney. To the best of our knowledge, our study has provided the first description of DMVs in a biopsy from a patient infected by SARS-CoV-2; previously, these structures have only been observed for infected cells cultured *in vitro*. In the absence of viral particles in the cytoplasm, this specific marker of viral replication might be very useful for identifying SARS-CoV-2-infected cells in a tissue sample.

Surprisingly, DMVs were observed in the kidneys but not in the lungs. Furthermore, viral particles were observed not only in renal endothelial cells but also in podocytes and tubular epithelial cells; this observation is consistent with previous histopathological findings (30, 31). These features highlighted the multiorgan tropism of SARS-CoV-2, which can infect and replicate in various cell types outside the respiratory tract.

The present study had a number of limitations. Firstly, we performed post-mortem needle and surgical biopsies rather than a full, conventional autopsy. No accidental viral contaminations were observed during the study period (data not shown). We conclude that post-mortem needle and surgical biopsies constitute a safe procedure that enables clinical correlations and assessment of the cause of death in most cases. Secondly, we performed TEM on biopsies from a small number of patients and organs. Even though our findings were in line with the literature data, the small number of samples prevented us from drawing any definitive conclusions with regard to the tissue ultrastructure.

CONCLUSION

Several differences were observed between ICU and non-ICU patients regarding lung damage. Our present results also highlighted the involvement of damage outside the lung in the fatal progression of COVID-19. Cardiac and hepatic damage was probably related to chronic disease decompensation, whereas kidney injury was more likely to be related to viral dissemination.

REFERENCES

- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* (2020) 382:727–33. doi: 10.1056/NEJMoa2001017
- World Health Organization. *Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic*. Geneva: World Health Organization (2022).
- Rodríguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguín-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis.* (2020) 34:101623. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101623
- Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med.* (2020) 8:475–81. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5
- COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network and the COVID-ICU Investigators. Clinical characteristics and day-90 outcomes of 4244 critically ill adults with COVID-19: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* (2021) 47:60–73. doi: 10.1007/s00134-020-06294-x
- Ziehr DR, Alladina J, Petri CR, Maley JH, Moskowitz A, Medoff BD, et al. Respiratory pathophysiology of mechanically ventilated patients with

Our TEM study was the first to describe the presence of virus-induced DMVs in kidney biopsies and thus provided unequivocal proof of intense SARS-CoV-2 replication in this organ. When seeking to describe lesions and identify the cause of death in cases of COVID-19, needle and surgical post-mortem biopsies are good surrogates for conventional autopsies.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by French Ministry of Health. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YZ, CB, and MS collected data. DC, NG, SE, EB, RU, and PR performed the pathological assessments. YZ, DC, SE, RU, SC, EB, and PR wrote the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Véronique Descamps (Department of Virology, Amiens Picardie University Hospital, Amiens, France) for technical assistance with RT-PCRs on biopsies. We would also like to thank Fabienne Arcanger (Plate-Forme IBISA de Microscopie Electronique, Université de Tours and CHRU de Tours) for technical assistance with EM sections.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.837258/full#supplementary-material>

- COVID-19: a cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* (2020) 201:1560–4. doi: 10.1164/rccm.202004-1163LE
7. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. *JAMA.* (2012) 307:2526–33. doi: 10.1001/jama.2012.5669
 8. Hariiri LP, North CM, Shih AR, Israel RA, Maley JH, Villalba JA, et al. Lung histopathology in coronavirus disease 2019 as compared with severe acute respiratory syndrome and H1N1 influenza: a systematic review. *Chest.* (2021) 159:73–84. doi: 10.1016/j.chest.2020.09.259
 9. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* (2020) 8:420–2. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X
 10. Zhao CL, Rapkiewicz A, Maghsoodi-Deerwester M, Gupta M, Cao W, Palaia T, et al. Pathological findings in the postmortem liver of COVID-19 patients. *Hum Pathol.* (2020) 109:59–68. doi: 10.1016/j.humphath.2020.11.015
 11. Bradley BT, Maioli H, Johnston R, Chaudhry I, Fink SL, Xu H, et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet.* (2020) 396:320–32. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31305-2
 12. Ding Y, He L, Zhang Q, Huang Z, Che X, Hou J, et al. Organ distribution of severe acute respiratory syndrome(SARS) associated coronavirus(SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J Pathol.* (2004) 203:622–30. doi: 10.1002/path.1560
 13. Loens K, Bergs K, Ursi D, Goossens H, Leven M. Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. *J Clin Microbiol.* (2007) 45:421–5. doi: 10.1128/JCM.00894-06
 14. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* (2020) 25:2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
 15. Eymieux S, Rouillé Y, Terrier O, Seron K, Blanchard E, Rosa-Calatrava M, et al. Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. *Cell Mol Life Sci.* (2021) 78:3565–76. doi: 10.1007/s00018-020-03745-y
 16. Laue M, Kauter A, Hoffmann T, Möller L, Michel J, Nitsche A. Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected vero cell cultures. *Sci Rep.* (2021) 11:3515. doi: 10.1038/s41598-021-82852-7
 17. Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, Bárcena M. Double-membrane vesicles as platforms for viral replication. *Trends Microbiol.* (2020) 28:1022–33. doi: 10.1016/j.tim.2020.05.009
 18. Blanchard E, Roingeard P. Virus-induced double-membrane vesicles. *Cell Microbiol.* (2015) 17:45–50. doi: 10.1111/cmi.12372
 19. Miller SE, Goldsmith CS. Caution in identifying coronaviruses by electron microscopy. *J Am Soc Nephrol.* (2020) 31:2223–4. doi: 10.1681/ASN.2020050755
 20. Goldsmith CS, Miller SE, Martines RB, Bullock HA, Zaki SR. Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task. *Lancet (Lond Engl).* (2020) 395:e99. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31188-0
 21. Neil D, Moran L, Horsfield C, Curtis E, Swann O, Barclay W, et al. Ultrastructure of cell trafficking pathways and coronavirus: how to recognise the wolf amongst the sheep. *J Pathol.* (2020) 252:346–57. doi: 10.1002/path.5547
 22. Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. *Ann Intern Med.* (2020) 173:268–77. doi: 10.7326/M20-2003
 23. Fox SE, Akmatbekov A, Harbert JL, Li G, Quincy Brown J, Vander Heide RS. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. *Lancet Respir Med.* (2020) 8:681–6. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30243-5
 24. Tian S, Xiong Y, Liu H, Niu L, Guo J, Liao M, et al. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol.* (2020) 33:1007–14. doi: 10.1038/s41379-020-0536-x
 25. Copin MC, Parmentier E, Duburcq T, Poissy J, Mathieu D, Lille COVID-19 ICU and Anatomopathology Group. Time to consider histologic pattern of lung injury to treat critically ill patients with COVID-19 infection. *Intensive Care Med.* (2020) 46:1124–6. doi: 10.1007/s00134-020-06057-8
 26. Martin-Vicente M, Almansa R, Martínez I, Tedim AP, Bustamante E, Tamayo L, et al. Absent or insufficient anti-SARS-CoV-2 S antibodies at ICU admission are associated to higher viral loads in plasma, antigenemia and mortality in COVID-19 patients. *medRxiv.* (2021) [Preprint]. doi: 10.1101/2021.03.08.21253121
 27. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* (2020) 369:718–24. doi: 10.1126/science.abc6027
 28. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodríguez JM, Aramburu JA, Peñuelas O, et al. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. *Am J Respir Crit Care Med.* (2013) 187:761–7. doi: 10.1164/rccm.201211-1981OC
 29. Yoshida T, Grieco DL, Brochard L, Fujino Y. Patient self-inflicted lung injury and positive end-expiratory pressure for safe spontaneous breathing. *Curr Opin Crit Care.* (2020) 26:59–65. doi: 10.1097/MCC.0000000000000691
 30. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int.* (2020) 98:219–27. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.003
 31. Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* (2020) 383:590–2. doi: 10.1056/NEJMc2011400
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Zerbib, Guilain, Eymieux, Uzbekov, Castelain, Blanchard, François, Chatelain, Brault, Maizel, Roingeard and Slama. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Article

ELISA-Based Analysis Reveals an Anti-SARS-CoV-2 Protein Immune Response Profile Associated with Disease Severity

Charline Herrscher ^{1,*}, Sébastien Eymieux ^{1,*}, Christophe Gaborit ², Hélène Blasco ³, Julien Marlet ^{1,4}, Karl Stefik ^{1,4}, Philippe Roingeard ¹, Leslie Grammatico-Guillon ^{1,2} and Christophe Hourieux ¹

¹ Inserm U1259 Morphogénèse et Antigénicité du VIH et des virus des Hépatites, Université de Tours et CHRU de Tours, 37000 Tours, France; julien.marlet@univ-tours.fr (J.M.); karl.stefik@univ-tours.fr (K.S.); philippe.roingeard@univ-tours.fr (P.R.); leslie.guillon@univ-tours.fr (L.G.-G.); christophe.hourieux@univ-tours.fr (C.H.)

² Epidémiologie des Données Cliniques en Centre-Val de Loire (EpiDclic), Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37000 Tours, France; christophe.gaborit@univ-tours.fr

³ Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHRU de Tours, 37000 Tours, France; helene.blasco@univ-tours.fr

⁴ Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHRU de Tours, 37000 Tours, France

* Correspondence: charline.herrscher@etu.univ-tours.fr (C.H.); sebastien.eymieux@univ-tours.fr (S.E.)



Citation: Herrscher, C.; Eymieux, S.; Gaborit, C.; Blasco, H.; Marlet, J.; Stefik, K.; Roingeard, P.; Grammatico-Guillon, L.; Hourieux, C. ELISA-Based Analysis Reveals an Anti-SARS-CoV-2 Protein Immune Response Profile Associated with Disease Severity. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 405. <https://doi.org/10.3390/jcm11020405>

Academic Editors: Muh-Shi Lin and Andrew Chih Wei Huang

Received: 14 December 2021

Accepted: 11 January 2022

Published: 14 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Since the start of the COVID-19 pandemic, many studies have investigated the humoral response to SARS-CoV-2 during infection. Studies with native viral proteins constitute a first-line approach to assessing the overall immune response, but small peptides are an accurate and valuable tool for the fine characterization of B-cell epitopes, despite the restriction of this approach to the determination of linear epitopes. In this study, we used ELISA and peptides covering a selection of structural and non-structural SARS-CoV-2 proteins to identify key epitopes eliciting a strong immune response that could serve as a biological signature of disease characteristics, such as severity, in particular. We used 213 plasma samples from a cohort of patients well-characterized clinically and biologically and followed for COVID-19 infection. We found that patients developing severe disease had higher titers of antibodies mapping to multiple specific epitopes than patients with mild to moderate disease. These data are potentially important as they could be used for immunological profiling to improve our knowledge of the quantitative and qualitative characteristics of the humoral response in relation to patient outcome.

Keywords: SARS-CoV-2 antibodies; SARS-CoV-2 linear epitopes; COVID-19; disease severity

1. Introduction

In December 2019, cases of atypical pneumonia were reported in Wuhan, China. The unknown etiologic agent was later identified as a new coronavirus displaying 79.6% of genomic sequence identity to the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) [1]. In March 2020, the World Health Organization (WHO) declared that coronavirus induced disease 2019 (COVID-19) was a global pandemic. During the first 24 months of the pandemic, there have been more than 280 million laboratory-confirmed cases of COVID-19 with over five million deaths.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is an enveloped, single-stranded positive sense RNA virus from the genus *Betacoronavirus* [2]. The main manifestations of SARS-CoV-2 infection include respiratory symptoms, systemic inflammation leading to multi-organ dysfunction, such as acute respiratory distress syndrome, cardiovascular disorders and neurological symptoms [3–6]. SARS-CoV-2 is more contagious than SARS-CoV, its greater transmissibility possibly being due to the larger number of asymptomatic patients with a high viral load [7]. The viral genome encodes four main structural proteins—spike (S), envelope (E), membrane (M) and nucleocapsid (N)—essential

for virion assembly and infection. Spike is the outermost protein on the surface of the virus. It contains a receptor-binding domain (RBD) that interacts with the host receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), to mediate viral entry into cells [8]. The M protein is the most abundant structural protein of SARS-CoV-2 and is able to bind all the other structural proteins. Its function remains incompletely understood, but the binding of M protein has been shown to stabilize the N protein and to foster viral assembly by stabilizing the N protein-RNA complex [9]. The E protein is the smallest of the structural proteins playing an important role in virus assembly, release and virulence [10]. The N protein is highly conserved, with an amino-acid sequence 90% identical to that of the SARS-CoV nucleocapsid [11]. The N protein packages the RNA of the viral genome and participates in virion assembly through its interaction with the M protein [12]. The N proteins of many coronaviruses are highly immunogenic and produced in abundance in virus-infected cells [13].

Much attention has been devoted to identifying the immunodominant linear epitopes on SARS-CoV-2 proteins since the start of the outbreak. These epitopes are important for diagnosis, for the development of monoclonal antibodies for prevention and treatment, and for the design of peptide-based vaccines [14–16]. Several immunodominant linear epitopes have been identified on the S, M, E, N (for review [17]) and ORF8 [18] proteins. However, only a few studies have investigated the possible correlation between specific reactivity to particular linear epitopes and disease severity [19–21]. Such correlations may provide important information about the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection and are of potential utility for patient stratification in medical practice. In this study, we performed bioinformatics analysis to predict antigenic linear epitopes in the S, M, N and ORF8 proteins, which we then used to establish peptide-based ELISAs for use on plasma samples from COVID-19 patients and controls. We then investigated the correlations between severity and reactivity to several of the epitopes identified.

2. Materials and Methods

2.1. Design and Participants

We performed a cross-sectional study of patients testing positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR during their hospitalization at Tours Regional University Hospital (Loire Valley, France) between 1 April 2020 and 1 July 2021. We analyzed plasma samples collected from these patients 25–35 days after symptom onset. We excluded: (i) patients who refused to participate (ii) patients for whom no clinical data were available and (iii) patients with incomplete biological data.

2.2. Clinical Variables of Interest

The outcomes for the study population were analyzed according to patient characteristics, including sociodemographic factors (age, sex) and comorbid conditions (cardiovascular disease, hypertension, diabetes mellitus, lung disease, renal insufficiency, dialysis, kidney transplantation, liver failure and obesity). Participants were classified into three groups (mild, moderate and severe) according to the WHO COVID-19 classification of cases [22].

2.3. Linear B-Cell Epitope Prediction

We used the primary sequences of the S, N, M and ORF8 proteins from the original (Wuhan) SARS-CoV-2 strain and the Bepipred-2.0 prediction module (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>, accessed on 13 December 2021) to identify likely B-cell linear epitopes in these proteins [23]. The epitope threshold value was set at 0.55. We also used the Ellipro Antibody epitope prediction tool (<http://tools.iedb.org/ellipro/>, accessed on 13 December 2021) [24] with the 3D structure prediction files for the S protein (PDB ID: 6VXX and 6VSB), the N-terminal domain of the N protein (PDB ID: 7CDZ) and the ORF 8 protein (PDB ID: 7JX6) to identify complementary B-linear epitopes, and for the formal exclusion of conformational epitopes from our peptide set. We also excluded predicted sequences covering a predicted N-glycosylation site in the S protein,

because chemical synthesis does not allow the addition of these glycosylated motifs to the peptide sequence. Long sequences predicted to be linear epitopes were split into peptides overlapping by five amino acids. Finally, based on the high degree of sequence identity between the SARS-CoV and SARS-CoV-2 N proteins, we were able to confirm our N peptide set on the basis of experimental determination of peptide reactivity in a SARS-CoV peptide-based ELISA described in a previous study [25]. N proteins display significant conservation among human coronaviruses. We therefore limited cross-reactivity with antibodies against commonly circulating human coronaviruses by aligning the sequences of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and its homologs in HCoV-HUK1, HCoV-OC43, HCoV-NL63 and HCoV-229E, to identify immunogenic peptides with the lowest degree of similarity.

2.4. Linear Peptide Library

Based on Bepipred predictions, we had 60 linear peptides (19–38 residues) synthesized (Proteogenix, Schiltigheim, France) (Table S1). Forty-six peptides (SK1 to SK39) based on the primary sequence of the S protein were synthesized. Ten linear peptides (NC1 to NC8) were synthesized for the N protein, and one peptide was synthesized for the M protein. Three peptides (NS1 to NS3) were synthesized based on the sequence of the ORF8 protein. This set of peptides included some peptides covering two versions of the same region. Peptide names ending in an apostrophe correspond to an extended version of the peptide to which 10 additional amino acids were added relative to the native peptide, equally distributed between the N-terminal and C-terminal parts of the molecule. A scrambled peptide (SK36) was used as the blank. The synthetic peptides were then purified by reverse-phase HPLC (>80% purity), with verification of their molecular weight by mass spectrometry. The purified peptides were then dissolved to generate a 1 mg/mL solution, in accordance with the manufacturer's instructions, for storage at temperature below -20°C .

2.5. Peptide-Base ELISA

Synthesized peptides were prepared in sterile phosphate-buffered saline (PBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a final concentration of 3000 ng/mL. Nunc Maxi-sorp 96-well immunoassay plates (Thermo Fisher Scientific) were coated by overnight incubation at 4°C with 100 μL of prepared peptides per well. The plates were washed three times with a plate washer. The washing solution (PBST) used for all washes was composed PBS supplemented with 0.1% Tween-20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The plates were then blocked by incubation with 3% non-fat dry milk (NFDm) prepared in PBS at room temperature for 1 h. The plates were washed once and 100 μL of diluted (1:50 in 1% NFDm prepared in PBST) human plasma were added per well. Then plates were incubated at room temperature for 30 min, washed six times with washing solution and incubated at room temperature for 30 min with 100 μL horseradish peroxidase (HRP)-labeled mouse anti-human IgG Fc γ -specific antibody (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) diluted 1:10,000 in 1% NFDm prepared in PBST. The plates were washed six times and incubated with 100 μL developing solution per well (Sigma Fast OPD, Sigma Aldrich) for 10 min in the dark at room temperature. The reaction was stopped by adding 100 μL 2 N H_2SO_4 per well and absorbance was measured on a microplate reader at 490 nm, with 630 nm as the reference wavelength.

2.6. Peptides of Interest

We pooled 50 different pre-pandemic plasma samples collected before January 2018, to constitute a pooled negative control (unrelated to the COVID-19 patients further investigated in our study). We first used 50 plasma samples randomly selected from the COVID-19 patients described above for the selection of peptides of interest. Briefly, all plasma samples (negative controls and samples from COVID-19 patients) were tested in duplicate against the whole set of synthesized peptides using ELISA assay.

2.7. Statistical Analysis

The continuous variables are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD), whereas the qualitative variables are expressed as absolute numbers and percentages. Peptide OD values were initially studied as continuous variables, but sensitivity analyses were performed to assess the value of treating peptide OD as a qualitative variable with a relevant threshold identified from ROC curves and graphical presentations. An optimal cut-off value was identified for each peptide. Each cut-off has been chosen accordingly to the best balance between odds ratio of severity and its p -value. We proposed a graphical plot that illustrates the OD ability to classify the COVID-19 disease as severe according to the variations in the OD value distribution, giving a discrimination threshold = cut-off (on the same basis as ROC curves) (Supplementary Data Figure S1). For the identification of factors associated with severity, we first performed bivariate analyses with the variables of interest, including the OD for each peptide, clinical and sociodemographic variables, in univariate logistic regression models. We then performed multiple logistic regression, including variables for which $p < 0.2$ in the model, together with variables considered clinically relevant. A descending stepwise process was used to select the final linear regression model. The odd ratios (ORs) and 95% CIs were estimated for an association between COVID-19 severity and biological outcomes, including the OD of each peptide as a binary variable with a threshold/cut-off chosen on the basis of OD distribution and OR.

All tests were two-tailed, and p values below 0.05 were considered statistically significant. We included all participants for whom the variables of interest were available in the final analysis, without imputing missing data. All statistical analysis were performed with SAS, version 9.4, with SAS Enterprise Guide 71 64-bit (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.8. Ethics Approval

This study involved the reuse of data that had already been recorded. It falls within the scope of the French Research Commission according to the 2016–41 law of 26 January 2016 on the modernization of the French health system (DC 2020_097), according to which written informed consent is required from all individuals included in biomedical studies. Samples were obtained from the registered biological collection DC-2020-3961.

3. Results

3.1. Characteristics of Participants

During the study period, we obtained 213 plasma samples from SARS-CoV-2 positive patients for whom complete clinical and biological data were available, and who had given consent for participation. The sociodemographic and clinical characteristics of the participants are shown in Table 1.

The median age of the participants was 69 (55–84) years, with a sex ratio of 0.85 (99 (46%) men and 114 (54%) women). The most common comorbid condition was hypertension (109 patients, 51%), followed by cardiovascular diseases (76 patients, 35%), obesity (52 patients, 24%) and diabetes mellitus (44 patients, 21%). Eighty-four patients (39%) had mild infections, 42 patients (20%) developed moderate infections and 87 participants (41%) were admitted to the intensive care unit (ICU) due to severe infection. Among patients developing mild infections, the main comorbid condition was hypertension (34%), followed by cardiovascular diseases (25%) and diabetes mellitus (20%). The proportion of women was higher than the proportion of men in the group of patients with mild infection (68% versus 32% in men). The most frequent comorbid factors in patients with moderate infection were hypertension (60%), cardiovascular diseases (43%) and obesity (24%). The other comorbid conditions were evenly distributed between disease severity groups (around 20% in each group). The proportion of women was higher than the proportion of men in the group of patients with moderate infections (64% versus 36% in men). Among patients admitted to the ICU, the percentage of patients with comorbidity factors was high, whatever the comorbid conditions considered. Hypertension (63%), cardiovascular disease (42%) and obesity were the most common comorbid conditions. The proportion of men

was higher than the proportion of women in the severe infection group (66% versus 34% in women).

Table 1. Characteristics of the patients included.

Clinical Data	Disease Severity			
	Mild N (%) 84 (39)	Moderate N (%) 42 (20)	Severe N (%) 87 (41)	Total N (%) 213 (100)
Median age (interquartile range)	65 (45.7–87.0)	83.5 (58.5–89.5)	69 (61.0–75.0)	69.0 (55.0–84.0)
Male	27 (32)	15 (36)	57 (66)	99 (46)
Female	57 (68)	27 (64)	30 (34)	114 (54)
Cardiovascular disease	21 (25)	18 (43)	37 (42)	76 (35)
Hypertension	29 (34)	25 (60)	55 (63)	109 (51)
Diabetes mellitus	17 (20)	9 (21)	18 (21)	44 (21)
Lung disease	10 (12)	6 (14)	17 (19)	33 (16)
Renal insufficiency	5 (6)	7 (17)	9 (10)	21 (10)
Dialysis	0 (0.0)	0 (0)	1 (1)	1 (0.5)
Kidney transplantation	0 (0.0)	1 (2)	4 (5)	5 (2)
Liver failure	4 (5)	0 (0)	1 (1)	5 (2)
Obesity	12 (14)	10 (24)	30 (34)	52 (24)

Data are absolute numbers (%) or medians (interquartile range).

3.2. Selecting the Peptides of Interest

Our peptide mapping identified several hotspots in the SARS-CoV-2 proteins covered (Figure 1). In this first set of ELISAs, peptides giving a mean optical density (OD) greater than 0.3 and at least five times higher than the OD obtained with the negative control were selected for further analysis (Table S2).

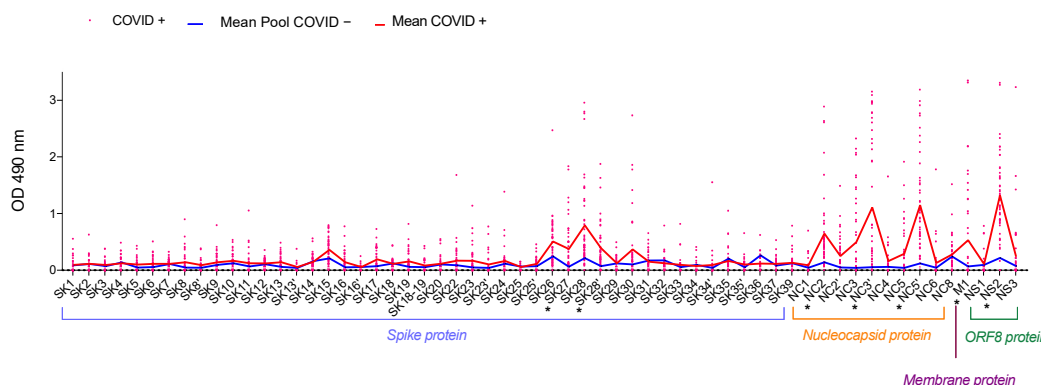


Figure 1. Identification of IgG-specific B-cell epitopes on the spike (S), nucleocapsid (N), membrane (M) and ORF8 proteins. We pooled 50 pre-pandemic plasma samples collected before January 2018 to constitute a COVID-19 negative control (Pool COVID−). We used 50 plasma samples from patients tested positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR, collected between 25 and 35 days after the onset of symptom, to evaluate IgG reactivity to 60 peptides. OD results are represented for each sample as a pink point for COVID+ samples. The red line represents the mean OD for COVID+ patients and the blue line represents the mean OD of 50 repeated measures for the COVID− pool. * indicates the peptides selected for further analysis.

For the S protein, at least one region was found to constitute a B-cell epitope. This region was covered by peptides SK27 and SK28. The mean OD obtained with SK27 was 0.335 for COVID+ versus 0.024 for the COVID− pool. For SK28, the mean OD for COVID+ samples was 0.748 and that for the COVID− pool was 0.175. Peptide reactivity was greater

for the N protein than for the S protein. Three peptides reacted strongly with COVID+ samples: NC2, NC3' and NC5'. Mean OD was 0.605 for NC2 vs. 0.101 for the COVID− pool, 1.063 for NC3' vs. 0.017 for the COVID− pool and 1.103 for NC5' vs. 0.082 for the COVID− pool. The single peptide obtained from the M protein showed also displayed a large difference in reactivity between the COVID+ and COVID− pool samples (0.489 vs. 0.032, respectively). For ORF8, only one peptide was highly reactive with COVID+ samples: NS2, with a mean OD of 1.275, versus 0.176 for the COVID− pool. We therefore selected the following peptides (SK27, SK28, NC2, NC3', NC5', M1 and NS2) for the next step of the study.

3.3. Analysis of the Selected Peptides

We analyzed antibody responses to selected peptides according to disease severity. The median OD and interquartile range for each peptide are shown in Table 2, and a boxplot for each peptide against disease severity is shown in Figure 2.

Table 2. IgG response to selected peptides.

Peptides of Interest	Disease Severity		
	Mild	Moderate	Severe
SK27	0.015 (0.000–0.065)	0.001 (0.000–0.1375)	0.342 (0.073–0.851)
SK28	0.138 (0.043–0.293)	0.124 (0.023–0.716)	0.591 (0.161–1.48)
NC2	0.237 (0.065–0.458)	0.273 (0.123–0.513)	0.432 (0.235–0.865)
NC3'	0.068 (0.005–0.649)	0.236 (0.037–2.101)	0.749 (0.221–2.522)
NC5'	0.532 (0.169–1.097)	0.662 (0.332–1.440)	1.052 (0.502–2.298)
M1	0.000 (0.000–0.235)	0.000 (0.000–0.085)	0.130 (0.000–1.012)
NS2	0.512 (0.072–1.216)	0.801 (0.476–1.319)	0.811 (0.467–1.138)

Data are expressed as the median (interquartile range).

These results suggest that the IgG response to selected epitopes, other than NS2, was stronger in patients with severe COVID-19 than in those with mild or moderate disease. Indeed, for every peptide other than NS2, the median value increased with disease severity. Large differences between groups were observed for some epitopes. Reactivity to the M1 peptide differed considerably between the mild, moderate and severe COVID-19 groups (Figure 2). By contrast, there was little difference between the groups in terms of reactivity to the NC2' peptide. For confirmation of these observations, we used logistic modeling to analyze the data, to identify clinical variables and peptides associated with disease severity.

3.4. Analysis of Variables and Peptides Associated with Disease Severity

We used ROC curves and graphical presentations to determine the optimal cut-off value for each peptide (Figure S1). We then analyzed the factors associated with the severity of SARS-CoV-2 infection. The results of this analysis are summarized in Table 3.

After adjustment, the analysis showed that a severe clinical presentation was more than three times more likely in patients over the age of 50 years (OR 3.5, 95% CI 1.05–13.36); 2.7 times more likely in male patients (OR 2.7, 95% CI 1.21–6.08) and 2.5 times more likely in patients with hypertension (OR 2.5, 95% CI 1.03–6.15). The severe clinical presentation was significantly associated with high levels of IgG reactivity to the SK27, NC3' and M1 epitopes. Indeed, for OD values greater than 0.05 for SK27, the probability of having severe COVID-19 disease increased by 410%; the risk of severe infection was, thus, more than four times higher (OR 4.1, 95% CI 1.80–8.83). OD greater than 0.17 for NC3' was associated with an almost four times higher risk of patients presenting severe clinical outcomes. Similarly, an OD greater than 0.9 for the M1 epitope was associated with higher severity, with a risk of developing the severe form almost seven times higher than that for an OD value below this threshold (OR 6.9, 95% CI 1.94–28.37). The probability of a severe COVID-19 outcome was four to seven times higher for values above the OD thresholds for SK27, NC3' and M1 peptides than for OD values below these thresholds. However, for NS2, an OD > 2 was

associated with a 90% lower risk of the severe clinical presentation than OD values below this threshold.

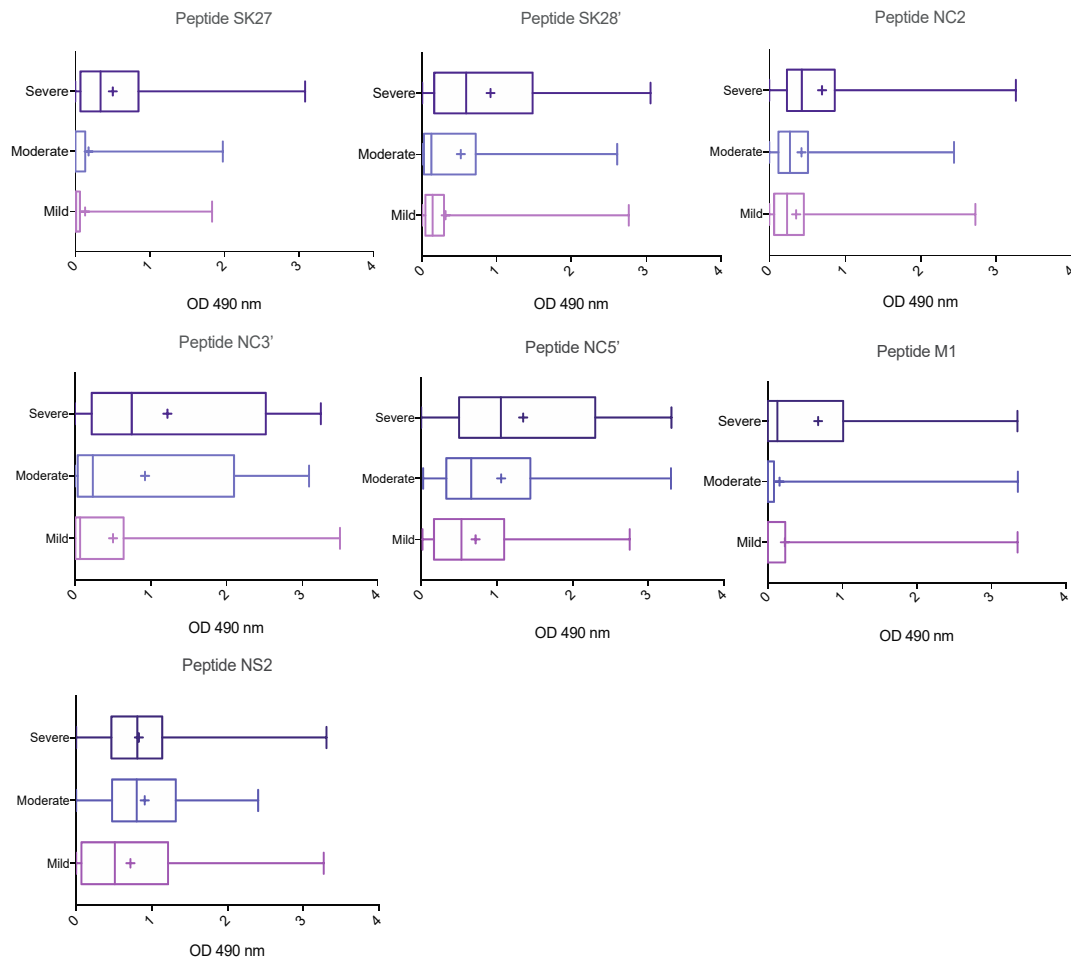


Figure 2. Association of epitope-specific IgG levels with disease severity. COVID-19 patients were classified on the basis of the clinical severity of disease (mild: $n = 84$; moderate: $n = 42$ and severe/ICU: $n = 87$).

Table 3. Clinical factors and B-cell epitopes associated with a severe clinical presentation, in multivariate logistic regressions analysis.

Variables of Interest	Univariate Analysis		Multivariate Analysis		
	Crude OR	<i>p</i> -Value	OR	95%CI	<i>p</i> -Value
<i>Clinical features</i>					
Age > 50 years	6.1	$<10^{-3}$	3.5	1.05–13.36	0.049
Male	3.8	$<10^{-3}$	2.7	1.21–6.08	0.02
Cardiovascular diseases	1.6	0.09	-	-	-
Hypertension	2.3	0.003	2.5	1.03–6.15	0.04

Table 3. Cont.

Variables of Interest	Univariate Analysis		Multivariate Analysis		
Chronic lung diseases	1.6	0.18	-	-	-
Diabetes mellitus	1.0	0.98	-	-	-
Obesity	2.6	0.01	-	-	-
Kidney chronic diseases	1.1	0.85	-	-	-
Liver failure	0.4	0.35	-	-	-
Peptides					
SK27 > 0.05	7.4	<10 ⁻³	4.1	1.80–9.83	<10 ⁻³
SK28 > 0.3	2.6	<10 ⁻³	-	-	-
NC2 > 0.1	4.2	0.001	-	-	-
NC3' > 0.17	4.9	<10 ⁻³	3.9	1.70–9.22	0.002
NC5' > 0.35	3.4	0.001	-	-	-
M1 > 0.9	9.1	<10 ⁻³	6.9	1.94–28.37	<10 ⁻³
NS2 > 2	0.1	0.06	0.1	0.002–0.63	0.03

4. Discussion

Many studies have been performed to identify B-cell linear epitopes in the SARS-CoV-2 proteins [18,19,26–37]. Our study confirms previous findings, identifying the same overall regions. Surprisingly, only two epitopes were found on the S protein, located within the S1/S2 subdomain. No IgG response to peptide covering the receptor binding domain (RBD) was detected, despite this region being known to be highly immunogenic [38]. However, previous studies have reported similar results, suggesting that the RBD is rich in conformational epitopes but lacks linear epitopes [20]. In addition, we cannot exclude non-detection of peptide reactivity in our ELISA approaches, due to the short length of the peptides or their low efficiency to be adsorbed on the plates.

This study focused particularly on the possible association between disease severity and IgG response to these linear epitopes that could be analyzed by ELISA. The clinical factors associated with disease severity and mortality in COVID-19 patients have been studied in detail since the start of the pandemic. The clinical data for our patients are consistent with those reported in other studies, demonstrating that increasing age, being male, dyspnea, diabetes, hypertension, and obesity are associated with disease severity [39–41]. The magnitude of the humoral response is highly variable and has been shown to be positively correlated with disease severity [42]. Only two studies have described the epitopes eliciting this strong IgG response linked to severe clinical outcomes [19,28]. Both these studies identified immunodominant epitopes within the S and N proteins. We identified the same epitopes in our analysis, together with an additional epitope on the M protein, for which a strong humoral response was strongly correlated with disease severity. Indeed, we found that the IgG response elicited by the M1 epitope was responsible for the largest difference between disease severity groups. Patients with mild-to-moderate COVID-19 had weak antibody responses to M1, whereas patients with severe clinical presentations had very strong IgG responses to M1 (OR 6.9, 95% CI 1.94–28.37). Finally, we also analyzed the predicted B-cell linear epitopes of ORF8. We identified one epitope that elicited a strong humoral response in patients infected with SARS-CoV-2. ORF8 was recently identified as a novel secreted protein absent from all human pathogenic coronaviruses except SARS-CoV-2 [43]. It has been suggested that ORF8 plays a biological role in the pathogenesis of SARS-CoV-2, by mediating immune evasion via the downregulation of MHC-I molecules [44]. We therefore investigated whether patients with different severities of COVID-19 had different IgG responses to an epitope (NS2) identified in ORF8. We found large differences in reactivity between groups for this particular epitope. Logistic modeling revealed that the risk of developing severe COVID-19 decreased by 90% above the NS2 cut-off. However, the established cut-off is very high (OD > 2), suggesting that the IgG response was strong regardless of clinical presentation. This observation confirms that ORF8 is a unique and specific protein secreted by SARS-CoV-2. Our results suggest that

patients with severe clinical outcomes have a weaker IgG response to ORF8 than patients with mild-to-moderate COVID-19 disease. We therefore provide new data for the NS2 epitope of the ORF8 protein, and describe a new epitope, M1, linked to COVID-19 severity. One limitation of this study is that we considered only short peptides. Longer peptides, which may retain some conformational information, may be more informative. However, the use of longer peptides would decrease the precision of identification for the epitopes involved. Another limitation of this study is that we could not have repetitions for all patients because of the restricted amount of plasma. However, when possible, plasma were tested in duplicate and OD obtained were very similar. In addition, a much larger cohort of COVID-19 patients with mild, moderate and severe disease will be required to strengthen these data.

The identification of serological markers of COVID-19 severity is an important goal, as it would facilitate profiling, making it possible to determine how viral responses differ between patients with different outcomes. The IgG response has been shown to be correlated with severity. This positive correlation raised the possibility that antibody-dependent enhancement (ADE) could, in some instances, contribute to the excessive immune response that exacerbates SARS-CoV-2 pathogenesis [45,46]. In this context, further studies on the immune response to the M1 and NS2 epitopes identified here will be useful, to determine the potential role of these epitopes in the immunopathogenicity of SARS-CoV-2 infection. Should these epitopes prove useful as clinical biomarkers of disease severity, ELISA-based assays would clearly be a valuable tool for monitoring them.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm11020405/s1>, Figure S1: Graphic determination of optimal OD cut-off for each peptide, Table S1: Peptide sequences of putative immunodominant SARS-CoV-2 IgG linear B-cell epitopes, Table S2: Peptides of interest: selection.

Author Contributions: Conceptualization, C.H. (Christophe Hourieux) and S.E.; Methodology, C.H. (Charline Herrscher) and S.E.; Software, C.H. (Christophe Hourieux), C.H. (Charline Herrscher) and S.E.; Validation, C.H. (Christophe Hourieux), C.H. (Charline Herrscher) and S.E.; Formal analysis, C.G. and L.G.-G.; Investigation, C.H. (Charline Herrscher), C.G. and L.G.-G.; Resources, C.H. (Charline Herrscher), J.M., K.S., S.E. and H.B.; Data curation, S.E., K.S. and J.M.; Writing—original draft preparation, C.H. (Charline Herrscher); Writing—review and editing, S.E., C.H. (Christophe Hourieux), C.H. (Charline Herrscher), L.G.-G. and P.R.; Visualization, C.H. (Charline Herrscher); Supervision, P.R., C.H. (Christophe Hourieux) and S.E.; Project administration, C.H. (Christophe Hourieux); Funding acquisition, C.H. (Christophe Hourieux). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Agence Nationale de la Recherche, grant number ANR-20-COVI-0011-01 and by the Centre-Val de Loire region, France, grant number 2020 00140687.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the French research Commission (DC 2020_097, approved 26 January 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy issues.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the virology, biochemistry, and occupational medicine services from Tours regional University hospital for their help to constitute the plasma collection of patients tested positive for SARS-CoV-2. We also would like to thank Philippe Despres for helpful discussion. Finally, we wish to thank Elena Angoulvant for her help with the initial development of ELISA conditions.

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

References

1. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **2020**, *579*, 270–273. [\[CrossRef\]](#)
2. Chen, Y.; Liu, Q.; Guo, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 418–423. [\[CrossRef\]](#)
3. Helms, J.; Kremer, S.; Merdji, H.; Clere-Jehl, R.; Schenck, M.; Kummerlen, C.; Collange, O.; Boulay, C.; Fafi-Kremer, S.; Ohana, M.; et al. Neurologic Features in Severe SARS-CoV-2 Infection. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 2268–2270. [\[CrossRef\]](#)
4. Wang, D.; Hu, B.; Hu, C.; Zhu, F.; Liu, X.; Zhang, J.; Wang, B.; Xiang, H.; Cheng, Z.; Xiong, Y.; et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* **2020**, *323*, 1061. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Rowley, A.H.; Shulman, S.T.; Arditi, M. Immune pathogenesis of COVID-19-related multisystem inflammatory syndrome in children. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 5619–5621. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Jiang, L.; Tang, K.; Levin, M.; Irfan, O.; Morris, S.K.; Wilson, K.; Klein, J.D.; Bhutta, Z.A. COVID-19 and multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, e276–e288. [\[CrossRef\]](#)
7. Lu, S.; Xie, X.; Zhao, L.; Wang, B.; Zhu, J.; Yang, T.; Yang, G.; Ji, M.; Lv, C.; Xue, J.; et al. The immunodominant and neutralization linear epitopes for SARS-CoV-2. *Cell Rep.* **2021**, *34*, 108666. [\[CrossRef\]](#)
8. Wang, Q.; Zhang, Y.; Wu, L.; Niu, S.; Song, C.; Zhang, Z.; Lu, G.; Qiao, C.; Hu, Y.; Yuen, K.-Y.; et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* **2020**, *181*, 894–904.e9. [\[CrossRef\]](#)
9. Astuti, I.; Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2020**, *14*, 407–412. [\[CrossRef\]](#)
10. Chai, J.; Cai, Y.; Pang, C.; Wang, L.; McSweeney, S.; Shanklin, J.; Liu, Q. Structural basis for SARS-CoV-2 envelope protein recognition of human cell junction protein PALS1. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3433. [\[CrossRef\]](#)
11. Grifoni, A.; Sidney, J.; Zhang, Y.; Scheuermann, R.H.; Peters, B.; Sette, A. A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* **2020**, *27*, 671–680.e2. [\[CrossRef\]](#)
12. Bai, Z.; Cao, Y.; Liu, W.; Li, J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses* **2021**, *13*, 1115. [\[CrossRef\]](#)
13. Dutta, N.K.; Mazumdar, K.; Gordy, J.T. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: A Target for Vaccine Development. *J. Virol.* **2020**, *94*, e00647-20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Galipeau, Y.; Greig, M.; Liu, G.; Driedger, M.; Langlois, M.-A. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 610688. [\[CrossRef\]](#)
15. Ahmad, T.A.; Eweida, A.E.; Sheweita, S.A. B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective diagnostics. *Trials Vaccinol.* **2016**, *5*, 71–83. [\[CrossRef\]](#)
16. Sawyer, L.A. Antibodies for the prevention and treatment of viral diseases. *Antivir. Res.* **2000**, *47*, 57–77. [\[CrossRef\]](#)
17. Farrera-Soler, L.; Daguer, J.-P.; Barluenga, S.; Winssinger, N. Experimental Identification of Immuno-dominant B-cell Epitopes from SARS-CoV-2. *Chimia* **2021**, *75*, 276–284. [\[CrossRef\]](#)
18. Wang, X.; Lam, J.-Y.; Chen, L.; Au, S.W.-N.; To, K.K.W.; Yuen, K.-Y.; Kok, K.-H. Mining of linear B cell epitopes of SARS-CoV-2 ORF8 protein from COVID-19 patients. *Emerg. Microbes Infect.* **2021**, *10*, 1016–1023. [\[CrossRef\]](#)
19. Amrun, S.N.; Lee, C.Y.-P.; Lee, B.; Fong, S.-W.; Young, B.E.; Chee, R.S.-L.; Yeo, N.K.-W.; Torres-Ruesta, A.; Carissimo, G.; Poh, C.M.; et al. Linear B-cell epitopes in the spike and nucleocapsid proteins as markers of SARS-CoV-2 exposure and disease severity. *EBioMedicine* **2020**, *58*, 102911. [\[CrossRef\]](#)
20. Li, Y.; Ma, M.; Lei, Q.; Wang, F.; Hong, W.; Lai, D.; Hou, H.; Xu, Z.; Zhang, B.; Chen, H.; et al. Linear epitope landscape of the SARS-CoV-2 Spike protein constructed from 1051 COVID-19 patients. *Cell Rep.* **2021**, *34*, 108915. [\[CrossRef\]](#)
21. Schwarz, T.; Heiss, K.; Mahendran, Y.; Casilag, F.; Kurth, F.; Sander, L.E.; Wendtner, C.-M.; Hoehstetter, M.A.; Müller, M.A.; Sekul, R.; et al. SARS-CoV-2 Proteome-Wide Analysis Revealed Significant Epitope Signatures in COVID-19 Patients. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 629185. [\[CrossRef\]](#)
22. Marshall, J.C.; Murthy, S.; Diaz, J.; Adhikari, N.K.; Angus, D.C.; Arabi, Y.M.; Baillie, K.; Bauer, M.; Berry, S.; Blackwood, B.; et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, e192–e197. [\[CrossRef\]](#)
23. Jespersen, M.C.; Peters, B.; Nielsen, M.; Marcatili, P. BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W24–W29. [\[CrossRef\]](#)
24. Ponomarenko, J.; Bui, H.-H.; Li, W.; Fusseder, N.; Bourne, P.E.; Sette, A.; Peters, B. ElliPro: A new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinform.* **2008**, *9*, 514. [\[CrossRef\]](#)
25. Wang, J.; Ji, J.; Ye, J.; Zhao, X.; Wen, J.; Li, W.; Hu, J.; Li, D.; Sun, M.; Zeng, H.; et al. The Structure Analysis and Antigenicity Study of the N Protein of SARS-CoV. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2003**, *1*, 145–154. [\[CrossRef\]](#)
26. Poh, C.M.; Carissimo, G.; Wang, B.; Amrun, S.N.; Lee, C.Y.-P.; Chee, R.S.-L.; Fong, S.-W.; Yeo, N.K.-W.; Lee, W.-H.; Torres-Ruesta, A.; et al. Two linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein that elicit neutralising antibodies in COVID-19 patients. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2806. [\[CrossRef\]](#)
27. Zamecnik, C.R.; Rajan, J.V.; Yamauchi, K.A.; Mann, S.A.; Loudermilk, R.P.; Sowa, G.M.; Zorn, K.C.; Alvarenga, B.D.; Gaebler, C.; Caskey, M.; et al. ReScan, a Multiplex Diagnostic Pipeline, Pans Human Sera for SARS-CoV-2 Antigens. *Cell Rep. Med.* **2020**, *1*, 100123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

28. Shrock, E.; Fujimura, E.; Kula, T.; Timms, R.T.; Lee, I.-H.; Leng, Y.; Robinson, M.L.; Sie, B.M.; Li, M.Z.; Chen, Y.; et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science* **2020**, *370*, eabd4250. [\[CrossRef\]](#)
29. Ladner, J.T.; Henson, S.N.; Boyle, A.S.; Engelbrektson, A.L.; Fink, Z.W.; Rahee, F.; D'ambrozio, J.; Schaecher, K.E.; Stone, M.; Dong, W.; et al. Epitope-resolved profiling of the SARS-CoV-2 antibody response identifies cross-reactivity with an endemic human CoV. *Immunology* **2020**, *2*, 100189.
30. Yi, Z.; Ling, Y.; Zhang, X.; Chen, J.; Hu, K.; Wang, Y.; Song, W.; Ying, T.; Zhang, R.; Lu, H.; et al. Functional mapping of B-cell linear epitopes of SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescent population. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 1988–1996. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Mishra, N.; Huang, X.; Joshi, S.; Guo, C.; Ng, J.; Thakkar, R.; Wu, Y.; Dong, X.; Li, Q.; Pinapati, R.; et al. Immunoreactive peptide maps of SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *bioRxiv* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
32. Klompus, S.; Leviatan, S.; Vogl, T.; Kalka, I.N.; Godneva, A.; Shinar, E.; Weinberger, A.; Segal, E. Cross-reactive antibody responses against SARS-CoV-2 and seasonal common cold coronaviruses. *medRxiv* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
33. Haynes, W.A.; Kamath, K.; Bozekowski, J.; Baum-Jones, E.; Campbell, M.; Casanovas-Massana, A.; Daugherty, P.S.; Dela Cruz, C.S.; Dhal, A.; Farhadian, S.F.; et al. High-resolution mapping and characterization of epitopes in COVID-19 patients. *medRxiv* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
34. Holenya, P.; Lange, P.J.; Reimer, U.; Woltersdorf, W.; Panterodt, T.; Glas, M.; Wasner, M.; Eckey, M.; Drosch, M.; Hollidt, J.-M.; et al. Peptide microarray based analysis of antibody responses to SARS-CoV-2 identifies unique epitopes with potential for diagnostic test development. *medRxiv* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
35. Heffron, A.S.; McIlwain, S.J.; Amjadi, M.F.; Baker, D.A.; Khullar, S.; Sethi, A.K.; Palmenberg, A.C.; Shelef, M.A.; O'Connor, D.H.; Ong, I.M. The landscape of antibody binding in SARS-CoV-2 infection. *Immunology* **2020**, *19*, e3001265. [\[CrossRef\]](#)
36. Zhang, X.; Wu, X.; Wang, D.; Lu, M.; Hou, X.; Wang, H.; Liang, T.; Dai, J.; Duan, H.; Xu, Y.; et al. Proteome-wide analysis of differentially-expressed SARS-CoV-2 antibodies in early COVID-19 infection. *medRxiv* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
37. Musicò, A.; Frigerio, R.; Mussida, A.; Barzon, L.; Sinigaglia, A.; Riccetti, S.; Gobbi, F.; Piubelli, C.; Bergamaschi, G.; Chiari, M.; et al. SARS-CoV-2 Epitope Mapping on Microarrays Highlights Strong Immune-Response to N Protein Region. *Vaccines* **2021**, *9*, 35. [\[CrossRef\]](#)
38. Premkumar, L.; Segovia-Chumbez, B.; Jadi, R.; Martinez, D.R.; Raut, R.; Markmann, A.; Cornaby, C.; Bartelt, L.; Weiss, S.; Park, Y.; et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* **2020**, *5*, eabc8413. [\[CrossRef\]](#)
39. Gallo Marin, B.; Aghagholi, G.; Lavine, K.; Yang, L.; Siff, E.J.; Chiang, S.S.; Salazar-Mather, T.P.; Dumenco, L.; Savaria, M.C.; Aung, S.N.; et al. Predictors of COVID-19 severity: A literature review. *Rev. Med. Virol.* **2021**, *31*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
40. Chidambaram, V.; Tun, N.L.; Haque, W.Z.; Majella, M.G.; Sivakumar, R.K.; Kumar, A.; Hsu, A.T.-W.; Ishak, I.A.; Nur, A.A.; Ayeh, S.K.; et al. Factors associated with disease severity and mortality among patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0241541. [\[CrossRef\]](#)
41. Williamson, E.J.; Walker, A.J.; Bhaskaran, K.; Bacon, S.; Bates, C.; Morton, C.E.; Curtis, H.J.; Mehrkar, A.; Evans, D.; Inglesby, P.; et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* **2020**, *584*, 430–436. [\[CrossRef\]](#)
42. Carrillo, J.; Izquierdo-Useros, N.; Ávila-Nieto, C.; Pradenas, E.; Clotet, B.; Blanco, J. Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *538*, 187–191. [\[CrossRef\]](#)
43. Chan, J.F.-W.; Kok, K.-H.; Zhu, Z.; Chu, H.; To, K.K.-W.; Yuan, S.; Yuen, K.-Y. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 221–236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Zhang, Y.; Chen, Y.; Li, Y.; Huang, F.; Luo, B.; Yuan, Y.; Xia, B.; Ma, X.; Yang, T.; Yu, F.; et al. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2024202118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Arvin, A.M.; Fink, K.; Schmid, M.A.; Cathcart, A.; Spreafico, R.; Havenar-Daughton, C.; Lanzavecchia, A.; Corti, D.; Virgin, H.W. A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2. *Nature* **2020**, *584*, 353–363. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Lee, W.S.; Wheatley, A.K.; Kent, S.J.; DeKosky, B.J. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 1185–1191. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Communication

Antibody Responses after a Third Dose of COVID-19 Vaccine in Kidney Transplant Recipients and Patients Treated for Chronic Lymphocytic Leukemia

Julien Marlet ^{1,2,*} , **Philippe Gatault** ³, **Zoha Maakaroun** ^{4,5} , **Hélène Longuet** ³, **Karl Stefic** ^{1,2} ,
Lynda Handala ^{1,2}, **Sébastien Eymieux** ^{1,2,6} , **Emmanuel Gyan** ⁷, **Caroline Dartigeas** ⁷
and **Catherine Gaudy-Graffin** ^{1,2}

- 1 INSERM U1259, Université de Tours et CHRU de Tours, 37000 Tours, France; karl.stefic@univ-tours.fr (K.S.);
L.HANDALA@chu-tours.fr (L.H.); sebastien.eymieux@univ-tours.fr (S.E.);
catherine.gaudy-graffin@univ-tours.fr (C.G.-G.)
2 Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHRU de Tours, 37000 Tours, France
3 Transplantation rénale-Immunologie clinique, CHRU de Tours, 37000 Tours, France;
philippe.gatault@univ-tours.fr (P.G.); H.LONGUET@chu-tours.fr (H.L.)
4 Centre de vaccination, CHRU de Tours, 37000 Tours, France; Z.MAAKAROUN-VERMESSE@chu-tours.fr
5 Service de médecine pédiatrique, CHRU de Tours, 37000 Tours, France
6 Plate-Forme IBiSA de Microscopie Electronique, Université de Tours and CHRU de Tours,
37000 Tours, France
7 Hématologie et Thérapie Cellulaire, CHRU de Tours, 37000 Tours, France; E.GYAN@chu-tours.fr (E.G.);
c.dartigeas@chu-tours.fr (C.D.)
* Correspondence: julien.marlet@univ-tours.fr



Citation: Marlet, J.; Gatault, P.; Maakaroun, Z.; Longuet, H.; Stefic, K.; Handala, L.; Eymieux, S.; Gyan, E.; Dartigeas, C.; Gaudy-Graffin, C. Antibody Responses after a Third Dose of COVID-19 Vaccine in Kidney Transplant Recipients and Patients Treated for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Vaccines* **2021**, *9*, 1055. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101055>

Academic Editors: Ger Rijkers and
Jean-Luc Murk

Received: 31 August 2021
Accepted: 16 September 2021
Published: 23 September 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The impact of a third dose of COVID-19 vaccine on antibody responses is unclear in immunocompromised patients. The objective of this retrospective study was to characterize antibody responses induced by a third dose of mRNA COVID-19 vaccine in 160 kidney transplant recipients and 20 patients treated for chronic lymphocytic leukemia (CLL). Prevalence of anti-spike IgG ≥ 7.1 and ≥ 30 BAU/mL after the third dose were 47% (75/160) and 39% (63/160) in kidney transplant recipients, and 57% (29/51) and 50% (10/20) in patients treated for CLL. Longitudinal follow-up identified a moderate increase in SARS-CoV-2 anti-spike IgG levels after a third dose of vaccine in kidney transplant recipients (0.19 vs. 5.28 BAU/mL, $p = 0.03$) and in patients treated for CLL (0.63 vs. 10.7 BAU/mL, $p = 0.0002$). This increase in IgG levels had a limited impact on prevalence of anti-spike IgG ≥ 30 BAU/mL in kidney transplant recipients (17%, 2/12 vs. 33%, 4/12, $p = 0.64$) and in patients treated for CLL (5%, 1/20 vs. 45%, 9/20, $p = 0.008$). These results highlight the need for vaccination of the general population and the importance of non-medical preventive measures to protect immunocompromised patients.

Keywords: COVID-19; vaccine; kidney transplant; chronic lymphocytic leukemia; antibody

1. Introduction

Vaccine effectiveness against symptomatic COVID-19 was estimated at between 70 and 97% after two doses of COVID-19 vaccine in immunocompetent patients [1–3]. In contrast, few immunocompromised patients have been enrolled in COVID-19 phase 3 clinical trials and vaccine effectiveness in this population remains unclear. In a recent observational study, solid organ transplant recipients had an 82-fold higher risk of breakthrough infection and a 485-fold higher risk of breakthrough infection with associated hospitalization and death [4]. Antibody responses after two doses of COVID-19 vaccine, defined as anti-spike IgG seroconversion, are impaired in these patients [5]. They were estimated between 38 to 42% for kidney transplant patients [5,6] and between 23 to 52% for patients with chronic lymphocytic leukemia, despite the fact that most of these CLL patients were not

undergoing cancer therapy [7–9]. The impact of a third dose of COVID-19 vaccine on antibody responses is unclear in these patients. Response rates to a third dose ranged between 47 and 68% in kidney transplant recipients [10–12] and limited data are available in patients treated for chronic lymphocytic leukemia (CLL). The objective of this retrospective study was to characterize antibody responses induced by a third dose of mRNA COVID-19 vaccine in 160 kidney transplant recipients and 20 patients treated for CLL.

2. Materials and Methods

SARS-CoV-2 anti-spike IgG was tested for all patients at least 21 days after the second and/or third dose of mRNA COVID-19 vaccine, using a SARS-CoV-2 IgG II Quant assay on an Alinity i system (Abbott). Assay results in AU/mL were converted into BAU/mL (international standard units [13]) using a conversion factor of 0.142, according to the manufacturer's recommendations. We defined responders as patients with positive SARS-CoV-2 IgG, corresponding to levels ≥ 7.1 binding antibody units (BAU)/mL, according to the manufacturer's recommendations and previous studies [14–18]. This interpretation is limited by its lack of association with vaccine effectiveness and its lack of comparability with other assays, using different cut-offs. As such, results were also compared with a cut-off of 30 BAU/mL, recently associated with 50% vaccine effectiveness against symptomatic COVID-19 in immunocompetent patients [19]. All calculations were performed with GraphPad Prism 9.0 using Wilcoxon test (paired values), Mann-Whitney (unpaired values) and Fisher's exact test (binomial variables). p -values < 0.05 (2-sided) were considered significant.

3. Results

3.1. Kidney Transplant Recipients

Prevalence of positive SARS-CoV-2 anti-spike IgG (≥ 7.1 BAU/mL) in kidney transplant recipients tested either after the second ($n = 97$) or third dose ($n = 160$) of COVID-19 vaccine was not significantly different (43%, 42/97 vs. 47%, 75/160, $p = 0.61$, Table 1). Prevalence of SARS-CoV-2 anti-spike IgG ≥ 30 BAU/mL was also not significantly different between these two groups (30%, 29/97 vs. 39%, 63/160, $p = 0.14$). SARS-CoV-2 anti-spike median IgG levels were not significantly different between these two groups (2.7 vs. 5.5 BAU/mL, $p = 0.42$, Figure 1).

In contrast, when considering only the 12 patients with longitudinal follow-up after both the second and third dose, an increase in anti-spike IgG levels was observed (0.19 vs. 5.28 BAU/mL, $p = 0.03$, Figure 1). In this subgroup, prevalence of positive SARS-CoV-2 anti-spike IgG and anti-spike IgG ≥ 30 BAU/mL did not increase after the third dose (17%, 2/12 vs. 42%, 5/12, $p = 0.37$ and 17%, 2/12 vs. 33%, 4/12, $p = 0.64$).

Age was associated with poor response to COVID-19 vaccines (>65 year, $p = 0.02$) but a history of COVID-19 RT-PCR was associated with better responses ($p = 0.04$, Table 1). Nine patients had a history of COVID-19, which occurred at a median of 206 days (IQR: 168–248) before the measurement of SARS-CoV-2 anti-spike IgG.

The third dose of vaccine was injected at a median of 43 days (IQR: 33–63) after the second dose. SARS-CoV-2 anti-spike IgG was measured at a median of 95 days (IQR: 48–124) and 52 days (IQR: 34–76) after the second and third dose of vaccine, respectively.

Table 1. Factors associated with response to COVID-19 vaccines in 245 kidney transplant recipients and 51 patients treated for chronic lymphocytic leukemia.

Response to COVID vaccine	Kidney Transplant						Chronic Lymphocytic Leukemia					
	After 2nd Dose (n = 97)			After 3rd Dose (n = 160)			After 2nd Dose (n = 51)			After 3rd Dose (n = 20)		
	No (n = 55)	Yes (n = 42)	<i>p</i>	No (n = 85)	Yes (n = 75)	<i>p</i>	No (n = 22)	Yes (n = 29)	<i>p</i>	No (n = 10)	Yes (n = 10)	<i>p</i>
Age > 65 year	31 (56)	13 (31)	0.02	41 (48)	26 (35)	0.08	17 (77)	20 (69)	0.55	8 (80)	6 (60)	0.63
Age < 50 year	5 (9)	8 (19)	0.23	15 (18)	24 (32)	0.06	0	1 (4)	1.0	0	0	-
Sex (female)	18 (33)	21 (5)	0.10	36 (42)	21 (28)	0.07	7 (32)	11 (38)	0.77	2 (20)	4 (40)	0.64
History of positive SARS-CoV-2 RT-PCR	1 (1.8)	6 (14)	0.04	0	2 (2.7)	0.22	-	-	-	-	-	-
COVID-19 vaccine												
Pfizer (BNT162b2)	43 (78)	32 (76)	0.81	53 (62)	45 (60)	0.88	-	-	-	-	-	-
Moderna (mRNA-1273)	3 (5.5)	4 (9.5)	0.46	11 (13)	16 (21)	0.20	-	-	-	-	-	-
Tyrosine kinase inhibitors or venetoclax	-	-	-	-	-	-	19 (86)	14 (48)	0.007	9 (90)	9 (90)	1.0
Prior-CLL directed therapy	-	-	-	-	-	-	15 (68)	12 (41)	0.54	9 (90)	7 (70)	0.58
Anti-CD20 monoclonal antibody within 2 years	-	-	-	-	-	-	2 (9)	0	0.18	1 (10)	0	1.0

Results are represented as median (range) or absolute values (percentages); *p* < 0.05 are in bold.

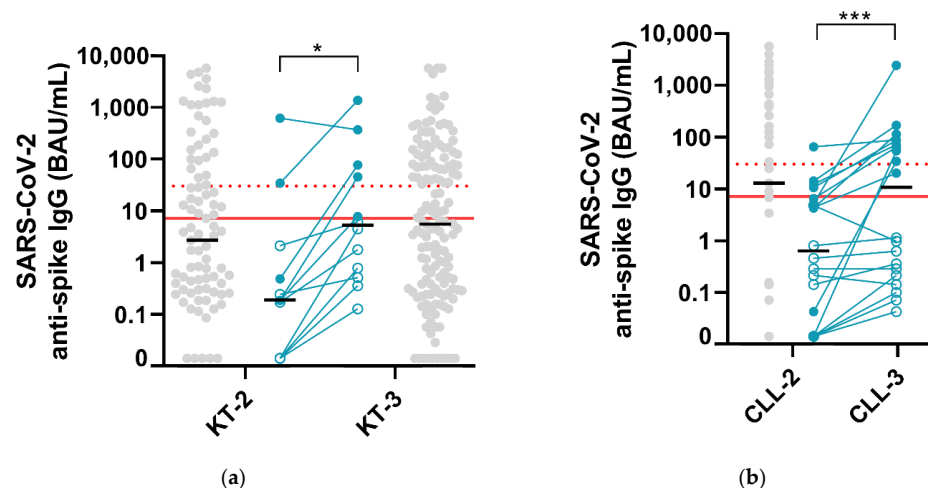


Figure 1. (a) SARS-CoV-2 anti-spike IgG levels measured in 245 kidney transplant (KT) recipients after the second (KT-2, $n = 97$) and third dose of COVID-19 vaccine (KT-3, $n = 160$). (b) SARS-CoV-2 anti-spike IgG levels measured in patients treated for chronic lymphocytic leukemia (CLL) after the second (CLL-2, $n = 51$) and the third dose of vaccine (CLL-3, $n = 20$). Longitudinal follow-up was performed for 12 KT patients and 20 CLL patients (responders and non-responders to the 3rd dose of vaccine in plain and empty blue dots, respectively). Light grey dots, patients without longitudinal follow-up; plain red bar, SARS-CoV-2 IgG II Quant assay cut-off (≥ 7.1 BAU/mL); dashed red bar, anti-spike IgG levels previously associated with 50 % vaccine effectiveness against symptomatic COVID-19 (≥ 30 BAU/mL) [19]; black bars, medians. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

3.2. Patients Treated for Chronic Lymphocytic Leukemia

Prevalence of positive SARS-CoV-2 anti-spike IgG and prevalence of SARS-CoV-2 anti-spike IgG ≥ 30 BAU/mL in 51 patients treated for CLL did not increase between the second and third dose of vaccine (57%, 29/51 vs. 50%, 10/20, $p = 0.61$ and 45%, 9/20, $p = 1.0$, Table 1). SARS-CoV-2 anti-spike median IgG levels were comparable between these two groups (12.9 vs. 10.7 BAU/mL, $p = 0.32$, Figure 1).

In contrast, when considering only the 20 patients with longitudinal follow-up after both the second and third dose, we observed an increase in anti-spike IgG (0.63 vs. 10.7 BAU/mL, $p = 0.0002$, Figure 1) and an increase in the prevalence of anti-spike IgG ≥ 30 BAU/mL (5%, 1/20 vs. 45%, 9/20, $p = 0.008$). In this subgroup, prevalence of positive SARS-CoV-2 anti-spike IgG did not increase after the third dose (20%, 4/20 vs. 50%, 10/20, $p = 0.10$).

Treatment with tyrosine kinase inhibitors or venetoclax was associated with poor response to the second dose of COVID-19 vaccine ($p = 0.007$, Table 1). The third dose of vaccine was injected at a median of 63 days (IQR: 48–81) after the second dose. SARS-CoV-2 anti-spike IgG was measured at a median of 43 days (IQR: 36–57) and 42 days (IQR: 31–45) after the second and third dose of vaccine, respectively.

4. Discussion

In 12 kidney transplant recipients with longitudinal follow-up, a moderate increase in SARS-CoV-2 anti-spike IgG levels was observed after the third dose of COVID-19 vaccine (0.19 vs. 5.28 BAU/mL, $p = 0.03$). This increase in IgG levels had no significant impact on the prevalence of anti-spike IgG ≥ 30 BAU/mL (17%, 2/12 vs. 33%, 4/12, $p = 0.64$). In 20 patients treated for CLL with longitudinal follow-up, a moderate increase in SARS-CoV-2 anti-spike IgG levels was observed after the third dose of COVID-19 vaccine (0.63

vs. 10.7 BAU/mL, $p = 0.0002$). This resulted in an increase in the prevalence of anti-spike IgG ≥ 30 BAU/mL (5%, 1/20 vs. 45%, 9/20, $p = 0.008$). When considering all patients, with or without longitudinal follow-up, prevalence of anti-spike IgG ≥ 30 BAU/mL after the third dose was 39% (63/160) in kidney transplant recipients and 50% (10/20) in patients treated for CLL. Overall, this suggests that a third dose of COVID-19 vaccine in immunocompromised patients can increase antibody levels. Still, this increase might not be clinically relevant because few patients reached anti-spike IgG levels ≥ 30 BAU/mL, previously associated with 50% vaccine effectiveness [19]. These results are in line with other studies in kidney transplant recipients [10–12] and provide new data regarding patients with CLL.

In kidney transplant recipients, our results confirm the association between young age (<65 years) and response to COVID-19 vaccines ($p = 0.02$) [6,20] and suggest a better response in patients with a history of COVID-19 ($p = 0.04$). In patients treated for CLL, our results confirm the association between treatment with tyrosine kinase inhibitors or venetoclax and non-response to COVID-19 vaccines ($p = 0.007$) [8].

One limitation of our study is the small number of patients with longitudinal follow-up. Indeed, antibody responses in immunocompromised patients are probably too heterogeneous to compare groups of unpaired patients. Other limitations of our study are the lack of antibody measurements prior to vaccination, the lack of in vitro investigation of neutralizing Ab titers, especially against circulating variants, and cellular responses. Other parameters such as disease stage and other treatments, not included in this study, could also have an impact on response to COVID-19 vaccines.

Overall, we believe these results highlight the need for vaccination of the general population and the importance of upholding non-medical preventive measures to protect immunocompromised patients, especially those at higher risk of non-response to COVID-19 vaccines.

Author Contributions: Conceptualization, J.M., P.G., Z.M., H.L., K.S., L.H., S.E., C.D., E.G. and C.G.-G.; methodology, J.M., P.G., Z.M., H.L. and C.D.; software, J.M.; validation, J.M., P.G., Z.M., C.D. and C.G.-G.; formal analysis, J.M., P.G., Z.M., H.L. and C.D.; investigation J.M., P.G., Z.M., H.L., E.G. and C.D.; resources, J.M., K.S., L.H., S.E. and C.G.-G.; data curation, J.M., P.G., Z.M., H.L. and C.D.; writing—original draft preparation, J.M.; writing—review and editing, J.M., P.G., Z.M., C.D. and C.G.-G.; visualization, J.M.; supervision, J.M., P.G., Z.M., C.D., E.G. and C.G.-G.; project administration, J.M., P.G., Z.M., C.D. and C.G.-G.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study was performed after patient information and anonymization of data according to French Reference Methodology MR-004 and to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Data collection was approved by the French Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (n° 2020_097) and sample collection was approved by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (authorization n° DC-2020-3961).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data supporting reported results can be provided by contacting the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank Vincent Roux for its participation to data collection and all the medical and paramedical staff, especially Léa Bouijoux, involved in data collection regarding this study.

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

References

1. Haas, E.J.; Angulo, F.J.; McLaughlin, J.M.; Anis, E.; Singer, S.R.; Khan, F.; Brooks, N.; Smaja, M.; Mircus, G.; Pan, K.; et al. Impact and Effectiveness of mRNA BNT162b2 Vaccine against SARS-CoV-2 Infections and COVID-19 Cases, Hospitalisations, and Deaths Following a Nationwide Vaccination Campaign in Israel: An Observational Study Using National Surveillance Data. *Lancet* **2021**, *397*, 1819–1829. [CrossRef]

2. Tenforde, M.W.; Olson, S.M.; Self, W.H.; Talbot, H.K.; Lindsell, C.J.; Steingrub, J.S.; Shapiro, N.I.; Ginde, A.A.; Douin, D.J.; Prekker, M.E.; et al. Effectiveness of Pfizer-BioNTech and Moderna Vaccines Against COVID-19 Among Hospitalized Adults Aged ≥ 65 Years—United States, January–March 2021. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* **2021**, *70*, 674–679. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Lopez Bernal, J.; Andrews, N.; Gower, C.; Robertson, C.; Stowe, J.; Tessier, E.; Simmons, R.; Cottrell, S.; Roberts, R.; O'Doherty, M.; et al. Effectiveness of the Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca Vaccines on Covid-19 Related Symptoms, Hospital Admissions, and Mortality in Older Adults in England: Test Negative Case-Control Study. *BMJ* **2021**, *373*, n1088. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Qin, C.X.; Moore, L.W.; Anjan, S.; Rahamimov, R.; Sifri, C.D.; Ali, N.M.; Morales, M.K.; Tsapepas, D.S.; Basic-Jukic, N.; Miller, R.A.; et al. Risk of Breakthrough SARS-CoV-2 Infections in Adult Transplant Recipients. *Transplantation* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
5. Stumpf, J.; Siepmann, T.; Lindner, T.; Karger, C.; Schwöbel, J.; Anders, L.; Faulhaber-Walter, R.; Schewe, J.; Martin, H.; Schirutschke, H.; et al. Humoral and Cellular Immunity to SARS-CoV-2 Vaccination in Renal Transplant versus Dialysis Patients: A Prospective, Multicenter Observational Study Using mRNA-1273 or BNT162b2 mRNA Vaccine. *Lancet Reg. Health Eur.* **2021**, 100178. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Grupper, A.; Rabinowich, L.; Schwartz, D.; Schwartz, I.F.; Ben-Yehoyada, M.; Shashar, M.; Katchman, E.; Halperin, T.; Turner, D.; Goykhman, Y.; et al. Reduced Humoral Response to mRNA SARS-Cov-2 BNT162b2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients without Prior Exposure to the Virus. *Am. J. Transplant.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
7. Roeker, L.E.; Knorr, D.A.; Thompson, M.C.; Nivar, M.; Lebowitz, S.; Peters, N.; Deonaraine, I.; Momotaj, S.; Sharan, S.; Chanlatte, V.; et al. COVID-19 Vaccine Efficacy in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia* **2021**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Herishanu, Y.; Avivi, I.; Aharon, A.; Shefer, G.; Levi, S.; Bronstein, Y.; Morales, M.; Ziv, T.; Shorer Arbel, Y.; Scarfò, L.; et al. Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **2021**, *137*, 3165–3173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Agha, M.; Blake, M.; Chilleo, C.; Wells, A.; Haidar, G. Suboptimal Response to COVID-19 mRNA Vaccines in Hematologic Malignancies Patients. *medRxiv* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
10. Benotmane, I.; Gautier, G.; Perrin, P.; Olagne, J.; Cognard, N.; Fafi-Kremer, S.; Caillard, S. Antibody Response After a Third Dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients With Minimal Serologic Response to 2 Doses. *JAMA* **2021**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Werbel, W.A.; Boyarsky, B.J.; Ou, M.T.; Massie, A.B.; Tobian, A.A.R.; Garonzik-Wang, J.M.; Segev, D.L. Safety and Immunogenicity of a Third Dose of SARS-CoV-2 Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients: A Case Series. *Ann. Intern. Med.* **2021**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Kamar, N.; Abravanel, F.; Marion, O.; Couat, C.; Izopet, J.; Del Bello, A. Three Doses of an mRNA Covid-19 Vaccine in Solid-Organ Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 661–662. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Kristiansen, P.A.; Page, M.; Bernasconi, V.; Mattiuzzo, G.; Dull, P.; Makar, K.; Plotkin, S.; Knezevic, I. WHO International Standard for Anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin. *Lancet* **2021**, *397*, 1347–1348. [\[CrossRef\]](#)
14. Ebinger, J.E.; Fert-Bober, J.; Printsev, I.; Wu, M.; Sun, N.; Figueiredo, J.C.; Eyk, J.E.V.; Braun, J.G.; Cheng, S.; Sobhani, K. Prior COVID-19 Infection and Antibody Response to Single Versus Double Dose mRNA SARS-CoV-2 Vaccination. *medRxiv* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
15. Narasimhan, M.; Mahimainathan, L.; Araj, E.; Clark, A.E.; Markantonis, J.; Green, A.; Xu, J.; SoRelle, J.A.; Alexis, C.; Fankhauser, K.; et al. Clinical Evaluation of the Abbott Alinity SARS-CoV-2 Spike-Specific Quantitative IgG and IgM Assays in Infected, Recovered, and Vaccinated Groups. *medRxiv* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
16. Prendecki, M.; Clarke, C.; Brown, J.; Cox, A.; Gleeson, S.; Guckian, M.; Randell, P.; Pria, A.D.; Lightstone, L.; Xu, X.-N.; et al. Effect of Previous SARS-CoV-2 Infection on Humoral and T-Cell Responses to Single-Dose BNT162b2 Vaccine. *Lancet* **2021**, *397*, 1178–1181. [\[CrossRef\]](#)
17. Gobbi, F.; Buonfrate, D.; Moro, L.; Rodari, P.; Piubelli, C.; Calder, S.; Riccetti, S.; Sinigaglia, A.; Barzon, L. Antibody Response to the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Subjects with Prior SARS-CoV-2 Infection. *Viruses* **2021**, *13*, 422. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Perkmann, T.; Perkmann-Nagele, N.; Koller, T.; Mucher, P.; Radakovics, A.; Marculescu, R.; Wolzt, M.; Wagner, O.F.; Binder, C.J.; Haslacher, H. Anti-Spike Protein Assays to Determine SARS-CoV-2 Antibody Levels: A Head-to-Head Comparison of Five Quantitative Assays. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Feng, S.; Phillips, D.J.; White, T.; Sayal, H.; Aley, P.K.; Bibi, S.; Dold, C.; Fuskova, M.; Gilbert, S.C.; Hirsch, I.; et al. Correlates of Protection against Symptomatic and Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection. *medRxiv* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
20. Danthu, C.; Hantz, S.; Dahlem, A.; Duval, M.; Ba, B.; Guibert, M.; El Ouafi, Z.; Ponsard, S.; Berrahal, I.; Achard, J.M.; et al. Humoral Response after SARS-Cov-2 mRNA Vaccine in a Cohort of Hemodialysis Patients and Kidney Transplant Recipients. *JASN* **2021**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69–V70, France, August to December 2020

Antonin Bal^{1,2,3}, Gregory Destras^{1,2,3}, Alexandre Gaymard^{1,2,3}, Karl Stefic⁴, Julien Marlet⁴, Sébastien Eymieux⁴, Hadrien Regue¹, Quentin Semanas¹, Constance d'Aubarede⁵, Geneviève Billaud¹, Frédéric Laurent^{6,7}, Claudia Gonzalez¹, Yahia Mekki¹, Martine Valette¹, Maude Bouscambert¹, Catherine Gaudy-Graffin⁴, Bruno Lina^{1,3}, Florence Morfin^{1,3}, Laurence Josset^{1,3}, the COVID-Diagnosis HCL Study Group^a

1. Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Laboratoire associé au Centre National de Référence des virus des infections respiratoires, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
2. These authors contributed equally to this article
3. CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Team VirPath, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France
4. U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France
5. Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHRU de Tours, France; INSERM U1259, Université de Tours, Tours, France
6. Occupational Health and Medicine Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
7. CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Team Pathogenesis of staphylococcal infections Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France
8. Laboratoire de Bactériologie, Institut des Agents Infectieux, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
9. The members of the COVID-Diagnosis HCL Study Group are listed below

Correspondence: Laurence Josset(laurence.josset@chu-lyon.fr)

Investigators:

COVID-Diagnosis HCL Study Group: Jean-Sébastien Casalegno, Emilie Frobert, Vanessa Escuret, Vinca Icard, Marion Jeannoel, Marie-Paule Milon, Christophe Ramière, Caroline Scholtès, Jean-Claude Tardy, Mary-Anne Traubad, Isabelle Schuffenecker

Citation style for this article:

Bal Antonin, Destras Gregory, Gaymard Alexandre, Stefic Karl, Marlet Julien, Eymieux Sébastien, Regue Hadrien, Semanas Quentin, d'Aubarede Constance, Billaud Geneviève, Laurent Frédéric, Gonzalez Claudia, Mekki Yahia, Valette Martine, Bouscambert Maude, Gaudy-Graffin Catherine, Lina Bruno, Morfin Florence, Josset Laurence, the COVID-Diagnosis HCL Study Group. Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69–V70, France, August to December 2020. Euro Surveill. 2021;26(3):pii=2100008. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.3.2100008>

Article submitted on 05 Jan 2021 / accepted on 21 Jan 2021 / published on 21 Jan 2021

We report the strategy leading to the first detection of variant of concern 202012/01 (VOC) in France (21 December 2020). First, the spike (S) deletion H69–V70 (ΔH69/ΔV70), identified in certain SARS-CoV-2 variants including VOC, is screened for. This deletion is associated with a S-gene target failure (SGTF) in the three-target RT-PCR assay (TaqPath kit). Subsequently, SGTF samples are whole genome sequenced. This approach revealed mutations co-occurring with ΔH69/ΔV70 including S:N501Y in the VOC.

Since September 2020 a severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) deletion H69–V70 (ΔH69/ΔV70) in the spike (S) protein has attracted increasing attention. This deletion was detected in the cluster-5 variant, identified both in minks and humans in Denmark. This cluster-5 variant carries a receptor binding domain (RBD) mutation Y453F and was associated with reduced susceptibility to neutralising antibodies of sera from recovered coronavirus disease (COVID-19) patients [1–3]. The ΔH69/ΔV70 has also co-occurred with either one of two other noteworthy RBD mutations [4]: N439K that is currently spreading in Europe and might also be related to reduced susceptibility to SARS-CoV-2 antibodies [5] and N501Y that was

identified for example in the SARS-CoV-2 variant of concern (VOC) 202012/01 recently detected in England [6]. Although the impact of ΔH69/ΔV70 on SARS-CoV-2 pathogenesis is not clear, enhanced surveillance is urgently needed.

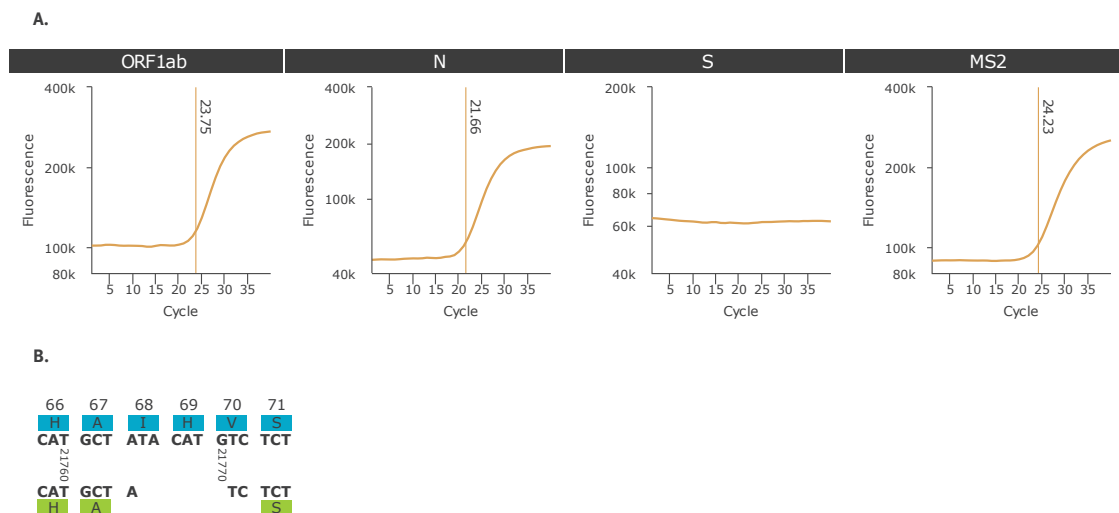
Herein we report the two-step strategy that enabled the timely detection of VOC 202012/01 in France, as well as other variants carrying ΔH69/ΔV70.

ΔH69/ΔV70 associated with S-gene target failure of a three-target RT-PCR assay

As part of routine SARS-CoV-2 genomic surveillance performed at the national reference centre (NRC) for respiratory viruses (Lyon, France) [7], a 6-nt deletion (21765–21770) within the S gene was identified in two nasopharyngeal samples collected in Lyon, France on 1 and 7 September 2020, respectively. The SARS-CoV-2 infection diagnosis had been performed on 2 and 8 September 2020, respectively with the Applied Biosystems TaqPath RT-PCR COVID-19 kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States (US)) that includes the open reading frame (ORF) 1ab, S, and nucleocapsid (N) gene targets. For these two samples, a S-gene target failure (SGTF) was observed while

FIGURE 1

(A) Amplification curves^a obtained with TaqPath COVID-19 RT-PCR kit for samples harbouring SARS-CoV-2 with nt deletion 21765–21770 in the spike gene and (B) pairwise sequence alignment from nt position 21758 to 21775 of a reference spike gene and a spike gene with the 21765–21770 deletion



Cq: cycle quantification cycle; MS2: MS2 bacteriophage internal positive control; N: nucleocapsid gene target; ORF1ab: open reading frame 1ab gene target; S: spike gene (S gene) target; SARS-CoV-2: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

^a The amplification profiles for the three targets (ORF1ab, N, S panels) included in the RT-PCR kit are shown for a SARS-CoV-2 positive sample harbouring the S-gene deletion 21765–21770. The amplification curve of the internal control is also represented (MS2 panel). For each plot, the vertical straight orange line indicates the determination of the Cq, whose value is indicated by a number next to the line.

^b Alignment using CoV-GLUE resource [8]. The sequence within the S gene, which lacks nts (i.e. 21765–21770 deletion) is in the lower part of the alignment and the reference sequence (Wuhan-Hu-1) is in the upper part. nt positions in each sequence are indicated by the vertical numbers. Amino acids encoded by the nt sequence containing the deletion are in green boxes, while those encoded by the nt reference sequence are in blue boxes. Amino acid numbering is above the blue boxes. The 21765–21770 deletion in the S gene results in deletion of amino-acid residues 69 and 70 in the S protein; on each side of the 21765–21770 deletion in the nt sequence, the remaining ATC (21764–21771–21772) encodes an isoleucine amino acid (I).

ORF1ab and N targets was correctly amplified with quantification cycle (Cq) values < 25 (Figure 1A).

The two samples were subjected to whole genome sequencing (WGS) and the sequences were deposited in the GISAID Initiative's EpiCoV database on 15 October 2020 (GISAID accession numbers: EPI_ISL_582112, EPI_ISL_582120). The mean coverage was 6903× and 6898×, respectively and the S deletion 21765–21770 was present in 100% of the reads. Using CoV-GLUE online resource [8], we found that the S deletion 21765–21770 led to the removal of two amino acids (ΔH69/ΔV70) in the N-terminal domain of the S1 subunit of the S protein (Figure 1B). The WGS method used was the amplicon-based ARTIC v3 protocol (<https://artic.network/ncov-2019>) combined with Nextera DNA Flex library and sequencing on NextSeq 500 platform (Illumina, San Diego, US). To confirm the deletion, one sample was also sequenced with an untargeted metagenomic protocol that yielded the same sequence. Of note, this metagenomic approach could not be applied for the second sample due to low viral load [9].

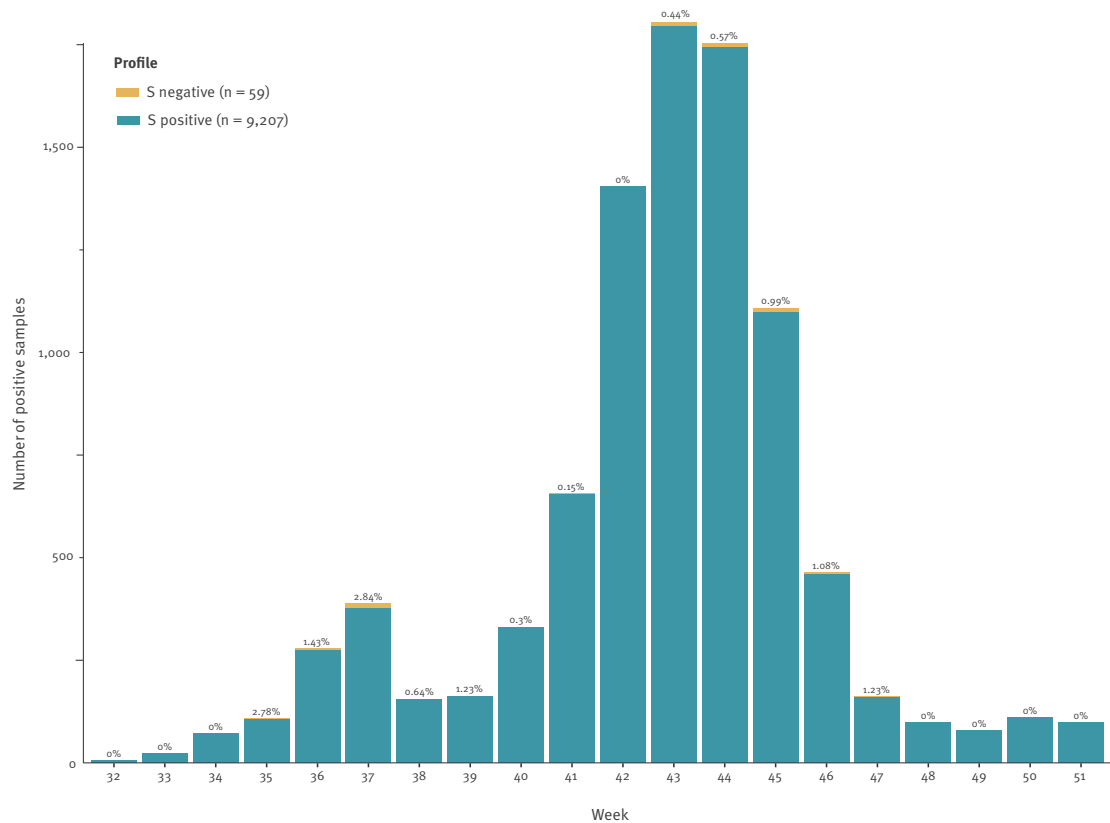
Although the coordinates of the primer/probe binding regions were not available for the TaqPath kit, the manufacturer confirmed that the S deletion H69–V70 was in the area targeted by the test.

ΔH69/ΔV70 screening with RT-PCR followed by whole genome sequencing

We then performed a retrospective analysis of the TaqPath kit results obtained at a community-based testing platform hosted by the virology laboratory of Lyon university hospital, from 3 August to 20 December 2020. We selected only the samples with a Cq value < 25 for the N target, the most sensitive target of the test. Of note, a Cq value of 25 with the TaqPath kit corresponds to a cycle threshold (Ct) value of 30 with the real time RT-PCR IP4 (Institut Pasteur assay, Paris, France) [10]. By doing so, we found that 59 of 9,266 (0.6%) positive tests had no amplification of the S gene. No significant increase of the SGTF was noticed over time; the proportion ranging from 0% (week numbers 32, 33, 34, 42, 48–51) to 2.84% (week number 37; Figure 2).

FIGURE 2

Prevalence of the S negative profile (negative for S target and positive for N and ORF1ab targets) with TaqPath COVID-19 RT-PCR kit, Lyon, France, 3 August (week 32)–20 December (week 51) 2020 (n = 9,266 samples tested)



N: nucleocapsid; ORF: open reading frame; S: spike.

Among the 59 samples with SGTF, 36 were available for WGS. These 36 samples were collected from 5 August to 11 November (18/36 were collected after 9 October). A total of 11 samples that presented an amplification of the S target were also sequenced. The sequencing results were fully concordant with the RT-PCR profiles (all of the samples with SGTF had the S deletion Δ H69/ Δ V70, while all of the S-gene positive samples did not contain Δ H69/ Δ V70). For samples with SGTF, other S mutations were detected and are summarised in the Table. For 21 of the 36 samples, the S mutations co-occurring with Δ H69/ Δ V70 were S477N and D614G; 10 of the 36 samples presented N439K and D614G mutations in addition to Δ H69/ Δ V70. Of note, the complete combination of S mutations in cluster-5 variant or in VOC 202012/01 was not found in any of the 36 samples.

The two-step strategy (i.e. screening with the TaqPath COVID-19 RT-PCR kit followed by WGS for SGTF samples) presented herein has been implemented in France since 20 December 2020. On 21 December, the virology

laboratory of university hospital of Tours reported a SGTF on a nasopharyngeal sample from a patient with a recent travel history from England (London). The sample was sent to the NRC for WGS and the detection of VOC 202012/01 (lineage B.1.1.7) was confirmed on 25 December, corresponding to the first detection of this variant in France (GISAID accession number: EPI_ISL_735391).

Ethical statement

Samples used in this study were collected as part of an approved ongoing surveillance conducted by the NRC for respiratory viruses in Lyon, France (World Health Organization reference laboratory providing confirmatory testing for COVID-19). The investigations were carried out in accordance with the General Data Protection Regulation (Regulation (EU) 2016/679 and Directive 95/46/EC) and the French data protection law (Law 78–17 on 06/01/1978 and Décret 2019–536 on 29/05/2019). No additional samples for the purpose of this study were collected. Patients were informed of

TABLE

Spike mutations co-occurring with $\Delta H69/\Delta V70$ in samples with S negative profiles (negative for S target and positive for N and ORF1ab targets) obtained with the RT-PCR TaqPath kit, Lyon, France, 5 August–11 November 2020 (n = 36 samples)

Spike mutation co-occurring with $\Delta H69/\Delta V70$ spike deletion	Number of sequences
S477N + D614G	21
N439K + D614G	10
H146Y + D614G	1
D80Y + N439K + D614G	1
$\Delta I670/\Delta 671/\Delta 672/\Delta 673$ deletion + S477N + D614G	1
D614G	1
V401L + S477N + D614G	1

N: nucleocapsid; ORF: open reading frame; S: spike.

the research and their non-objection approval was confirmed. This study was presented by the ethics committee of the Hospices Civils de Lyon (HCL), Lyon, France and registered on the HCL database of RIPHN studies (AGORA N°41).

Discussion and conclusion

According to CoV-GLUE resource [8] (update from GISAID: 14 December 2020), the S deletion 21765–21770 has been identified in 4,632 sequences worldwide (99% in Europe). Interestingly, only 16 sequences containing this deletion were sampled between 15 March and 23 July corresponding to the first wave of COVID-19 pandemic in Europe. Herein, using data obtained with TaqPath RT-PCR kit, we found an overall prevalence of 0.6%, suggesting a limited circulation of variants presenting $\Delta H69/\Delta V70$ during the second wave of the pandemic in Lyon, France. Of note, at the time of the study no travel restriction measures were implemented in France. The two-step strategy presented herein enabled to identify SARS-CoV-2 variants carrying $\Delta H69/\Delta V70$ and RBD mutations. More importantly, this strategy allowed the first detection of the VOC 202012/01 in France.

It should be underlined that N439K, Y453F or N501Y RBD mutations that can co-occur with $\Delta H69/\Delta V70$ might be associated with an increased affinity to angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) or reduced sensitivity to SARS-CoV-2 antibodies [3,5,11–13]. The N501Y mutation of the VOC 202012/01, in particular, might be also responsible of the higher transmissibility reported for this lineage [14].

It has been hypothesised that $\Delta H69/\Delta V70$ might compensate some RBD mutations and might be involved in the transmissibility of the variants containing these mutations [4,6]. In addition, it has been recently shown that the combined $\Delta H69/\Delta V70$ and D796H mutant was less sensitive to neutralising antibodies [15]. As the N-terminal domain of the S1 subunit of the S protein may interact with lung receptors [16] and might be a

target of neutralising antibodies [17,18], further studies are needed to understand the consequences of $\Delta H69/\Delta V70$ on SARS-CoV-2 transmissibility and host-immune response.

The present study has several limitations. First we selected only samples with a Cq value <25 for the N gene that corresponds to the limit of sensitivity of the WGS method used. The detection of VOC 202012/01 could therefore be underestimated, but not the prevalence. In addition, this strategy cannot identify other variants of concern that do not carry $\Delta H69/\Delta V70$ as the variant 501Y.V2 first detected in South Africa [19]. However, it allows rapid retrospective and prospective evaluation of the prevalence of VOC 202012/01, including in countries with limited sequencing capacity.

Importantly, the TaqPath kit did not lead to false negative conclusions regarding the SARS-CoV-2 diagnosis as the two other targets remained positive. The data presented herein emphasise that the TaqPath RT-PCR assay is a useful and cost-effective tool enabling a rapid, large-scale screening of SARS-CoV-2 variants with $\Delta H69/\Delta V70$. In the meantime, a similar approach has been adopted in the United Kingdom where the frequency of SGTF is used as a proxy for estimating and monitoring the spread of the VOC 202012/01 [14,20]. Samples with SGTF should be further addressed to national referral laboratories for SARS-CoV-2 WGS in order to confirm the presence of VOC 202012/01. This two-step strategy can contribute to the timely detection and isolation of VOC 202012/01 cases and has been reinforced in France as national diagnostic platforms have mainly implemented the TaqPath RT-PCR kit.

Acknowledgements

We would like to thank all microbiologist, clinicians, laboratory technicians who contributed to this investigation. We thank the authors, the originating and submitting laboratories for their sequence and metadata shared through GISAID on which this research is based. We gratefully acknowledge all the members and authors of CoV-GLUE, Nextstrain.org, and Virological.org for sharing their analysis in real-time. We thank Philip Robinson (DRCL, Hospices Civils de Lyon) for his help in manuscript preparation.

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

AB, GD, AG, LJ, FM, GB, MB, FL, CG, BL, YM, MV conceived and conducted the study. QS performed the sample preparations and sequencing. HR performed bioinformatic analysis. CA, KS, JM, SE, CGG, are the guarantor for sample collection. AB was the main writer of the manuscript. The COVID-Diagnosis HCL Study Group is involved in the routine diagnosis of SARS-CoV-2 infection at the university hospital of Lyon, France.

References

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). ECDC to assess risk associated with spread of SARS-CoV-2 in mink farms. Stockholm: ECDC; 2020. [Accessed 8 Nov 2020]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-assess-risk-associated-spread-sars-cov-2-mink-farms>
- World Health Organization (WHO). SARS-CoV-2 mink-associated variant strain – Denmark. Geneva: WHO. [Accessed 25 Nov 2020]. Available from: <http://www.who.int/csr/don/06-november-2020-mink-associated-sars-cov-2-denmark/en/>
- Lassaunière R, Fonager J, Rasmussen M, Frische A, Polacek Strandh C, Bruun Rasmussen T, et al. Working paper on SARS-CoV-2 spike mutations arising in Danish mink, their spread to humans and neutralization data. Copenhagen: Statens Serum Institut. Available from: https://files.ssi.dk/Mink-cluster-5-short-report_AFO2
- Kemp SA, Datir RP, Collier DA, Ferreira I, Carabelli A, Harvey W, et al. Recurrent emergence and transmission of a SARS-CoV-2 Spike deletion $\Delta H69/\Delta V70$. *bioRxiv*. 2020:2020.12.14.422555; (Preprint). <https://doi.org/10.1101/2020.12.14.422555>
- Thomson EC, Rosen LE, Shepherd JG, Spreafico R, Filipe A da S, Wojcechowskyj JA, et al. The circulating SARS-CoV-2 spike variant N439K maintains fitness while evading antibody-mediated immunity. *bioRxiv*. 2020:2020.11.04.355842. (Preprint). <https://doi.org/10.1101/2020.11.04.355842>
- Andrew Rambaut, Nick Loman, Oliver Pybus, Wendy Barclay, Jeff Barrett, Alessandro Carabelli, Tom Connor, Tom Peacock, David L Robertson, Erik Volz, on behalf of COVID-19 Genomics Consortium UK (CoG-UK). Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. *Virological.org*. [Accessed 21 Dec 2020]. Available from: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563/1>
- Bal A, Destras G, Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Valette M, Escuret V, et al. Molecular characterization of SARS-CoV-2 in the first COVID-19 cluster in France reveals an amino acid deletion in nsp2 (Δ 268del). *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(7):960-2. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.03.020> PMID: 32234449
- Singer J, Gifford R, Cotten M, Robertson D. CoV-GLUE: A Web Application for Tracking SARS-CoV-2 Genomic Variation. 2020. doi: <https://doi.org/10.20944/preprints202006.0225.v1>
- Charre C, Ginevra C, Sabatier M, Regue H, Destras G, Brun S, et al. Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. *Virus Evol*. 2020;6(2):veaa075. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa075> PMID: 33318859
- World Health Organization (WHO). Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols. Geneva: WHO; 24 January 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols>
- Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, DaSilva J, Poston D, Lorenzi JC, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *eLife*. 2020;9:e61312. <https://doi.org/10.7554/eLife.61312> PMID: 33112236
- Baum A, Fulton BO, Wloga E, Copin R, Pascal KE, Russo V, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*. 2020;369(6506):1014-8. <https://doi.org/10.1126/science.abd0831> PMID: 32540904
- Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Dingens AS, et al. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell*. 2020;182(5):1295-1310.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012> PMID: 32841599
- Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. *medRxiv*. 2020:2020.12.30.20249034. (Preprint). <https://doi.org/10.1101/2020.12.30.20249034>
- Kemp SA, Collier DA, Datir R, Gayed S, Jahun A, Hosmillo M, et al. Neutralising antibodies drive Spike mediated SARS-CoV-2 adaptation. *medRxiv*. 2020:2020.12.05.20241927. (Preprint). <https://doi.org/10.1101/2020.12.05.20241927>
- Soh WT, Liu Y, Nakayama EE, Ono C, Torii S, Nakagami H, et al. The N-terminal domain of spike glycoprotein mediates SARS-CoV-2 infection by associating with L-SIGN and DC-SIGN. *bioRxiv*. 2020:2020.11.05.369264. (Preprint). doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.05.369264>
- Chi X, Yan R, Zhang J, Zhang G, Zhang Y, Hao M, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*. 2020;369(6504):650-5. <https://doi.org/10.1126/science.abc6952> PMID: 32571838
- McCarthy KR, Rennick LJ, Nambulli S, Robinson-McCarthy LR, Bain WG, Haidar G, et al. Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. *bioRxiv*. 2020:2020.11.19.389916. (Preprint). <https://doi.org/10.1101/2020.11.19.389916>
- Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *medRxiv*. 2020:2020.12.21.20248640. (Preprint). <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.20248640>
- Public Health England (PHE). Investigation of novel SARS-CoV-2 variant. Variant of Concern 202012/01. London: PHE. Available from: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/947048/Technical_Briefing_VOC_SH_NJL2_SH2.pdf

License, supplementary material and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence and indicate if changes were made.

Any supplementary material referenced in the article can be found in the online version.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2021.



OPEN ACCESS

Edited by:

Stephen Allen Morse,
Centers for Disease Control and
Prevention (CDC), United States

Reviewed by:

Pedro Xavier-Elas,
Federal University of Rio de
Janeiro, Brazil
Segaran P. Pillai,
United States Department of
Homeland Security, United States

*Correspondence:

Louis Bernard
l.bernard@chu-tours.fr
Nathalie Heuzé-Vourc'h
nathalie.vourc'h@med.univ-tours.fr

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases - Surveillance,
Prevention and Treatment,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 16 July 2020

Accepted: 03 September 2020

Published: 20 October 2020

Citation:

Bernard L, Desoubreux G,
Bodier-Montagutelli E, Pardessus J,
Brea D, Allimonier L, Eymieux S,
Raynal P-I, Vasseur V, Vecellio L,
Mathé L, Guillon A, Lanotte P,
Pourchez J, Verhoeven PO, Esnouf S,
Ferry M, Etteradossi N, Blanchard Y,
Brown P, Roingeard P, Alcaraz J-P,
Cinquin P, Si-Tahar M and
Heuzé-Vourc'h N (2020) Controlled
Heat and Humidity-Based Treatment
for the Reuse of Personal Protective
Equipment: A Pragmatic
Proof-of-Concept to Address the
Mass Shortage of Surgical Masks and
N95/FFP2 Respirators and to Prevent
the SARS-CoV2 Transmission.
Front. Med. 7:584036.
doi: 10.3389/fmed.2020.584036

Controlled Heat and Humidity-Based Treatment for the Reuse of Personal Protective Equipment: A Pragmatic Proof-of-Concept to Address the Mass Shortage of Surgical Masks and N95/FFP2 Respirators and to Prevent the SARS-CoV2 Transmission

Louis Bernard^{1,2*†}, Guillaume Desoubreux^{2,3,4†}, Elsa Bodier-Montagutelli^{2,4,5†},
Jeffrey Pardessus^{2,4}, Deborah Brea^{2,4}, Laurine Allimonier^{2,4}, Sébastien Eymieux^{2,6,7},
Pierre-Ivan Raynal^{2,6}, Virginie Vasseur^{2,4}, Laurent Vecellio^{2,4}, Ludovic Mathé⁸,
Antoine Guillon^{2,4,9}, Philippe Lanotte^{2,10,11}, Jérémie Pourchez¹², Paul O. Verhoeven^{13,14},
Stéphane Esnouf¹⁵, Muriel Ferry¹⁵, Nicolas Etteradossi¹⁶, Yannick Blanchard¹⁶,
Paul Brown¹⁶, Philippe Roingeard^{2,6,7}, Jean-Pierre Alcaraz¹⁷, Philippe Cinquin^{17,18},
Mustapha Si-Tahar^{2,4†} and Nathalie Heuzé-Vourc'h^{2,4*†}

¹ Médecine interne et maladies infectieuses, CHU de Tours, Tours, France, ² Université de Tours, Tours, France, ³ Parasitologie-mycologie-médecine tropicale, CHU de Tours, Tours, France, ⁴ Inserm U1100, Centre d'étude des pathologies respiratoires (CEPR), Tours, France, ⁵ Pharmacie à usage intérieur, CHU de Tours, Tours, France, ⁶ Biologie cellulaire-Microscopie électronique, CHU de Tours, Tours, France, ⁷ UMR Inserm U1259-Morphogénèse et antigénicité du VIH et des virus des hépatites, Tours, France, ⁸ Blanchisserie centrale GCS NOT, CHU de Tours, Tours, France, ⁹ Médecine intensive-Réanimation, CHU de Tours et Université de Tours, Tours, France, ¹⁰ Bactériologie-Virologie-Hygiène hospitalière, CHU de Tours, Tours, France, ¹¹ ISP Equipe 5-Bactéries et Risque Materno-fostale, INRAE, Nouzilly, France, ¹² Mines Saint-Etienne, Université Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, Saint-Etienne, France, ¹³ GIMAP, EA 3064, Université Jean Monnet, Université de Lyon, Saint-Etienne, France, ¹⁴ Service des Agents Infectieux et d'Hygiène, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France, ¹⁵ Service d'Étude du Comportement des Radionucléides (SECR), CEA, Université Paris Saclay, Gif-sur-Yvette, France, ¹⁶ French Agency for Food Environmental and Occupational Health Safety (Anses), Ploufragan, France, ¹⁷ TIMC-IMAG, UMR5525 Univ. Grenoble Alpes-CNRS, La Tronche, France, ¹⁸ CIC-IT1406 INSERM/CHU Grenoble Alpes/Univ. Grenoble Alpes, La Tronche, France

Background: The coronavirus infectious disease-2019 (COVID-19) pandemic has led to an unprecedented shortage of healthcare resources, primarily personal protective equipment like surgical masks, and N95/filtering face piece type 2 (FFP2) respirators.

Objective: Reuse of surgical masks and N95/FFP2 respirators may circumvent the supply chain constraints and thus overcome mass shortage. Methods, design, setting, and measurement: Herein, we tested the effects of dry- and moist-air controlled heating treatment on structure and chemical integrity, decontamination yield, and filtration performance of surgical masks and FFP2 respirators.

Results: We found that treatment in a climate chamber at 70°C during 1 h with 75% humidity rate was adequate for enabling substantial decontamination of both respiratory

viruses, oropharyngeal bacteria, and model animal coronaviruses, while maintaining a satisfying filtering capacity.

Limitations: Further studies are now required to confirm the feasibility of the whole process during routine practice.

Conclusion: Our findings provide compelling evidence for the recycling of pre-used surgical masks and N95/FFP2 respirators in case of imminent mass shortfall.

Keywords: SARS-CoV-2, facemask, recyclability, surgical face masks, COVID-19, heating, FFP2/N95, coronavirus

HIGHLIGHTS

- A worldwide mass shortage of surgical masks and N95/FFP2 respirators has been observed during the coronavirus infectious disease-2019 (COVID-19) pandemic;
- Alternative means for recycling pre-used face masks are warranted in such a context of sanitary crisis;
- A moist heating treatment results in a satisfactory decontamination of critical respiratory pathogens while preserving the structural integrity and filtration efficiency of protective masks.

INTRODUCTION

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (also referred to as SARS-CoV-2) is responsible for the coronavirus infectious disease-2019 (COVID-19) pandemic. SARS-CoV-2 remains viable over several hours on different inert surfaces and up to 3 h in the air (1). During previous other epidemics, the airborne route of transmission was already associated with nosocomial super-spreading events (2). Although not fully elucidated so far, transmission of SARS-CoV-2 may occur partly by aerosol droplets and contaminated postillions of aerodynamic diameter ranging from 0.25 to 3.0 μm (3). Accordingly, any face-to-face contact closer than ≤ 6 feet to a symptomatic patient should be considered significant exposure, if sustained for at least a few minutes (4).

In order to reduce the risk of interindividual contamination (5), most governments, medical societies, and health associations agreed to recommend to healthcare workers and caregivers systematic wearing of protective face masks, like surgical masks and N95/filtering face piece (FFP) respirators to cover the mouth and nose during the COVID-19 pandemic (to be complemented by meticulous hand hygiene, eye protection, gloves, and gown wearing). Approved protective masks are composed of several layers of nanofibers made with polypropylene (6). Surgical masks are primarily designed to prevent transmission of pathogens from infected patients wearing them to others and from contaminating their surroundings and direct environment (5). Additionally, FFP respirators protect noninfected healthy people wearing them from inhalation of aerosol particles. According to European standards, FFPs are sorted in three distinct subclasses depending on their aerosol filtration efficiency and leakage percentages. During the COVID-19 pandemic, caregivers are encouraged

to wear at least FFP2-grade respirators (specifications close to N95 respirators in the USA), coming in contact with patients infected with SARS-CoV-2 or suspected of being so. Both surgical masks and N95/FFP2 respirators are single-use disposable devices, and most industrial manufacturers are currently overwhelmed by massive orders. Thus, several countries and health facilities are now suffering from in- and out-hospital mass shortage of protective surgical masks and N95/FFP2 respirators.

Therefore, in the present context of world sanitary emergency, alternative processes allowing to extend the existing on-hand supplies are critically required to offer satisfying respiratory protective means for all healthcare workers (7). Production of fabric masks (e.g., with non-cellulose synthetic fibers based on nonwoven polypropylene [Spunbond, Meltblown, Spunbond (SMS)]) (5) or application of different decontamination means to pre-used protective masks has been urgently assessed. Many strategies are unsatisfactory (8, 9), insufficiently documented, or leading to poor decontamination yields and loss of filtration performances. Moreover, both the practical transposition of all these treatment procedures to each hospital service, attendant care, and nursing department and the wearers' comfort have often been neglected. Thanks to an incredible international multidisciplinary effort, promising disinfecting processes are emerging and some are already in application in "real-life conditions."

Herein, we demonstrate the benefits of an easy-to-use recycling solution that will reduce the overall burden on mass shortage in healthcare facilities using a heating stage at 70°C, a temperature known to inactivate the SARS-CoV-2 (10). Hence, we provide a simple procedure that efficiently decontaminates surgical masks and FFP2 respirators from respiratory pathogens while preserving filtration performances.

MATERIALS AND METHODS

Protective Masks

All assays on oropharyngeal bacteria, influenza virus, and filtration performances were carried out using conventional elastic surgical masks (different brands including THF type II R 3 Plis®, CA Diffusion, Halluin, France) and FFP type 2 (FFP2) respirators (RP2_M®, CA Diffusion). Inactivation assays on surrogate animal coronaviruses were performed using surgical (THF type IIR CA1960®, CA Diffusion) and FFP2 (FFP2 NRD type IIR 2192S-WH®, Medicom, Saint Barthélémy d'Anjou,

France). All were certified by EN 149:2001+A1:2009 NF or EN 14683+AC standards.

Model Strains of Oropharyngeal Bacteria

Streptococcus pyogenes (isolate 19-103100), *Staphylococcus aureus* (strains ATCC 29213 and ATCC 6538), and *Haemophilus influenzae* strains (isolate CIP776) were grown in heart-brain liquid medium (BD Brain Heart infusion broth®), Beckton Dickinson, Rungis, France) or in Muller–Hinton® agar (bioMérieux, Craponne, France).

For titration, bacteria were diluted 10-fold up to 1:10,000, and 50 µl of each dilution were then deposited onto agar plates, trypticase soy agar TSH® (bioMérieux) for *S. aureus* and *S. pyogenes* or onto Chocolate agar PolyViteX® agar (bioMérieux) for *H. influenzae*, before incubation at 37°C and subsequent counting of the number of colony-forming units (CFU/ml).

Model Strains of Respiratory Viruses

The influenza A H3N2/Scotland/20/74 strain was prepared as previously described (11) and cultured onto canine kidney epithelial mycoplasma-free Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (ATCC CCL-34) with minimum essential medium-Eagle (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin.

Two animal coronaviruses were used as surrogates for SARS-CoV-2. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain CV777 (12) was grown on Vero cells (ATCC® CCL-81) in MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 0.3% tryptone phosphate broth, 0.02% yeast extract (12) (adjuvants to culture media cells), 1% penicillin/streptomycin, and 10 µg/ml trypsin (13). Infectious bronchitis virus of chicken (IBV) strain Mass 41 (14) was propagated on primary cultures of kidney cells prepared from specific pathogen-free chicken embryos of 19 days of age (14), maintained in BHK-21 medium (Gibco, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 0.15% tryptone phosphate broth, 1% penicillin/streptomycin, 1.5% of FBS, and the pH was adjusted to 7.2 with NaHCO₃ (15). Suspensions of IBV and PEDV were prepared in culture medium containing 20% FBS before inoculation onto masks.

Influenza virus titration was performed using the plaque-forming unit (PFU) method adapted from Matrosovich et al. (16). Briefly, six-well cell culture plates were seeded at 1.0×10^6 MDCK cells/well. One day later, cells were washed with MEM buffer and infected at 37°C with 400 µl of serial dilutions of the sample. Plates were gently shaken every 10 min for 1 h. Then, each well was covered with 3 ml of a mixture of MEM buffer, 1.2% Avicel® (Dupont, Copenhagen, Denmark), 1% penicillin/streptomycin, and 1 µg/ml of TPCK-Trypsin® (Thermo Fisher Scientific). Plates were further incubated at 37°C for 72 h. After two washings in PBS buffer, cell layers were stained with a solution containing 10% crystal violet oxalate, 10% formaldehyde, and 20% ethanol, and plaques were counted. Viral titers were finally expressed as PFU/ml. Animal PEDV and IBV coronaviruses were titrated according to Reed and Muench (17), and virus titers were expressed as TCID₅₀/ml (50% tissue culture infective dose per milliliter), as calculated based on immunoperoxidase monolayer assay on Vero cells (PEDV) or

immunofluorescent assay on primary chicken kidney cells (IBV) (18), using pathogen-specific pig and chicken anti-sera.

Dry- and Moist-Air Heating Treatment Procedures

The surgical masks and FFP2 respirators were inserted into ISO11607-certified sterilization bags (NF EN 868-5, Amcor, Zürich, Switzerland) and submitted to different heat treatments based on either single usual runs (70°C–15 min, 70°C–60 min, 90°C–3 h, 100°C for 60 min, or 120°C–10 min) in the tumble-drying machine (Kannegiesser®, Nanterre, France) with rotation but without detergent or single transit [70°C–1 h no humidity or 70°C–1 h with 75% humidity rate (HR)] in an HPP260® constant climate chamber (Memmert GmbH, Schwabach, Germany). For the coronavirus experiments, the experimentally contaminated protective masks were inserted into a Binder KBF115® climate chamber (Binder GmbH, Tuttingen, Germany) and submitted to a single heat treatment of 70°C–1 h-with 75% HR.

Assessment of the Structural and Chemical Integrity

After the heating treatment, surgical masks and FFP2 respirators underwent successive evaluations that were carried out as GO/NO GO steps in order to ensure the preservation of their integrity and their function (Supplementary Figure 1). For GO/NO GO Step 1, unused surgical masks, and FFP2 respirators were thoroughly observed for obvious changes in physical appearance (color, shape, and size), and their ultrastructure was compared to untreated masks using scanning electron microscopy [(SEM) Ultra Plus® FEG, Zeiss, Oberkochen, Germany]. For such a purpose, mask layers were first coated with 40-Å platinum using a PECS 682® apparatus (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

At the molecular level, modifications of the treated (unused) surgical masks and FFP2 respirators were evaluated by Fourier-transform infrared spectroscopy equipped with single-reflection diamond attenuated total reflectance (ATR) accessory (i.e., Vertex 70v FT-IR® spectrometer, Bruker, Billerica, MA, USA) with a Golden Gate® (Specac, Orpington, United Kingdom): acquisition was recorded between 4,000 and 600 cm⁻¹, with a resolution of 4 cm⁻¹ and 64 scan repetitions. Volatile molecules trapped in the film were identified by thermal desorption (TD) through a TD 350® thermo-desorber (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) coupled to a GC-6890® gas chromatography (GC) associated with a MS5973N® mass spectrometer [(MS) Agilent, Les Ulis, France] under TD conditions at 140°C and under helium for 10 min (19). Only the treatment conditions that allowed correct preservation of the masks integrity were kept for further assessments described below.

Assessment of the Decontamination Yield

For GO/NO GO Step 2 (Supplementary Figure 1), 50 µl of each pathogen suspension were deposited onto a delimited area of protective surgical masks and FFP2 respirators on either the inner or the outer lining. Then, the masks were incubated at 37°C

for 1 h to dry the pathogen suspension and further submitted to dry-air or moist-air heating treatments, as described above. Control masks (with deposition of bacteria or virus suspension, but no heating treatment) were stored at 4–6°C for the same duration. Thereafter, all the afore-delimited areas were cut out, placed into 2-ml sterile water or culture medium (when loaded with either bacteria or viruses, respectively, in order to resuspend the residual pathogens), and then mixed. Next, the suspensions were diluted and analyzed as described above for titration. Since the relative extraction rates from the FFP2 respirator fibers were estimated at 22 and 15% for bacteria (*S. aureus*) and virus (influenza A H3N2/Scotland/20/74), respectively, the lower limit of detection (LLOD) was thus established at <100 CFU/ml for bacteria and <17 PFU/ml for influenza virus. The extraction rate was 0.06 and 10% for the IBV and PEDV (a 10-fold dilution was necessary to dilute the residual FBS, which interfered with viral isolation). The extraction rates (ratio between infectious titers of initial viral inoculum and virus eluted from masks) were 16.6 and 3% for the PEDV and IBV, respectively. The LLOD for the PEDV and IBV re-isolation procedures was determined by 10-fold serial dilutions and was $10^{1.5}$ TCID₅₀/ml for both viruses. The TCID₅₀ reduction after moist-air heating treatment was calculated to be at least the difference between the infectious titer of eluted virus and the LLOD. Only the treatment condition that allowed correct achievement of decontamination yield were kept for further assessments described below.

Assessment of the Bacterial Filtration

For GO/NO GO Step 3, the evaluation of the filtration efficacy of the surgical masks was performed following the EN 14683:2019 standard (20) (Supplementary Figure 1). Briefly, a specimen of the inside surgical mask material was clamped between a six-stage viable Andersen cascade impactor and an aerosol chamber (glass, 445 mm long and 60 mm in external diameter; Supplementary Figure 2, left panel). Aerosolization of $3.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$ droplets from a 3-ml suspension of *S. aureus* (ATCC 6538) was achieved by the E-Flow® mesh nebulizer (Pari GmbH, Starnberg, Germany) to maintain a bacterial challenge ($2,200 \pm 500$ CFU per test) during a 1-min nebulization. Each test specimen was conditioned at $21 \pm 5^\circ\text{C}$ and $85 \pm 5\%$ HR for the time required to bring them into equilibrium with atmosphere prior to testing. Finally, the filtration efficiency of the masks was expressed as a percentage of the CFU initially present in the challenge aerosol that passed through the material.

Assessment of the Viral Filtration

For the rest of GO/NO GO Step 3 (Supplementary Figure 1), aerosolization of a suspension at 3.5×10^7 PFU/ml influenza A H3N2/Scotland/20/74 virus strain was achieved by the Aerogen Solo® mesh nebulizer (Aerogen, Galway, Ireland) (21) and using the experimental setup described in Supplementary Figure 2 (right panel). The size of the droplets ($3.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$) was similar to the EN 14683:2019 standard that is dedicated to the assessment of medical devices for usage against respiratory pathogens. After nebulization, the virus was collected in a BioSampler® device (SKC, Eighty Four, PA, USA) filled with 5 ml of MEM buffer, and the percentage of viral particles passing through the masks was

determined by virus titration as aforementioned. Considering the experimental setting, the LLOD for filtration was estimated at 2.5 PFU/ml.

Measurement of the Inspiratory Resistance

For GO/NO GO Step 3 bis., an original mounting using a 4000 series® digital flow meter (TSI, Marseille, France) was exploited for measuring the inspiratory resistance of the surgical masks and FFP2 respirators before and after treatments (Supplementary Figure 3). Two pressure gauges (Magnehelic 2000-0®, Dwyer Instruments, Suresnes, France) continuously controlled the pressure differential between the flow meter and the pump. Different inspiratory flow rates were tested from 15 to 60 L/min. The difference in inspiratory resistance of heat-treated masks compared to control masks was expressed in Pascal (Pa) per square centimeter.

RESULTS

The global design of the study is summarized in Supplementary Figure 1. Following the runs in the tumble-drying machine, only the treatment condition at 70°C during 15 or 60 min allowed complete preservation of the global structure and the integrity of the surgical masks and FFP2 respirator nanofibers. In contrast, longer or hotter processes were deleterious for the quality, with slight or rough obvious destruction. After one 60-min cycle in the climate chamber at 70°C and 75% HR, no macro- or micro-alterations were observed (Figure 1A). Contrary to the autoclaving process, the surgical masks and FFP2 respirators were not wet in such a condition (GO/NO GO Step 1, positively checked). The same finding was observed after 3–5 iterative cycles of moist heating (data not shown). After moist-air heating treatment, there was no proof of (oxidization-based or chemical) alteration at the molecular level (Figure 1B) of any layer of the surgical masks and FFP2 respirators. This was also the case for the elastic rubber band (not shown). Besides, the mask layers were confirmed as composed of polypropylene only, except for the mid-layer of treated/untreated surgical masks and FFP2 respirators that also presented four additional bands centered at 3,300, 1,642, 1,564, and 723 cm^{-1} and 3,295, 1,640, 1,565, and 1,530 cm^{-1} , respectively, which probably correspond to a molecule of the amide family. TD-GC-MS chromatogram indicated that two new molecules were trapped in the treated FFP2 respirators (in comparison with untreated respirators): they actually corresponded to benzoic acid and an unidentified compound (Figure 1B). Nevertheless, their respective signal intensities were so weak that no one could conclude to significant modification of any of the four layers of the FFP2 respirators. The same comment applied to the elastic rubber bands (not shown). Altogether, only the treatment conditions with dry-air heating at 70°C for 15–60 min and moist-air heating at 70°C for 1 h were thus kept for further investigations (Supplementary Figure 1).

Decontamination assay showed the inability of dry-air heating (70°C, 15 or 60 min) to drastically reduce the number of bacteria and the virus titers (by 0 to $-1.0 \log_{10}$ only; data not shown). In

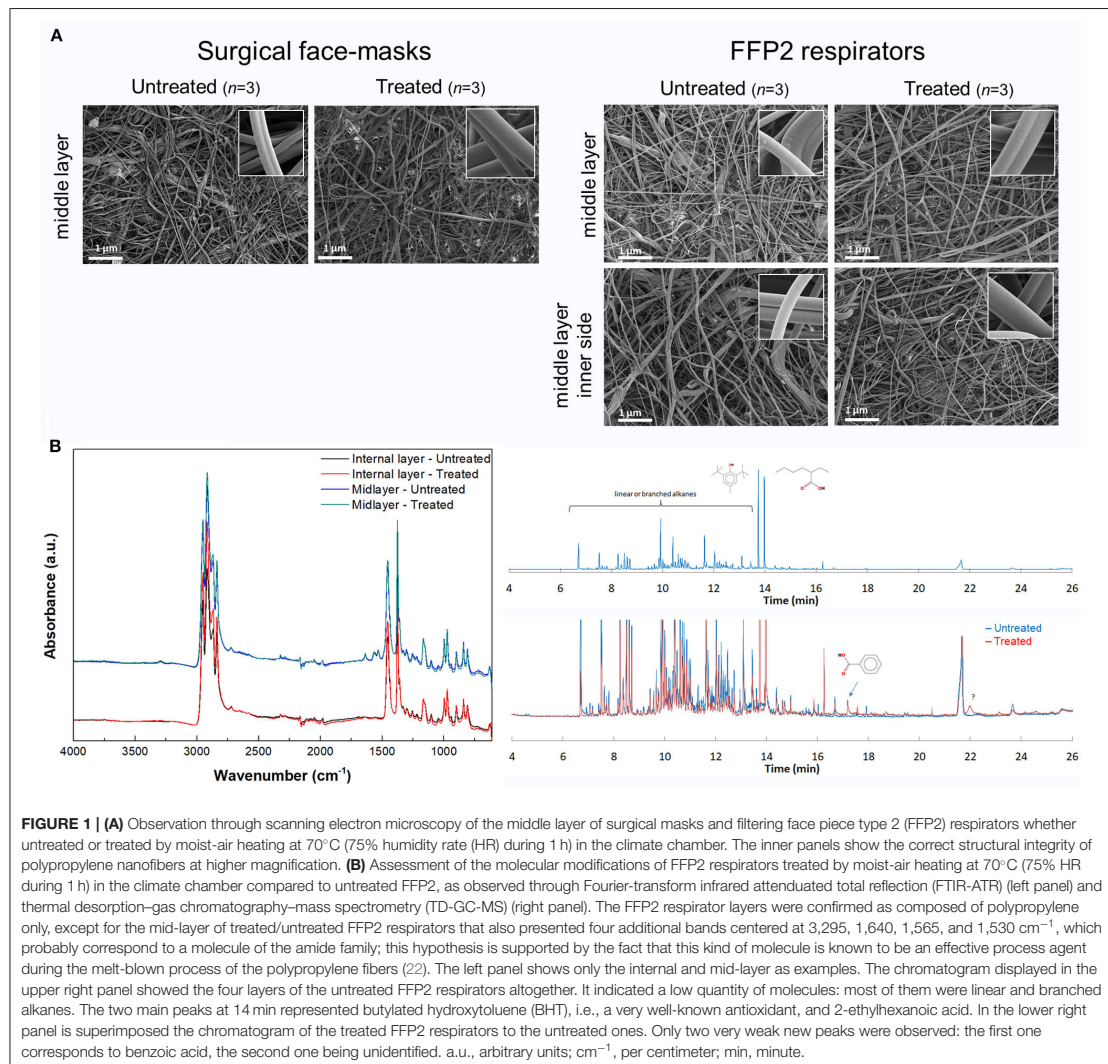
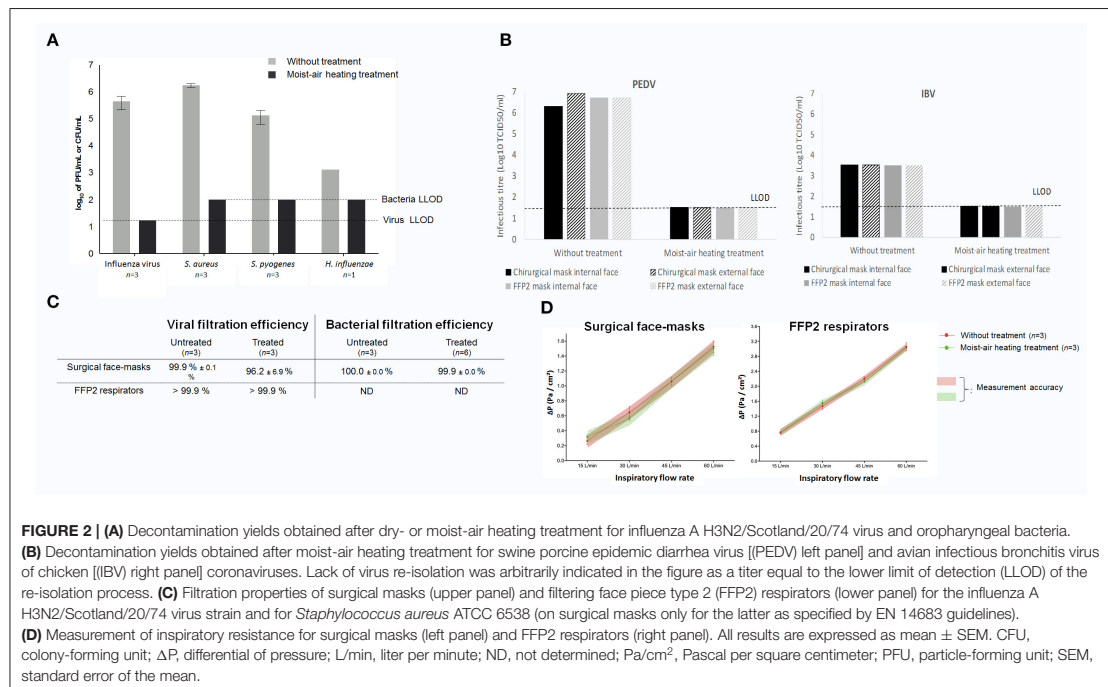


FIGURE 1 | (A) Observation through scanning electron microscopy of the middle layer of surgical masks and filtering face piece type 2 (FFP2) respirators whether untreated or treated by moist-air heating at 70°C (75% humidity rate (HR) during 1 h) in the climate chamber. The inner panels show the correct structural integrity of polypropylene nanofibers at higher magnification. **(B)** Assessment of the molecular modifications of FFP2 respirators treated by moist-air heating at 70°C (75% HR during 1 h) in the climate chamber compared to untreated FFP2, as observed through Fourier-transform infrared attenuated total reflection (FTIR-ATR) (left panel) and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry (TD-GC-MS) (right panel). The FFP2 respirator layers were confirmed as composed of polypropylene only, except for the mid-layer of treated/untreated FFP2 respirators that also presented four additional bands centered at 3,295, 1,640, 1,565, and 1,530 cm⁻¹, which probably correspond to a molecule of the amide family; this hypothesis is supported by the fact that this kind of molecule is known to be an effective process agent during the melt-blown process of the polypropylene fibers (22). The left panel shows only the internal and mid-layer as examples. The chromatogram displayed in the upper right panel showed the four layers of the untreated FFP2 respirators altogether. It indicated a low quantity of molecules: most of them were linear and branched alkanes. The two main peaks at 14 min represented butylated hydroxytoluene (BHT), i.e., a very well-known antioxidant, and 2-ethylhexanoic acid. In the lower right panel is superimposed the chromatogram of the treated FFP2 respirators to the untreated ones. Only two very weak new peaks were observed: the first one corresponds to benzoic acid, the second one being unidentified. a.u., arbitrary units; cm⁻¹, per centimeter; min, minute.

contrast, moist-air heating in climate chamber (70°C, 75% HR for 60 min) resulted in a remarkable decrease of oropharyngeal pathogens and influenza virus (GO/NO GO Step 2, positively checked): $-6.0 \log_{10}$ for *S. aureus*, $-5.0 \log_{10}$ for *S. pyogenes*, $-3.0 \log_{10}$ for *H. influenza*, and $-5.5 \log_{10}$ for the influenza A H3N2/Scotland/20/74 virus strain ($P < 0.05$) (Figure 2A), which corresponds to the maximum based on the limit of detection of each assay. The moist heating treatment also allowed inactivation of the two surrogate animal coronaviruses, as evidenced by TCID₅₀ reductions of at least $-5 \log_{10}$ and $-2 \log_{10}$ for PEDV or IBV, respectively, irrespective of the kind of protective masks and mask side (inside/outside linings) tested (Figure 2B). Therefore,

only the moist-air treatment condition (70°C for 60 min with 75% HR) was kept for further analyses.

After treatment in the climate chamber at 70°C during 60 min with 75% HR, the bacterial filtration efficiency of surgical masks for *S. aureus* was assessed at $100.0 \pm 0.0\%$ for the moist-heated treatment (vs. $99.9 \pm 0.0\%$ for untreated masks; right panel of Figure 2C, GO/NO GO Step 3, positively checked), following the EN 14683 standard. The viral filtration performances for the influenza virus were $96.2 \pm 6.9\%$ with the surgical masks and $>99.9\%$ with the FFP2 respirators (left panel of Figure 2C, GO/NO GO Step 3, positively checked). Noteworthy, filtration of fluorescein, using the same experimental setup, resulted



in 98.9 and 99.9% filtration for surgical masks ($n = 2$) and FFP2 respirators ($n = 2$), respectively (data not shown). The discrepancy between the virus and fluorescein filtration rate for surgical masks was due to the heterogeneous and low viability of the influenza A H3N2/Scotland/20/74 virus during nebulization/collection (data not shown).

Whatever the inspiratory flow, no difference were observed regarding the resistance parameters of control masks and treated ones for both surgical masks and FFP2 respirators (**Figure 2D**, GO/NO GO Step 3 bis., positively checked).

DISCUSSION

SARS-CoV-2 is a virus with an outer envelope, which means that it is theoretically very sensitive to conventional decontamination methods. Few years ago during the H1N1 influenza pandemic, the National Academy of Medicine (formerly known as Institute of Medicine, USA) already suggested that simple decontamination techniques [e.g., bleach, ethylene oxide, ultraviolet (UV) germicidal irradiation, hydrogen peroxide gas, microwave oven irradiation, etc. (8, 23)] should be deeply investigated in an effort to extend the service life of protective masks (24). Unfortunately, many processes showed that either the structural integrity or the filtration performance of such treated mask could be drastically altered following multiple exposure to aerosols, chemicals, and extreme temperature (25). Furthermore, inappropriate decontamination may be a

potential risk of infection since recycled surgical masks and N95/FFP2 respirators may become a reservoir for pathogens (26). For instance, UV treatment was found to destroy the outer polypropylene nanofibers. Likewise, dry heating $\geq 160^\circ\text{C}$, as well as 70% isopropyl alcohol spraying, caused significant filter degradation (8). Gamma irradiation with 20 kGy (2 Mrad) was demonstrated as sufficient for inactivating the viruses, but studies showed possible deformation of the masks, compromising the inner filtering layer of N95/FFP2 respirators and also the correct mask fitting on the face (9). However, in light of the current sanitary emergency, the Atlanta Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recently provided guidelines for “crisis alternate strategies,” including the use of improvised homemade or treated masks (27). Thanks to several national task forces, comprising both academic laboratories and private companies, evaluating the reuse of surgical masks and N95/FFP2 respirators, promising decontamination processes have emerged during the COVID-19 sanitary crisis. One of the most advanced is hydrogen peroxide vapor, already applied in a clinical setting in the USA, and showing decontamination and maintenance of post-decontamination performances on N95 respirators (28). Hopefully, wearers will not suffer discomfort due to residual hydrogen peroxide odor, as previously described (29).

Tumble-drying machines are cosmopolitan equipment, which is commonly used at home or in the hospital for laundry. They offer the possibility to heat at 70°C —a temperature

reported to *in vitro* inactivate the SARS-CoV-2 by decreasing its TCID₅₀ titer in Vero-E6 cells from 6.8 log₁₀ to undetectable level after 5 min of exposure—or higher temperatures (10). In the past, such hot-air drying processes already showed good decontamination performance for reducing the bacteria and virus burden (30, 31), but only at $\geq 92^{\circ}\text{C}$ (32). Unfortunately, in the present study, we evidenced that dry-air heating in the tumble machine failed to reach satisfying decontamination yields and even generated sometimes degradation of the material with exposure to moderate to extreme hot temperatures $> 70^{\circ}\text{C}$ and/or the mechanical frictions inside the machine. In contrast, and as suggested by preliminary studies (33, 34), we showed herein that a unique step of moist-air heating at 70°C during 1 h in climate chamber, with 75% HR, was efficient on relevant surrogate viruses of SARS-CoV-2. Overall, our findings showed that this treatment did not generate an alteration of the surgical masks and FFP2 respirators at the structural and molecular levels, while it ensured effective bacterial/viral decontamination and allowed conservation of their filtration efficiency and resistance performances. Interestingly, the masks were not wet after climate chamber decontamination (contrary to autoclaving), avoiding an additional drying step that may be deleterious.

To date, climate chambers are mostly reserved to hospital pharmacies or pharmaceutical companies. They enable traceable control of the temperatures, and they can provide 3–80% HR inside. One could easily imagine the feasibility of implementing and defining a logical circuit for recycling the protective surgical masks and N95/FFP2 respirators and then ensuring their return to their first user—a critical item to be considered to ensure acceptability of reuse.

Through the aforementioned method, one can say that we have totally fulfilled the conditions recommended by The Center for Infectious Disease Research and Policy of Minnesota University, which states that, in the case of a pandemic, an acceptable decontamination method must render the organism (or a closely related surrogate) nonviable and not diminish filter and fit performance, respirator integrity and structure, or comfort, odor, and wears. Moreover, the moist heating treatment has also been recently included in pandemic crisis standards of care decontamination recommendations by the Atlanta CDC based on previous studies showing efficient decontamination of closely related virus surrogates (H1N1 virus) (33). One limitation of our study lies in the fact that only one brand of FFP2 respirators has been tested for the preservation of its filtration properties through recycling treatment. Moreover, our experimental procedures deviated slightly from the standards NF EN 149+A1 (FFP2)/NF EN 14683+AC recommendations for assessing the filtrating performance and the inspiratory resistance of untreated and treated protective masks (35). Therefore, further investigations in line with the standard guidelines are required, in addition to ones using the actual SARS-CoV-2 instead of animal surrogate viruses. Another limitation lies in the approach of our demonstration that was carried out on the bench only: most surgical masks and FFP2 respirators tested herein had never been worn by nursing staff [noteworthy, a few pre-used masks were nonetheless moist heating treated and then tested; they exhibited

neither difference in the SEM morphology nor in resistance at inspiratory flow (data not shown)]. In practice, further assessment in real life seems necessary to specifically address the saturation of filters with saliva/expectoration. Moreover, an evaluation of the impact of multiple treatment cycles seems required. However, other previous assays showed sustainment of all the face mask properties at the sealing surface up to 10 iterative treatment cycles based on moist-air heating (36), and our preliminary data herein did not show any negative impact for three to five cycles on structural integrity, altogether supporting the rationale for our approach.

CONCLUSIONS

Major Finding

Overall, our findings may pave the way in healthcare facilities for the reutilization of decontaminated, intact protective masks. Our study supports this straightforward strategy to circumvent surgical masks and N95/FFP2 respirators mass shortage, especially during the current COVID-19 pandemic.

Perspectives

Should our recycling process be extended to other brands of surgical masks and N95/FFP2 respirators and thus be validated in the future by (inter-)national and sanitary authorities, mask decontamination could be recommended in hospital laundries and laboratories equipped with the adequate heat equipment.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have seen and approved the manuscript. They all contributed significantly to the work. LB, GD, LV, AG, PL, PR, MS-T, and NH-V conceived the ideas. EB-M, JPa, LA, DB, SEy, P-IR, VV, JPo, PV, LM, SEs, MF, NE, YB, LB, PB, PR, and NH-V collected the data. SEs, JPo, NE, NH-V, MS-T, GD, J-PA, and PC contributed to the organization of the tests. GD, LB, EB-M, MF, JPo, PR, MS-T, and NH-V led the writing. The manuscript has not been previously published nor being considered for publication elsewhere.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to all the staff for their technical/scientific contribution in the study: Véronique Dennion-Delattre for Tours University Hospital, Yoann Montigaud, Lara Leclerc, Coralie Laurent, and Gwendoline Sarry for Les Mines Saint-Etienne, Estelle Audoux and Amelie Prier for Saint-Etienne university, Béatrice Grasland, Lionel Bigault, Hélène Quenault, Evelyne Lemaître, and Chantal Allée for Anses, Floriane Carpentier for the CEA. The Anses team thanks Prof. J.L. Lanoisellé (Institut de Recherche Dupuy De

Lôme, Pontivy, France) for kindly allowing access to the Institute climatic chamber. The authors thank the REACTing consortium and the APAVE. This work is part of a French task force initiated by CNRS and CEA, involving several research organisms and industrial partners.

REFERENCES

- van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* (2020) 382:1564–7. doi: 10.1101/2020.03.09.20033217
- Chen Y-C, Huang L-M, Chan C-C, Su C-P, Chang S-C, Chang Y-Y, et al. SARS in hospital emergency room. *Emerg Infect Dis.* (2004) 10:782–8. doi: 10.3201/eid1005.030579
- Liu Y, Ning Z, Chen Y, Guo M, Liu Y, Gali NK, et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature.* (2020) 582:557–60. doi: 10.1101/2020.03.08.982637
- Klompas M, Morris CA, Sinclair J, Pearson M, Shenoy ES. Universal masking in hospitals in the Covid-19 era. *N Engl J Med.* (2020) 382:e63. doi: 10.1056/NEJMp2006372
- Rodriguez-Palacios A, Cominelli F, Basson AR, Pizarro TT, Ilic S. Textile masks and surface covers-A spray simulation method and a “universal droplet reduction model” against respiratory pandemics. *Front Med.* (2020) 7:260. doi: 10.3389/fmed.2020.00260
- Fang J, Zhang L, Sutton D, Wang X, Lin T. Needleless melt-electrospinning of polypropylene nanofibers. *J Nanomater.* (2012) 2012:e382639. doi: 10.1155/2012/382639
- CAB, Solidarites, CAB, Solidarites. COVID-19 : *Stratégie de Gestion et D'utilisation des Masques de Protection*. Ministère des Solidarités et de la Santé (2020). Available online at: <http://solidarites-sante.gouv.fr/actualites/presse/communiqués-de-presse/article/covid-19-strategie-de-gestion-et-d-utilisation-des-masques-de-protection> (Accessed March 23, 2020).
- Viscusi D, King W, Shaffer R. Effect of decontamination on the filtration efficiency of two filtering facepiece respirator models. *J Int Soc Respir Prot.* (2007) 24:93–107.
- Feldmann F, Shupert WL, Haddock E, Twardoski B, Feldmann H. Gamma irradiation as an effective method for inactivation of emerging viral pathogens. *Am J Trop Med Hyg.* (2019) 100:1275–7. doi: 10.4269/ajtmh.18-0937
- Chin A, Chu J, Perera M, Hui K, Yen H-L, Chan M, et al. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe.* (2020) 1:e10. doi: 10.1101/2020.03.15.20036673
- Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriviou N, Akira S, Chignard M, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem.* (2005) 280:5571–80. doi: 10.1074/jbc.M410592200
- Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol.* (1978) 58:243–7. doi: 10.1007/BF01317606
- Strandbygaard B, Lavazza A, Lelli D, Blanchard Y, Grasland B, Poder SL, et al. Inter-laboratory study to characterize the detection of serum antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* (2016) 197:151–60. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.11.020
- Picault JP, Drouin P, Guittet M, Bennejean G, Protais J, L'Hospitalier R, et al. Isolation, characterisation and preliminary cross-protection studies with a new pathogenic avian infectious bronchitis virus (Strain PL-84084). *Avian Pathol.* (1986) 15:367–83. doi: 10.1080/03079458608436300
- Hopkins SR. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque-purified isolants. *Avian Dis.* (1974) 18:231–9. doi: 10.2307/1589131
- Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, Klenk H-D. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virology.* (2006) 3:63. doi: 10.1186/1743-422X-3-63
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol.* (1938) 27:493–7. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
- Grasland B, Loizel C, Blanchard P, Oger A, Nignol A-C, Bigarré L, et al. Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Vet Res.* (2005) 36:685–97. doi: 10.1051/vetres:2005024
- Buchalla R, Boess C, Bögl KW. Characterization of volatile radiolysis products in radiation-sterilized plastics by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: screening of six medical polymers. *Radiat Phys Chem.* (1999) 56:353–67. doi: 10.1016/S0969-806X(99)00311-4
- Allegra S, Riffard S, Leclerc L, Girardot F, Stauffert M, Forest V, et al. A valuable experimental setup to model exposure to Legionella's aerosols generated by shower-like systems. *Water Res.* (2020) 172:115496. doi: 10.1016/j.watres.2020.115496
- Bowling JD, O'Malley KJ, Klimstra WB, Hartman AL, Reed DS. A vibrating mesh nebulizer as an alternative to the collision three-jet nebulizer for infectious disease aerobiology. *Appl Environ Microbiol.* (2019) 85:e00747–19. doi: 10.1128/AEM.00747-19
- US Patent for Charge Stabilized Electret Filter Media Patent (Patent # 5,645,627 issued July 8, 1997) - Justia Patents Search. Available online at: <https://patents.justia.com/patent/5645627> (Accessed April 22, 2020).
- Vo E, Rengasamy S, Shaffer R. Development of a test system to evaluate procedures for decontamination of respirators containing viral droplets. *Appl Environ Microbiol.* (2009) 75:7303–9. doi: 10.1128/AEM.0799-09
- Institute of Medicine. *Reusability of Facemasks during an Influenza Pandemic: Facing the Flu*. Washington, DC: The National Academies Press (2006).
- Martin SB, Moyer ES. Electrostatic respirator filter media: filter efficiency and most penetrating particle size effects. *Appl Occup Environ Hyg.* (2000) 15:609–17. doi: 10.1080/10473220050075617
- Coulliette AD, Perry KA, Edwards JR, Noble-Wang JA. Persistence of the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus on N95 respirators. *Appl Environ Microbiol.* (2013) 79:2148–55. doi: 10.1128/AEM.03850-12
- CDC. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. Centers for Disease Control and Prevention (2020). Available online at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/ppe-strategy/face-masks.html> (Accessed April 3, 2020).
- Staff RT. *Duke: How to Decontaminate N95 Masks for Reuse* | RT. RT: For Decision Makers in Respiratory Care (2020) Available online at: <https://www.rtmagazine.com/public-health/healthcare-policy/occupational-health/duke-how-to-decontaminate-n95-respirators-for-reuse/> (Accessed May 19, 2020).
- Viscusi DJ, Bergman MS, Novak DA, Faulkner KA, Palmiero A, Powell J, et al. Impact of three biological decontamination methods on filtering facepiece respirator fit, odor, comfort, and donning ease. *J Occup Environ Hyg.* (2011) 8:426–36. doi: 10.1080/15459624.2011.585927
- Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA, Tostowaryk W, Wells GA. Comparison of cloth, paper, and warm air drying in eliminating viruses and bacteria from washed hands. *Am J Infect Control.* (1991) 19:243–9. doi: 10.1016/S0196-6553(05)80256-1
- Tano E, Melhus A. Level of decontamination after washing textiles at 60°C or 70°C followed by tumble drying. *Infect Ecol Epidemiol.* (2014) 4:24314. doi: 10.3402/iee.v4.24314
- Pastorino B, Touret F, Gilles M, Lamballerie X de, Charrel RN. Prolonged infectivity of SARS-CoV-2 in fomites. *Emerg Infect Dis.* (2020) 26:2256–7. doi: 10.1101/2020.04.11.036855
- Heimbuch BK, Wallace WH, Kinney K, Lumley AE, Wu C-Y, Woo M-H, et al. A pandemic influenza preparedness study: use of energetic methods to decontaminate filtering facepiece respirators contaminated

- with H1N1 aerosols and droplets. *Am J Infect Control*. (2011) 39:e1–9. doi: 10.1016/j.ajic.2010.07.004
34. Lore MB, Heimbuch BK, Brown TL, Wander JD, Hinrichs SH. Effectiveness of three decontamination treatments against influenza virus applied to filtering facepiece respirators. *Ann Occup Hyg*. (2012) 56:92–101. doi: 10.1093/annhyg/mer054
 35. BS EN 149:2001+A1:2009 - Juin 2001. Available online at: https://www.boutique.afnor.org/norme/bs-en-1492001a12009/appareils-de-protection-respiratoire-demi-masques-filtrants-contre-les-particules-exigences-essais-marquage/article/668354/eu089165?gclid=EAlaQobChMIvJW69-Sw6AIVDTeCh3aLwBYEAYASAAEGIT3vD_BwE (Accessed March 23, 2020).
 36. Fischer R, Morris DH, Doremalen N van, Sarchette S, Matson J, Bushmaker T, et al. Effectiveness of N95 Respirator Decontamination and Reuse against SARS-CoV-2 Virus. *Emerg Infect Dis*. (2020) 26:2253–5. doi: 10.31219/osf.io/phcsb

Conflict of Interest: NH-V has previously had a research contract with Aerogen.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Bernard, Desoubreux, Bodier-Montagutelli, Pardessus, Brea, Allimonier, Eymieux, Raynal, Vasseur, Vecellio, Mathé, Guillon, Lanotte, Pourchez, Verhoeven, Esnouf, Ferry, Etteradossi, Blanchard, Brown, Roingeard, Alcaraz, Cinquin, Si-Tahar and Heuzé-Vourc'h. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Sébastien EYMIEUX

Analyse du cycle du SARS-CoV-2 en modèle cellulaire par microscopie électronique à transmission

Résumé

À l'image d'autres virus à ARN, le cycle des *Coronaviridae* comporte la formation de structures viro-induites, nécessaires à la réplication du génome viral, et dérivées des membranes du réticulum endoplasmique (RE). Concernant cette famille virale, les mécanismes de sortie de la cellule sont encore largement méconnus. Le premier objectif de nos travaux était de décrire les caractéristiques ultrastructurales du réseau membranaire de réplication du SARS-CoV-2, par une analyse cinétique en microscopie électronique à transmission. Le second objectif était de mieux comprendre les mécanismes de sortie de ce virus, en identifiant les structures cellulaires impliquées lors de cette étape du cycle, par la réalisation de coupes sériées. Dès 6 h p.i., les cellules infectées présentent des *annulate lamellae*, organe composé d'une accumulation de pores nucléaires dans des citernes du RE. À 8 h p.i., un réseau de vésicules à double membrane (DMVs) se met en place, associé aux premières images de bourgeonnement de particules virales dans le ERGIC. À 24 h p.i., on observe l'accumulation de particules virales dépourvues de Spike au sein de grandes vacuoles intracellulaires. L'analyse des coupes sériées à 10 h p.i. a permis de mettre en évidence une sortie par exocytose de particules virales uniques, au sein de petites vésicules de sécrétion. Ces observations apportent de nouveaux éléments de compréhension du cycle du SARS-CoV-2, et des *Coronaviridae* en général, qui pourront être mis à profit pour la conception et l'évaluation de molécules anti-virus à ARN à large spectre.

Mots clés : SARS-CoV-2, microscopie électronique, interactions virus-cellule, morphogenèse, vésicules à double membrane, annulate lamellae

Abstract

Like other RNA viruses, *Coronaviridae* life cycle requires the formation of viral-induced organelles, which are necessary for viral genome replication, and derived from the endoplasmic reticulum (ER) membranes. Concerning this viral family, the mechanisms of cell exit are still largely unclear. The first objective of our work was to describe the ultrastructural characteristics of the membrane replication network of SARS-CoV-2, by a kinetic analysis in transmission electron microscopy. The second objective was to better understand the exit mechanisms of this virus, by identifying the cellular structures involved during this step of the cycle, thanks to serial sections. As early as 6 h p.i., infected cells display *annulate lamellae*, an organelle composed of an accumulation of nuclear pores in ER cisternae. At 8 h p.i., a network composed of double membrane vesicles (DMVs) is established, associated with the first images of viral particle budding in the ERGIC. At 24 h p.i., we observed an accumulation of spikeless viral particles within large intracellular vacuoles. Serial sections analysis at 10 h p.i. revealed a cellular egress by exocytosis of single viral particles, within small secretory vesicles. Our observations provide new insights into the cycle of SARS-CoV-2, and *Coronaviridae* in general. These data could be used for the design and evaluation of broad-spectrum anti-RNA virus molecules.

Keywords: SARS-CoV-2, electron microscopy, virus-cell interactions, morphogenesis, double membrane vesicles, annulate lamellae