



HAL
open science

Etude du rôle de l'immunité innée dans la physiopathologie et dans la transgression de la barrière d'espèces par le SARS-CoV-2 chez différentes espèces animales

Adèle Gambino

► **To cite this version:**

Adèle Gambino. Etude du rôle de l'immunité innée dans la physiopathologie et dans la transgression de la barrière d'espèces par le SARS-CoV-2 chez différentes espèces animales. Médecine humaine et pathologie. École nationale vétérinaire - Alfort, 2024. Français. NNT : 2024ENVA0004. tel-04822057

HAL Id: tel-04822057

<https://theses.hal.science/tel-04822057v1>

Submitted on 6 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2024ENVA0004

**ETUDE DU ROLE DE L'IMMUNITE INNEE DANS LA
PHYSIOPATHOLOGIE ET DANS LA TRANSGRESSION DE
LA BARRIERE D'ESPECES PAR LE
SARS-COV-2 CHEZ DIFFERENTES ESPECES ANIMALES**

THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

Docteur de l'École nationale vétérinaire d'Alfort

Spécialité : Microbiologie

École doctorale n°581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Adèle GAMBINO

Directrice de thèse : Sophie LE PODER
Co-encadrante de thèse : Virginie DOCEUL

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le 8 octobre 2024

Préparée dans l'Unité UMR VIROLOGIE, INRAE-ANSES-ENVA

Composition du jury avec voix délibérative :

Président	Pierre-Emmanuel CECCALDI, Professeur, Université Paris Cité
Rapporteur & Examinatrice	Mariette DUCATEZ, Directrice de recherche, INRAE (Université de Toulouse)
Rapporteur & Examineur	Fabrizio MAMMANO, Directeur de recherche, INSERM (Université Tours)
Examineur	Nicolas MEUNIER, Directeur de recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)
Examineur	Jean MILLET, Chargé de recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dr. Mariette Ducatez et Dr. Fabrizio Mammano d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également, Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi, Dr. Nicolas Meunier et Dr. Jean millet de faire partie de mon jury de thèse en tant d'examineurs. Je remercie également Pr. Nolwenn Jouvenet et Dr. Damien Vitour d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse, merci pour ces échanges enrichissants et bienveillants.

Un grand merci à ma directrice de thèse, Pr. Sophie Le Poder ainsi qu'à ma co-encadrante, Dr. Virginie Doceul pour leur encadrement sans faille.

Sophie, merci de m'avoir donné ma chance en m'accueillant au sein de ton équipe pour mon stage de M1, puis de M2 et enfin pour ce travail de thèse. Merci pour tous tes conseils qui ont toujours été très enrichissants. Merci pour toutes nos conversations. Tes connaissances sur les coronavirus sont impressionnantes et t'écouter en parler est passionnant. Merci également pour toutes tes anecdotes sur les animaux et l'école vétérinaire qui m'auront bien fait rire. On peut dire que nous sommes deux chats noirs, mais tu as toujours su relativiser face aux difficultés et trouver une solution, merci pour ça.

Virginie, merci d'avoir été présente tout au long de cette thèse. Tes précieuses suggestions et ton expertise ont largement enrichi ce travail. Merci d'avoir toujours été à mon écoute.

Je vous remercie également toutes les deux pour votre bienveillance sans faille, merci d'avoir toujours été disponible tout au long de cette thèse. Merci d'avoir su m'accompagner et surtout d'avoir su me rassurer quand j'en avais besoin. Merci également pour votre confiance et votre patience.

Je tiens à remercier chaleureusement l'équipe coronavirus, Hélène, Chloé, Virginie et Younes. Younes, merci pour ton aide depuis ton arrivée au sein de notre équipe. Cette fin de thèse n'aurait pas été la même sans toi. Merci également à Hélène pour sa contribution dans ce travail de thèse et d'avoir pris du temps pour m'expliquer

l'histologie. Chloé, je te souhaite le meilleur pour ta thèse. Je remercie également Maxime pour son aide.

Un immense merci à tous les membres de l'UMR virologie. Merci pour votre accueil, travailler à vos côtés a été un véritable plaisir. Je pense notamment à Fleur et à nos conversations en culture saine et en BM2 qui vont me manquer. Merci également à Bernard de m'avoir fait rire dès qu'on se croisait dans les couloirs. Il est grand temps de t'avouer que je ne suis pas double championne de France de Krav-maga.

Un immense merci à tous les doctorants présents et passés : Chloé, Manon, Marie. Merci Manon D pour ton encadrement durant mon stage de M1 et merci Juliette pour tes précieux conseils. Je remercie tout particulièrement les membres du bureau Doc land : Aïlona, Pascal, Axel, Valentine et Sarah. Merci d'être passé de collègues à amis. Merci pour tous ces moments de rigolades dans le bureau, pour tous les potins et pour tous les bonbons. Merci de m'avoir toujours soutenue et rassurée. Merci pour toutes les sorties que nous avons faites et qui m'ont permis de passer de supers moments. Je vous souhaite le meilleur pour vos thèses respectives qui, j'en suis sûre seront incroyables et je touche du bois pour que tous les western blot que vous ferez soient parfaits.

Enfin je tiens à remercier de tout cœur ma famille et en particulier mes parents et ma sœur. Leur soutien a été sans faille durant toutes ces années, merci d'avoir su me changer les idées quand j'en avait besoin. Merci également à mes amies Magda et Laury qui me soutiennent depuis le collège. Un merci tout particulier à ma copine Faten, nos weekends et nos moments de rire ont été très utiles pendant ces trois ans.

RESUME

Le SARS-CoV-2 est un virus de la famille des *Coronaviridae*, genre *Betacoronavirus* qui aurait pour origine un virus proche provenant d'une espèce de chauve-souris. Son émergence en Chine fin 2019 ainsi que l'apparition de nombreux variants ont donné lieu à la plus grande pandémie virale du XXI^{ème} siècle. L'infection par le SARS-CoV-2 engendre la maladie COVID-19 qui est caractérisée par des symptômes respiratoires pouvant être de légers à sévères avec une pneumonie parfois fatale. La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense contre une infection virale et permet la synthèse d'interférons (IFN) qui vont induire la production de centaines de molécules antivirales (Interferon-stimulated genes, ISG). Elle peut aussi contribuer à l'établissement d'une inflammation possiblement délétère. Nous avons souhaité étudier l'implication de la réponse IFN dans la physiopathologie du SARS-CoV-2 par deux approches : chez des hamsters syriens infectés par des variants (D614G, Delta, Omicron) du SARS-CoV-2 de pathogénicité différente et dans un modèle de souris déficientes ou non pour le récepteur de l'interféron de type I. Nous montrons dans le modèle du hamster Syrien, une corrélation positive au premier jour post-infection de la cavité nasale entre l'intensité de la réplication virale, la réponse IFN de type III et la synthèse de cytokines inflammatoires. Le variant Delta cause des dommages tissulaires plus précocement dans l'épithélium olfactif associés à des réponses IFN et inflammatoires très fortes. Le variant Omicron, le moins pathogène, est celui qui induit plus lentement une réponse interféron avec une réponse inflammatoire amoindrie. Cependant, dans le modèle murin, nous montrons que la réponse IFN-I est nécessaire pour contrôler la réplication virale. Si à des temps très précoces de l'infection, le défaut d'induction de la voie IFN-I ne semble pas délétère, au 4^{ème} jour post-infection, en lien avec la réplication et diffusion accrue du virus, le niveau des cytokines inflammatoires est au final similaire à celui des souris contrôles et nous observons dans la cavité nasale une augmentation des lésions tissulaires. La réponse IFN peut aussi être un facteur déterminant dans la capacité d'un virus à franchir la barrière d'espèce. En effet, l'aptitude d'un virus à contrecarrer la réponse IFN de différents hôtes potentiels pourrait favoriser le franchissement de la barrière d'espèce. Certaines protéines du SARS-CoV-2 sont capables d'inhiber la voie d'induction des ISGs dans les cellules humaines et nous nous sommes demandés si les orthologues viraux des virus SARS-CoV-like de chauve-souris conservent cette propriété. Nous montrons ainsi que comme pour le SARS-CoV-2, la protéine virale Nsp13 des virus BANAL-236, BANAL-103 et RATG13 qui infectent les chauves-souris, inhibent aussi l'induction de la voie IFN humaine.

Ainsi, l'induction de la voie interféron a des conséquences multiples au cours de l'infection virale et les virus, comme le SARS-CoV-2 peuvent de diverses manières contrecarrer son induction ce qui confère un avantage répliatif. Son étude reste importante pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et adapter au mieux les traitements antiviraux mais aussi pour détecter des virus animaux qui pourraient détourner facilement les réponses antivirales des cellules humaines et avoir ainsi un potentiel zoonotique.

ABSTRACT

SARS-CoV-2 is a virus from the Coronaviridae family, Betacoronavirus genus, which is believed to have originated from a closely related virus found in a species of bat. Its emergence in China at the end of 2019 and the appearance of numerous variants have led to the largest viral pandemic of the 21st century. The infection causes the disease COVID-19, characterized by respiratory symptoms ranging from mild to severe, with pneumonia that can sometimes be fatal. The innate immune response is the first line of defense against a viral infection and allows for the synthesis of interferons (IFN), which induce the production of hundreds of antiviral molecules (Interferon-stimulated genes, ISG). It can also contribute to potentially harmful inflammation. We aimed to study the involvement of the IFN response in the pathophysiology of SARS-CoV-2 through two approaches: in Syrian hamsters infected with SARS-CoV-2 variants (D614G, Delta, Omicron) of different pathogenicity and in a mouse model deficient or not for the IFN-I receptor. We show in the Syrian hamster model a positive correlation on the first day post-infection of the nasal cavity between the intensity of viral replication, the IFN-III response, and the synthesis of inflammatory cytokines. The Delta variant causes tissue damage earlier in the olfactory epithelium, associated with very strong IFN and inflammatory responses. The Omicron variant, the least pathogenic, induced a delayed interferon response with a reduced inflammatory response. However, in the mouse model, we showed that the IFN-I response is necessary to control viral replication. If at very early times of infection, the lack of induction of the IFN-I pathway does not seem harmful, on the 4th day post-infection, linked to increased viral replication and dissemination, the level of inflammatory cytokines is ultimately similar to that of control mice, and we observed an increase in tissue lesions in the nasal cavity. The IFN response can also be a determining factor in a virus's ability to cross the species barrier. Indeed, a virus's ability to counteract the IFN response of different potential hosts could facilitate crossing the species barrier. Some SARS-CoV-2 proteins can inhibit the induction of ISGs in human cells, and we wondered if the viral orthologs of bat SARS-CoV-like viruses retain this property. We showed that, like SARS-CoV-2, the viral protein Nsp13 of the viruses BANAL-236, BANAL-103, and RATG13, which infect bats, also inhibit the induction of the human IFN pathway. Thus, the induction of the interferon pathway has multiple consequences during viral infection, and viruses like SARS-CoV-2 can counteract its induction in various ways, which confers a replicative advantage. Its study remains important to better understand the pathophysiology of the disease and to better adapt antiviral treatments, but also to detect animal viruses that could easily circumvent the antiviral responses of human cells and thus have zoonotic potential.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RESUME	5
ABSTRACT	6
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ABBREVIATIONS	13
INTRODUCTION	17
I. Présentation générale des Coronavirus	19
A. Classification et phylogénie.....	19
B. Biologie des coronavirus	20
1. Le génome	20
2. Les protéines du SARS-CoV-2	21
2.A. Les protéines non structurales.....	21
2.B. Les protéines structurales	27
2.B.1 La protéine Spike	27
2.B.2 La protéine d'enveloppe.....	28
2.B.3. La protéine de Membrane	29
2.B.4. La Nucléocapside.....	30
2.B.5. L'hémagglutinine Estérase.....	31
2.C. Les protéines accessoires	32
3. Cycle des coronavirus.....	33
3.A. Entrée du virus	34
3.B. Réplication et transcription du génome	37
3.C. Encapsidation et bourgeonnement des nouveaux virions	39
C. Les coronavirus animaux	40
1. Les coronavirus chez les animaux d'élevages.....	40
2. Les coronavirus chez les animaux de compagnie	43
II. Les coronavirus Humains	44
A. Les Coronavirus humains peu pathogènes.....	44

B.	Les coronavirus humains hautement pathogènes	44
1.	Le SARS-CoV.....	44
2.	Le MERS-CoV	45
C.	Pandémie SARS-CoV-2	46
1.	La pandémie due au SARS-CoV-2	46
2.	Apparition de Variants	46
3.	SARS-CoV-2 et CoVID-19	48
3.1.	La maladie COVID-19	48
3.2.	Physiopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2	50
4.	Les franchissements de barrière d'espèce par le SARS-CoV-2	54
4.A.	Origine animale du SARS-CoV-2.....	55
4.B	SARS-CoV-2 et animaux	57
4.B.1.	<i>Infections naturelles</i>	57
4.B.1.a.	Visons.....	57
4.B.1.b.	Chats	58
4.B.1.c.	Cerfs de Virginie.....	59
4.B.1.d.	Hamsters	59
4.B.2.	Infections expérimentales et modèles animaux	59
4.B.2.a.	Hamster	59
4.B.2.b.	Souris.....	60
4.B.2.c	: Furets.....	62
4.B.2.d	: Primates non-humains	63
III.	SARS-CoV-2 et Interféron.....	63
A.	Introduction.....	63
B.	Généralité sur le système Interféron	64
1.	La voie d'induction de l'IFN-I et -III.....	65
2.	La voie de réponse à l'IFN-I et -III.....	66
C.	Rôle de la réponse IFN dans la physiopathologie associée à l'infection par le SARS-CoV-2.....	67
D.	Le traitement interféron comme thérapie contre l'infection par le SARS-CoV-2	70
E.	Activation de la réponse IFN-I et III par le SARS-CoV-2.....	72
F.	Modulation du système IFN par le SARS-CoV-2.....	74

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	79
RESULTATS	81
Partie 1 : Infection par différents variants du SARS-CoV-2 dans le modèle du hamster syrien	83
I. Introduction.....	83
II. Résultats/ Discussion.....	85
Partie 2 : Etude de la réponse IFN-I dans un modèle murin	108
I. Introduction.....	108
II. Matériels et méthodes.....	109
III. Résultats.....	115
IV. Discussion.....	130
Annexe	136
Partie 3 : Etude de l'inhibition de la voie IFN par le SARS-CoV-2 et sa conservation chez d'autres coronavirus apparentés.....	137
I. Introduction.....	137
II. Matériels et méthodes.....	138
III. Résultats.....	150
IV. Discussion.....	167
DISCUSSION GENERALE	173
CONCLUSION GENERALE	187
BIBLIOGRAPHIE	189

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Phylogénie des coronavirus	19
Figure 2 : Particule virale et organisation génomique des Coronavirus. Exemple du SARS-CoV-2	21
Figure 3 : Représentation du Complexe de Réplication et transcription des coronavirus	24
Figure 4 : Photo du SARS-CoV-2 et structure de la protéine spike.....	28
Figure 5 : Organisation schématique de la protéine Membrane du SARS-CoV-2.....	30
Figure 6 : Schéma organisationnel de la protéine Nucléocapside	31
Figure 7 : Modulation des réponses au stress cellulaire par la modulation des voies de l'apoptose et de l'autophagie par les protéines accessoires du PEDV, SARS-CoV et SARS-CoV-2.....	33
Figure 8 : Cycle viral du coronavirus SARS-CoV-2	34
Figure 9 : Entrée du virus SARS-CoV-2 dans la cellule	35
Figure 10 : Schéma explicatif de la transcription des ARN génomiques et sous génomique des coronavirus	39
Figure 11 : Chronologie de l'apparition des variants 2020-2022	48
Figure 12 : Schéma descriptif des symptômes de la COVID-19.....	50
Figure 13 : Immunothrombose des COVID-19 sévères.....	54
Figure 14 : Franchissement de barrière d'espèce de différents coronavirus humains	55
Figure 15 : Le franchissement de la barrière d'espèce par le SARS-CoV-2	57
Figure 16 : Mutations génétiques identifiées dans la souche murinisée MA-30.....	62
Figure 17 : Le système interféron.....	65
Figure 18 : L'efficacité de la réponse IFN varie au cours du temps lors d'une COVID-19.	70
Figure 19 : Modulation de la réponse IFN par les protéines virales du SARS-CoV-2.....	78
Figure 20 : Echelle de marquage des coupes histologiques de poumons	114
Figure 21 : Infection de souris Sv/129 WT et KO IFNAR avec un virus SARS-CoV-2 adapté au modèle murin (MA30)	115

Figure 22 : Quantification de l'ARN viral sous-génomique après infection de souris Sv/129 par le MA30	117
Figure 23 : Mesure des niveaux d'expression des ARNm de différents marqueurs dans les cornets olfactifs de souris Sv/129 infectées par le virus MA30	119
Figure 24 : Analyse en composantes principales à différents temps post infection dans les cornets olfactifs	121
Figure 25 : Analyse histologique de la cavité nasale des souris infectées par le MA30	123
Figure 26 : Mesure des niveaux d'expression des ARNm de différents marqueurs dans le poumon de souris Sv/129 infectées par le virus MA30.....	126
Figure 27 : Analyse en composantes principales à différents temps post infection dans le poumon	127
Figure 28 : Analyses histologiques des poumons de souris infectées	129
Figure 29 : Principe du clonage Gateway.....	139
Figure 30 : Banques de plasmides d'expression construites par des réactions LR (clonage Gateway).....	140
Figure 31: Principe du test d'interaction basé sur la reconstitution de la Nanoluciférase.....	143
Figure 32 : Principe du double hybride en Levure	146
Figure 33 : Principe du test rapporteur luciférase	147
Figure 34 : Crible des interactions entre les protéines du SARS-CoV-2 et la protéine STAT1 de la voie interféron par reconstitution de la nanoluciférase	151
Figure 35 : Double hybride en levure pour étudier l'interaction Nsp9-STAT1	153
Figure 36 : Expression des protéines Nsp6, Nsp9 et Nsp13-V5-HIS	154
Figure 37 : Effet des protéines Nsp6, Nsp13, Nsp9 sur l'activation du promoteur ISRE	155
Figure 38 : Inhibition de la translocation de pSTAT1 par Nsp13 du SARS-CoV-2.	157
Figure 39 : Les coronavirus de chauve-souris apparentés au SARS-CoV « Bat-SARS-CoV-like »	159
Figure 40 : Alignement des séquences protéiques des Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1	162

Figure 41 : Expression des protéines Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1.	163
Figure 42 : Effet des protéines Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1 sur l'activation du promoteur ISRE	164
Figure 43 : Inhibition de la translocation de pSTAT1 par les protéines Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1	166
Figure S 1: Représentation de la cavité nasale d'un rongeur	136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Rôle des protéines Non structurales du SARS-CoV-2	26
Tableau 2 : Bat-SARSCoV-like et similarité avec SARS-CoV-2.....	56
Tableau 3: Les mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire innée par les protéines du SARS-CoV-2.	76
Tableau 4 : Amorces utilisées pour les réactions de qPCR.....	112
Tableau 5 : Anticorps primaires.....	113
Tableau 6 : Anticorps secondaires	113
Tableau 7: Ensemencement cellulaire et transfection	142
Tableau 8 : Identité de séquences nucléotidiques entre les protéines Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1.....	160
Tableau 9 : Comparaison de l'infection SARS-CoV-2 chez le hamster et la souris 129/Sv d'après nos études.....	178

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACE2 : Angiotensine Converting Enzyme 2

AD : Domaine activateur de la transcription

ADN : Acide désoxyribonucléique

APN : Aminopeptidase N

ARN : Acide RiboNucleotidique

ARNm : ARN messenger

ARNsg : ARN subgénomique

Bcov : Coronavirus Bovin

DAD : Diffuse alveolar damage

DB : Domaine de liasion à l'ADN

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

CCoV : Canine Coronavirus

CoV : Coronavirus

COVID-19 : Coronavirus Disease 2019

CTD : Domaine C-terminal

DMV : Vésicule à double membrane

E : Enveloppe

FCoV : Feline Coronavirus

FeCV : Feline Enteric Coronavirus

FIPV : Feline Infectious Peritonitis Virus

HCoV : Human Coronavirus

HE : Hemagglutinine esterase

HEK-293T : Human Embryonic Kidney 293T

HeLa : Henrietta Lacks

IBV : Infectious Bronchitis Virus

IFN : Interferon

IFNAR : IFN α receptor

IRF : Interferon regulatory factor
ISG : Interferon stimulated gene
ISGF : Interferon stimulated gene factor
ISRE : IFN-stimulated gene
KO : Knock-out
M : Membrane
MERS-CoV : Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
MHV : Mouse Hepatitis Virus
N : Nucléocapside
Nanoluc : Nanoluciférase
NK : Natural killer
Nsp : Protéine non structurale
NTD : Domaine N-terminal
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : Open reading frame
PAMPs : Pathogen associated molecular patterns
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDCoV : Porcine DeltaCoronavirus
PeCoV : Porcine Enteric Coronavirus
PFA : Paraformaldéhyde
PHEV : Porcine Hemmaglutining Encephalitis Virus
PIF : Peritonite Infectieuse Féline
PRR : Patern recognition receptor
RE : Réticulum Endoplasmique
RBD : Domaine de liaison au récepteur
RdRp : RNA dependent RNA polymerase
RNP : Ribonucléoprotéine
RTC : Replication-Transcription Complex

RT-qPCR : Quantitative real time polymerase chain reaction

S : Spike

SADS : Syndrome de la diarrhée aigue porcine

SARS : Severe Acute Respiratory Syndrome

STAT : Signal transducer and activator of transcription

SVF : Sérum de veau foetal

TGEV : Transmissible Gastroenteritis Virus

TLR : Toll like recpetor

TMD : Domaine transmembranaire

TMPRSS2 : Protéase transmembranaire à sérine 2

TRS : Transcription Regulation Sequence

VOC : Variant Of Concern

VOI : Variant Of Interest

VUM : Variant Under Monitoring

WT : Wild-type

INTRODUCTION

I. Présentation générale des Coronavirus

A. Classification et phylogénie

Les Coronavirus (CoV) sont des virus appartenant au domaine des *Riboviria*, au royaume des *Orthovirinae*, au phylum des *Pisuviricota*, à la classe des *Pisoniviricetes*, à l'ordre de *Nidovirales*, au sous ordre des *Cornidovirineae*, à la famille des *Coronaviridae* et à la sous-famille des *Orthocoronavirinae*. Les *Orthocoronavirinae* se décomposent en quatre genres : les *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, et *Delta*-coronavirus. Les *Alpha*-et *Beta*-coronavirus sont des virus infectants les mammifères tandis que les *Gamma*- et *Delta*-coronavirus infectent majoritairement les oiseaux. Ce sont des virus enveloppés dont le génome est composé d'un ARN simple brin de polarité positive. (Figure 1).

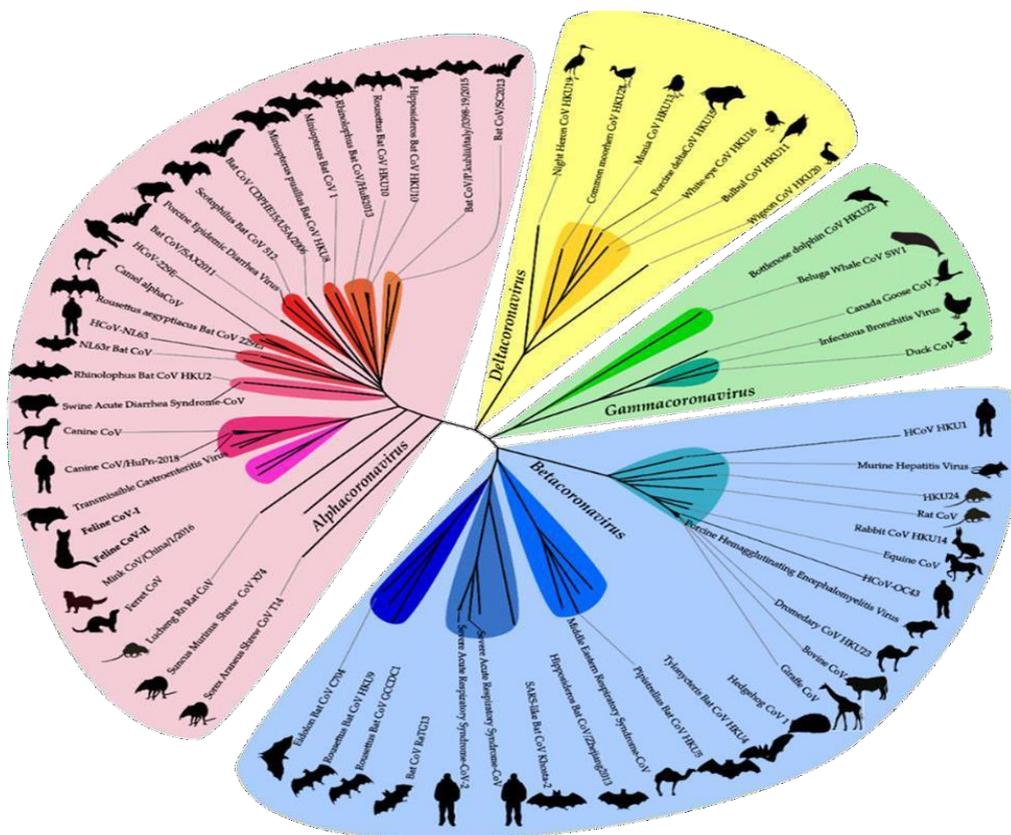


Figure 1 : Phylogénie des coronavirus.

Les *Orthocoronavirinae* se décomposent en quatre genres : les *Alpha*-(Rose), *Beta*-(Bleu) *Gamma* (Jaune), et *Delta* (Vert)-coronavirus. Les *Alpha*-et *Beta*-coronavirus

sont des virus infectants les mammifères tandis que les *Gamma*- et *Delta*-coronavirus infectent majoritairement les oiseaux. D'après Manon Delaplace.

B. Biologie des coronavirus

1. Le génome

L'ARN génomique des coronavirus est d'environ 30kB, il fait partie de l'un des génomes les plus long des virus à ARN. Il est coiffé à son extrémité 5' et polyadénylé à l'extrémité 3'. L'organisation des cadres de lecture du génome est systématiquement la suivante : deux grands ORFs (Open Reading Frame), appelés ORF1a et ORF1b occupent les deux premiers tiers du génome à partir de l'extrémité 5'. Ces 2 ORFs sont directement traduits en seize protéines non structurales (Nsp) qui sont impliquées dans la réplication et la transcription du génome viral. Le tiers restant du génome viral code pour quatre protéines structurales, toujours positionnées dans le même ordre ; Spike (S), Enveloppe (E), Membrane (M) et Nucleocapside (N) (Figure 2). Il est à noter que certains coronavirus, comme le coronavirus bovin possèdent une cinquième protéine structurale, l'hémagglutinine estérase (HE). Entre les séquences codant pour les protéines structurales sont intercalés plusieurs gènes codant pour des protéines accessoires. Celles-ci sont nommées en fonction de leur position sur le génome. Elles sont très variables d'un coronavirus à un autre et si leurs fonctions ne sont pas très bien connues elles semblent avoir un rôle dans la virulence du virus et dans sa capacité à échapper à la réponse immunitaire innée¹.

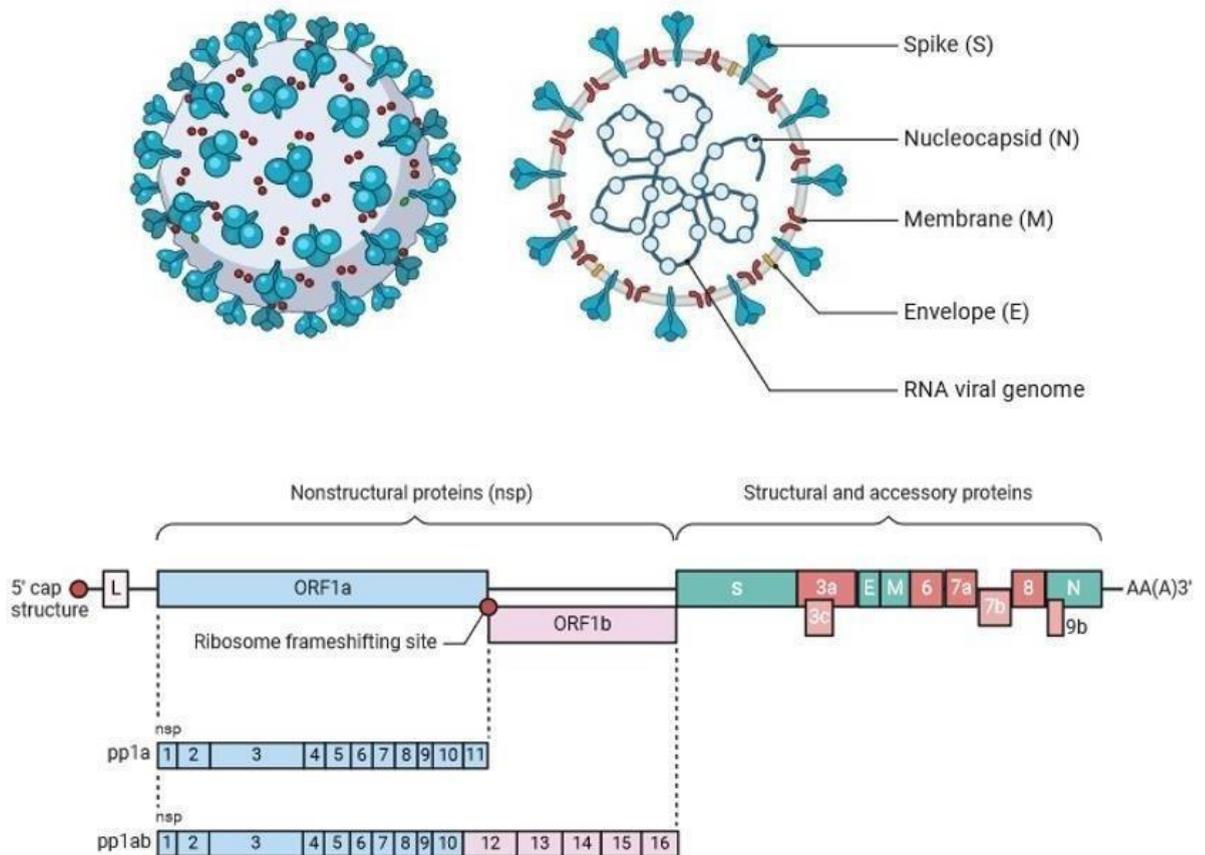


Figure 2 : Particule virale et organisation génomique des Coronavirus. Exemple du SARS-CoV-2

Le génome du SARS-CoV-2 est composé à son extrémité 5' de deux grands ORFs, ORF1a et ORF1b qui codent pour 16 protéines non structurales. L'extrémité 3' est composée des ORFs codant pour les protéines structurales Spike, Enveloppe, Membrane et Nucléocapside. Les ORFs codant pour les protéines accessoires sont intercalés entre les séquences codant pour les protéines structurales. L'extrémité 5' est coiffée tandis que l'extrémité 3' possède une queue poly(A). Créé avec Biorender

2. Les protéines du SARS-CoV-2

2.A. Les protéines non structurales

Les protéines non structurales sont codées par les ORF1a et ORF1b. Ces ORF vont dans un premier temps être traduits en deux grandes polyprotéines pp1a et pp1ab

grâce à un changement de cadre de lecture de -1 programmé entre les deux ORFs. Les polyprotéines sont ensuite clivées de façon auto-protéolytiques par deux protéases : Nsp3 (papain-like protease) et Nsp5 (chymotrypsin-like ou main protéase) ce qui permet la libération des Nsp 1 à 11 de pp1a et Nsp 12 à 16 de pp1ab. Les différentes Nsp ont des rôles variés permettant la réplication-transcription du génome viral. Certaines sont aussi impliquées dans l'échappement au système immunitaire inné ¹.

La protéine Nsp1 va rapidement être libérée dans le cytoplasme. Elle a pour rôle d'interférer avec la réponse immune innée et d'inhiber la synthèse de protéines cellulaires par divers mécanismes qui peuvent varier selon les CoVs. Ainsi la protéine Nsp1 de TGEV semble inhiber uniquement la traduction des ARNm cellulaires tandis que la protéine Nsp1 du SARS-CoV peut en plus dégrader les ARNm cellulaires ^{2,3}.

Les fonctions de la protéine Nsp2 ne sont pas encore bien définies. Cependant il a été montré que Nsp2 est capable d'interagir avec les prohibitines 1 et 2 (PHB1 et PHB2) conduisant à une perturbation de la signalisation intracellulaire de l'hôte lors de l'infection ⁴. De plus, une étude récente a montré que la protéine Nsp2 du SARS-CoV-2 est capable d'interagir avec des protéines de la famille des HSP (Heat Shock protein) dont le rôle est de protéger la cellule du stress, de maintenir la protéostasie et de prévenir la mort cellulaire ⁵. L'étude montre également que Nsp2 interagit avec des molécules de polyamines qui sont d'importants facteurs jouant un rôle dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. Ces molécules sont généralement requises lors d'une infection virale durant les étapes de réplication ou de traduction des protéines virales. Ces interactions seraient impliquées dans le cycle de réplication virale ⁵.

Les Nsp 3, 4 et 6 sont impliquées dans la formation de vésicules à double membrane (DMV)^{1,6,7}. Ce sont des organelles de réplication dont le but est de promouvoir un environnement concentré en métabolites, cofacteurs et enzymes virales, favorisant la réplication virale et un échappement à la réponse immune innée cellulaire. Les organelles de réplication sont retrouvées chez tous les virus à ARN simple brin de polarité positive. Dans l'ordre des Nidovirales, les usines virales sous forme de

vésicules à double membrane sont retrouvées chez les artérovirus et les coronavirus. Chez les Coronavirus, ces vésicules sont issues du réticulum endoplasmique (ER)¹. Nsp3 et Nsp4 sont des protéines transmembranaires. La co-expression et l'interaction de Nsp3 dans la membrane externe et Nsp4 dans la membrane interne sont suffisantes pour induire la formation des DMV ⁶. De plus, il existe des pores moléculaires qui connectent la lumière des DMV au cytosol. Nsp6 a été montré comme n'étant pas indispensable pour la formation des DMV mais a pour rôle d'établir des connections entre les DMV et le ER pour organiser spatialement les clusters de DMV

1,8.

Dans les organelles de réplication, les protéines non structurales Nsp7 à Nsp16 vont s'assembler pour former un complexe de réplication-transcription (RTC) facilitant la synthèse de l'ARN viral (Figure 3). Dans ce RTC, un complexe minimal a été montré comme étant complètement fonctionnel pour la réplication et la transcription, les autres Nsp servant de support. Il est composé de Nsp12, la RNA polymérase RNA-dépendante (RdRp) responsable de la synthèse virale, d'un hétérodimère Nsp7-Nsp8 avec une sous-unité Nsp8 agissant comme facteur de processivité et stabilisant les régions de Nsp12 impliquées dans la liaison à l'ARN et de deux molécules Hélicases Nsp13, dont une seule est liée à un brin d'ARN modèle, la deuxième servant à stabiliser le RTC ^{1,9,10}. Il a été montré que la RdRp de SARS-CoV-2 est l'une des plus rapides des RdRp virales ^{1,11}. Une des caractéristiques de la réplication des CoVs est la présence d'un système de correction des erreurs génétiques ce qui est unique au sein des virus à ARN. Cette fonction est portée par Nsp14 qui a une activité d'exoribonucléase 3' à 5' au niveau de son extrémité N-terminale. Cette fonction est régulée par Nsp10 qui sert de co-facteur à Nsp14^{1,12}. De plus, Nsp14 possède également une activité N7-méthyltransférase à son extrémité C-terminale qui catalyse la coiffe de l'ARNm^{13,14}. La protéine Nsp15 est une endoribonucléase spécifique de l'uridine¹⁵. Son rôle va être d'empêcher l'accumulation d'ARN double brin long qui pourrait activer MDA5, un senseur de la réponse immunitaire de l'hôte¹⁶. La protéine Nsp16 est quant à elle impliquée dans le coiffage des ARN viraux par son activité 2'-O-méthyltransférase (2'-O-MTase)¹⁷. Nsp10 est également un co-facteur crucial dans la régulation du processus de liaison de Nsp16 au substrat ARN et le donneur méthyl¹⁷. Les fonctions

de la Nsp11 ne sont pas encore connues. Une étude réalisée sur le MHV indique que le clivage Nsp10/Nsp11 est indispensable pour la réplication du virus en culture cellulaire tandis qu'une autre indique que ce clivage n'est pas nécessaire pour la réplication virale de l'IBV en culture cellulaire^{18,19}. Les fonctions des Nsp sont résumées dans le [tableau 1](#).

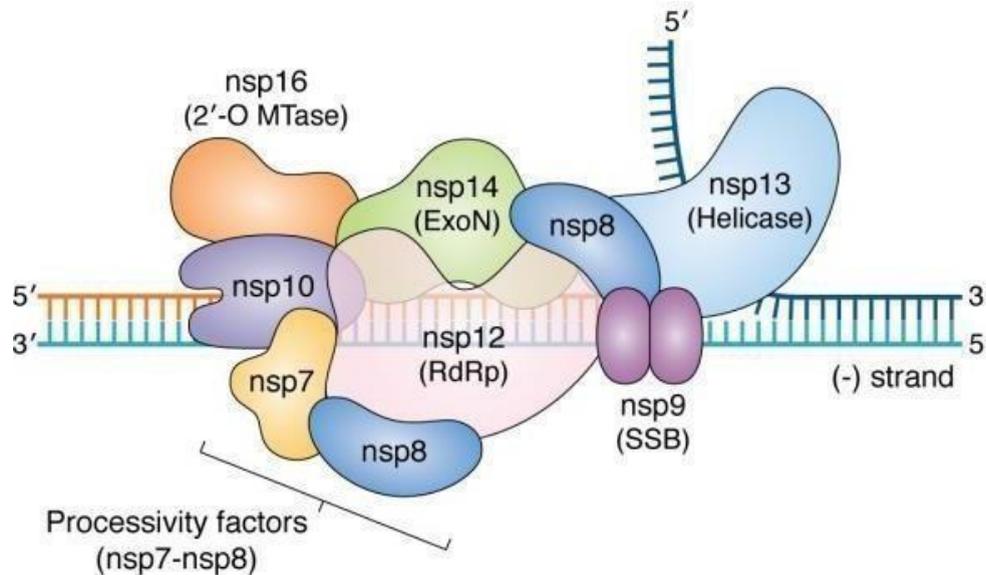


Figure 3 : Représentation du Complexe de Réplication et transcription des coronavirus

Le complexe de réplication-transcription des coronavirus est composé des Nsp7 à 16. Le complexe minimal est composé de la RdRp Nsp12, d'un hétérodimère Nsp7-Nsp8, d'une copie secondaire de Nsp8 et de deux hélicases Nsp13. Créée avec Biorender

Au cours de cette thèse nous sommes intéressés plus particulièrement aux protéines non structurales Nsp13 et Nsp9 :

Nsp13 : Les hélicases sont des enzymes ubiquitaires dont le rôle est de défaire la forme en hélice de l'ARNdb formé lors de la réplication et de générer de l'ARN simple brin qui servira de modèle pour la réplication du génome. C'est un moteur biologique qui couple l'énergie chimique libérée par l'hydrolyse de l'ATP via une NTPase (Nucleotide triphosphate hydrolysis) à une énergie mécanique qui va permettre le déroulement des hélices d'acides nucléiques. Les hélicases ont été classées dans six superfamilles (SF1 à SF6) en fonction de leur séquence d'acides aminés conservée.

Les Nsp13 des coronavirus humains (HCoV) et du Mouse Hepatitis Virus (MHV) font parties de la superfamille SF1²⁰. Nsp13 est une protéine multifonctionnelle qui possède une activité directe d'hélicase dans le sens 5'-3', une activité ATPase et une activité ARN 5'-triphosphatase²⁰. Son rôle dans la réplication virale a été montré comme étant essentiel. Dans le RTC, Nsp13 va s'associer à Nsp12 puis va former un complexe avec Nsp8¹⁰. La structure cristallographique de la protéine Nsp13 du MERS-CoV a été la première structure à haute résolution complète des Nsp de tous les coronavirus humains à avoir été rapportée²¹. Nsp13 est une protéine hautement conservée chez les coronavirus. Par exemple, il n'y a qu'un seul acide aminé qui diffère entre Nsp13 SARS-CoV (I570) et Nsp13 SARS-CoV-2 (V570)²². Du fait de son importance dans la réplication virale, de sa structure et de sa grande conservation entre les différents CoVs, de nombreuses études indiquent que Nsp13 est une cible intéressante pour le développement de molécules antivirales. De plus, Nsp13 du SARS-CoV-2 a été montré comme jouant un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée²³⁻²⁵. Cette activité sera détaillée dans la partie III « Interféron » de cette introduction.

Nsp9 est une protéine qui fait également partie du RTC¹⁰. C'est une petite protéine de 15kDa qui interagit avec Nsp12. Des études de la structure de Nsp9 du SARS-CoV et du SARS-CoV-2 ont montré qu'en solution, la protéine forme un homodimère avec une faible affinité avec l'ADN simple brin et l'ARN. De plus, des similarités ont été montrées entre Nsp9 et les protéines membres de la famille des SSB (single-stranded DNA binding)²⁶. Notamment Nsp9 a l'habileté de se lier aux acides nucléiques d'une façon non spécifique permettant de stabiliser la synthèse du nouveau brin ARN. Tout comme Nsp13, Nsp9 fait partie des protéines virales ciblées pour le développement de molécules antivirales.

Tableau 1 : Rôle des protéines Non structurales du SARS-CoV-2

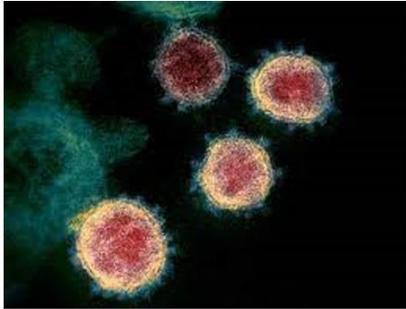
Protéine	Rôle	Références
Nsp1	- Inhibition de la machinerie de traduction cellulaire - Interfère avec la réponse immunitaire	2,3,24
Nsp2	- Perturbe la signalisation intracellulaire de l'hôte	4
Nsp3	- Rôle dans la formation des DMV - Protéase : clivage de Nsp1, Nsp2 et Nsp3	6,7
Nsp4	- Rôle dans la formation des DMV	6,7
Nsp5	- Protéase : clive Nsp4 à Nsp16 - Inhibition de la voie IFN	27-29
Nsp6	- Etablit des connections entre les DMV et le ER - Formation d'autophagosome pour la dégradation des protéines immunomodulatrices	8,30
Nsp7	- Co facteur de Nsp8 et Nsp12 dans le RTC	31
Nsp8	- Co facteur de Nsp12 - Primase	31,32
Nsp9	- Liaison à l'ARN et Nsp8 - Transfert de nucleotidyl-monophosphate par Nsp12 - Adaptateur de Nsp14 et Nsp16 durant le processus de coiffe, agit comme un substrat NiRAN pour la RNAylation	26,33
Nsp10	- Co facteur de Nsp14 et Nsp16	12,17
Nsp11	- Fonction inconnue	18,19
Nsp12	- ARN polymérase ARN dépendante	34
Nsp13	- Hélicase ARN	20
Nsp14	- Activité exoribonucléase - Activité méthyl transférase	13
Nsp15	- Endoribonucléase Uridine-spécifique	15
Nsp16	- Rôle dans le coiffage des ARN via le domaine 2'-O-méthyl transférase	17

2.B. Les protéines structurales

2.B.1 La protéine Spike

La protéine Spike est une glycoprotéine de fusion de classe I d'environ 30nm de long et qui est retrouvée à la surface de la membrane virale. Les coronavirus tiennent leur nom du fait que cette protéine donne une forme de couronne au virus lorsqu'il est observé en microscopie électronique (Figure 4a). Cette protéine est essentielle pour le virus lors de l'infection. En effet, elle a pour rôle de médier l'entrée du virus dans la cellule hôte et influence son tropisme cellulaire ³⁵. La protéine S s'assemble en homotrimère. Chaque monomère comporte deux sous-unités S1 et S2 qui régulent la liaison au récepteur et la fusion à la membrane respectivement (Figure 4b) ^{35,36}. La sous-unité S1 est divisée en un domaine N-terminal (NTD) et un domaine de liaison au récepteur (RBD). Le RBD est hautement variable génétiquement. Il est constitué de cinq feuillets Beta antiparallèles et d'une courte hélice. La sous-unité S2 comporte un peptide de fusion, un domaine transmembranaire ainsi que deux régions de répétitions heptades (HR1 et HR2) ³⁶. La protéine S est également soumise à des modifications post-traductionnelles telle que la glycosylation, qui vont masquer les épitopes antigéniques et contribuer à l'échappement à la réponse immunitaire. En raison de son rôle crucial dans l'entrée du virus, la protéine S est soumise à une forte pression de sélection et sa séquence évolue assez rapidement ³⁷.

A.



B.

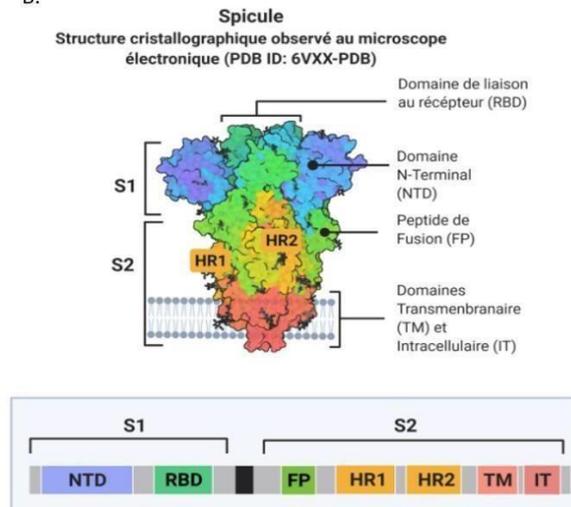


Figure 4 : Photo du SARS-CoV-2 et structure de la protéine spike

A. Photo du SARS-CoV-2 obtenue en microscopie électronique. B. Structure de la protéine Spike. Elle est composée de deux sous-unités S1 et S2. S1 possède un domaine de liaison au récepteur et S2 un peptide de fusion. Adaptée de « An In-depth Look into the Structure of the SARS-CoV2 Spike Glycoprotein » sur Biorender

2.B.2 La protéine d'enveloppe

La protéine d'enveloppe (E) des coronavirus est la plus petite des protéines structurales et celle que l'on retrouve en plus petite proportion dans l'enveloppe virale. C'est une protéine conservée chez les coronavirus ³⁸. Elle est composée de trois domaines, un domaine N-terminal (NTD), un domaine transmembranaire hydrophobe (TMD) et un long domaine C-terminal hydrophobe (CTD)^{38,39}. Des études ont montré que la protéine E du SARS-CoV-2 possède 94,74% de similarité avec celle du SARS-CoV et 36% de similarité avec MERS-CoV ⁴⁰. La protéine E est le plus souvent localisée à proximité des sites de trafic intracellulaire des protéines comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le compartiment intermédiaire ERGIC ⁴¹. De récentes études ont montré qu'un des rôles de la protéine E est de retenir la protéine S en régulant la voie de sécrétion cellulaire ⁴². Cette rétention va notamment permettre une N-glycosylation de la protéine S, ce qui va limiter l'activité de fusion conformationnelle et son expression à la surface de la cellule, empêchant ainsi la

formation de syncytia et facilitant donc l'entrée des nouveaux virions formés⁴². De plus, la protéine E semble importante dans le processus de bourgeonnement des virions puisque des études dans lesquelles différents coronavirus mutés ou délétés du gène E ont montré que les virions avaient alors une morphologie aberrante³⁸. La protéine E du SARS-CoV-2 est capable de s'auto-oligomériser pour former un canal ionique pentamérique, en formant une viporine. Une viporine est un pore membranaire composé de protéines virales qui régulent les canaux ioniques cellulaires. Des études ont montré que la protéine d'enveloppe peut modifier l'homéostasie du Ca^{2+} dans la cellule et déclencher un processus d'inflammation⁴³. Une hypothèse serait que la protéine E puisse déclencher la libération virale via un flux ioniques ou d'une fission membranaire mais cette hypothèse n'est pour l'instant pas validée⁴³. Cette capacité à former des canaux ioniques semble également pouvoir jouer un rôle dans la virulence du SARS-CoV-2⁴⁴.

2.B.3. La protéine de Membrane

La protéine de Membrane M joue un rôle central dans l'assemblage du virus et dans sa morphogénèse. Elle est localisée au niveau du compartiment ERGIC et sert de plateforme pour le recrutement des autres protéines virales structurales⁴⁵. Il a été montré que la protéine M est capable d'interagir avec toutes les protéines structurales ainsi qu'avec elle-même et que ces interactions sont suffisantes pour former des particules pseudo-virales, c'est-à-dire des particules virales non infectieuses⁴⁵. La protéine M est constituée de trois hélices transmembranaires et d'un domaine intra virion composé de huit feuillets beta (Figure 5)⁴⁶. La région N-terminale est orientée vers l'extérieur du virion tandis que la région C-terminale est orientée vers l'intérieur du virion. De plus, elle possède au moins un site de N-glycolysation. De manière intéressante, la structure tridimensionnelle de la protéine M du SARS-CoV-2 présente une forte homologie avec la protéine accessoire ORF3a⁴⁶.

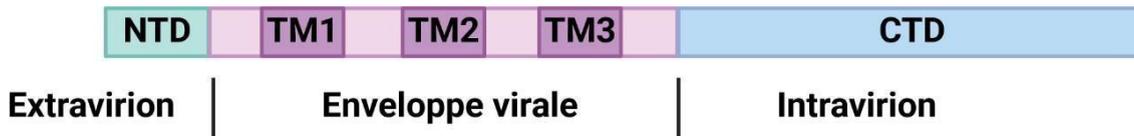


Figure 5 : Organisation schématique de la protéine Membrane du SARS-CoV-2.

Elle possède trois domaines transmembranaires, un domaine N-terminal orientée vers l'extérieur du virion et un domaine c-terminal orienté vers l'intérieur du virion. Créée avec Biorender.

2.B.4. La Nucléocapside

La Nucléocapside est une protéine de 419 acides aminés hautement conservée au sein du genre coronavirus ⁴⁷. C'est l'une des protéines structurales les plus abondantes dans les cellules infectées par le virus. Elle est constituée de deux régions structurales conservées appelées NTD et CTD. Elle est également constituée de régions intrinsèquement désordonnées (IDR) qui incluent les modules N-arm, une région centrale de liaison flexible riche en serine et arginine (LKR) et qui contient des sites de phosphorylation et le module C-tail (Figure 6) ⁴⁷. Le NTD est responsable de la liaison à l'ARN. Le CTD est lui aussi un site de liaison à l'ARN mais également de dimérisation. Les IDR sont quant à eux responsables de la régulation des activités du NTD et du CTD ⁴⁷.

La fonction primaire de la protéine N est de protéger le génome viral en formant des ribonucléocapsides hélicoïdales (RNP) ⁴⁷. La protéine N joue également un rôle dans la transcription de l'ARN viral, la réplication du génome et la régulation de la réponse immune antivirale. En particulier, N peut contrecarrer la réponse anti-virale cellulaire médiée par les ARN interférants grâce à son activité de liaison à l'ARN cellulaire et en induisant sa dégradation ⁴⁸. De plus, la protéine N peut induire une réponse humorale et cellulaire après l'infection, ce qui en fait une cible de choix pour le développement de vaccin.

La séparation en phase liquide-liquide (LLPS) est un processus commun pour subdiviser le matériel biologique en compartiments intra-cellulaires. Dans le cas d'une infection virale et plus précisément lors de la formation des virions, la formation de

compartiments protéines-acides nucléiques séquestrant les protéines cellulaires de l'hôte semble nécessaire pour protéger les virions de la réponse immunitaire et pour concentrer les composants viraux pour améliorer l'efficacité de réplication ⁴⁹. La phosphorylation du domaine LKR de la protéine N du SARS-CoV-2 module la phase de séparation induite par l'ARN. Ces LLPS seraient notamment impliqués dans l'interaction entre le complexe protéine N-ARN viral et d'autres protéines structurales comme Nsp12 ^{47,50}.



Figure 6 : Schéma organisationnel de la protéine Nucléocapside.

La protéine N est constituée de deux régions structurales conservées appelées NTD et CTD ainsi que de régions intrinsèquement désordonnées (IDR) qui incluent les modules N-arm, une région centrale de liaison flexible riche en serine et arginine (LKR) et qui contient des sites de phosphorylation et le module C-tail. Créée avec Biorender.

2.B.5. L'hémagglutinine Estérase

Certains coronavirus comme HCoV-OC43, HCoV-HKU1 et BCoV (Bovine coronavirus) possèdent une 5^{ème} protéine structurale : l'hémagglutinine estérase (HE). L'HE est composée de deux domaines : le premier domaine est un domaine lectine de liaison au récepteur spécifique de l'acide sialique O-acétylé et le deuxième domaine est un domaine sialate-O-acétylestérase détruisant le récepteur ⁵¹. Le rôle des HE n'est pas très bien connu. Chez MHV, l'expression de HE n'est pas indispensable et est très vite perdue lors de la propagation en culture cellulaire ⁵². Contrairement aux β 1CoV (OC43, BCoV, CoV porcins, canins, équins et lagomorphes), pour lesquels l'expression de HE est critique pour l'infection ^{51,53,54}. Cependant, nous retrouvons des différences de fonctionnalités de l'HE au sein même du groupe des β 1CoV. Par exemple, l'activité lectine de l'HE est maintenue chez BCoV tandis que cette fonction est perdue chez OC43 suite à une adaptation du virus dans le tractus respiratoire humain entraînant de multiples mutations dans le site de liaison au récepteur de HE ⁵¹.

2.C. Les protéines accessoires

Les gènes codant pour les protéines accessoires des coronavirus sont intercalés entre les gènes codant pour les protéines structurales. Le nombre et le rôle des protéines accessoires sont spécifiques à chaque coronavirus. SARS-CoV-1 code pour huit protéines accessoires tandis que SARS-CoV-2 en possède neuf. Certains coronavirus comme PEDV n'en possède qu'une seule ⁵⁵. Elles sont nommées en fonction de leur position sur le génome et non pas en fonction de leur rôle. La protéine accessoire ORF3b du Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV) n'est pas la même que la protéine ORF3b du Transmissible Gastro Enteritis Virus (TGEV). Les protéines accessoires ne sont pas nécessaires pour la réplication du virus *in vitro*. Si toutes leurs fonctions ne sont pas définies, ces protéines sont considérées comme ayant un rôle dans la virulence. Elles sont impliquées dans la modulation de la réponse au stress cellulaire, et de la réponse au système immunitaire innée ⁵⁶. Par exemple la protéine ORF8b du SARS-CoV-2 est une protéine qui va s'associer à la membrane du Réticulum Endoplasmique, interagir avec la protéine ATF6 (Activating Transcription Factor 6) ce qui va déclencher une voie de signalisation permettant la modulation de voie de réponse au stress comme l'autophagie ou l'apoptose ⁵⁷. La protéine ORF3a du SARS-CoV-2 est quant à elle impliquée dans l'induction de l'apoptose caspase- dépendante dans de multiple types cellulaires⁵⁸. Au contraire, la protéine ORF3 de PEDV inhibe l'apoptose des cellules infectées pour faciliter la prolifération virale (Figure 7)^{55,59}. Également, certaines protéines accessoires du SARS-CoV-2 ont été décrites comme inhibitrices de la réponse interféron. Cette partie sera détaillé dans la partie III « Interféron »

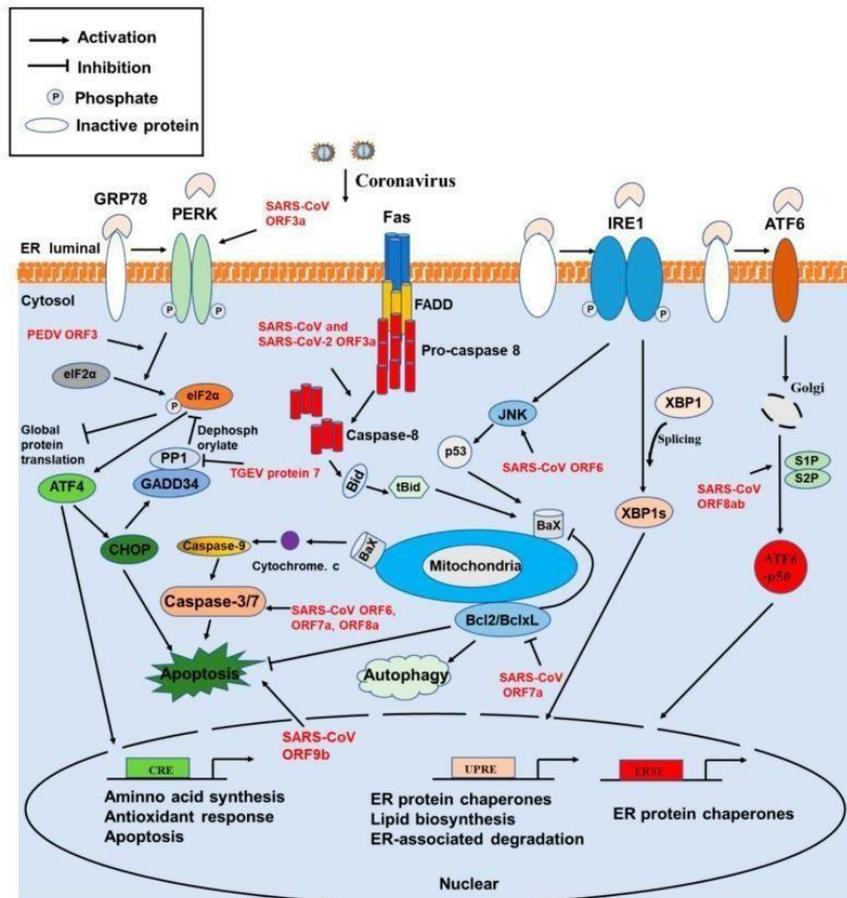


Figure 7 : Modulation des réponses au stress cellulaire par la modulation des voies de l'apoptose et de l'autophagie par les protéines accessoires du PEDV, SARS-CoV et SARS-CoV-2.

Schéma montrant les trois voies de signalisation UPR ainsi que les voies corrélées de l'apoptose et de l'autophagie régulées par les protéines accessoires. Les protéines virales accessoires modulant la voie sont représentées en rouge. D'après Fang et al. 2021.

3. Cycle des coronavirus

Le cycle viral des coronavirus est composé de plusieurs étapes essentielles telles que l'attachement au récepteur cellulaire et l'entrée dans la cellule, la réplication et transcription du génome et le bourgeonnement des nouveaux virions. Le cycle est décrit dans cette partie et résumé dans la figure 8, en prenant exemple du SARS-CoV-2

2

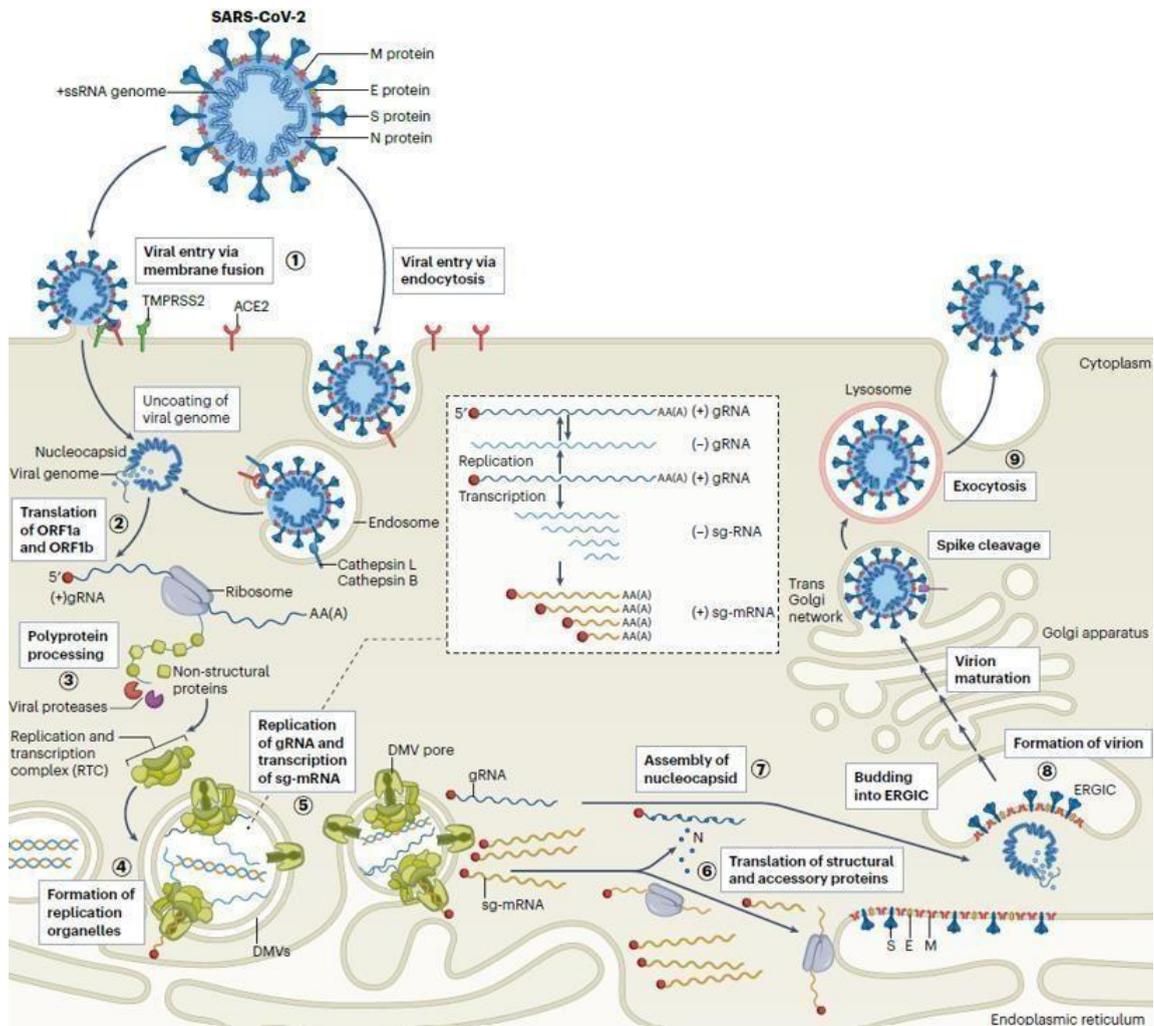


Figure 8 : Cycle viral du coronavirus SARS-CoV-2

La première étape du cycle réplcatif du SARS-CoV-2 consiste en l'attachement au récepteur ACE2. Le virus va ensuite entrer dans la cellule soit par fusion à la membrane soit par endocytose (1). Les ORF1a et 1B vont alors être traduits (2) et clivés en 16 protéines non structurales (3). La réplication et la transcription du génome va avoir lieu dans des DMV après formation du RTC (4,5). Les protéines structurale et accessoires vont être traduites (6), les RNP vont se former (7) et il va ensuite y avoir assemblage des nouveaux virions (8) et sortie par exocytose (9). Steiner et al, 2024

3.A. Entrée du virus

La première étape du cycle viral est l'entrée du virus dans la cellule hôte. Cette étape nécessite dans un premier temps un attachement au récepteur cellulaire spécifique de l'hôte et à l'induction de la fusion des membranes virales et cellulaires permettant un relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 9).

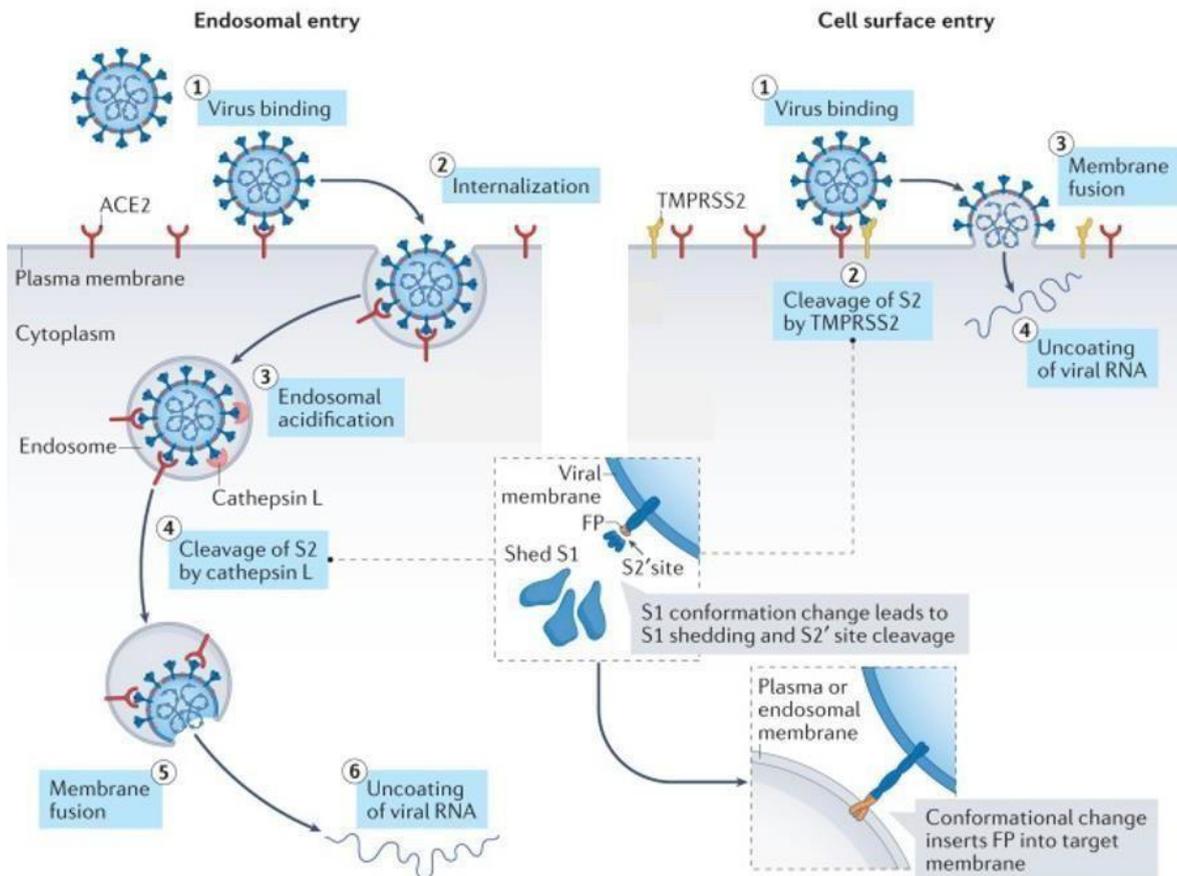


Figure 9 : Entrée du virus SARS-CoV-2 dans la cellule.

La protéine S du virus va se fixer au récepteur ACE2 (1). Deux voies d'entrée existent. L'entrée par voie endosomale (à gauche) : le virus va être internalisé dans un endosome (2) qui va subir une acidification (3) créant un changement conformationnel permettant le clivage de la sous-unité S2 (4) et la fusion des membranes (5) libérant l'ARN viral (6). L'entrée par fusion des membranes à la surface cellulaire (à droite) : la protéase TMPRSS2 va cliver la sous-unité S2 (2) permettant la fusion des membranes (3) et la libération de l'ARN viral (4). Modifiée de B.Jackson, 2022

L'entrée des coronavirus dans la cellule hôte est médiée par l'interaction entre la protéine virale S et le récepteur cellulaire menant à la fusion des membranes virale et cellulaire. Il existe une grande variété de récepteurs chez les différents coronavirus. Le premier récepteur identifié fut celui du MHV en 1991⁶⁰. Il s'agit de la protéine CEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule), une protéine transmembranaire de type I qui appartient à la superfamille des Immunoglobulines^{60,61}. Les Alphacoronavirus comme HCoV-229, TGEV, FCoV II et CCoV partagent comme récepteur commun l'Amino peptidase N (APN) spécifique de leur espèce hôte

même si de manière intéressante, tous ces virus sont capables de se lier à l'APN félin⁶¹. En effet, la protéine S de ces quatre virus présente une forte homologie de séquence même si les domaines de liaison au récepteur sont localisés dans des régions différentes. D'autres coronavirus comme BCoV et HCoV-OC43 utilisent des acides sialiques comme récepteurs⁶². Les coronavirus SARS-CoV et SARS-CoV-2 se lient à l'ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2)^{63,64}. C'est une protéine membranaire de type I exprimée de façon abondante dans le tissu pulmonaire⁶¹. La surface externe du RBD de la protéine S et l'hélice alpha N-terminale de ACE2 forment l'interface d'interaction entre le virus et ce récepteur. Il y a 20 résidus de l'ACE2 et 17 résidus du RBD impliqués dans des réseaux d'interactions hydrophiles entre les chaînes latérales⁶⁵. Parmi ceux-ci, certains comme Lys417, Leu452, Glu484 et Asn501 font partie des résidus mutés sur la protéine S des variants du SARS-CoV-2, entraînant une meilleure liaison au récepteur^{65,66}. Concernant la localisation tissulaire d'ACE2, des études transcriptomiques réalisées chez l'Homme et chez des animaux modèles suggèrent que l'expression d'ACE2 dans le poumon est limitée aux cellules alvéolaires de type II tandis que le niveau d'expression semble plus abondant dans la cavité nasale et notamment au niveau des cellules sustentaculaires de l'épithélium olfactif^{65,67-69}. Des niveaux d'expression élevés d'ACE2 sont également retrouvés dans l'intestin grêle, le colon, les testicules, le rein, le cœur, et la thyroïde⁷⁰. Dans le cas du SARS-CoV-2, en plus de l'ACE2, diverses molécules ont été suggérées comme récepteurs alternatifs telles que les lectines de type C, DC-SIGN ou L-SIGN ainsi que des membres de la famille des récepteurs phosphatidylsérine comme TIM1 et AXL⁷¹⁻
⁷⁴. Les lectines sont connues pour se lier à un large spectre de virus en reconnaissant les glycanes à la surface du virion tandis que les récepteurs phosphatidylsérines augmentent l'efficacité d'entrée d'un grand nombre de virus enveloppés en se liant aux phosphatidylsérines de la membrane des virions^{65,71,72}.

Afin de permettre l'entrée du virus dans la cellule hôte, la protéine S va subir un changement conformationnel et va se replier dans un état énergétiquement stable. Elle va passer dans un état appelé métastable, qui va lui permettre d'être transformée en un état d'énergie plus faible avant la fusion des membranes⁶⁵. Cette transition est permise par l'intermédiaire de deux étapes de clivage protéolytique après la liaison

avec ACE2. Chez le SARS-CoV-2, le premier clivage est localisé à la frontière du domaine S1-S2 de la protéine S et est réalisé par une furine de la cellule. Le deuxième est localisé dans la sous-unité S2 et nécessite le recrutement d'une protéase cellulaire ⁶⁵. Les deux protéases majoritairement impliquées dans ce clivage sont la cathepsine L et TMPRSS2 (Transmembrane protease, serine 2) ⁶⁵. Cette dernière est présente à la surface de la membrane cellulaire et médie le clivage de la protéine S au niveau de la membrane plasmique tandis que l'activation de S via la cathepsine L a lieu dans un endolysosome (Figure 9) ⁶⁵. Le clivage furine localisée à la jonction S1-S2 distingue le SARS-CoV-2 (et notamment la souche primitive Wuhan-HU-1) des autres sarbecovirus, pour lesquels le clivage n'est pas réalisé par des protéases. Le clivage se fait au niveau d'un site multibasique composé des acide aminés Arg-Arg-Ala-Arg ⁶⁵. Contrairement à d'autres virus possédant également un site de clivage furine (VIH-1, Influenza aviaire), les sous-unités S1 et S2 sont associées par des liaisons faibles et sont donc facilement séparables ⁶⁵. Cette observation suggère que l'acquisition du site de clivage furine est un évènement récent ⁶⁵. Le premier clivage S1-S2 est nécessaire pour activer le deuxième clivage par la protéine TMPRSS2 ou la cathépsine L si la protéine TMPRSS2 est absente ⁶⁵. Après clivage de la région S2', le peptide de fusion va être exposé et va pouvoir s'insérer dans la membrane de la cellule hôte, causant une restructuration des domaines HR1 et HR2 de S, ce qui induit un rapprochement des membranes virale et cellulaire créant un pore de fusion par lequel la nucléocapside rejoindra le cytoplasme de la cellule cible ⁶⁵.

3.B. Réplication et transcription du génome

Une fois entré dans la cellule, le génome viral va être libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il va ensuite être répliqué, transcrit et traduit afin de permettre la formation de nouveaux virions. Lors de la première étape, les ribosomes cellulaires vont traduire les ORF1a et ORF1ab directement à partir de l'ARN génomique (ARNg) en deux grandes polyprotéines pp1a et pp1ab grâce à un changement de cadre de lecture de -1 programmé entre les deux ORFs ⁷⁵. Ce décalage est permis par la présence d'une structure ARN de type pseudo nœud ainsi que d'une séquence « glissante » de 7-nt (5'-UUUAAAC-3') commune à tous les coronavirus, et située juste en amont du codon

stop d'ORF1a. Les polyprotéines sont ensuite clivées de façon auto-protéolytique par deux protéases : Nsp3 (papain-like protease) et Nsp5 (chymotrypsin-like ou main protease) ce qui permet le relargage des Nsp 1 à 11 de pp1a et des Nsp 1 à 16 de pp1ab ⁷⁵. Les protéines non structurales vont ensuite induire la formation du complexe de réplication-transcription (RTC) dans un milieu favorable à la réplication au sein de vésicules à double membrane (DMV) ¹⁰. Une fois le RTC assemblé, l'ARNg viral va servir de modèle pour la réplication et la transcription du génome. Pour la réplication du génome, le RTC va synthétiser une copie complète du génome viral de polarité négative qui va servir de modèle pour la synthèse d'un ARNg de polarité positive qui servira pour la traduction de nouvelles protéines pp1a et pp1ab ou pour l'encapsidation dans les nouveaux virions ^{75,76}. Par la suite, il y aura formation d'ARN messagers sous génomiques (ARNsg) dû à un mécanisme de transcription discontinu unique aux virus de l'ordre de *Nidovirales*. Ces ARNsg sont constitués de la séquence leader de l'extrémité 5' du génome viral et d'une extrémité 3' commune. Lorsque le RTC synthétise la copie d'ARN négatif, il peut arrêter la synthèse s'il atteint une séquence de régulation de transcription (TRS-B) et se dissocier de l'ARN modèle. Les séquences TRS-B sont retrouvées à l'extrémité 3' des ORFS codant pour les protéines structurales et de certaines protéines accessoires ⁷⁵. La synthèse va alors reprendre au niveau d'une autre séquence leader, cette fois-ci située légèrement avant l'extrémité 5' appelé TRS-L (Figure 10). Tous les ARNsg négatifs produits vont alors servir de modèle pour la transcription d'ARNsg de polarité positive, qui vont eux même être traduits en protéines structurales et accessoires ⁷⁵. Il est important de préciser que plus un ORF est situé en 3' du génome, plus l'ARNsg correspondant sera synthétisé en grande quantité. Ainsi l'ARNsg de la Nucléocapside est le plus abondant tandis que celui de la protéine Spike est le moins abondant. Différents ARN sous-génomiques de tailles différentes sont synthétisés recouvrant un à plusieurs cadres de lecture mais chaque ARNm sous-génomique permettra la synthèse d'une seule protéine virale correspondant au premier cadre de lecture situé du côté 5' de cet ARN.

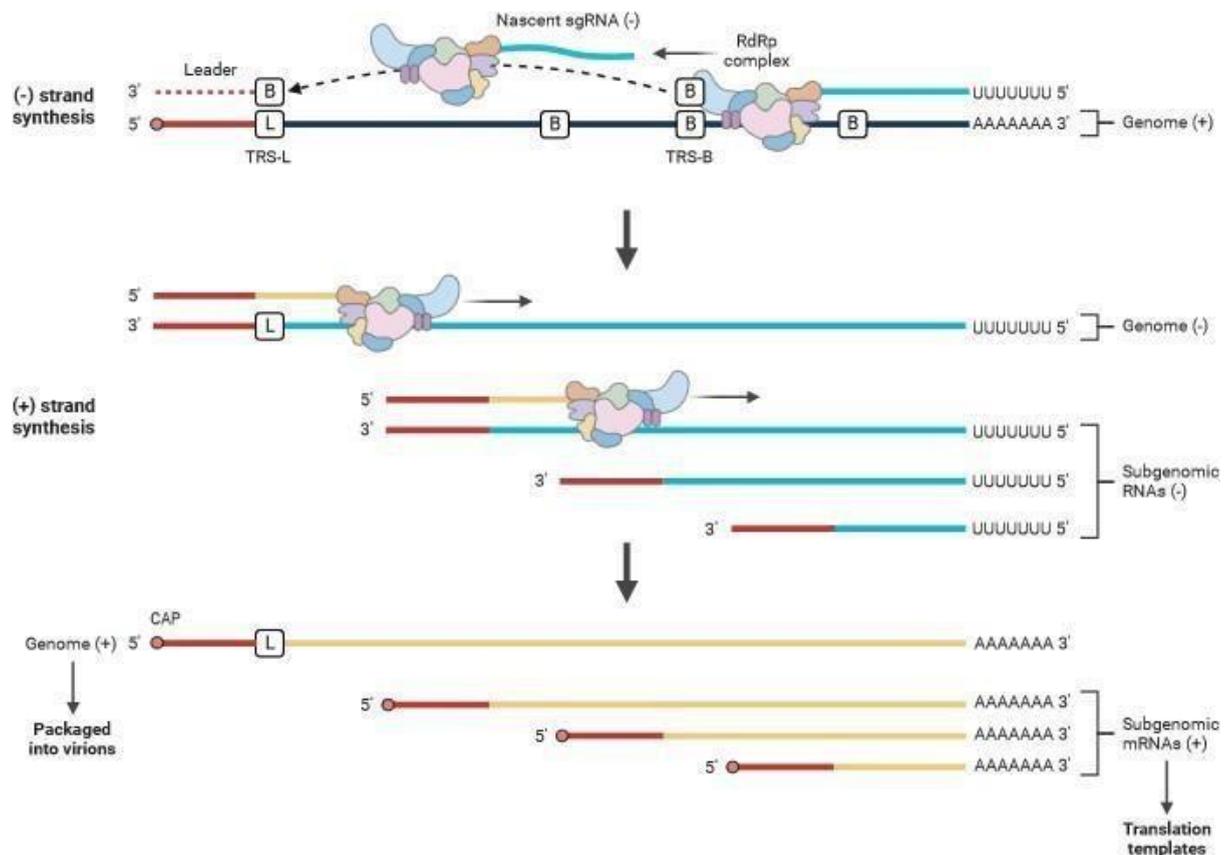


Figure 10 : Schéma explicatif de la transcription des ARN génomiques et sous-génomiques des coronavirus

Les coronavirus vont avoir une transcription dite « discontinue ». Lorsque le RTC va rencontrer une séquence TRS-B située en 3' du brin d'ARN (+) il va se décrocher du brin modèle et se raccrocher à une séquence TRS-L situé en 5'. Les ARNsg (-) nouvellement synthétisés vont par la suite servir de brin modèle pour la synthèse d'ARNsg (+) qui serviront pour la traduction des protéines structurales et accessoires. Les ARNg seront encapsidés dans les nouveaux virions. D'après Biorender

3.C. Encapsidation et bourgeonnement des nouveaux virions

Après l'entrée du virus dans la cellule, la transcription et la réplication du génome, le génome viral nouvellement synthétisé va se retrouver dans le cytoplasme. Il va alors y avoir encapsidation de l'ARNg par les protéines de nucléocapside pour former les complexes de ribonucléoprotéine (RNP) des nouveaux virions. Il semblerait que ce processus est immédiat après la sortie des DMV et qu'il est permis par la présence des protéines N au niveau des pores des DMV et par l'interaction entre N et Nsp3 ¹.

La protéine N des RNP va ensuite interagir avec la queue cytoplasmique de la protéine M au niveau du compartiment ERGIC ce qui va induire son incorporation dans les nouveaux virions ⁷⁷. Ensuite, la protéine M va jouer un rôle d'organisateur de l'assemblage des virions en interagissant avec les autres protéines structurales. Elle va interagir avec la protéine d'enveloppe et maintenir la protéine S au niveau du site d'assemblage. Les nouveaux virions vont alors rejoindre l'environnement extracellulaire via la voie d'exocytose lysosomale Arl8b-dépendante ⁷⁸. Les virions vont transiter par l'appareil de Golgi et subir des modifications post-transcriptionnelles.

C. Les coronavirus animaux

Les infections aux coronavirus posent des problèmes de santé publique humaine mais également vétérinaire. On retrouve de nombreuses infections chez les animaux d'élevages tels que les poules, les bovins et les porcins mais également chez les animaux de compagnie.

1. Les coronavirus chez les animaux d'élevages

Parmi les coronavirus causant des problèmes dans les élevages, on retrouve le premier coronavirus à avoir été découvert en 1931. Il s'agit de l'Infectious Bronchitis Virus (IBV), responsable de plusieurs formes de pathologies chez les poules ⁷⁹. Il se transmet par voie aérienne ou fécale ou par contact indirect via, par exemple des équipements d'élevage contaminés. Le virus va dans un premier temps se répliquer dans les tissus respiratoires, entraînant une infection du système respiratoire supérieur ⁸⁰. L'IBV peut également infecter les reins, causant des pathologies néphrétiques pouvant être mortelles ⁸⁰. On peut également retrouver des infections de l'oviducte chez les jeunes poules ce qui peut endommager la production d'œufs ⁸⁰. L'IBV est très contagieux et est retrouvé dans de nombreux élevages à travers le monde. L'IBV est responsable d'énormes pertes économiques dans l'industrie aviaire ⁷⁹.

Les élevages de porcs sont également impactés par les infections dues aux coronavirus. Parmi les six coronavirus porcins connus, quatre d'entre eux appartiennent au genre *Alphacoronavirus* ; le Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV), le Porcine Respiratory Coronavirus (PRCV), le Porcine Epidemic Diarrhea

Virus (PEDV) et le Swine Acute Diarrhea Virus (SADS-CoV). Le Porcine Hemagglutinate Syndrome Coronavirus (PHEV) est apparenté au *Betacoronavirus* et le Porcine Deltacoronavirus (PDCoV) est quant à lui un *Deltacoronavirus*⁸¹. Un coronavirus chimérique recombinant entre TGEV et PEDV (SeCoV) est apparu dans les années 2000 dans certains pays d'Europe comme l'Espagne, la Slovaquie, l'Italie et l'Allemagne. Il n'y a à ce jour que très peu d'information sur la virulence et l'impact de ce virus⁸¹⁻⁸⁵.

Les coronavirus porcins peuvent causer différentes pathologies. TGEV, PEDV, SADS-CoV et PDCoV sont des coronavirus porcins entériques (PeCoV), ils causent tous les quatre des infections gastro-intestinales pouvant être mortelles. Le premier des PeCoV à avoir été découvert est le TGEV. Les premières caractérisations de la maladie à TGEV ont eu lieu en 1935 mais ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard en 1946, que l'agent étiologique a été identifié aux Etats-Unis⁸¹. Les manifestations cliniques associées au TGEV sont semblables à celles des autres coronavirus entériques porcins et incluent une perte d'appétit, des diarrhées, des vomissements, une déshydratation et une perte de poids. Ces signes cliniques apparaissent 1 à 3 jours après infection et disparaissent généralement dans les 10 jours post-infection. Cependant, chez les porcelets de moins de deux semaines, une infection à TGEV cause la mort dans 100% des cas⁸⁶. TGEV est un virus très contagieux, il se transmet majoritairement par voie oro-fécale, par voie respiratoire^{86,87}. Due à sa forte contagiosité, TGEV s'est très vite répandu dans toutes les régions du monde causant de grandes pertes économiques. De nos jours, la prévalence de cette infection est très basse, environ 3%⁸⁸. Cette diminution de prévalence est due à une immunisation par protection croisée des porcs infectés par PRCV. En effet, Le PRCV est un mutant d'une souche de TGEV isolée en 1984 contenant une délétion dans le gène Spike des nucléotides 621-681^{81,89}. Si TGEV est surtout un virus entérique, PRCV a un tropisme respiratoire. Il se limite au tractus respiratoire supérieur avec comme cible la trachée, les amygdales et les poumons. Il semblerait qu'il infecte préférentiellement les cellules non ciliées et les cellules qui ne produisent pas de mucus⁹⁰. Dans le poumon, le PRCV cible majoritairement les pneumocytes de type II mais également les cellules épithéliales bronchiolaires et les macrophages⁸¹. Une infection à PRCV peut causer

de la dyspnée, de la tachypnée (respiration rapide), des éternuements et de la fièvre. Les symptômes étant relativement modérés, PRCV est considéré comme non-pathogène ⁸¹.

PEDV a été isolé pour la première fois en Angleterre en 1971, il s'est très vite répandu dans d'autres pays européens et a été détecté en Asie en 1982 ⁹¹. Son taux de létalité est entre 50 et 90% chez les jeunes porcelets. De nos jours PEDV ne cause plus d'épizootie importante en Europe même si quelques cas ont été rapportés en Allemagne, Ukraine, France, Belgique, Italie et Autriche entre 2014 et 2019 ^{81,82,92-96}. Cependant PEDV est problématique en Asie où il cause de nombreuses épidémies qui semblent être plus sévères qu'en Europe ⁸¹. La Chine, le Japon, la Corée et les USA ont développé des vaccins vivants, inactivés et sous-unitaires pour les truies mais ces vaccins ne sont pas assez efficaces pour contrôler les épizooties ⁸¹.

PDCoV, également appelé HKU15 a été identifié à Hong-Kong en 2012 lors d'une surveillance virologique de coronavirus chez les mammifères. Ce n'est que quelques années plus tard, en 2014 et aux USA qu'il causa une épizootie porcine démontrant sa capacité pathogénique ^{97,98}. Contrairement aux autres coronavirus entériques porcins, PDCoV peut infecter un large spectre d'hôte comme les poules, les dindes, les bovins mais également les humains ⁹⁹⁻¹⁰¹. En effet, en Novembre 2021, des chercheurs américains ont isolé PDCoV chez trois enfants haïtiens présentant des symptômes modérés tels que de la toux, des douleurs abdominales et un état fébrile. Les souches isolées chez ces enfants seraient le résultat d'au moins deux événements indépendants de franchissement de barrières d'espèces. A ce jour, PDCoV chez les humains ne pose pas de problème de santé publique mais il reste nécessaire de continuer sa surveillance étant donné les interactions fréquentes entre les humains et les porcs ^{81,100,102}.

SADS-CoV est le coronavirus porcine qui a émergé le plus récemment. En effet, il a été détecté en Chine pour la première fois en 2017 lors d'une épizootie qui a coûté la vie à environ 24 500 porcs ^{81,103,104}. Cependant, des études rétrospectives ont montré qu'il était présent sur le territoire Chinois depuis au moins août 2016 ¹⁰⁵.

Les bovins peuvent être infectés par le coronavirus bovin BCoV (*Beta-coronavirus*). Le BCoV est retrouvé sur tous les continents et des études de séroprévalence ont montré que 90% des bovins y ont été exposés au cours de leur vie. ³³³ Il est à l'origine de des gastro-entérites chez les très jeunes veaux (âgés de moins de 8 jours) mais également des pathologies respiratoires. Un vaccin est disponible. Il est administré à la vache gestante afin que le colostrum donné au veau soit enrichi en anticorps permettant de protéger sa paroi intestinale. Le BCoV possède une similarité de 95 % avec le coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43) et de 93 % avec le virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine (PHEV). Une étude parue en 2006 suggère que le virus humain OC43 sera le résultat d'une adaptation du virus BCoV à l'espèce humaine vers 1890. Cette date coïncide avec la description d'une épidémie de symptômes respiratoires connue sous le nom de « grippe Russe ». Il a été émis l'hypothèse que cette épidémie serait en fait le résultat de l'émergence du virus HCoV-OC43.

2. Les coronavirus chez les animaux de compagnie

Nous retrouvons également les coronavirus chez les animaux de compagnie tels que les chiens ou les chats. Nous allons prendre l'exemple des coronavirus félines FCoV. Les coronavirus félin FCoV font partie des Alphacoronavirus. Les FCoVs sont présents sous deux sérotypes FCoV-I et FCoV-II. FCoV-I est le sérotype le plus répandu en Europe et en Amérique avec 80 à 95% des infections naturelles ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Le sérotype II est plus souvent retrouvé en Asie où il représente 2,5 à 29,5% des infections naturelles ¹⁰⁸. Les FCoVs de type II sont le résultat d'une recombinaison homologe entre le sérotype I et un coronavirus canin CCoV. En effet, le gène S du FCoV-II provient du CCoV ¹⁰⁹. Des études ont montré que les deux sérotypes de FCoV entrent dans les cellules par des récepteurs différents. Le récepteur permettant l'entrée du sérotype I n'est pas connu tandis que le récepteur du sérotype II est l'APN (Aminopeptidase N) ^{110,111}. Il existe deux biotypes de FCoV distingués selon la virulence de l'infection induite chez le chat :

- FeCV (Feline Enteric Coronavirus) est un biotype non virulent, à l'origine de symptômes intestinaux bénins. Le tropisme de FeCV se limite aux entérocytes intestinaux ¹⁰⁸.
- FIPV (Feline infectious peritonitis virus) est très virulent et à l'origine de la maladie.

appelée péritonite infectieuse féline (PIF) qui est 100% létale. Le virus infecte les macrophages et les monocytes circulant, ce qui va permettre sa dissémination dans l'organisme et l'atteinte de différents organes¹¹². Il existe deux formes cliniques de PIF: la forme sèche se caractérise par des lésions pyogranulomateuses dans différents organes (rein, foie, système nerveux central) et la forme humide par une accumulation de liquide dans les cavités abdominales ou thoraciques. ¹¹²

II. Les coronavirus Humains

Il existe sept coronavirus humains. Parmi eux, nous pouvons distinguer ceux qui sont peu pathogènes : HCoV-229 ; HCoV-NL63 ; HCoV- OC43 et HCoV-HKU1, et ceux qui sont fortement pathogènes : SARS-CoV, MERS-CoV et SARS-CoV-2.

A. Les Coronavirus humains peu pathogènes

HCoV-229E (*Alpha-coronavirus*) est le premier coronavirus humain à avoir été identifié en 1966 ¹¹³. Un an plus tard en 1967, HCoV-OC43 (*Beta-coronavirus*) a été isolé chez des patients souffrants de rhumes. HCoV-NL63 (*Alpha-coronavirus*) et HKU1 (*Beta-coronavirus*) ont respectivement été découvert en 2003 et 2004 ^{113,114}. Ces coronavirus provoquent des infections modérées du système respiratoire supérieur avec comme symptômes généraux des maux de têtes, de la toux, des écoulements nasaux et de la fièvre. Ils sont répandus dans le monde entier et sont responsables de la majorité des rhumes hivernaux¹¹⁵. Leur mode de transmission se fait par propagation de gouttelettes oropharyngées. Ils sont considérés comme peu pathogènes mais peuvent chez certains patients avec des comorbidités entrainer des pneumonies plus sévères.

B. Les coronavirus humains hautement pathogènes

1. Le SARS-CoV

Le premier coronavirus hautement pathogène à avoir émergé est le SARS-CoV (aussi appelé le SARS-CoV-1 depuis l'émergence du SARS-CoV-2). Il appartient au Genre des *Beta-coronavirus*. C'est en novembre 2002 que plusieurs cas de pneumonie atypique ont été déclarés dans une ville de la province de Guangdong en Chine¹¹⁶.

Les patients présentaient de la toux, des myalgies, de la fièvre et des maux de têtes. D'autres symptômes comme des vomissements, des vertiges et des diarrhées peuvent également être présents mais ils sont moins communs ¹¹⁷. En février 2003, le ministre de la santé Chinois rapporte à l'OMS 300 cas dont 5 décès dans la province de Guangdong. L'épidémie s'est très vite répandue et il a notamment été rapporté le cas d'un médecin de 64 ans qui s'est rendu à Hong Kong dans l'hôtel M¹¹⁷. L'homme a rapidement été transporté à l'hôpital pour détresse respiratoire, dont il décédera quelques jours plus tard. De nombreuses personnes qui logeaient au même étage que ce patient dans l'hôtel M ont également développé des symptômes et été transportées à l'hôpital. De nombreux soignants s'occupant de ces patients ont également été infectés. Le virus s'est rapidement propagé dans 29 pays. L'OMS a déclaré l'état d'épidémie le 15 mars 2003¹¹⁷. Ce n'est que plusieurs mois après l'apparition des cas de pneumonie, en mars 2003 que l'agent étiologique responsable fut identifié. Il s'agissait d'un nouveau Beta-coronavirus, appelé SARS-CoV. Il est le premier virus identifié dans le sous-genre des *Sarbecovirus*. L'épidémie causa de nombreuses perturbations dans les pays touchés avec l'implémentation de mesures sanitaires importantes et des perturbations dans les voyages aériens. Ces mesures ont permis de mettre fin à l'épidémie assez rapidement puisque l'OMS déclara la fin de l'épidémie en juillet 2003 avec 8096 cas et 774 décès ¹¹⁷.

2. Le MERS-CoV

En juin 2012, 10 ans après l'émergence du SARS-CoV, un homme décède d'une pneumonie aiguë et d'une insuffisance rénale dans un hôpital de Jeddah en Arabie Saoudite ¹¹⁸. Très vite, le virus responsable fut isolé chez ce patient. Il s'agit d'un Beta-coronavirus inconnu proche du SARS-CoV. Ce virus fut nommé MERS-CoV¹¹⁹. Il s'agit aussi d'un Betacoronavirus mais appartenant au sous-genre *Merbecovirus*. En avril 2012, plusieurs cas d'infection dus au MERS-CoV ont été détectés dans un hôpital de Jordanie. Le virus circule toujours au Moyen-Orient avec un taux de mortalité d'environ 35%¹²⁰. On compte environ 2500 cas et 800 décès au total. Certains patients peuvent en plus des lésions respiratoires, être atteints de symptômes gastrointestinaux et d'insuffisance rénale¹²⁰.

C. Pandémie SARS-CoV-2

1. La pandémie due au SARS-CoV-2

Fin décembre 2019, les autorités de Wuhan, une province du Hubei en Chine ont déclaré plusieurs cas de patients atteints d'une pneumonie d'origine inconnue¹²¹. Ces patients présentaient une forte fièvre, de la toux et une détresse respiratoire. Les autorités ont rapidement fait le lien entre la majorité des premiers patients et leur présence dans le Huanan Seafood Whole sale Market, un marché aux poissons dans lequel on pouvait retrouver non seulement des produits de la mer mais également des animaux vivants comme des volailles ou des animaux sauvages¹²². Le 31 décembre, la commission municipale de la santé de Wuhan a informé l'Organisation Mondiale de la Santé de l'apparition d'une épidémie de pneumonie inconnue¹²³. Le 9 janvier, l'agent étiologique responsable de cette épidémie a été identifié par des scientifiques chinois, il s'agit du SARS-CoV-2¹²⁴. L'OMS désignera la maladie associée à cette infection par Covid-19. De plus en plus de cas sont alors décrits notamment dans des clusters familiaux ou dans des centres de soins démontrant la facilité de la transmission inter-humaine. L'épidémie s'est ensuite très vite propagée en dehors de la province de Wuhan et de la Chine, et de nombreux pays à travers le monde ont déclaré très rapidement des cas d'infection¹²³. Le 11 mars 2020, l'OMS déclare l'épidémie de SARS-CoV-2 comme étant une pandémie. Au 10 juillet 2024, le nombre de cas mondial de covid-19 recensé était de 775 368 466 dont 7 048 375 décès¹²⁵. Afin de lutter contre la pandémie, de nombreux pays ont pris des mesures importantes avec des confinements et une obligation du port du masque dans les lieux publics. De plus, des vaccins à ARN ont rapidement été mis au point et utilisés à grande échelle permettant de limiter la mortalité due à cette infection virale.

2. Apparition de Variants

Très vite après l'apparition des premiers cas de Covid-19, des variants ont émergé. Certains de ces variants ont alors été classés en différents groupes selon leur potentiel impact sur la santé publique : les variants préoccupants VOC (Variant Of Concern), les variants d'intérêts VOI (Variant Of Interest) et les variants en cours d'évaluation VUM (Variant Under Monitoring). L'apparition de ces variants est principalement due aux capacités de mutations génétiques du SARS-CoV-2.

Ces variants sont dépendants de la sélection naturelle et plus précisément d'une sélection positive associée à des mutations conférant un bénéfice au virus. La majorité des mutations sont localisées sur la protéine Spike du virus. Le premier variant à être apparu possède une mutation sur sa protéine spike en position D614G, il est très vite devenu majoritaire en Europe¹²⁶. En septembre 2020, le variant Alpha (lignage B.1.1.7) a été identifié au Royaume-Uni, il contient principalement neuf mutations sur sa protéine spike^{127,128}. Le variant Alpha semble plus transmissible que la souche D614G. Les variants Beta (lignage B.1.351) et Gamma (lignage P.1) ont été identifiés respectivement en septembre 2020 en Afrique du Sud et en novembre 2020 au Brésil^{66,129}. Leurs différentes mutations leur confèrent une plus grande transmissibilité ainsi qu'un échappement à la réponse immunitaire humorale. Le variant Delta (sous lignage B.1.617.2) est apparu en octobre 2020 en Inde, ce variant fut important au cours de la pandémie car il a été très virulent et très transmissible même chez les sujets vaccinés¹³⁰. Le variant Omicron (lignage B.1.1.529) a été identifié en novembre 2021 au Botswana¹³¹. Des analyses de séquences ont montré qu'Omicron possède plus de 50 mutations par rapport à la souche originale de SARS-CoV-2 de Wuhan. Plus de la moitié de ces mutations sont retrouvées dans la protéine S dont 15 dans le RBD¹³². Les mutations Q498R, S477N et N501Y sont associées à une augmentation de la liaison à ACE2 et donc un niveau d'infection plus élevé, en effet Omicron est 3,3 fois plus transmissible que Delta et son R0 (nombre de reproduction de base, indiquant le nombre de personne pouvant être infecté à partir d'un seul individu infecté) est 4,2 fois plus élevé¹³³. Les nombreuses mutations ont diminué l'efficacité des vaccins mis en place. Plusieurs sous-variants d'Omicron ont émergé (BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4...) et nous parlons alors de « complexe Omicron ». En juillet 2024, le variant Omicron JN.1 est prédominant en France (données Santé Publique France) ([Figure 11](#)). Il a été montré que des événements de recombinaisons entre variants Omicron et d'autres variants ont fait émerger des variants d'Omicron hybrides. Par exemple, le variant XE est un hybride des variants BA.1 et BA.2. Le variant XD est décrit comme étant le résultat d'une recombinaison entre le variant Delta et BA.1¹³³. Des mutations sur d'autres protéines structurales ont également été décrites. Par exemple, les variants Alpha, Gamma et Omicron partagent les mutations R203K et G204R au niveau de leur protéine N tandis que Delta et Beta partagent sur la N les mutations R203M et T205I¹³⁰.

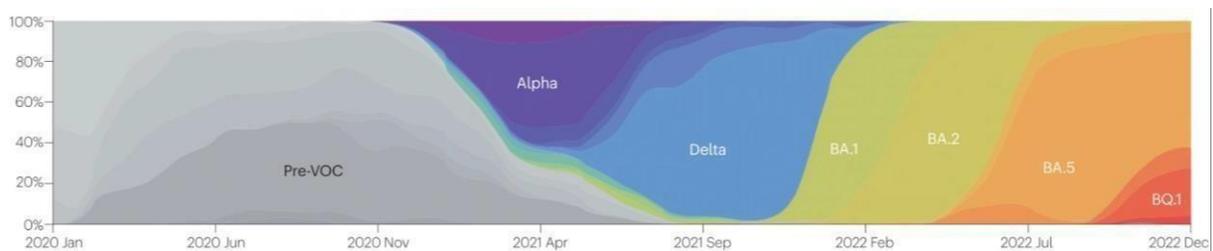


Figure 11 : Chronologie de l'apparition des variants 2020-2022

Schéma montrant la chronologie de l'apparition des variants du SARS-CoV-2 entre 2020 et 2022. D'après Markov et al, 2023

3. SARS-CoV-2 et COVID-19

3.1. La maladie COVID-19

Le SARS-CoV-2 se transmet d'Homme à Homme par aérosol via la respiration de gouttelettes chargées de virus générées lors de toux ou d'éternuements des personnes infectées¹³⁴. Il existe également des infections indirectes par contact avec des surfaces inertes contaminées¹³⁴. Certaines études montrent également la possibilité d'une transmission oro-fécale^{134,135}. De nombreux tests de diagnostic ont été mis en place pour détecter rapidement les cas positifs de COVID-19. Parmi eux, les tests PCR (Polymerase Chain Reaction) permettant la détection de l'ARN viral du SARS-CoV-2 dans des échantillons respiratoires (écouvillons nasaux) sont rapidement devenus le test standard pour le diagnostic. La sensibilité de ces tests varie selon le moment où le test est effectué après exposition du virus. Une étude montre que la sensibilité de ces tests est de 33% 4 jours après l'exposition, 62% si le test est réalisé le jour où les premiers symptômes apparaissent et 80% 3 jours après l'apparition des symptômes¹³⁶.

Le SARS-CoV-2 peut infecter des personnes de tout âge, adulte ou enfant et homme et femme sans distinction. Cependant la maladie semble plus sévère chez les personnes de plus de 65 ans et chez les patients présentant des comorbidités tels que le diabète, de l'hypertension et des pathologies chroniques¹³⁷. Les hommes

développent également une COVID-19 plus sévère que les femmes avec un taux de létalité de 2.8% chez les hommes et 1.7% chez les femmes ^{137,138}.

L'infection SARS-CoV-2 est asymptomatique dans 40% des cas mais les personnes infectées asymptomatiques peuvent quand même transmettre le virus. Pour les 60% de cas symptomatiques, les premiers symptômes de la maladie apparaissent dans les 2 à 14 jours après l'infection. Dans 80% des cas, la maladie va être peu ou moyennement grave. Les patients vont être atteints de fièvres, de toux, de fatigue, rhinite, de myalgie, de maux de tête et parfois de difficulté respiratoire plus ou moins légère. Certains patients ont également une perte de goût (dysgeusie) et d'odorat (anosmie). Une étude par méta-analyse, réalisée en 2020 avant l'apparition du variant Omicron, regroupant 10 études avec 1627 patients a montré que 52.73% des patients ont une détérioration de l'olfaction. Une autre méta-analyse de 9 études avec 1390 participants a montré que 43.93% des patients souffraient de dysgeusie ^{137,139}. Des symptômes digestifs peuvent également être retrouvés chez certains patients comme des nausées, des vomissements, des diarrhées (Figure 12).

Les patients développant une COVID-19 sévère vont voir leur état général rapidement s'altérer et peuvent développer une détresse respiratoire aiguë (SDRA) avec des dommages importants dans les poumons, une tempête cytokinique, des thromboses et de nombreux dommages dans d'autres organes comme le cœur, le foie ou les reins pouvant mener à un choc septique et le décès des patients ¹³⁷.

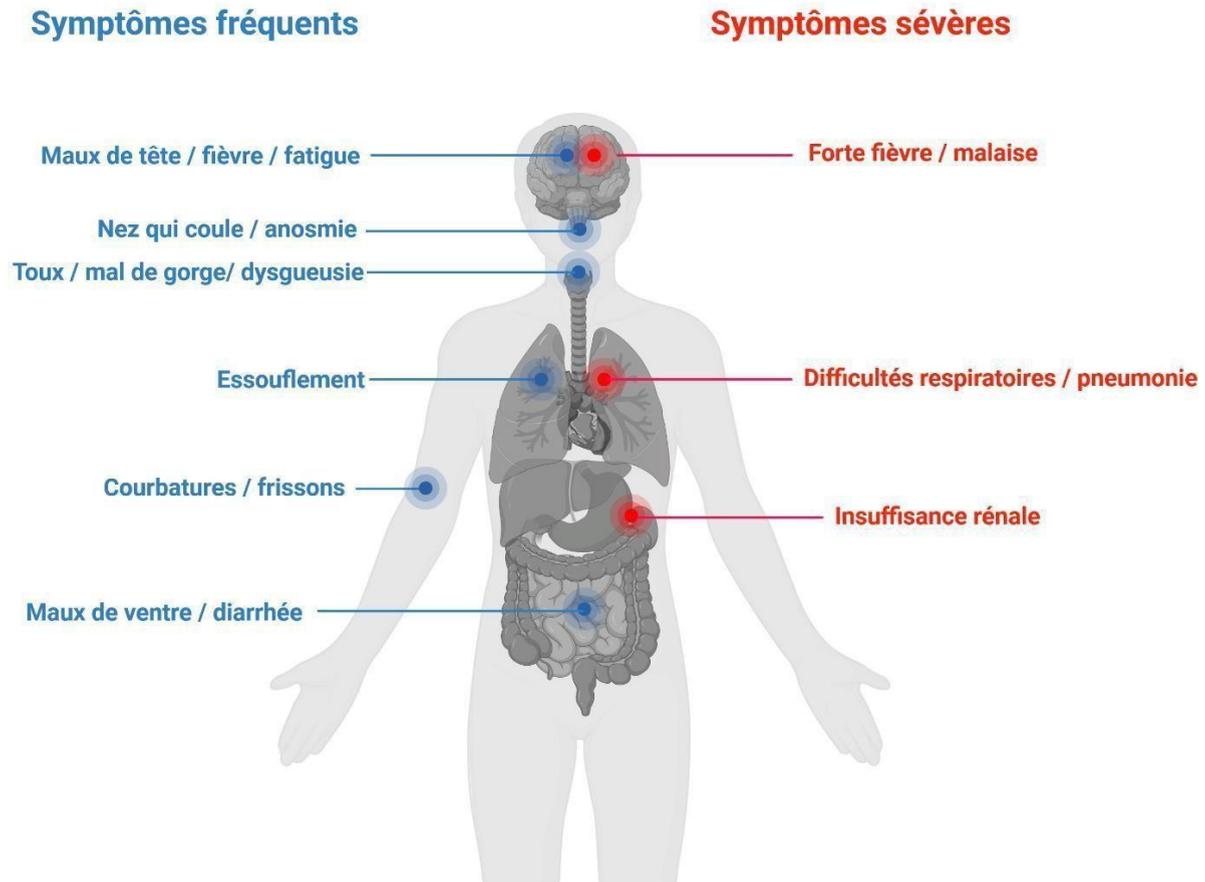


Figure 12 : Schéma descriptif des symptômes de la COVID-19

En bleu les symptômes assez fréquents et modérés et en rouge les symptômes moins courants et plus sévères. Créée avec Biorender.

3.2. Physiopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2

Les premières cellules ciblées par le SARS-CoV-2 lors d'une infection sont les cellules multiciliées du nasopharynx ou de la trachée ainsi que les cellules sustentaculaires dans la muqueuse olfactive^{140,141}. L'infection de ces cellules causent une inflammation importante menant à une perte de la structure du tissu épithélial ainsi que de la structure et de la fonction des neurones sensoriels olfactifs, causant une diminution ou une perte de l'odorat chez de nombreux patients COVID-19^{140,141}. Plusieurs études menées sur des modèles animaux ont également montré une atteinte de leurs

fonctions olfactives après infection avec le SARS-CoV-2. Des souris transgéniques K18-hACE2 infectées par voie intranasale montrent une perte de l'odorat pendant plusieurs semaines ainsi qu'une invasion neuronale par voie transmucosale excepté pour le variant omicron¹⁴². D'autres études confirment ces résultats chez des souris dont l'expression du récepteur ACE2 est médiée par le promoteur ACE2 murin endogène. Le réel potentiel neuroinvasif du SARS-CoV-2 reste débattu car dans ces études en modèle murin, l'expression ectopique du récepteur ACE2 pourrait induire un biais. Chez le hamster, une anosmie est observée pendant quelques jours suite à l'infection. Quelques études suggèrent que ce signe clinique serait lié à l'infection du bulbe olfactif^{140,143,144}. Dans nos expériences sur ce modèle et celles d'autres équipes, aucune infection du système nerveux central n'a été observée chez le hamster. En revanche, il est montré comme chez l'humain, une infection importante des cellules sustentaculaires de l'épithélium olfactif dans la cavité nasale. Suite à cette infection, une infiltration massive de cellules immunitaires, notamment des neutrophiles, provoquent des dommages tissulaires et une desquamation de l'épithélium olfactif pouvant être à l'origine de l'anosmie.

Si l'infection n'est pas restreinte à la cavité nasale, le virus peut alors se disséminer le long de l'arbre trachéo-bronchique et atteindre le tractus respiratoire inférieur. Il va alors infecter les alvéoles et causer une inflammation limitant les échanges gazeux. Il a été montré dans des études *in vivo* et *in vitro* que les cellules alvéolaires majoritairement infectées sont les cellules alvéolaires de type 2 (AT2). Les AT2 sont les cellules alvéolaires qui vont produire le surfactant nécessaire pour la lubrification des poumons afin de limiter la tension de surface dans les alvéoles durant la respiration. De plus, les AT2 sont les cellules progénitrices des AT1, qui sont les cellules recouvrant la surface alvéolaire et qui régulent les échanges gazeux¹⁴⁵.

L'inflammation excessive des alvéoles pulmonaires peut provoquer chez certains patients un COVID-19 sévère, entraînant des dégâts vasculaires et une perte de l'aération du tissu pulmonaire. Ces patients présentent un fort relargage de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, IL-8 et TNF α ainsi que des concentrations élevées de marqueurs inflammatoires comme D-dimer, ferritine et CRP^{146,147}. Des études histologiques sur des patients SDRA ont permis de montrer des dommages

histologiques pulmonaires connus sous le nom de dommage alvéolaire diffus (DAD)¹⁴⁸. Un DAD chez des personnes décédées du COVID-19 est caractérisé par une première phase d'exsudation avec un œdème interstitiel et intra-alvéolaire, de la mort cellulaire des pneumocytes, une thrombose microvasculaire, une congestion des capillaires et une inflammation, puis une seconde phase avec une hyperplasie des AT2 qui prolifèrent afin de tenter de régénérer les alvéoles¹⁴⁵. Ces dégâts vont alors provoquer un déséquilibre de la balance coagulation-fibrinolyse, limitant les échanges en oxygène ainsi que la formation de thrombus de fibrine. Ces phénomènes sont donc causés par un dommage de l'épithélium cellulaire, pouvant être induit par de nombreux stimuli comme une hypoxie, des cytokines ou des chimiokines¹⁴⁵. La présence des cytokines et des chimiokines va entraîner le recrutement de cellules immunitaires telles que les macrophages et les neutrophiles qui contribuent à une coagulation du sang exacerbée menant à la formation de thrombose¹⁴⁹. Par exemple, une augmentation du nombre de neutrophiles est associée à une maladie sévère. Les neutrophiles lors de l'inflammation, vont subir ce qu'on appelle une NETose (Neutrophil Extracellular Trap). Suite à la désorganisation de leur enveloppe nucléaire, il y a libération de leur chromatine dans le milieu extracellulaire. Ensuite, les fibres de chromatine extracellulaires vont former un réseau appelé NET qui permet la capture des pathogènes¹⁵⁰. Cependant, durant l'infection par le SARS-CoV-2, ces NET vont activer un axe impliqué dans le processus de coagulation qui va alors être stimulé de façon exagérée et mener à la formation de thrombose pouvant provoquer une embolie pulmonaire¹⁵¹. Des études ont également mis en évidence le rôle du complément dans les dégâts pulmonaires liés à l'infection qui, lorsqu'il va être activé, va activer des cellules T cytotoxiques exprimant CD16 qui vont causer des dégâts dans les cellules endothéliales microvasculaires et le relargage des chimiokines pro-inflammatoires IL-8 et CCL2^{145,151,152}. La formation de thrombus de fibrine est contrecarrée par la voie de fibrinolyse (Figure 13). Des études ont montré que lors d'une COVID-19 sévère, les macrophages, les monocytes dérivés des macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK (natural killer) sont fortement présentes. Des analyses par single-cell sequencing d'échantillons nasopharyngés ont également montré que les

macrophages inflammatoires sont enrichis chez les patients COVID-19 sévères et qu'ils expriment CCL2, CCL3, CCL20, CXCL1, CXCL3, CXCL10, IL-8, IL1 β et TNF α ¹⁴⁵.

La seconde phase du DAD est une phase de prolifération caractérisée par une hyperplasie des AT2. Des études ont montré que les patients atteints par un SDRA associé à la COVID-19 ont des cellules AT1 et AT2 qui expriment plus faiblement des marqueurs de différenciation. En effet, leurs cellules AT2 montrent un niveau d'expression plus faible de ETV5 qui code pour un facteur de transcription nécessaire pour maintenir l'identité des cellules AT2 ainsi que pour la différenciation des AT1¹⁵³. Les cellules AT1 durant une COVID-19 sévère ont également une expression diminuée de CAV1, un marqueur tardif de la maturation des AT1¹⁵⁴. Ces données suggèrent que le SARS-CoV-2 va inhiber la différenciation des AT2 en AT1. Les cellules sont alors dans un état appelé DATP (Damage-associated transient progenitors) qui est associé à des dégâts pulmonaires. Cet état est également associé à une prolongation de l'activation de la voie IFN- I et IFN-III¹⁴⁵.

La dernière étape de SDRA associé à la COVID-19 est une phase fibrotique. Des études ont montré que le niveau d'expansion des fibroblastes et le degré de fibrose corrèle avec la durée de la maladie, indiquant que la fibrose évolue tout au long de la COVID-19. De nombreux fibroblastes présents dans le poumon de patients infectés expriment CTHRC1, un marqueur des fibroblastes pathologiques, contribuant à la formation de matrice extracellulaire pathologique qui bloque la régénération des poumons induisant des dégâts respiratoires chroniques¹⁴⁵.

Pour résumer, lorsque la réponse immunitaire initiale n'est pas efficace pour contrer l'infection, une seconde phase d'amplification de la réponse inflammatoire est mise en place. Cette réponse exacerbée va induire une surproduction de cytokines, chimiokines et de cellules immunitaires innées. Cette phase va être délétère pour certains patients dont la maladie va être aggravée.

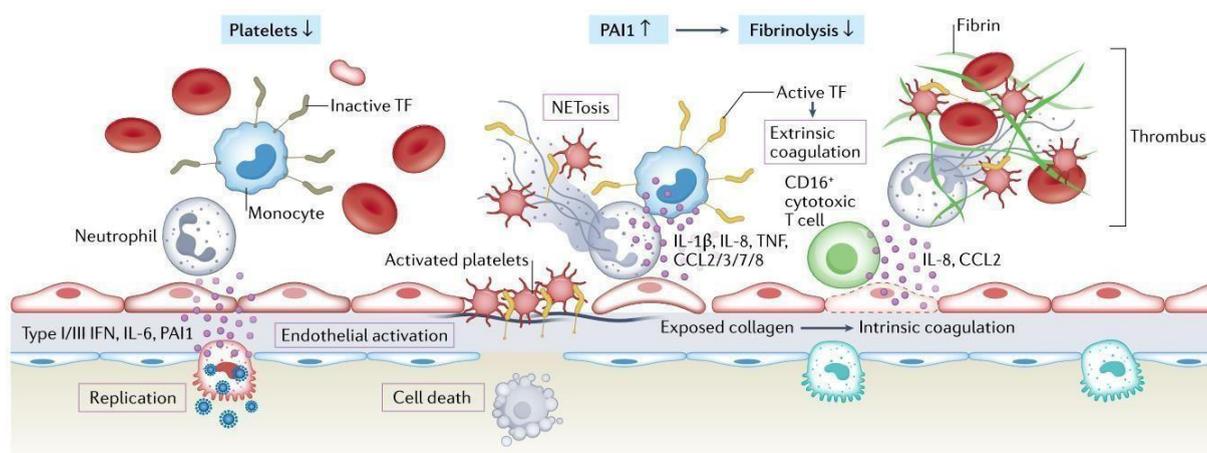


Figure 13 : Immunothrombose des COVID-19 sévères.

Le COVID-19 est marqué par un déséquilibre de la coagulation et de la fibrinolyse, qui peut commencer par la perturbation de l'épithélium alvéolaire. Ce déséquilibre est caractérisé par une première phase d'exsudation avec un œdème interstitiel et intra-alvéolaire, de la mort cellulaire des pneumocytes, une thrombose microvasculaire, une congestion des capillaires et une inflammation, puis une seconde phase avec une hyperplasie des AT2 qui prolifèrent afin de tenter de régénérer les alvéoles. Ces dégâts vont alors provoquer un déséquilibre de la balance coagulation-fibrinolyse limitant les échanges en oxygène ainsi que la formation de thrombus de fibrine. Ces phénomènes sont causés par un dommage de l'épithélium cellulaire, pouvant être induit par de nombreux stimuli comme une hypoxie, des cytokines ou des chimiokines. D'après Lamers et al, 2022.

4. Les franchissements de barrière d'espèce par le SARS-CoV-2

Les coronavirus ont une grande capacité à franchir la barrière d'espèce. Tous les coronavirus humains ont une origine animale et résultent d'une adaptation à l'espèce humaine plus ou moins récente. Par exemple, le SARS-CoV et le MERS-CoV ont pour origine des virus relativement proches génétiquement infectant des chauves-souris. Ces virus se sont ensuite adaptés chez la civette pour le SARS-CoV et le dromadaire pour le MERS-CoV avant d'être transmis à l'Homme (Figure 14). Les mécanismes permettant les franchissements de barrière d'espèce ne sont pas totalement connus.

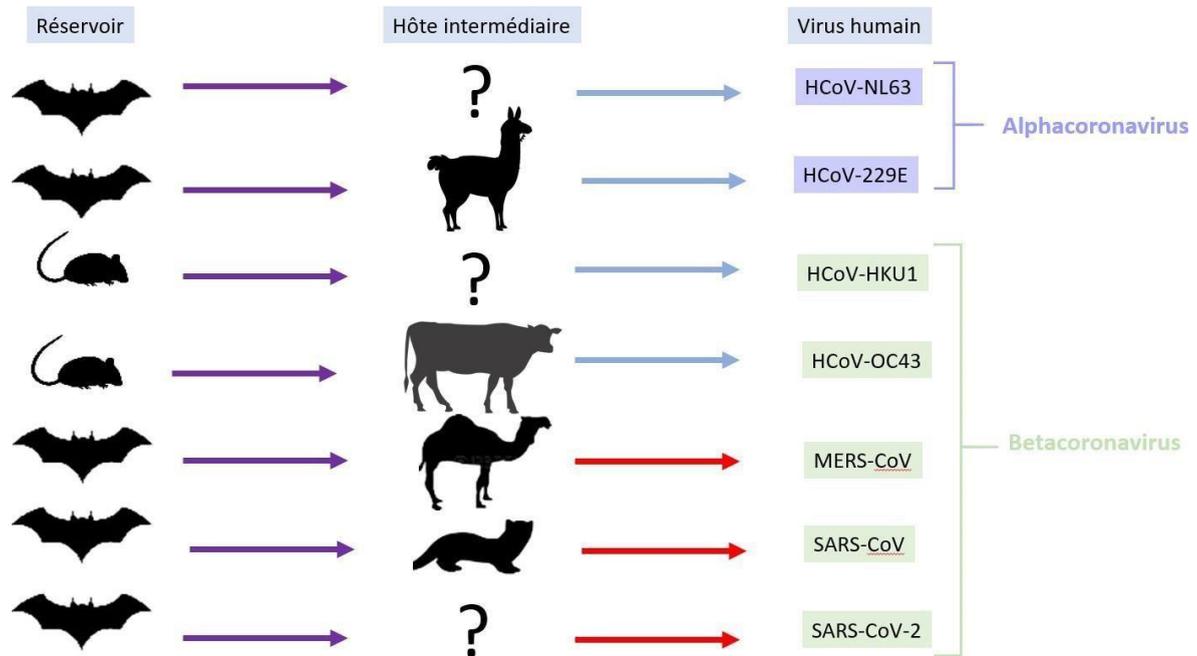


Figure 14 : Franchissement de barrière d'espèce de différents coronavirus humains

Les coronavirus HCoV-NL63, HCoV-229E, MERS-CoV, SARS-CoV et SARS-CoV-2 ont tous pour hôte réservoir la chauve-souris tandis que HCoV-HKU1 et HCoV-OC43 aurait comme hôte réservoir un rongeur. Ils sont ensuite adaptés à l'Homme via un hôte intermédiaire connu ou non.

4.A. Origine animale du SARS-CoV-2

De nombreuses études s'intéressent à l'origine du SARS-CoV-2 afin de comprendre comment ce virus a pu être introduit dans la population humaine et prévenir de possibles nouvelles émergences. L'origine du SARS-CoV-2 n'est pas actuellement connue mais des études suggèrent que ce virus s'est transmis à l'Homme par l'intermédiaire d'une espèce animale.

Les chauves-souris, appartenant en particulier à la famille des Rhinolophidae sont de bonnes candidates pour être l'hôte naturel du virus. Plusieurs *Sarbecovirus* (Bat-SARSCoV-like) proches du SARS-CoV-2 ont été identifiés depuis de nombreuses années chez ces espèces de chauve-souris. En 2013, une étude a isolé pour la

première fois un *Sarbecovirus* de chauve-souris capable d'utiliser le récepteur ACE2 humain, suggérant qu'un virus de chauve-souris soit capable d'infecter l'Homme sans un processus d'adaptation par une espèce animale intermédiaire¹⁵⁵. De nombreux Sarbecovirus de Rhinolophes ont une forte homologie avec le SARS-CoV-2. Ainsi, RatG13, un Bat-CoV isolé en Chine en 2013 chez *R. affinis* possède 96.1% de similarité sur le génome complet avec SARS-CoV-2. En 2020, plusieurs virus appelés BANAL-52, -103, -236 ont été isolés au Laos chez *R. malayanus*. BANAL-52 possède 96.8% de similarité de séquence sur le génome complet avec SARS-CoV-2¹⁵⁶. Ces virus peuvent aussi reconnaître le récepteur ACE2 humain et infecter des cellules humaines. Ils pourraient être les ancêtres les plus proches du SARS-CoV-2¹⁵⁶. Cependant le manque de contact direct entre les chauves-souris et les humains laisse penser que si les chauves-souris sont les hôtes originels du SARS-CoV-2, il serait transmis à l'Homme via un hôte intermédiaire qui n'est pour l'instant pas identifié¹⁵⁷.

Au cours de cette thèse, nous nous intéresserons à différents Bat-SARSCoV-like plus ou moins proches du SARS-CoV-2. Le [tableau 1](#) résume ces différents Bat-SARSCoV-like, leur origine et leur similarité avec le SARS-CoV-2.

Tableau 2 : Bat-SARSCoV-like et similarité avec SARS-CoV-2.

Bat-CoV	Année et pays de découverte	Espèce	Similarité de séquence complète avec SARS-CoV-2 (%)	Nbr acide aminé commun sur RBD de Spike
BANAL-52	2020, Laos	<i>R. malayanus</i>	96.8 %	16/17
RATG13	2013, Chine	<i>R. affinis</i>	96.1%	11/17
BANAL-103	2020, Laos	<i>R. pusillus</i>	94,33%	16/17
BANAL-236	2020, Laos	<i>R. marshallis</i>	94,94%	15/17

4.B SARS-CoV-2 et animaux

On estime qu'une soixantaine d'espèces animales est sensible à l'infection au SARS-CoV-2 (Figure 15). Ces infections chez les animaux sont préoccupantes car le virus peut s'y adapter, évoluer et provoquer ultérieurement de nouvelles émergences virales chez l'Homme.

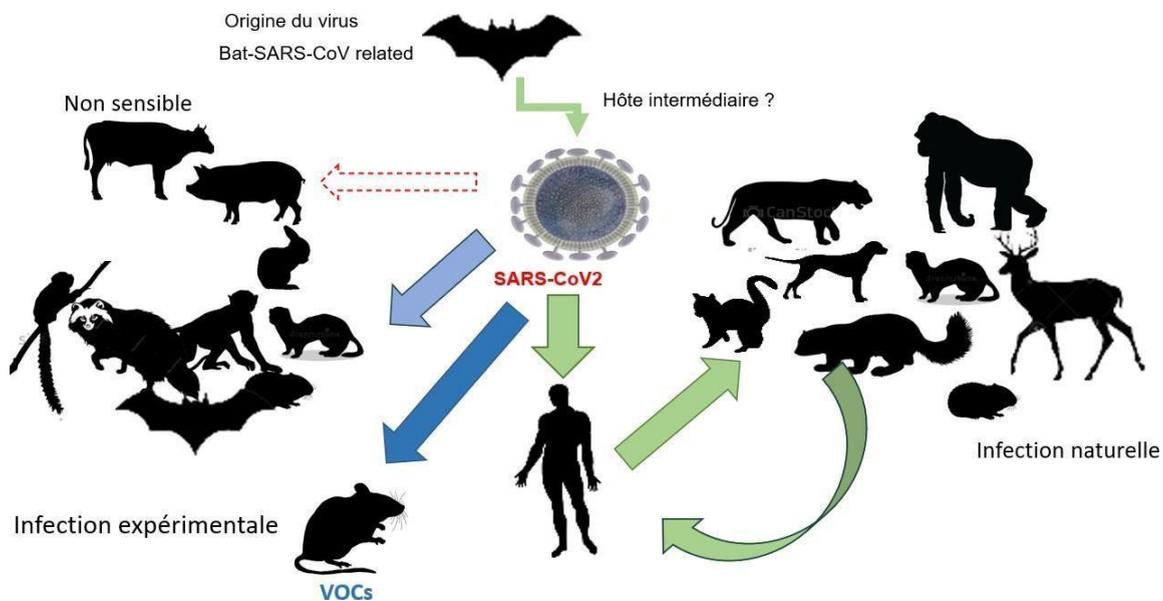


Figure 15 : Le franchissement de la barrière d'espèce par le SARS-CoV-2

De nombreuses espèces animales sont sensibles à l'infection par le SARS-CoV-2. D'autres comme les bovins et les porcins ne le sont pas. Flèches bleues : infections expérimentales. Flèches vertes : Infections naturelles. VOC : Variants of Concerns.

4.B.1. Infections naturelles

4.B.1.a. Visons

En avril 2020, les premiers cas d'infection de vison dans des fermes aux Pays-Bas ont été rapportés. Plusieurs séquençages ont permis de classer les isolats dans 5 clusters dont deux provenaient de la souche originale de Wuhan et dont trois possédaient la mutation D614G¹⁵⁸. L'épidémie chez les visons s'est très vite rependue et plusieurs fermes dans le monde ont été touchées. Au Danemark, après la détection de cas dans

certaines fermes du pays, les autorités ont décidé d'abattre tous les visons même s'ils ne présentaient pas de signes cliniques (environ 13 millions) et de clôturer les fermes dans tout le pays jusqu'à fin 2021¹⁵⁹. Cette action a causé de lourdes pertes économiques pour le Danemark puisque le pays est l'un de plus grands producteurs de peau de vison. Cette décision a été motivée du fait qu'un des variants identifiés chez ces visons possédait une combinaison de mutations uniques lui permettant de passer du vison à l'Homme. D'autres pays ont été touchés dans leur fermes à visons comme l'Espagne, la France, la Suède, la Grèce, la Pologne, l'Italie, la Lituanie, le Canada et les Etats- Unis. La France possédait quatre fermes de visons. Les premiers cas de vison infectés par le virus en France ont été détectés le 22 novembre 2020 dans une ferme de l'Eure- et-Loir¹⁶⁰. Les 1000 animaux de la ferme ont alors été abattus par précaution. Chez les visons, l'infection par SARS-CoV-2 cause des signes cliniques respiratoires, une perte de l'appétit et parfois la mort des animaux¹⁶¹.

4.B.1.b. Chats

Les animaux d'élevage ne sont pas les seuls à être réceptifs au virus. Des cas d'infection chez les animaux de compagnie comme le chat et le chien ont été détectés. C'est en Belgique que le premier cas de chat infecté par le SARS-CoV-2 a été identifié au début de la pandémie¹⁶². En mars 2021, une étude a montré que sur 70 chats infectés par le SARS-CoV-2, 54% étaient asymptomatiques et 46% présentaient des signes cliniques associés à l'infection¹⁶³. Parmi les 32 chats malades, 26 ont guéri tandis que six d'entre eux sont morts durant l'infection (3 par euthanasie et 3 dus à des complications médicales). Certain des chats décédés avaient des pathologies cardiaques mais aucun lien direct avec l'infection SARS-CoV-2 n'a été fait. Chez les cas symptomatiques modérés, les chats récupèrent dans les 7 à 15 jours après l'apparition des symptômes¹⁶³. La forte proximité des propriétaires de chats avec leur animal facilite la transmission du virus, ce qui pourrait expliquer le nombre important de chats infectés. Des cas de chats infectés par des visons dans des fermes touchées par l'épidémie ont également été décrits¹⁶⁴. A noter qu'un cas de transmission chat-Homme a été rapporté dans le sud de la Thaïlande¹⁶⁵. D'autres félidés sont sensibles

au virus, avec notamment des cas détectés chez des tigres, des lions, des cougars, des léopards et des lynx¹⁵⁷.

4.B.1.c. Cerfs de Virginie

Chez les animaux sauvages, les cerfs de Virginie en Amérique du Nord sont très réceptifs à l'infection par le SARS-CoV-2. Des analyses par RT-PCR ont montré que 35.8% des cerfs de Virginie testés dans l'Ohio entre janvier et mars 2021 étaient positifs au SARS-CoV-2¹⁶⁶. Les variants détectés suivent les vagues de variants détectés chez l'Homme, attestant de nombreux événements de transmission de l'Homme vers le Cerf de Virginie. Cependant un variant Alpha-like a également été détecté chez ces cerfs montrant une adaptation du virus à son hôte¹⁶⁷. De plus, il a été montré la présence de VOCs qui ne circulent plus chez l'Homme ce qui laisse penser que les Cerfs de Virginie pourraient devenir des espèces réservoirs d'anciens variants¹⁶⁸. L'adaptation du virus à un nouvel hôte animal, la grande population de Cerfs de Virginie en Amérique du Nord et leur proche contact avec les Hommes sont des éléments préoccupants qui pourraient favoriser l'émergence de nouvelles souches de SARS-CoV-2 chez l'Homme¹⁶⁹.

4.B.1.d. Hamsters

Des cas d'infections naturelles ont été décrits chez le hamster, notamment dans une animalerie à Hong Kong en Chine. Il s'agissait d'infections dues au variant delta et qui furent la source d'infection humaine, notamment une employée de l'animalerie où ont été détectés les animaux infectés¹⁷⁰.

4.B.2. Infections expérimentales et modèles animaux

4.B.2.a. Hamster

Le hamster s'avère être un bon modèle animal pour étudier les infections SARS-CoV-2 et plus précisément les hamsters syriens (*Mesocricetus auratus*). Les hamsters syriens sont déjà utilisés pour l'étude d'autres virus respiratoires comme le virus Influenza ou des adenovirus^{171,172}. Le hamster Syrien peut être infecté naturellement

par tous les variants du SARS-CoV-2. L'infection par le SARS-CoV-2 chez le hamster syrien va provoquer des symptômes légers à modérés avec une léthargie, une atteinte respiratoire et une perte de poids progressive qui débute 1 jour ou 2 après l'infection.¹⁷³ Une hyposmie est observable chez les animaux infectés qui dure au moins 11 jours.¹⁷⁴ Les animaux guérissent environ 2 semaines après l'infection. Tout comme chez l'être humain, les hamsters mâles et âgés développent une maladie plus sévère que les hamsters jeunes et femelles.^{173,175} L'infection chez le hamster est associée à un niveau élevé de réplication virale et des dommages tissulaires importants dans la muqueuse olfactive et le poumon qui sont visibles en histologie.^{176,177} Une surexpression de chimiokines et cytokines inflammatoires dans le tractus respiratoire supérieur et inférieur sont aussi observées et peuvent durer plusieurs jours. Il est possible aussi d'étudier les voies de transmission du virus SARS-CoV-2 grâce à ce modèle, notamment sa transmission aérienne.¹⁷⁸ Ainsi, l'infection SARS-CoV-2 chez le hamster mime assez bien l'infection chez l'Homme ce qui en fait le modèle animal couramment utilisé pour l'étude de l'infection et pour des essais de molécules thérapeutiques.¹⁷³

4.B.2.b. Souris

Les souris ne sont naturellement pas un bon modèle pour l'étude du SARS-CoV-2. En effet, le récepteur ACE2 murin ne permet pas une liaison efficace avec la protéine virale Spike ce qui empêche l'entrée du virus dans la cellule. Les souris étant des animaux facilement utilisables en laboratoire, différentes stratégies ont été mises en place afin de pouvoir les utiliser comme modèle d'infection.¹⁷³

Une première méthode proposée a été la génération de souris génétiquement modifiées pour exprimer le récepteur ACE2 humain. Trois lignées de souris transgéniques exprimant hACE2 existent et diffèrent par le promoteur permettant l'expression du récepteur : soit un promoteur tissu-spécifique (par exemple, Krt18 pour les cellules épithéliales), soit un promoteur universel (CMV suivi par un promoteur beta-actine de poulet) soit un promoteur murin ACE2 endogène.^{173,179-181}

Il est également possible de générer des souris transduites avec des adenovirus ou des virus adeno-associé exprimant le récepteur ACE2 humain. Cette approche permet une expression transitoire du récepteur et peut être utilisée avec différentes lignées de souris. Cette méthode est notamment utilisée pour les études sur le MERS-CoV et SARS-CoV-2.^{173,182,183}

Une autre approche consiste à modifier le virus pour qu'il puisse infecter les souris.¹⁷³ Perlman et son équipe ont généré des virus SARS-CoV-2 adaptés au modèle murin et virulents.¹⁸⁴ Pour ce faire, ils ont dans un premier temps inséré une séquence codant pour la substitution N501Y au niveau du gène de la spike de la souche Wuhan-hu-1 du SARS-CoV-2 par génétique inverse. Cette substitution est essentielle pour la liaison de la protéine Spike au récepteur ACE2 murin. Le virus est alors capable d'infecter les souris BALB/c mais l'infection est peu symptomatique. Afin de rendre le virus plus virulent, les chercheurs ont réalisé plusieurs passages du virus en isolant le virus à partir du poumon des souris infectées et en le ré-inoculant à des souris naïves et ce pendant 30 passages. Le virus est alors devenu très virulent jusqu'à être létal pour certaines souris. Plusieurs mutations ont été détectées sur la protéine spike de ce virus, appelé virus MA30¹⁸⁴ (Figure 16). La mutation Q498R (Q493R chez d'autres isolats), détectable dès le 10^{ème} passage semble augmenter la capacité du virus à se lier au récepteur.^{184,185} Les mutations Q493R et K417N sont également présentes au 30^{ème} passage. Ces mutations semblent être impliquées dans l'augmentation de la stabilité de la protéine virale et de son affinité avec le récepteur ACE2 murin.¹⁸⁴ On retrouve également chez certains isolats la mutation E484K mais elle ne semble pas être requise pour la virulence chez les souris. Certaines protéines non structurales comportent également des mutations. Les mutations T295I de la protéine Nsp4 et T67A de la protéine Nsp9 ont été détectées au 20^{ème} passage. Elles ont été décrites précédemment dans un modèle de souris adaptée au SARS-CoV-2 comme causant une maladie sévère chez la souris BALB/c mais pas létale suggérant donc que ces mutations sont importantes dans la virulence du virus mais pas suffisantes pour induire la mort.¹⁸⁶ De manière intéressante, la mutation T67A de la protéine Nsp9 a déjà été décrite dans l'étude d'un modèle murin létal de SARS-CoV.¹⁸⁷ A noter également que ces mutations sont retrouvées chez les variants Beta, Gamma et Omicron.

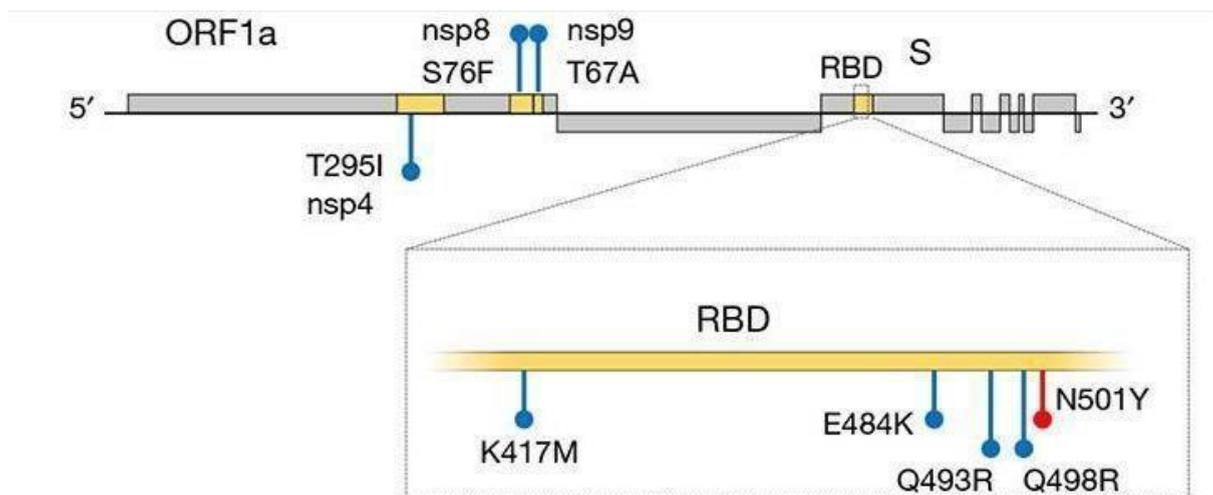


Figure 16 : Mutations génétiques identifiées dans la souche murinisée MA-30

La mutation N501Y dans le domaine RBD de la protéine Spike est essentielle pour la liaison du virus au récepteur ACE2 murin. On retrouve également des mutations chez certaines protéines non structurales comme Nsp4, Nsp8 ou Nsp9. D'après Wong et al, 2022.

4.B.2.c : Furets

Les furets peuvent également être utilisés comme modèle d'étude de l'infection par le SARS-CoV-2. L'infection chez les furets va être limitée aux voies respiratoires supérieures avec une réplication virale qui va être plus robuste au niveau de la cavité nasale. La sévérité de la maladie va être globalement moyenne avec comme signe clinique principal une fièvre élevée dans les deux jours après l'infection avec un pic au bout de 4 jours. Une toux occasionnelle peut être détectée mais pas de perte de poids ou de mortalité, ce qui ne fait pas du furet un bon modèle pour étudier la pathogénicité du virus.¹⁸⁸ Cependant, il a été montré que le SARS-CoV-2 peut se transmettre entre furets par contact direct ou indirect, ce qui en fait un bon modèle pour étudier les mécanismes de transmission de ce virus¹⁸⁹.

4.B.2.d : *Primates non-humains*

Certaines espèces de primates non humains comme les macaques rhésus, les macaques cynomolgus, les marmosets communs et les babouins sont sensibles à l'infection par le SARS-CoV-2. L'infection provoque généralement des symptômes respiratoires modérés ou moyens avec une infection des voies respiratoires et des lésions pulmonaires.¹⁹⁰ Comme chez les humains, les macaques rhésus développent une maladie plus sévère avec l'âge, en faisant un bon modèle pour l'étude de la sévérité de la maladie âge-dépendante.¹⁹¹ Ces modèles sont surtout utilisés pour l'évaluations d'agents thérapeutiques ou de vaccin contre la COVID-19 avant les essais cliniques.¹⁹²

III. SARS-CoV-2 et Interféron

A. Introduction

Lorsqu'une cellule est infectée par un pathogène, de nombreux mécanismes vont être mis en place pour contrer l'infection. La première défense mise en place est la réponse innée. Elle est majoritairement localisée au niveau des barrières épithéliales et conduira à une réponse immunitaire adaptative. De manière générale, la première étape de la réponse innée va être la reconnaissance d'une large variété de motifs conservés chez les agent pathogènes, appelé PAMPs (pathogen associated molecular pattern) par des récepteurs spécifiques de l'immunité innée, appelés PRR (pattern recognition receptor), retrouvés chez les cellules épithéliales, les macrophages et les cellules dendritiques résidentes. La détection des PAMPs par les PRR va induire une cascade de signalisation menant à la synthèse d'effecteurs moléculaires qui vont médier la réponse immunitaire. Parmi ces effecteurs moléculaires, nous retrouvons les cytokines qui sont divisées en six groupes : les interleukines (IL), les Tumor Necrosis Factor (TNF), les chimiokines, les Transforming growth factors (TGF), les hemopoietic growth factors et les interférons (IFN). La production de cytokines va également entraîner le développement de cellules adaptatives B et T permettant la clairance du virus. Cependant, il est connu que certains virus respiratoires comme la grippe peuvent entraîner une réponse inflammatoire exacerbée qui devient alors délétère pour l'hôte,

on parle alors de tempête cytokinique. Le SARS-CoV-2 peut également causer ce phénomène, ce qui va conduire à une COVID-19 sévère avec de nombreux dégâts pulmonaires.

Dans ce chapitre, nous décrivons dans un premier temps le système IFN puis nous nous intéresserons au rôle de l'IFN lors d'une infection par SARS-CoV-2, ainsi que son implication dans la physiopathologie de l'infection.

B. Généralité sur le système Interféron

Les IFN sont un groupe de cytokines divisées en trois familles : Le type I (IFN-I), le type II (IFN-II) et le type III (IFN-III). L'IFN-I est constitué chez l'humain de 13 différents sous-types d'IFN α et d'un sous-type de chaque IFN β , IFN ϵ , IFN τ , IFN κ , IFN ω , IFN δ , and IFN ζ .¹⁹³ L'IFN-III inclut chez l'humain l'IFN- λ 1 (IL-29), l'IFN- λ 2 (IL-28A), l'IFN- λ 3 (IL-28B) et l'IFN- λ 4.¹⁹³ Chez la souris, l'IFN-III est représenté par seulement deux sous-types IFN- λ 2 et IFN- λ 3.¹⁹⁴

L'IFN-I joue un rôle central dans la mise en place d'un état antiviral dans la cellule infectée et les cellules avoisinantes. Il permet de limiter la propagation du virus, améliore la présentation des antigènes et la production de chimiokines par les cellules immunitaires. Un autre rôle important de l'IFN-I est son effet sur la réponse immunitaire adaptative puisqu'il augmente la production d'anticorps ainsi que les effecteurs de la réponse des cellules T. Il peut être produit par la majorité des cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes mais les cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs) ont été montrées comme étant la source majeure de production des IFN-I.^{193,195,196} Tout comme l'IFN-I, l'IFN-III joue un rôle dans la mise en place de l'immunité antivirale, cependant étant donné l'expression limitée de son récepteur, son activité antivirale va être retrouvée principalement au niveau des muqueuses intestinales et dans le tractus respiratoire supérieur et inférieur (Figure 17). L'IFN-II est composé d'un seul membre l'IFN- γ , il est produit majoritairement par les cellules NK et les cellules lymphocytes T. La stimulation à l'IFN- γ va améliorer la présentation de l'antigène aux ACP (cellules présentatrices

agents pathogènes, on retrouve par exemple, les lipopolysaccharides des bactéries Gram négative ou les acides nucléiques viraux. Il existe quatre grandes familles de PRR : les TLR (Toll-like réceptors) ; les RLR (Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors) qui incluent RIG-I, MDA5 (Melanoma-associated differentiating protein 5) et LGP 2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2) ; les NLR (NOD-like receptor family et les récepteurs de type lectine-C.¹⁹⁸ Les TLR font partie des PRR les mieux caractérisés. Chez l'Homme, on retrouve 10 TLR différents. Les TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont retrouvés à la surface de la cellule tandis que les TLR 3, 7, 8 et 9 sont exprimés à la surface des compartiments endosomaux et sont impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux. En effet, TLR3 reconnaît les ARN double brin produits pendant la réplication virale tandis que les TLR 7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin. Le TLR9 quant à lui, reconnaît les virus à ADN. Suite à la détection des PAMPs par les TLR, une voie de signalisation va être déclenchée via le recrutement des protéines adaptatrices MyD88 pour les TLR 7,8,9 et TRIF pour les TLR 3 et 4. Ceci va aboutir d'un côté à l'activation du facteur de transcription NFκ-B et d'un autre côté au recrutement de kinases comme TBK1 et IKK ϵ qui vont activer les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (Interferon response factor 3/7) (Figure 17).

Les RLR sont également capables de détecter les PAMPs. RIG-I et MDA5 vont déclencher la réponse inflammatoire et interféron via l'adaptateur MAVS (Figure 17).

NF-κB va déclencher la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire comme des cytokines (TNFα et IL-1, IL-6) et des chimiokines comme CCL2 ou CXCL8. IRF3 et IRF7 sont impliqués dans la synthèse de gènes codants pour les IFN-I et III.

2. La voie de réponse à l'IFN-I et -III

L'IFN-I est reconnu par un récepteur spécifique hétérodimérique, composé de deux sous-unités, IFNAR1 de faible affinité et IFNAR2 de haute affinité. Malgré sa plus faible affinité au ligand, IFNAR1 semble être responsable de la distinction entre les différents sous-types d'IFN-I.¹⁹⁹

L'IFN-III est reconnu par un récepteur également composé de deux sous-unités : IL-10R2 qui est largement exprimée et IFN λ R1 exprimée préférentiellement par les cellules épithéliales au niveau des barrières mucosales et par les leucocytes. La sous-unité IL-10R2 est également impliquée dans la voie de signal d'IL-10, IL-22 et IL-26. ⁵

Les récepteurs IFNAR1 et IFNAR2 sont associés à des kinases JAKs (Janus-activated kinases) : la tyrosine kinase 2 (TYK2) et la Janus kinase 1 (JAK1) respectivement. IL-10R2 et IFN λ R1 sont également associées à TYK2 et JAK1 mais certaines études suggèrent que l'activation de la voie JAK/STAT médiée par l'IFN-III peut se faire de façon indépendante de TYK2. ²⁰⁰ La liaison de l'IFN-I ou de l'IFN-III à leurs récepteurs respectifs va induire l'activation des kinases par auto-phosphorylation. Il y a ensuite recrutement des protéines STAT (Signal Transducer and activator of transcription) qui vont également être phosphorylées et former un complexe avec IRF9. La formation du complexe STAT1-STAT2-IRF9 est connu sous le nom de complexe ISGF3 (IFN stimulated Gene Factor 3). Le complexe ISGF3 va alors transloquer dans le noyau et se fixer au motif ISRE (IFN Stimulated Response Element) présent au niveau des promoteurs cibles, ce qui va mener à la synthèse de centaines de protéines codées par les ISG. Les protéines codées par les ISG sont impliquées dans la réponse immunitaire et peuvent être classer dans deux catégories : les ISG antiviraux et les ISG immunomodulateurs/ inflammatoires. Les ISG codant des protéines antivirales comme 2',5'-oligoadenylate (OAS), Mx1, Mx2 ou Protein kinase R (PKR) ne sont pas sensibles à l'affinité de liaison des IFN et vont inhiber la réplication virale via différents mécanismes, comme la dégradation de l'ARN viral ou l'inhibition de la transcription et de la traduction de l'ARNm viral. Les ISG immunomodulateurs/ inflammatoires comme *CXCL11*, *IL-8* et *IRF1* ont besoin d'une forte affinité entre l'IFN et le récepteur pour être activés ^{193,201,202}. Des différences existent entre les cinétiques d'expression des ISGs et les réponses inflammatoires induites par l'IFN-I et -III.

C. Rôle de la réponse IFN dans la physiopathologie associée à l'infection par le SARS-CoV-2

Lors d'une infection par le SARS-CoV-2, il a été montré qu'il y a une réponse IFN-I moins importante et plus altérée chez les patients présentant une COVID-19 sévère.

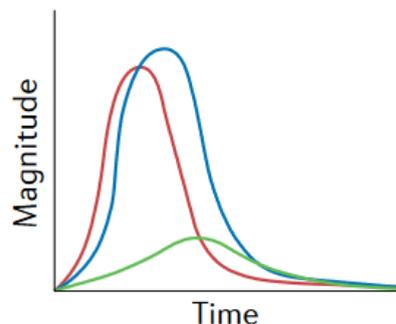
Cette observation est aussi faite lors d'infection par les autres coronavirus hautement pathogènes tandis qu'avec les coronavirus peu pathogènes on retrouve une réponse IFN-I élevée. ²⁰¹ Différentes études indiquent que les IFN-I et III sont peu ou pas du tout retrouvés dans le sang de patients hospitalisés pour une COVID-19 sévère. ¹⁹³ Des études similaires réalisées sur des échantillons nasopharyngés de patients gravement atteints concluent également à une réponse IFN-I et III diminuée dans les cellules épithéliales nasales. ²⁰³ Toutes ces études permettent de mettre en avant le rôle de l'IFN-I et de l'IFN-III dans la protection contre l'infection au SARS-CoV-2. Cependant d'autres études indiquent qu'un niveau élevé d'IFN-I et III est corrélé avec une COVID-19 sévère. Par exemple, une étude montre qu'un niveau élevé d'IFN- α dans le sang à 5-10 jours post-infection est lié à une maladie grave. ²⁰⁴ Deux autres études montrent que l'expression des IFN-I et III dans les liquides de lavages broncho-alvéolaires (BALF) est plus élevée chez les patients avec une COVID-19 sévère. ^{205,206} Il semblerait que l'effet bénéfique ou délétère de l'IFN soit déterminé par le moment et la localisation de la réponse IFN. En effet, une réponse IFN précoce et localisée au niveau du tractus respiratoire permet un contrôle de la propagation virale ainsi qu'une protection contre une maladie sévère tandis qu'une réponse IFN tardive et systémique induirait une inflammation excessive et une maladie grave (Figure 18). ¹⁴⁵

De plus, une étude a montré qu'environ 10% des patients hospitalisés pour une COVID-19 grave ont des auto-anticorps neutralisant contre les IFN-I, notamment contre les 13 sous-types d'IFN- α , et/ou IFN- ω et plus rarement contre l'IFN- β ^{207,208}. La présence de ces auto-anticorps n'est pas associée à des maladies virales sévères et n'induit pas de pathologie particulière chez ces patients. Ces anticorps ne sont pas trouvés chez les patients infectés développant une COVID-19 asymptomatique ou modéré. La présence de ces anticorps va empêcher la mise en place d'une réponse antivirale innée et donc le contrôle de l'infection. La majorité des patients ayant cette particularité sont des hommes, ce qui pourrait expliquer le risque accru des hommes de développer une pneumonie sévère après infection.

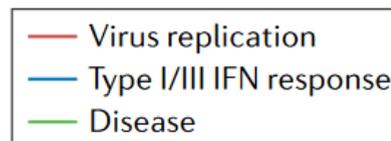
De nombreuses études ont également été faites à l'aide de modèle *in vivo* afin de mieux comprendre la réponse immunitaire innée à l'infection et la pathogénèse du virus. Dans une première étude, Boudewijns et son équipe ont comparé l'infection

SARS-CoV-2 chez la souris et le hamster déficients pour les voies IFNs²⁰⁹. Des souris C57BL/6 déficientes pour le récepteur IFNAR1 (*ifnar1*^{-/-}) ou IL28R (récepteur de l'IFN-III) ont été comparées à des souris WT. Les auteurs ont montré une réplication du virus un peu plus augmentée chez les souris *ifnar*^{-/-} par comparaison aux deux autres groupes. Des analyses transcriptomiques de tissus pulmonaires infectés des souris *ifnar*^{-/-} montrent une corrélation entre les senseurs des acides nucléiques (TLR3/TLR9/DDX58/POLR3A) et la charge virale. De plus, les souris *ifnar*^{-/-} présentent une pathologie pulmonaire modérée. Les mêmes auteurs ont ensuite analysé le niveau de réplication virale dans des tissus pulmonaires de hamsters wild-type, délétés spécifiquement de la réponse IFN-III, ou déficient pour le gène STAT2 qui est commun aux voies IFN-I et -III (*IL28R*^{-/-} et *STAT2*^{-/-}). Ils mettent en évidence l'importance de STAT2 pour bloquer la réplication virale dans le poumon puisque les hamsters déficients STAT2 présentent moins de dégâts pulmonaires que les hamsters WT ou *IL28R*^{-/-}²⁰⁹.

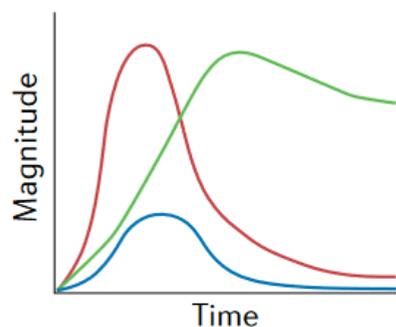
Mild or symptomatic case



- Rapid IFN response
- Few or no symptoms
- Controlled viral replication



Severe COVID-19



- Delayed or poor IFN response
- Increased viral replication
- Potentially fatal disease
- Auto-IFN antibodies
- Mutations in IFN or TLR signalling genes
- Poor plasmacytoid DC responses
- Inflammatory monocytes and neutrophils
- Immunothrombosis

Figure 18 : L'efficacité de la réponse IFN varie au cours du temps lors d'une COVID-19.

Une réponse rapide à l'interféron (IFN) est associée à une réplication virale contrôlée et à une maladie bénigne, tandis qu'une réponse IFN faible ou retardée est associée à une réplication virale importante et à une maladie grave. D'après Lamers et al, 2022.

D. Le traitement interféron comme thérapie contre l'infection par le SARS-CoV-2

La dérégulation des réponses IFN lors de l'infection par SARS-CoV-2 met en avant son importance dans le développement de la maladie mais aussi son potentiel comme cible thérapeutique. De nombreuses études ont montré que les IFN- I (α et β) et IFN- III sont capables d'inhiber la réplication du virus dans différentes lignées de cellules épithéliales (Calu3 et Vero E6).²¹⁰

Jhuti et son équipe ont comparé les résultats de plusieurs essais thérapeutiques utilisant un traitement IFN sur des patients adultes atteints de la COVID-19 entre 2019 et 2021.²¹¹ Parmi ces études, 5 montrent un effet bénéfique de la thérapie par IFN, 4 ne montrent pas ou très peu d'effet tandis que 2 montrent un effet délétère du traitement. La différence de résultats entre ces études peut être due à des grandes variabilités des mesures de résultats, le mode d'administration du traitement, les sous-types d'IFN utilisés et le moment de l'administration du traitement.²¹¹

En effet, une étude comparant 12 IFN-I et 3 IFN-III recombinants a montré que les différents IFN n'inhibent pas la réplication du virus avec la même intensité dans des cellules A549-ACE2. Les IFN- α 8, - β , et - ω semblent être les plus efficaces tandis que l'IFN- λ semble être le moins efficace. Cette étude montre également que les variants Alpha, Gamma et Delta sont plus résistants à l'action des IFN par rapport à la souche ancestrale ²¹². Des études ont également montré qu'un traitement IFN-I ou IFN-III administré dans les phases précoces de la COVID-19 chez l'Homme est efficace pour restreindre la réplication du virus tandis qu'un traitement administré plus tardivement est moins voire pas du tout efficace. ^{145,213}

De multiples essais cliniques ont également été réalisés avec des traitements combinant de l'IFN avec d'autres molécules antivirales. En ce qui concerne l'IFN-I, des essais de traitement en injection sous-cutané d'IFN β -1a seul ou en combinaison avec du lopinavir/ritonavir ou du remdesivir chez des patients hospitalisés n'ont pas été concluant avec très peu ou pas du tout d'effet.²¹⁴ Une étude en essai clinique de phase 2 à Hong Kong avec injection en sous-cutané d'IFN β -1b combiné à du lopinavir/ritonavir a montré une diminution du temps de clairance du virus et de la résolution des symptômes.²¹⁵ Trois études ont testé l'effet de l'IFN β -1a sur l'infection par inhalation.²¹⁶⁻²¹⁸ Deux de ces études ont montré un effet bénéfique du traitement tandis que la troisième non¹⁹³. Des études ont également porté sur un traitement à base d'IFN-III. Des essais cliniques de stade 2 conduits à Toronto et Stanford, dans lesquels des patients COVID-19 recevaient une injection sous-cutanée d'IFN λ -1a pégylé (= conjugué à des chaînes de polyéthylène glycol pour les protéger et augmenter leur demi-vie dans l'organisme) a montré de bons résultats pour les patients de Toronto avec une clairance du virus plus rapide mais pas de différence chez les patients de Stanford.^{193,219,220}

Des études sur des modèles *in vivo* ont également confirmé le bénéfice d'un traitement IFN dans les phases précoces de l'infection. Bessière et son équipe ont administré par voie intranasale de l'IFN- α à des hamsters syriens un ou trois jours après l'infection par SARS-CoV-2.²²¹ Les hamsters ayant reçu le traitement un jour après l'infection ont montré une perte de poids limitée ainsi qu'un titre viral qui diminue rapidement tandis que le traitement administré aux animaux trois jours après l'infection, au moment des premiers symptômes, n'a pas eu d'effet sur l'infection.²²¹

Les différentes études utilisant les IFN comme traitement ont montré des effets contradictoires sur l'infection par SARS-CoV-2. L'effet bénéfique ou délétère dépendrait donc du mode d'administration, du moment de l'administration et des différents sous-types et combinaisons utilisés d'IFN.

E. Activation de la réponse IFN-I et III par le SARS-CoV-2

Plusieurs études suggèrent que l'ARN viral de SARS-CoV-2 est détecté par différents PRR. ²¹³

Une étude a montré que des macrophages humains avec une expression de TLR2 diminuée et des macrophages murins déficients pour TLR2 stimulés avec la protéine E du SARS-CoV-2 ont une production cytokinique et pro-inflammatoire atténuée par rapport à des macrophages WT, mettant en évidence le rôle de TLR2 dans la détection du virus. Des résultats similaires ont été obtenus en administrant la protéine E du SARS-CoV-2 chez des souris n'exprimant pas TLR2 (TLR2^{-/-}) au niveau pulmonaire. Cette étude montre que la protéine E du SARS-CoV-2 est capable d'induire une inflammation dépendante du TLR2 dans le poumon ^{222,223}.

Des études *in silico* ont montré que la protéine S du SARS-CoV-2 est capable de se lier au TLR1 et TLR6 et également au TLR4 avec une plus forte affinité. ^{223,224} Le rôle de TLR4 dans la détection du SARS-CoV-2 a été confirmé en stimulant des macrophages murins TLR4^{-/-} avec la protéine S, pour lesquelles une diminution significative de la production IL-1b a été montrée par rapport à des macrophages wild-type. ^{223 225}

TLR 7 semble également impliqué dans la réponse à l'infection. Le TLR7 est principalement exprimé dans les endosomes des cellules dendritiques plasmacytoides et est un bon activateur de la réponse IFN. Il a été montré que les personnes ayant un défaut génétique inné en TLR7 sont plus prédisposées à faire une CoVID-19 sévère. ²²⁶

Le TLR3 a été montré comme protecteur contre l'infection SARS-CoV-2. Des souris TLR3^{-/-} infectées par le virus montrent des dégâts pulmonaires et une charge virale bien plus importants que les souris sauvages. ²²³

Des études menées chez des souris déficientes pour l'adaptateur Myd88 et infectées par un virus SARS-CoV murinisé (rMA15) ont montré une plus grande sensibilité à l'infection que des souris wild type, avec une pathologie pulmonaire augmentée et une mortalité de plus de 90% à 6 jours post-infection. ²²⁷ De plus, les souris MyD88^{-/-} montrent une diminution de la production de cytokines

inflammatoires et de chimiokines dans le tissu pulmonaire ainsi qu'une diminution du recrutement de monocytes et macrophages inflammatoires dans le poumon après infection par le SARS-CoV. Ces résultats suggèrent que la réponse immunitaire innée médiée par MyD88 est présente lors d'une infection par SARS-CoV. ²²⁷ Une autre étude menée par la même équipe s'est intéressée au rôle de TRIF, l'adaptateur des TLR 3 et TLR4, lors d'une infection au SARS-CoV.²²⁸ Les souris déficientes pour TLR3 ou TLR4 ont montré une sensibilité accrue à l'infection par SARS-CoV sans augmentation de la mortalité tandis que des souris déficientes pour l'adaptateur TRIF ont quant à elles une sensibilité augmentée mais également un plus haut risque de mortalité et une production en cytokine diminuée. Ces études montrent l'importance des adaptateurs des TLR dans la mise en place de l'immunité par SARS-CoV et suggèrent des mécanismes similaires lors d'une infection par SARS-CoV-2.²²⁸

Plusieurs études montrent le rôle des récepteurs RIG-I-Like dans la réponse immunitaire innée lors d'une infection au SARS-CoV-2. Dans une étude publiée en 2021, Loske et son équipe, ont établi un modèle *in vitro* de cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 exprimant un niveau basal de MDA5 qui est bas et similaire au niveau d'expression retrouvé dans les cellules épithéliales nasales d'adultes sains.²²⁹ Après avoir infecté ces cellules avec le SARS-CoV-2, les auteurs ont montré qu'il y avait une réplication rapide du virus associée à une détection inefficace du virus par MDA5. De plus, une quantité infime de transcrits codant l'IFN β -1 et certains ISG a été détectée en réponse à l'infection. Cependant, lorsque les auteurs ont augmenté modérément le niveau basal de MDA5 en transduisant des vecteurs lentivirus, une augmentation significative de l'expression d'IFN β -1, et d'ISG tel que Mx1, BST2, RSAD2 et IFIT1 a été retrouvée. Leurs résultats indiquent également que dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur, dans les macrophages et dans les cellules dendritiques, il y a un niveau d'expression basal de MDA5 et RIG-I plus fort chez des enfants sains que chez des adultes sains, résultant en une réponse antivirale à l'infection SARS-CoV-2 plus forte chez les enfants que chez les adultes. Cette étude montre l'importance du rôle de MDA5 dans la détection du SARS-CoV-2 par la cellule et dans la mise en place d'une réponse ISG robuste.²²⁹ Dans une seconde étude, une induction moins importante de l'expression des gènes

Codant pour IL-6, CXCL10, IFN β et IFIT2 suite à l'infection par le SARS-CoV-2 a été rapportée dans des cellules Calu3 déficientes pour MAVS, MDA5 ou RIG-I en comparaison à des cellules WT.²³⁰ Ces résultats associent une forte réponse immunitaire innée à l'activation des RIG-I et MDA5.²²³ Cependant, d'autres études suggèrent que l'ARN viral du SARS-CoV-2 peut être détecté que par MDA5 et non pas par RIG-I dans les cellules épithéliales pulmonaires.²³¹

F. Modulation du système IFN par le SARS-CoV-2

De nombreuses études montrent que, comme beaucoup d'autres virus, le SARS-CoV-2 a développé de nombreux mécanismes afin de moduler la réponse IFN et d'échapper à la réponse immunitaire. Les différentes stratégies mises en place sont listées dans le [tableau 3](#) et résumées dans la [figure 19](#).

Les protéines non structurales ainsi que les protéines accessoires ont un rôle important dans l'échappement à la réponse immunitaire innée. Elles sont capables d'interagir de manière directe et indirecte avec les différents composants de la voie d'induction de l'IFN et de la voie JAK/STAT.

La protéine Nsp7 et la protéine accessoire ORF9b sont capables d'inhiber la production d'IFN en ciblant la voie des TLR3.²³²

La protéine Nsp1 interagit avec les sous-unités ribosomales 18S et 40S afin de déréguler la traduction de l'ARNm cellulaire ce qui conduit à une inhibition de l'activation des voies de synthèse ou de réponse à l'IFN.²³³ Les protéines Nsp7 et Nsp8 qui forment un hétérodimère, interagissent de façon directe avec la protéine MDA5 au niveau de son domaine CARD ce qui conduit à l'inhibition de la poly-ubiquitination lié à K63 de MDA5 et une inhibition de la voie de synthèse des ISG.²³⁴ De plus, Nsp8 et Nsp9 sont capables de se lier au complexe ARN 7SL bloquant la machinerie de trafic des protéines cellulaires sécrétées, entraînant une inhibition de la sécrétion des cytokines et chimiokines impliquées dans la réponse IFN et inflammatoire.³³ L'ORF9b est capable d'atténuer la réponse IFN et inflammatoire en supprimant l'activation de NF-kb via l'inhibition de la poly-ubiquitination de NEMO, un modulateur essentiel pour

l'activation de NF- κ B, ainsi qu'en interagissant avec RIG-I, MDA5, MAVS, TBK1, STING et TRIF. L'importante activité antagoniste d'ORF9b semble avoir un rôle prépondérant dans la suppression de la réponse immunitaire.^{235,236} Les protéines Nsp3, Nsp6 et Nsp13 sont également capables de bloquer la translocation d'IRF3 dans le noyau. Nsp6 et Nsp13 interagissent avec TBK1 tandis que Nsp3 interagit directement avec IRF3.^{24,235} Les protéines Nsp5, Nsp12, Nsp14, Nsp15, ORF6 et ORF8 sont quant à elles capables d'inhiber la translocation d'IRF3 dans le noyau sans forcément jouer sur sa phosphorylation.²³⁵

Les protéines du SARS-CoV-2 peuvent également inhiber la voie JAK/STAT. Les protéines Nsp14 et ORF6 peuvent inhiber l'expression du récepteur IFNAR1. En effet, Nsp14, via son activité catalytique, peut manipuler la machinerie traductionnelle de l'hôte et jouer sur l'expression des protéines.^{235,237} La phosphorylation des protéines STAT1 et STAT2 est également impactée par de nombreuses protéines virales telles que Nsp6, Nsp12, Nsp13, ORF7a et ORF7b, entraînant une inhibition de la translocation du complexe ISGF3 dans le noyau et donc la synthèse des ISG. ORF6 est également capable d'inhiber cette translocation sans avoir d'effet sur la phosphorylation des STAT.²³⁸

Les protéines structurales peuvent également inhiber la réponse interféron à différentes étapes. La protéine N interagit avec la voie des RLR en bloquant l'interaction TRIM25-TBK1, TBK1-IRF3 et leur phosphorylation ainsi que leur translocation dans le noyau cellulaire. De plus, le domaine de dimérisation de la protéine N est capable d'inhiber l'oligomérisation de MAVS entraînant une réponse IFN tronquée. Une étude a suggéré que la protéine N aurait un double rôle dans la régulation de la voie IFN. Selon cette étude, une faible dose de N aurait un effet antagoniste de la voie IFN tandis qu'une forte dose aurait l'effet contraire et induirait une forte réponse interféron.²³⁹ Mu et son équipe ont réalisé une étude dans laquelle ils montrent qu'après traitement avec de l'IFN β , la protéine N interagit directement avec les protéines STAT1 et STAT2 de la voie JAK/STAT, conduisant à une inhibition de leur phosphorylation et en conséquence de leur translocation dans le noyau. La protéine de membrane M du SARS-CoV-2 est également inhibitrice de la voie des

RLR. Elle inhibe la phosphorylation et la translocation d'IRF3 en supprimant les interactions RIG-I-MAVS, MAVS-TBK1 et TRAF3-TBK1. ²³⁵

Tableau 3: Les mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire innée par les protéines du SARS-CoV-2.

Repris et adapté de Soo-Jin Oh et al, 2022.

Protéine virale	Fonction immunologique	Voie cellulaire ciblée
N	Inhibition des interactions TRIM-25-RIG-I et TBK1-IRF3 Suppression de l'activation de TBK1, IRF3, STAT1 et STAT2 Suppression de l'oligomérisation de MAVS	Activation des RLR Production des IFN
M	Inhibition des interactions RIG-I-MAVS, MAVS-TBK1 et TRAF3-TBK1 Suppression de l'activation de IRF3 Suppression de l'oligomérisation de MAVS	Activation des RLR Production des IFN
Nsp1	Clivage des ARNm de l'hôte Inhibition de la traduction des protéines de la réponse IFN	Activation et production des IFN
Nsp3	Inhibition de l'activation de MDA5 Protéolyse de IRF3	Production des RLR
Nsp5	Suppression de la translocation nucléaire d'IRF3	Activation et production des IFN
Nsp6	Suppression de l'activation de IRF3, STAT1 et STAT2	Activation et production des IFN
Nsp7/8	Suppression de l'ubiquitination-K63 de MDA5 Atténuation du système traductionnel de l'hôte Inhibition de la voie du TLR3-TRIF	Activation des RLR Activation et Production des IFN
Nsp9	Suppression du système d'export des protéines sécrétées	Activation et Production des IFN

Nsp12	Suppression de l'activation de IRF3, STAT1	Production des IFN
Nsp13	Suppression de l'activation de TBK1, IRF3, STAT1 et STAT2	Production des IFN
Nsp14	Suppression de l'activation d'IRF3 et de la voie médiée par RIG-I Suppression de la machinerie traductionnelle de l'hôte Diminution de l'expression de ISG15 et IFNAR1	Production des IFN et expression des ISG
Nsp15	Suppression de l'activation de IRF3	Activation des IFN
Nsp16	Suppression de l'activation d'IRF3 et de la voie médiée par MDA5 Diminution de l'expression des ISG	Production des IFN et expression des ISG
ORF3b	Suppression de l'activation de IRF3	Activation des IFN
ORF6	Suppression de IRF3/7 et STAT1/2 Diminution de l'expression de IFNAR	Activation des IFN et expression des ISG
ORF7a	Inhibition de la phosphorylation de STAT1	Expression des ISG
ORF7b	Inhibition de la phosphorylation de STAT1 et STAT2	Expression des ISG
ORF8	Suppression de l'activation de IFR3	Activation des IFN
ORF9b	Inhibition du complexe MAVS/ TRAF3/TRAF6 Inhibition de la voie du TLR3-TRIF	Activation des RLR

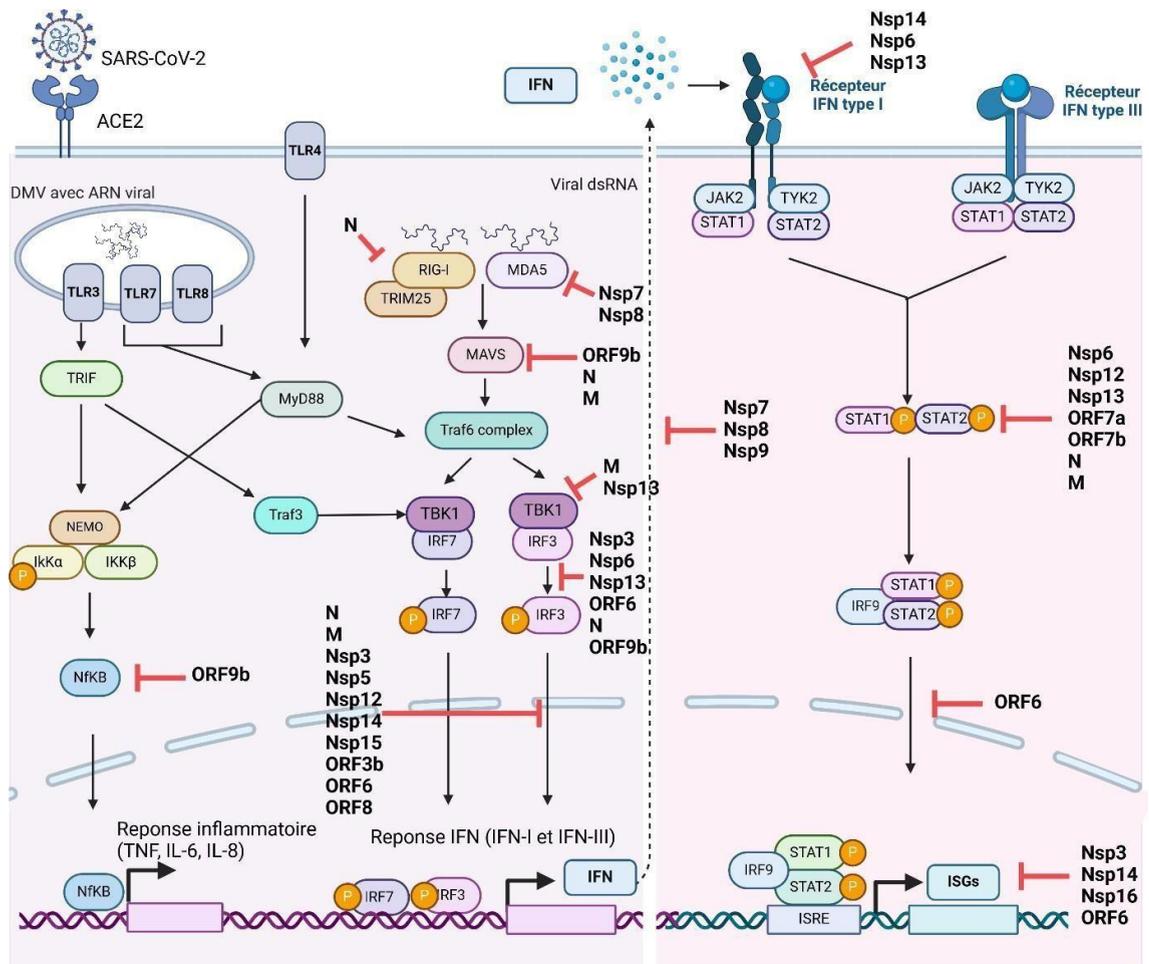


Figure 19 : Modulation de la réponse IFN par les protéines virales du SARS-CoV-2

Créée avec Biorender

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Le SARS-CoV-2 est un virus qui a émergé fin 2019 à Wuhan, en Chine et qui a causé une des pandémies humaines les plus importantes de notre époque²⁴⁰. La maladie associée, la COVID-19 est principalement respiratoire avec comme symptômes principaux de la fièvre, des difficultés respiratoires et de l'anosmie/ agueusie. La maladie peut être asymptomatique mais également engendrer des cas de pneumonies très graves pouvant aller jusqu'à causer la mort des personnes infectées. La grande capacité du virus à évoluer a conduit à l'émergence de nouveaux variants assez rapidement après le début de la pandémie. Les différents variants, classés selon leur potentiel impact sur la santé publique, sont rapidement devenus majoritaires dans le monde et possèdent des propriétés leur permettant d'être plus transmissibles et de mieux échapper à la réponse immunitaire. Le variant D614G a émergé dès Mars 2020 et a vite remplacé la souche Wuhan initiale. D'autres variants comme Delta ou Omicron sont apparus au cours de l'épidémie avec comme particularités, une pathogénicité importante pour le variant Delta et une forte capacité à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte ainsi qu'une moindre pathogénicité pour le variant Omicron. ^{241–}
²⁴³ L'origine du SARS-CoV-2 n'est pas très bien déterminée, mais il provient très probablement d'un virus proche circulant chez certaines espèces de chauve-souris (Bat-SARS-CoV-like).¹⁵⁶ De nombreuses espèces animales peuvent être naturellement infectées par le SARS-CoV-2 et ses variants comme les chiens, les chats, les cerfs de Virginie, les hamsters et les visons.¹⁵⁷ Ces observations font redouter une adaptation du virus vers d'autres espèces animales et l'émergence de nouveaux variants. La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense de l'hôte contre une infection virale. Elle permet aux cellules infectées et adjacentes d'établir un état antiviral très tôt après l'exposition aux virus. Les cellules infectées sécrètent de l'interféron qui active des voies de signalisation, ce qui entraîne l'expression de centaines de gènes stimulés par l'IFN et l'instauration d'un état antiviral. Afin d'établir une infection, un virus doit être capable de surmonter cette réponse antivirale mise en place par l'hôte. De nombreuses études ont montré que le SARS-CoV-2 était capable de contrecarrer la réponse immunitaire innée de l'hôte par

des mécanismes moléculaires précis.²³⁵ Ces mécanismes d'échappement au système immunitaire inné sont probablement importants dans l'adaptation du virus à une espèce hôte.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle de l'immunité innée dans la physiopathologie et dans la transgression de la barrière d'espèces par le SARS-CoV-2.

Dans un premier temps, nous avons étudié la physiopathologie et notamment la réponse immunitaire innée induite par trois variants de pathogénicité différente : les variants D614G, Delta et Omicron. L'objectif a été d'évaluer s'il y avait une corrélation entre la réponse immunitaire innée et la pathogénicité observée à des temps précoces de l'infection. Ces premiers événements, notamment au niveau du site primaire de réplication qu'est la cavité nasale, ont été peu étudiés jusqu'à présent alors qu'ils pourraient aider à la compréhension de la physiopathologie de la maladie. Nous avons réalisé cette étude chez des hamsters syriens infectés par les différents variants en nous focalisant sur la cavité nasale et le poumon.

Une réponse IFN-I incontrôlée pouvant devenir délétère au cours de l'infection, nous avons souhaité examiner spécifiquement son implication à la fois dans le contrôle de l'infection virale mais aussi dans l'établissement des dommages tissulaires. Nous avons alors comparé la physiopathologie de l'infection entre des souris Sv/129 wild-type (WT) et des souris ayant une réponse IFN-I déficiente (*ifnar^{-/-}*) après infection avec un virus SARS-CoV-2 adapté au modèle murin.

Enfin, nous avons exploré le rôle de la réponse immunitaire innée dans la transgression de la barrière d'espèce. En effet, le SARS-CoV-2 est capable d'inhiber la réponse IFN humaine grâce à l'interaction de certaines protéines virales (Nsp13, Nsp6, ORF6...) avec des protéines de la voie IFN. Nous nous sommes demandé si pour des coronavirus de chauve-souris, plus ou moins proches génétiquement du SARS-CoV-2 (Bat-SARS-CoV-like virus), les orthologues de certaines protéines virales avaient aussi la capacité d'inhiber la voie de réponse à l'IFN-I humaine. Cette étude pourrait contribuer à expliquer pourquoi ces virus peuvent assez facilement s'adapter à l'Homme.

RESULTATS

Partie 1 : Infection par différents variants du SARS-CoV-2 dans le modèle du hamster syrien

I. Introduction

Depuis l'émergence du SARS-CoV-2, de nombreux variants sont apparus à travers le monde. Ces variants ont acquis des propriétés augmentant leur transmissibilité et leur capacité à moduler le système immunitaire. Dans cette partie nous nous sommes intéressés à trois variants qui après leur émergence sont rapidement devenus prédominants dans le monde. Le variant D614G a rapidement remplacé la souche initiale de Wuhan. Le variant Delta a été montré comme étant hautement transmissible et est l'un des variants les plus virulents qui a circulé. Le variant Omicron qui circule actuellement est également très transmissible, mais moins pathogène pour l'Homme.¹³⁰

De nombreuses études se sont intéressées aux différences entre ces trois variants notamment au niveau de leur physiopathologie au cours de l'infection. Ici, nous avons ciblé les événements précoces, dès J1 post-infection qui se déroulent dans la cavité nasale et dans le poumon suite à l'infection et ce, pour les trois variants. Le but était de comparer l'infection entre les variants et d'étudier la possibilité que leurs différences de virulence et de transmissibilité soient liées à des événements qui se déroulent tôt après l'infection, comme la réponse immunitaire innée, notamment dans la cavité nasale.

Nous avons choisi comme modèle d'étude, le hamster syrien. Ce modèle est couramment utilisé dans l'étude de l'infection par le SARS-CoV-2 car il s'infecte naturellement par tous les variants et que les symptômes développés sont similaires à ceux développés communément par l'Homme, comme une perte de poids, des difficultés à respirer ou de l'anosmie.^{173,176}

Les hamsters ont été infectés par les différents variants et nous avons étudié la physiopathologie de l'infection à des temps précoces, soit 1 et 4 jours post-infection. Nous avons montré que le variant Delta cause des dommages bien plus sévères que

les deux autres variants étudiés dans l'épithélium olfactif des hamsters infectés dès J1 post-infection diffusion plus rapide dans la zone postérieure de la cavité nasale et le poumon. Nous montrons aussi une forte corrélation au début de l'infection entre l'intensité de la réplication virale et l'induction de l'expression de l'IFN-III, de certains ISGs de marqueurs de cellules immunitaires innées et cytokines pro-inflammatoires. Ainsi pour le variant Omicron qui a une réplication virale plus lente que les autres variants, l'intensité de la réponse immunitaire innée n'est pas aussi intense que ce qui est observé avec les autres variants à J1 post-infection et est globalement similaire à J4. Au final, c'est une réponse immunitaire innée modérée qui semble être associée à la faible pathogénicité du variant Omicron. Notre étude montre aussi que pour comprendre la physiopathologie induite par les différents variants, il est important d'avoir une approche cinétique et d'étudier les événements très précoces de l'infection.

Cet article est soumis dans le journal Virulence depuis avril 2024.

II. Résultats/ Discussion

SARS-CoV-2 Delta variant induces severe damages in the nasal cavity from the first day post-infection in the Syrian hamster model.

Maxime Fusade-Boyer^{1#}, Adèle Gambino^{1#}, Laetitia Merle-Nguyen², Audrey Saint-Albin², Ophélie Ando-Grard², Younes Boujedli¹, Hélène Huet¹, Meriadeg Ar Gouilh³, Sandra Martin-Latil¹, Bernard Klonjkowski¹, Nicolas Meunier² & Sophie Le Poder¹

Both authors equally contributed to this work

Authors affiliations:

¹UMR VIROLOGIE, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France

²Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires (UR892), INRAE, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

³Department of Virology, University Caen Normandie, INSERM Dynamicure UMR 1311, CHU Caen, Caen, France.

Corresponding author:

sophie.lepoder@vet-alfort.fr

Abstract word count: 250

Main text word count: 4155

Running title: Early damage of the olfactory epithelium after Delta SARS-CoV2 infection

Key words: SARS-CoV-2 variants, nasal cavity, olfactory epithelium

Abstract

SARS-CoV-2 replication initiates in the nasal cavity and can spread to the lower respiratory tract. However, the early physiopathological events that occur in the nasal cavity after infection remain poorly understood. In this study, we investigated the initial steps of viral infection from 1 day post-infection (dpi) in Syrian hamsters infected with SARS-CoV-2 D614G, Delta and Omicron (BA.1) variants and compared them with animals sacrificed at 4 dpi. While the level of viral replication in the nasal turbinates of the three groups of hamsters was equivalent at 4dpi, the amount of viral RNA at 1dpi was higher in D614G- and Delta-infected animals than in the Omicron group. No difference in viral RNA levels or inflammatory markers in the nasal turbinates was observed between D614G- and Delta-infected animals, except for a significantly higher level of IFN- λ in the Delta group at 1dpi. Additionally, histological analysis revealed a more rapid diffusion of the Delta virus reaching the posterior zone of the nasal cavity at 1dpi inducing significant damage to the olfactory epithelium. At the same time, the D614G and Omicron infections were essentially restricted to the anterior part of the nasal cavity with less damage observed. Consistently, viral replication was already effective in the lungs of all Delta-infected hamsters at 1 dpi, but only in two of the six D614G animals. Our results highlight the importance of studying viral infection in the nasal cavity very early after infection with a spatial approach to better understand the physiopathology of the different SARS-CoV-2 variants.

Introduction

Since its emergence in 2019²⁴⁰, the intense circulation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2) led unsurprisingly to the appearance of numerous variants²⁴⁴. This emergency arose from a higher transmissibility and/or the ability to escape the immune response, and became rapidly dominant in the human population. The first example was the SARS-CoV-2 strain containing the spike mutation D614G which rapidly replaced the original Wuhan strain at the beginning of the pandemic in Europe in 2020, due to its increased transmissibility²⁴¹. So far, the World Health Organization (WHO) labelled five variants as variants of concern (VOCs): Alpha, Beta, Gamma, Delta and Omicron²⁴⁴. The most remarkable VOCs regarding biological features are the Delta and Omicron variants. Delta variant, which emerged in India in late 2020, was much more transmissible than the previous strains, but also likely more pathogenic since infection was associated with higher hospitalization risk and ICU admission^{242,245,246}. Delta variant also moderately escaped neutralizing antibodies produced after infection with the original strain²⁴⁷. Omicron, which was first detected later in November 2021 in South Africa, is presently predominant all over the World. Omicron is highly transmissible and is also able to evade the humoral immune response due to mutations in the spike protein^{243,248}. Its constant genetic evolution led to the emergence of numerous subvariants (BA.1, BA.2, XBB, XBB1.5, etc..) ^{249,250}. In terms of pathogenicity, Omicron induces less severe infection in humans. This decreased pathogenicity was suspected timely, when field epidemiological data from South Africa suggested a lower hospitalization rate following Omicron emergence²⁵¹. Since, many studies showed its inherent decreased pathogenicity compared to previous variants²⁵²⁻²⁵⁶.

Understanding the underlying mechanisms that explain the differences in the physiopathology of the different variants remains crucial to adapt the therapeutic and prophylactic

countermeasures. To this aim, infections of Syrian hamster appear as a robust model mimicking a variety of symptoms observed during human infection (anosmia, breathing difficulties ...) ^{257,258} ¹⁷⁷. Using this model, many studies have compared the physiopathology of the main interesting VOCs but most of them focused their attention later than 2 days post-infection. Here, we hypothesized that the very early events of infection occurring in the nasal cavity may differ according to the different VOCs. We infected hamsters with the D614G, Delta, and Omicron (BA.1) variants and sacrificed them at 1 day and 4 days post-infection (dpi) for viral and pathological analysis. The initial infection events in the nasal cavity differed depending on the infecting VOCs at 1 dpi. The most striking difference was that the Delta variant caused more severe damage to the olfactory epithelium and exhibited a faster virus diffusion into the posterior zone of the nasal cavity and lungs.

Materials and Methods

Viruses

The SARS-CoV-2 D614G strain BetaCoV/France/IDF/200107/2020 was isolated in the beginning of the pandemic in Europe in March 2020 by Dr. Paccoud from La Pitié-Salpêtrière Hospital in France. This strain was kindly provided by the Urgent Response to Biological Threats (CIBU) hosted by Pasteur Institute (Paris, France), headed by Dr. Jean-Claude Manuguerra. The SARS-CoV-2 Delta strain (UCN 46, clade 21A) was isolated from nasopharyngeal swabs obtained from patients suffering from respiratory infection, suspected of COVID19 and submitted to molecular diagnosis in Caen Hospital in Normandie during the 2021 summer. The SARS-CoV-2 Omicron BA.1 strain (hCoV-19/Netherlands/NH-RIVM-72291/2021, Omicron variant, lineage B.1.1.529) was obtained through the EVAg platform.

Viruses were amplified in VERO-E6 cell culture under 5% CO₂ at 37°C for D614G and Delta strains, and at 35°C for the Omicron virus.

Animal experimentation

Syrian golden hamsters were used to investigate pathogenicity of different variants of SARS-CoV-2 virus. Animals were housed in biosafety level 3 facility at the national veterinary school of Alfort. The protocol was approved by the ANSES/EnvA/UPEC Ethics Committee (CE2A16) and authorized by the French ministry of Research under the number APAFIS#25384-2020041515287655. Three groups of twelve 8-week-old males (Janvier's breeding Centre, Le Genset, St Isle, France) were each infected by one of the following strains: D614G, Delta, or Omicron (BA.1). Infection was performed by intranasal inoculation of 80 µl of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing $5 \cdot 10^3$ TCID₅₀ of SARS-CoV-2 under gas anesthesia with isoflurane. As a control group, five animals were intranasally inoculated with 80 µl of DMEM. Animals were weighted daily. At 1 and 4 dpi, 6 hamsters from each group were necropsied. The right side of the nasal turbinates (NT) and the right cranial lobe of the lungs were collected and stored at -80°C in beaded tubes (MP Biomedicals) for molecular analysis. The left side of the nasal cavity was harvested for histology.

Viral replication and innate immunity response analysis

Total RNA TRIzol/chloroform extraction was performed from lungs and nasal turbinates (NT) harvested at 1 and 4 dpi. 1 mL of TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added in each sample tube before mixing them three times at 6000 rpm for 10s in a bead beater (FastPrep MP Biomedicals). Samples were then incubated at room temperature for 5 min before centrifugation for 5min at 12000g at 4°C. Supernatant was collected and 200 µL of chloroform were added

before a shaking step for 15s and a room temperature incubation for 15min. Each tube was then centrifuged for 15min at 16 000g and 4°C. About 300-350µl of the aqueous phase of each sample were collected and mixed with 500µL of isopropanol for 15s before incubation at room temperature for 10min. The tubes were then centrifuge at 16 000g for 10min at 4°C. The supernatant was removed and the pellet was washed two times with 75% ethanol before drying at room temperature for 5min and being eluted in 50µl of RNase free water.

Viral replication and host genes expressions were assessed in the NT and in the lungs by using the QuantitTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen) performed in 96-well plates in a final volume of 20µl on a LightCycler 96 (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. For each PCR reaction, 100ng of RNA was used and quantification was made using the $2^{-\Delta CT}$ method and the geometric means of two housekeeping genes (Actin Beta and RPS6KB1). The primers used for genes amplifications are listed in S1 Table.

Immunohistochemistry analysis

The immunohistochemistry analysis of the olfactory mucosa tissue sections was performed as described previously²⁵⁹. Briefly, animal hemi-heads were fixed for 3 days at room temperature in 4% paraformaldehyde (PFA) and decalcified in Osteosoft (Merck Millipore; Saint-Quentin Fallavier; France) for 3 weeks. Blocks were cryoprotected in 30% sucrose. Cryo-sectioning (12 µm) was performed to generate coronal sections of the nasal cavity. Sections were stored at -80 °C until use.

For immunohistochemistry, non-specific staining was blocked by incubation with 2% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton. Sections were then incubated overnight with primary antibodies directed against SARS Nucleocapsid protein (1/1000; mouse monoclonal; clone 1C7C7; Sigma-Aldrich) and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) (1/500; rabbit

monoclonal; clone EPR16588; Abcam), Fluorescence staining was performed using donkey anti-mouse-A555; donkey anti-rabbit-A488 (1/800; Molecular Probes A-31570; A32790 respectively).

To assess the impact of the VOCs infection on the olfactory turbinates, we focused our measures on coronal sections of nasal turbinates in an anterior part containing mainly respiratory epithelium and in a posterior part of the nasal cavity, containing the NALT and the end of the Steno's gland. We selected these areas as our previous results had shown that the D614G VOCs infection starts in this chosen anterior zone and is just appearing in the posterior zone²⁶⁰.

To assess the level of infection, we scored the presence of the virus in the respiratory epithelium, olfactory epithelium, Steno's gland epithelium and cellular debris in the lumen of the nasal cavity on SARS-CoV-2 N protein IHC signal from 0 (absence of infection in the observed zone) to 10 (fully infected zone). To assess epithelium damage, we scored the integrity of the respiratory epithelium (RE) and olfactory epithelium (OE) from 0 (no damage) to 10 (fully damaged zone) based on Hoechst staining according to missing nuclei area, irregularity of the epithelium structure and increased distance between nuclei indicating loosening of the epithelium leading to desquamation²⁶⁰. We also assessed the presence of cellular debris in the lumen cavity based on Hoechst staining with a score of zero in absence of debris to 10 when the lumen is filled with cellular debris. All quantifications were performed blindly of the VOCs used for infection. Images for all fluorescent IHC were acquired with a Panoramic Scan 150 (3D Histech) and analyzed with the CaseCenter 2.9 viewer (3D Histech).

Statistical analysis

Analysis was performed using GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software). Comparison between groups was performed using Mann-Whitney test for bodyweight data and for viral and

host genes expression data. Immunohistochemistry scores were statistically analyzed using a two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test. For all statistical analysis, p-values less < 0.05 were considered significant. Multivariate statistical analysis on RNA levels in nasal turbinates was achieved using Principal Component Analysis (PCoA) with R software. Detailed information on statistical test used, sample size and p-value are provided in the figure captions.

Results

1/ Rapid diffusion of the Delta variant to lungs from day 1 post-infection

Three cohorts of 12 Syrian hamsters were infected intranasally with 5.10^3 TCID₅₀ of either D614G, or Delta or Omicron (BA.1) variants. For each group, six animals were sacrificed at 1 dpi and the six remaining at 4dpi (Figure 1A). The weight of the animals was monitored daily, and we observed a similar weight loss in the hamsters infected with the Delta and D614G variants beginning at 2dpi. Throughout the experiment, hamsters infected with the Omicron variant did not experience weight loss (Figure 1B).

We assessed the level of viral replication in each group of hamsters at 1 and 4 dpi by measuring viral subgenomic RNA targeting the E gene in the nasal turbinates (NT) and in the lungs by RT-qPCR. At 1 dpi, in the NT, levels of SARS-CoV-2 replication were similar with Delta or D614G variants, but about 10-fold lower in hamsters infected with the Omicron variant (Figure 1C) ($p < 0.05$ in comparison with D614G and $p < 0.001$ in comparison with Delta variant). In the lungs, at 1dpi, all the hamsters infected with Delta variant displayed an effective viral replication, whereas this was observed in only 2 of the 6 hamsters in the D614G variant infected group and in only 1 of the 6 hamsters in the Omicron variant infected group.

At 4 dpi, there was no statistically significant difference in viral levels among the three infected groups in the NT. The lungs of hamsters infected with D614G or Delta variants showed similar levels of replication, while in those infected with Omicron variant viral replication was detected in only 2 of 6 hamsters and was 10-fold lower.

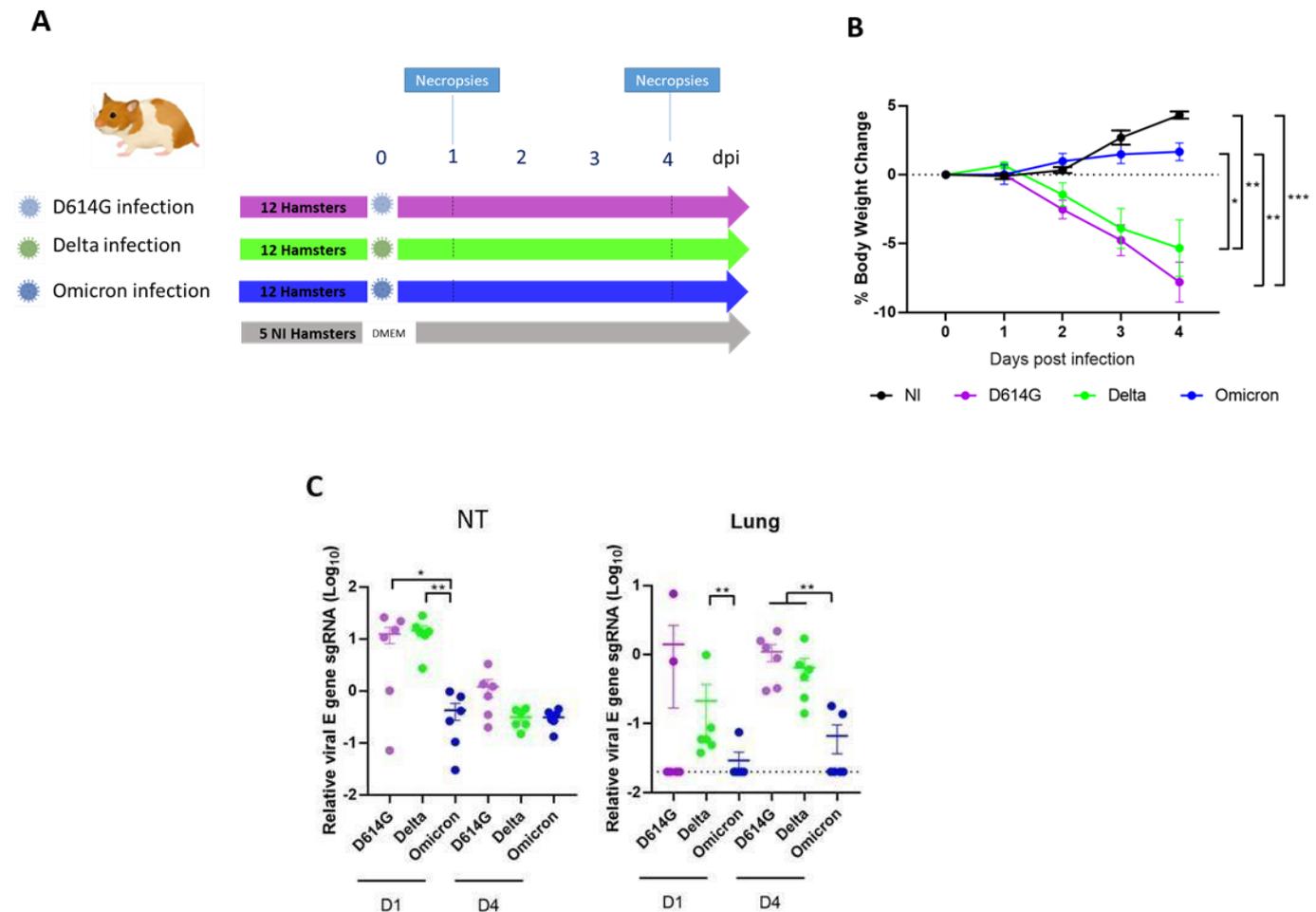


Figure 1. Infection of hamsters with D614G, Delta and Omicron (BA.1) SARS-CoV-2 variants. (A) Animal experimental design. Hamsters were infected via intranasal route with $5 \cdot 10^3$ TCID₅₀ of each variant. (B) Weight change of animals. Statistical analysis performed with a two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. (C) Viral replication levels in the nasal turbinates (NT) and in the lung at 1dpi (D1) and 4 dpi (D4), determined by RT-qPCR targeting viral subgenomic RNA (sgRNA) relative to housekeeping genes RPS6KB1 and β -actin. Means \pm SEM, n=6. Statistical analysis with Mann Whitney tests. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; dpi: days post infection; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, NI: Non-infected

2/ High elevation of inflammatory markers in the nasal turbinates of D614G and Delta infected animals from day 1 post-infection

Next, we assessed the innate immune response and inflammation triggered by the three SARS-CoV-2 variants by measuring mRNA expression of different targets by RT-qPCR at 1 and 4 dpi in the nasal turbinates (Figure 2).

We first studied mRNA expression of the main cytokines involved in inflammatory pathways (IL-1 β , TNF- α , IL-6) (Figure 2A). The highest mRNA expression levels of the three main pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6) were similarly observed in hamsters infected with D614G and Delta VOC at 1dpi. Hamsters infected with Omicron displayed a 10-fold lower mRNA expression level of these cytokines at 1dpi. At 4 dpi, the expression pattern was similar in the three groups of infected animals, except a lower expression of TNF- α in the Delta group. Then, we measured the mRNA expression of different interferons and ISGs in the NT of infected and non-infected animals at 1 and 4dpi (Figure 2B). The increase expression of IFN- α , IFN- β and IFN- γ was equivalent in all the infected groups at 1 and 4dpi compared to non-infected animals. However, IFN- λ , ISG15 and Mx2 expression levels in infected animals were about 1000-fold higher than in controls and significant differences were observed, especially between Delta and Omicron variants at 1dpi. Interestingly, IFN- λ mRNA expression was different between D614G and Delta infected animals, with a higher level in Delta animals ($p < 0.05$). For these three genes, their expression was about 10-fold lower in hamsters infected with Omicron with a p -value < 0.01 between Omicron and Delta. At 4 dpi, the levels of IFN- λ , ISG15 and Mx2 were still higher than in the non-infected animals. The differences in mRNA expression between the three infected groups were less marked, as these levels tended to

increase in the Omicron group compared to 1dpi, whereas they decreased in the Delta group, particularly IFN- λ and Mx2.

Next, we investigated the mRNA expression of chemoattractive cytokines (CXCL9 and CXCL10) and innate immune cells that we had previously characterized during SARS-CoV-2 infection in the NT²⁶⁰. We explored indirectly by RT-qPCR the presence of neutrophils (Ncf2), circulating and resident macrophages (CD68; Iba1 respectively) (Figures 2B and 2C). From 1dpi, the transcript levels of all these markers were significantly upregulated in hamsters infected with the D614G and Delta variants. In Omicron-infected hamsters, no increased mRNA expression was observed for Ncf2 and for the other markers the increase was moderate at 1dpi and 4dpi.

We performed the same analysis in the lungs of all hamsters (Figure S1). At 1 dpi, the difference between infected and control animals was more limited than that observed in the nasal turbinates, except for ISG15 and MX2 whose levels were 100-fold higher in the lungs of D614G and Delta animals compared to controls (Figure S1B). Elevation of these ISGS was only 10-fold higher for Omicron infected animals. At 4dpi more markers were elevated in all infected animals. Again, significant differences ($p < 0.01$) were observed between Omicron and the other variants infected animals for many markers (TNF- α , IL-10, IFN- λ , CXCL9, CXCL10, Ncf2, and CD68).

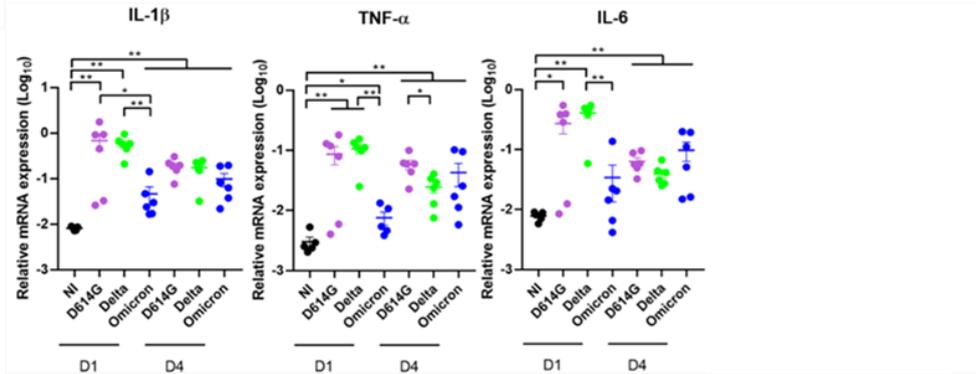
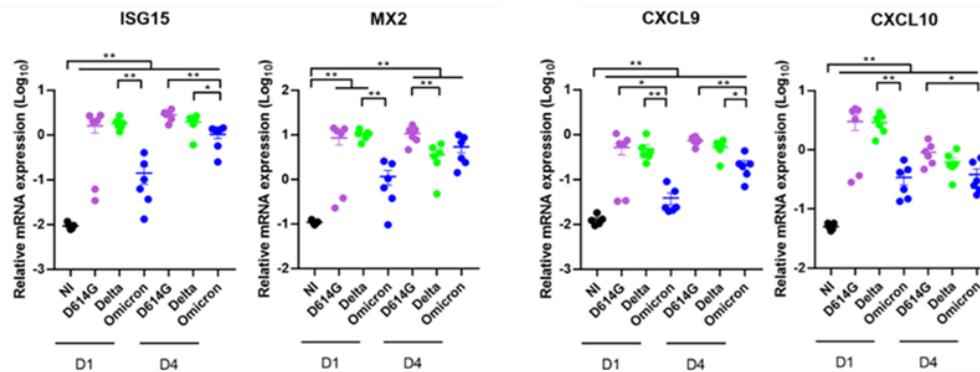
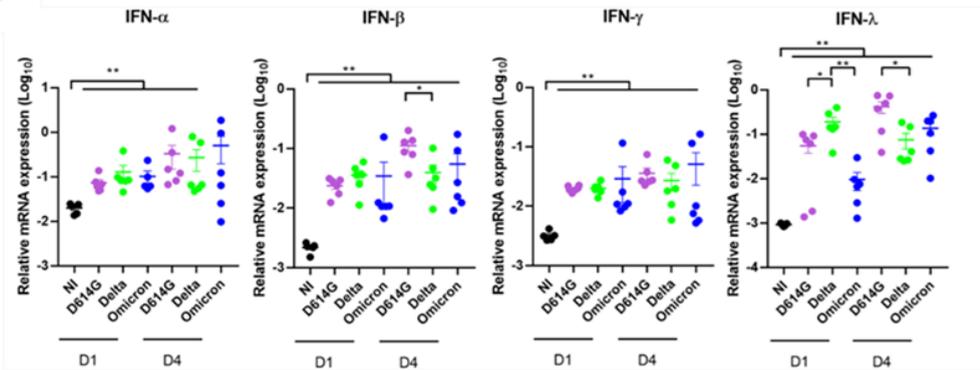
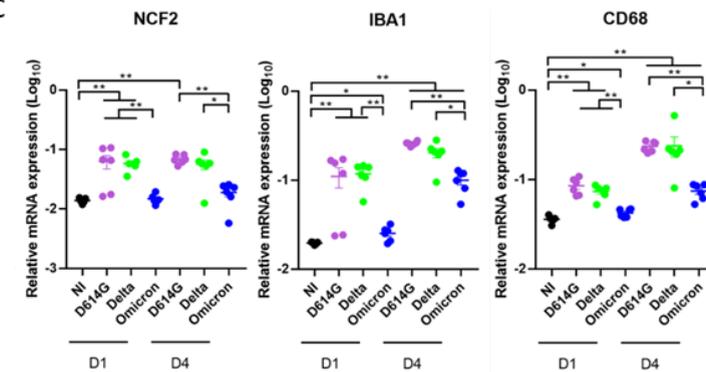
A**B****C**

Figure 2. Increase of inflammation markers in the olfactory turbinates of infected hamsters starts as early as 1dpi. mRNA relative expression at 1dpi (D1) and 4dpi (D4) in the olfactory turbinates from hamsters infected with D614G, Delta and Omicron (BA.1) variants **(A)** of inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6). **(B)** of markers from the IFN pathway (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , ISG15, MX2) and leucocytes chemo attractive cytokines (CXCL9, CXCL10). **(C)** of neutrophils (Ncf2) and resident / circulating macrophages (Iba1, CD68). Results are expressed as means \pm SEM, n=6, Statistical analysis were performed using Mann Whitney tests. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. NI=Non-infected

3/ Correlation between viral replication and inflammatory markers at 1dpi in the nasal turbinates

As we had noticed differences in the levels of viral replication and inflammatory transcripts between infected animals within the same group, we sought to establish a potential correlation between these parameters.

At 1dpi in the nasal turbinates, we found strong correlations between the level of viral transcripts and IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- λ , MX2, ISG15, CXCL9, CXCL10, Ncf2, Iba1 and CD68 (Figure 3A). We observed no correlation at 4 dpi, which is consistent with the similar levels of the virus and mRNA inflammatory markers among the animals. Finally, PCoA analysis displayed clear separated group of Omicron hamsters from the two other groups ($p=0.003$) but not the Delta from the D614G (Figure 3B).

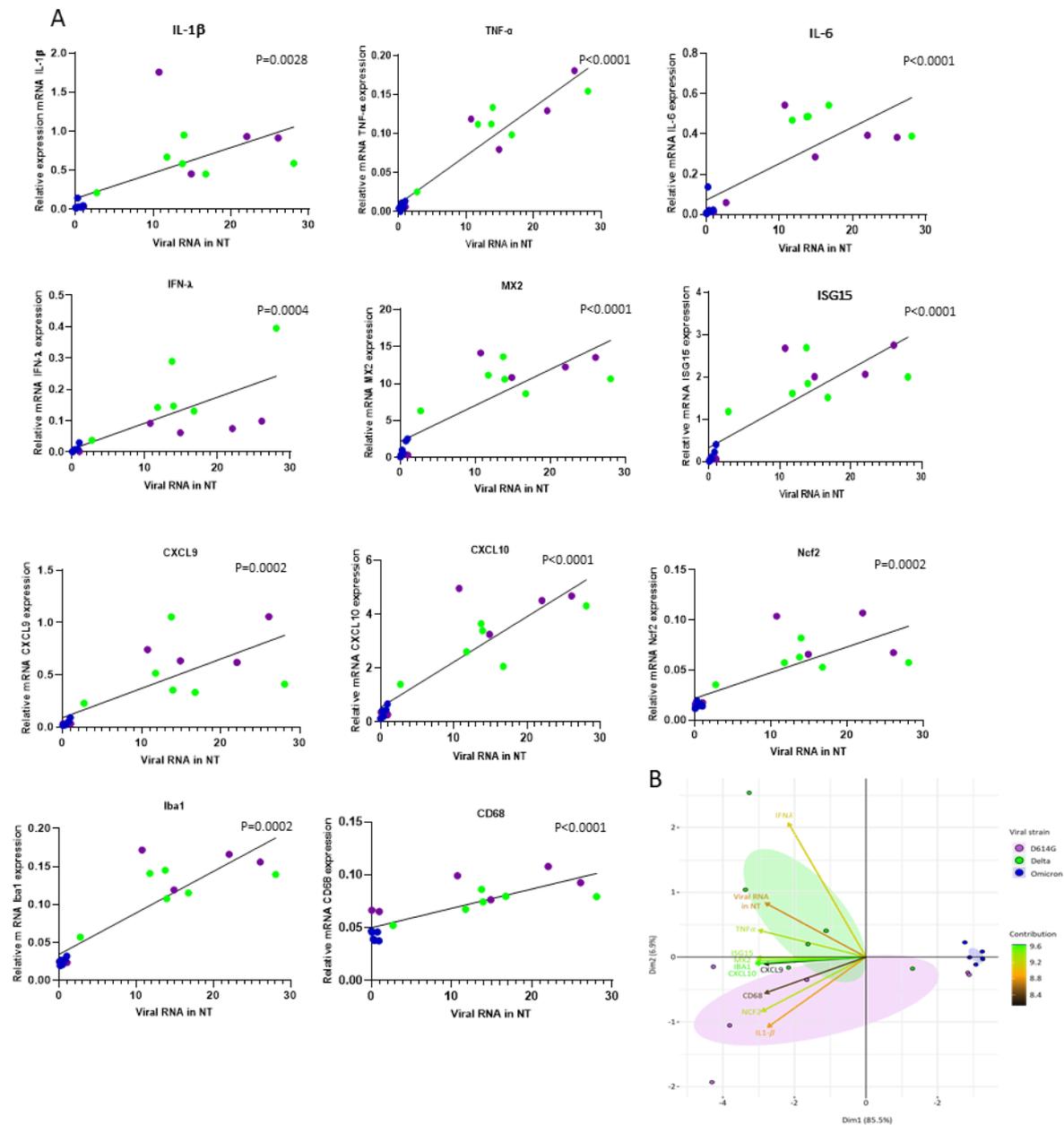


Figure 3. Correlation between viral RNA level and inflammatory markers at 1dpi in the nasal turbinates. (A) Spearman t-test between mRNA relative expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- λ , MX2, ISG15, CXCL9, CXCL10, Ncf2, Iba1, CD68 and the viral level quantified in the nasal turbinates at 1dpi. Significant p-values are indicated **(B)** PCoA biplots of RNA levels in nasal turbinates. Each dot represents a separate animal, colored according to the VOCs. Ellipses represent a confidence interval of 95%. Arrows are colored according to the contribution of the corresponding gene to the first two components of PCoA. The omicron group differs significantly from the others (permutational multivariate analysis of variance with adonis, $P < 0.005$).

4/ The Delta variant causes more damage in the nasal cavity at the early stage of infection

As we observed the main differences between the three groups of hamsters by molecular analysis in the nasal turbinates at 1dpi, we conducted histological examinations of the nasal cavity at this time point. The presence of the virus and the resulting damages were examined in both the anterior and posterior regions of the nasal turbinates (Figure 4A) that we previously observed to be infected at a high and low level respectively at 1 dpi with the D614G variant²⁶⁰. In the anterior zone, the level of infection in the respiratory epithelium (RE), which is predominant in this zone, was similar among all three variants (Figures 4A and D). However, the damages to this epithelium were more significant in animals infected with the Delta variant, with more cellular debris in the lumen. The olfactory epithelium (OE) of the anterior zone was equally infected in D614G and Delta animals. However, Omicron animals exhibited significantly lower infection rates in this area ($p < 0.001$ compared to Delta).

In the posterior zone, histological analysis revealed significant differences with the Delta variant infection. We scored a high presence of the virus in the OE with this variant, in contrast to the D614G variant which exhibited limited infection and Omicron variant no infection at all (Figures 4C and E). Interestingly, the Steno's gland epithelium was infected by Omicron VOC in this zone. This infection was however lower than with the D614G and Delta VOCs (Fig. 4C). Concomitantly, the olfactory epithelium of animals infected with the Delta variant was greatly altered in this zone with a damage score significantly higher compared to the D614G and Omicron variants ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$ respectively). We also observed lots of cellular debris filling the lumen of the nasal cavity in these animals ($p < 0.0001$). In hamsters infected with D614G and Omicron variants, lesions in the nasal cavity were more discreet in this zone, with better integrity of the OE and fewer cellular aggregates in the lumen of the nasal cavity.

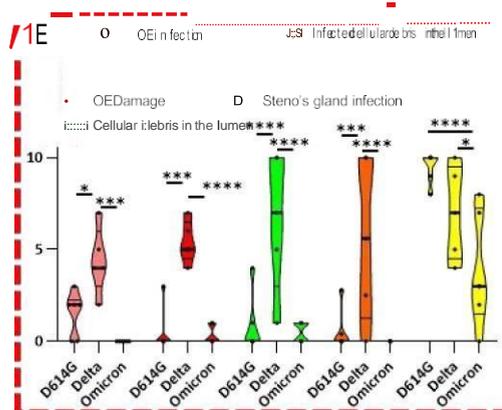
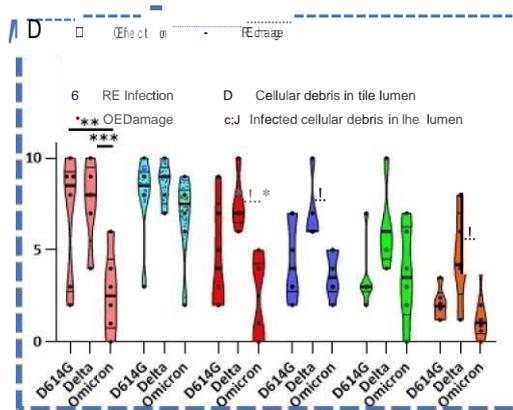
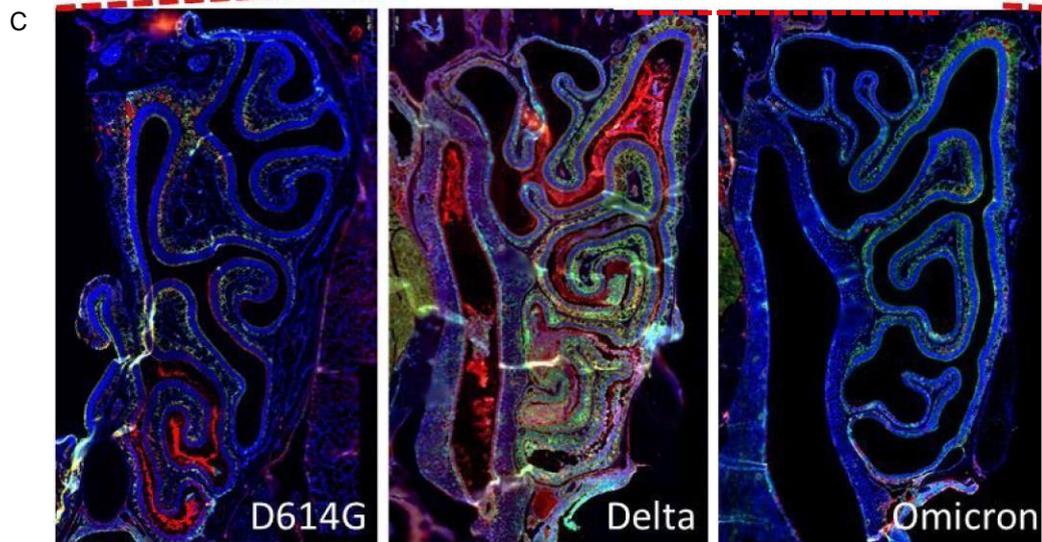
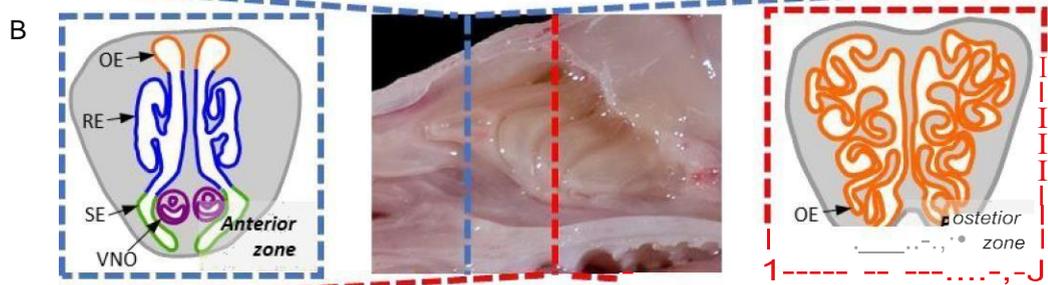
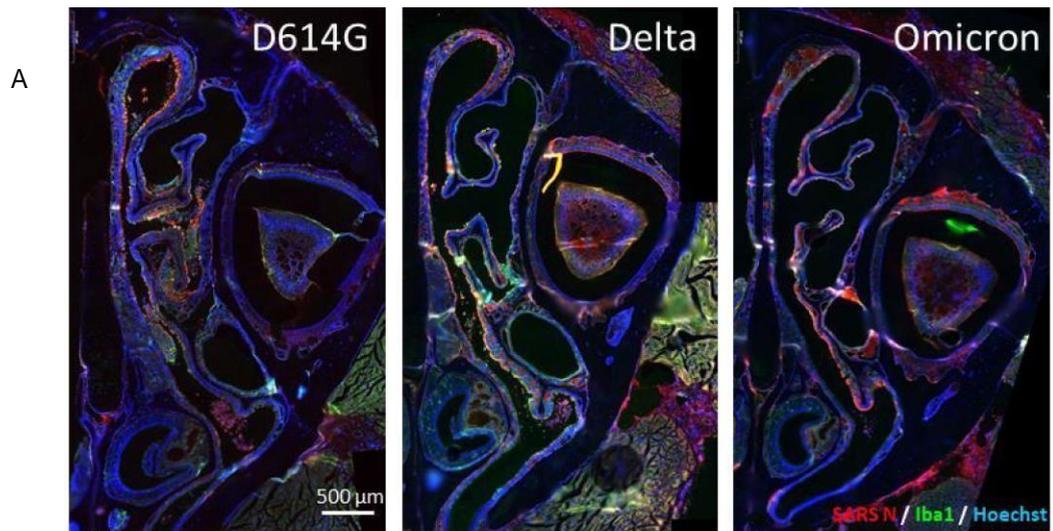


Figure 4: Delta variant induces severe histological damage in the nasal cavity from day 1 post-infection. Hamsters infected with D614G, Delta or Omicron (BA.1) variant were sacrificed at 1 dpi for histological analyses of the nasal cavity and immunostaining of N SARS-CoV-2 antigen (Red) and Iba1 cells (Green). Representative images of the anterior (A) or posterior (C) zones of the nasal cavity (B). Scores of infections and damages induced in anterior zone (D) and posterior zone (E). Mean \pm SEM, n=6, Mann Whitney; *P< 0.05; **P< 0.01, ***P< 0.001, ****P< 0.0001 OE: Olfactory Epithelium, RE: Respiratory Epithelium, VNO: Vomeronasal organ SE: Squamous epithelium

Discussion

Acute SARS-CoV-2 infections lead to different clinical outcomes in humans, from asymptomatic infection to severe respiratory distress and death. Several factors contribute to the diverse range of symptoms, with the infecting SARS-CoV-2 variant being one of them. Omicron and its subvariants cause milder disease than previous variants like D614G and Delta^{252,256}. On the contrary, the number of severe clinical cases was highest during Delta variant infection^{245,261}. The Syrian golden hamsters model has been useful to understand the variant pathophysiology differences. Consistent with previous studies²⁵³, we observed in infected hamsters a low pathogenicity of the BA.1 Omicron variant compared to D614G or Delta variants, with no change of body weight and a moderate tropism to the lower respiratory tract (Figure 1).

For the Delta variant, most studies in hamsters did not reveal any differences compared to D614G or ancestral strains in terms of viral replication level or cytokine inductions^{262,263}. In our study, we compared for the first time the diffusion of the different VOCs within the nasal cavity starting at 1dpi. Few damages were observed after Omicron infection. With the D614G variant, the infection resulted in a high level of infected cell debris in the anterior zone of the nasal cavity lumen (Figures 4A and 4D). Interestingly, we observed that the Delta variant spread more rapidly, reaching already at 1dpi the posterior zone of the nasal cavity and the lungs,

which are far less affected at this stage with the D614G and Omicron BA.1 infections (Figures 1C and 4C). Moreover, the destruction of the olfactory epithelium was significantly greater after infection with the Delta variant at 1 dpi, particularly in the posterior zone, with statistically significant differences (Figure 4E). These particular features observed with the Delta variant could be related to an increased viral fusogenicity which has been linked to the P681R mutation in the spike protein^{264,265}. This property allows a more efficient cell diffusion through the formation of syncytia of the Delta variant²⁶⁴. With a similar kinetic approach in hamsters, Saito *et al.* study suggested that the Delta virus diffuses more rapidly within the lungs compared to the ancestral strain, reaching earlier the lung periphery even though the total viral load was similar to animals infected with the Wuhan strain.

The pathogenicity of the Delta virus in the nasal cavity seems not to be due to an increase viral replication, as the viral loads in NT were similar between D614G and Delta strains (Figure 1C). Other *in vivo* studies also did not demonstrate higher viral replication with Delta infection^{266,267,268}. Nevertheless, we observed heterogeneity among D614G animals with two of them harbouring a lower level of viral replication in the NT at 1dpi. Conversely, in accord with the enhanced spread characteristic of the Delta virus, all animals in this group have already attained a high level of virus load in the nasal turbinates.

As, it was demonstrated that the damages in the olfactory epithelium is induced more by the infiltration of the innate immune cells rather than by the viral replication *per se*²⁶⁰, we analysed by qPCR the presence of neutrophils (Ncf2), resident macrophages (Iba1) and circulating macrophages (CD68). We observed significant lower levels of these cell markers in Omicron - infected animals consistent with the few lesions present in the nasal cavity (Figures 2C and 4D). However, we had no differences between Delta and D614G infected hamsters. We also

investigated expression levels of cytokines and interferons responses by qPCR. Again Omicron-infected animals displayed lower expression of them especially at 1dpi, in accordance with previous studies²⁶⁹. Only IFN- λ level was significantly higher in Delta animals compared to D614G and no other statistically difference was discernible between both groups (Figure 2B). Contrary to IFN type I, IFN- λ expression is restricted to some cell types^{270,271} among them the epithelial cells from the nasal cavity, which are the SARS-CoV-2 primary target cells. Thus, IFN- λ could be a good marker of SARS-CoV-2 replication in NT. Indeed, the highest level of IFN- λ production in the Delta group could be due to the widespread infection within the entire nasal cavity at 1dpi. Altogether, the molecular results indicated strong correlations between viral replication in NT and induction of inflammatory responses at 1 dpi (Figure 3A). Baker *et al* study observed also a correlation between the viral load in human nasal fluids and several inflammatory cytokines at early stage of infection²⁷². Consequently, since the viral loads were lower in the Omicron group, the PCoA analysis enabled clear differentiation of these animals from other infection groups. However, it did not distinguish between the D614G and Delta groups, which had similar quantities of virus (Figure 3B).

The first day post-infection may be too late to distinguish cytokines and interferons responses between D614G and Delta strains. By this time, the infection and the destruction of the OE in the anterior zone is already engaged in D614G animals, triggering the inflammation process (Figure 4A). In Calu-3 cells, infection with the original SARS-CoV-2 strain induces the expression of type I and III IFNs along with the expression of ISGs from 6h post-infection and reaches significant levels from 12h onwards²⁷³. Then, it would be interesting to assess the induction of the innate immune response *in vivo* at an earlier stage, prior to 24 hours post-

infection. This could enable to better investigate the timing of inflammation stimulation and the differences between Delta and D614G variants.

Overall, our results indicate that studying early stages of the infection is very informative to decipher the physiopathology of SARS-CoV-2 variants, and to distinguish their virulence especially when their differences are modest. The SARS-CoV-2 is evolving with the regular appearance of new Omicron subvariants. Some of them (BA.5, BA.2.75 and BA.2.86) seem to be regaining virulence in comparison to BA.1^{274,275,276,277} and it remains necessary to continue to assess the potential pathogenicity of newly emerging variants in order to possibly adapt the public health countermeasures.

Acknowledgment: We would like to thank all the people from the PRBM platform of ENVA who helped us in the BSL3 animal facility and Alice Peron for technical help.

Funding: This work was supported by ANRS (grant DIVA, n° 22178).

Authors contribution: Conceptualization SLP, MFB, NM and AG Investigation: MFB, AG, LMN, ASA, OAG, YB, HH, MAG, SML, BK, SLP, NM Formal analysis: SLP, MFB, NM and AG Writing: SLP, MFB and AG with input from all authors.

Competing interests: All authors do not have conflict of interest.

Availability of data and material. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, SLP, upon reasonable request. Not applicable for material. Raw data have been deposited at the 4TU.ResearchData databank (<https://data.4tu.nl>) and are available under the accession number doi.org/10.4121/a4563fc2-5feb-48eb-b195-3ac4ccc99fe9.

S1 Table. List of primers

Gene name	Primers sequences (5' to 3')	NCBI accession number or Reference
Actin- β	ACTGCCGCATCCTCTTCCT	278
	TCGTTGCCAATGGTGATGAC	
CD68	CACCTGGGGCCATGTTTCTC	260
	CTCGGGTAATGCAGAAGGCA	
CXCL9	ACTGCCTCGTGTTACATCA	XM_040747409.1
	CCTTCGGGTGACAAAAACGA	
CXCL10	GCCATTCATCCACAGTTGACA	279
	CATGGTGCTGACAGTGGAGTCT	
Iba1	TGGATGAGATCAACAAGCAATTC	260
	AAGGCTTCCAGTTTGGAGGG	
IFN- α 7	CTGGTGGCTGTGAGGAAATA	280
	AGCAAGTTGGCTGAGGAAGA	
IFN- β	CCATCATGACCAACAGGTGGA	MW017682.1
	GTCTGGCCTCAAGTTCCTCG	
IFN- γ	GGCCATCCAGAGGAGCATAG	281
	TTTCTCCATGCTGCTGTTGAA	
IFN- λ	TCACATAGCCCGTTCAAGTC	XM_040734647.1
	TTCTTGAGCAGCCACTCTTCTATG	
IL-1 β	GGCTGATGCTCCCATTCG	282
	CACGAGGCATTTCTGTTGTTCA	
IL-6	CCTGAAAGCACTTGAAGAATTCC	279
	GGTATGCTAAGGCACAGCACT	
	GTTGCCAAACCTTATCAGAAATGA	282

IL-10	TTCTGGCCCGTGGTTCTCT	
ISG15	AAAGCCTACAGCCATGACCT	XM_013119951.2
	TTAGTCAGGGGCACCAGGAA	
Mx2	CCAGTAATGTGGACATTGCC	281
	CATCAACGACCTTGTCTTCAGTA	
NCF2	ATGTTCAATGGACAGAAGGGGC	260
	TGGGATCTTTCTGGGGCACT	
RPS6KB1	TCAGACCGGTGGAAAACCTCTAC	283
	TGATGCAAATGCCCAAAGC-	
SARS-CoV-2 E	CGATCTCTGTAGATCTGTT TC	This article
	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
TNF- α	GGAGTGGCTGAGCCATCGT	279
	AGCTGGTTGTCTTTGAGAGACATG	

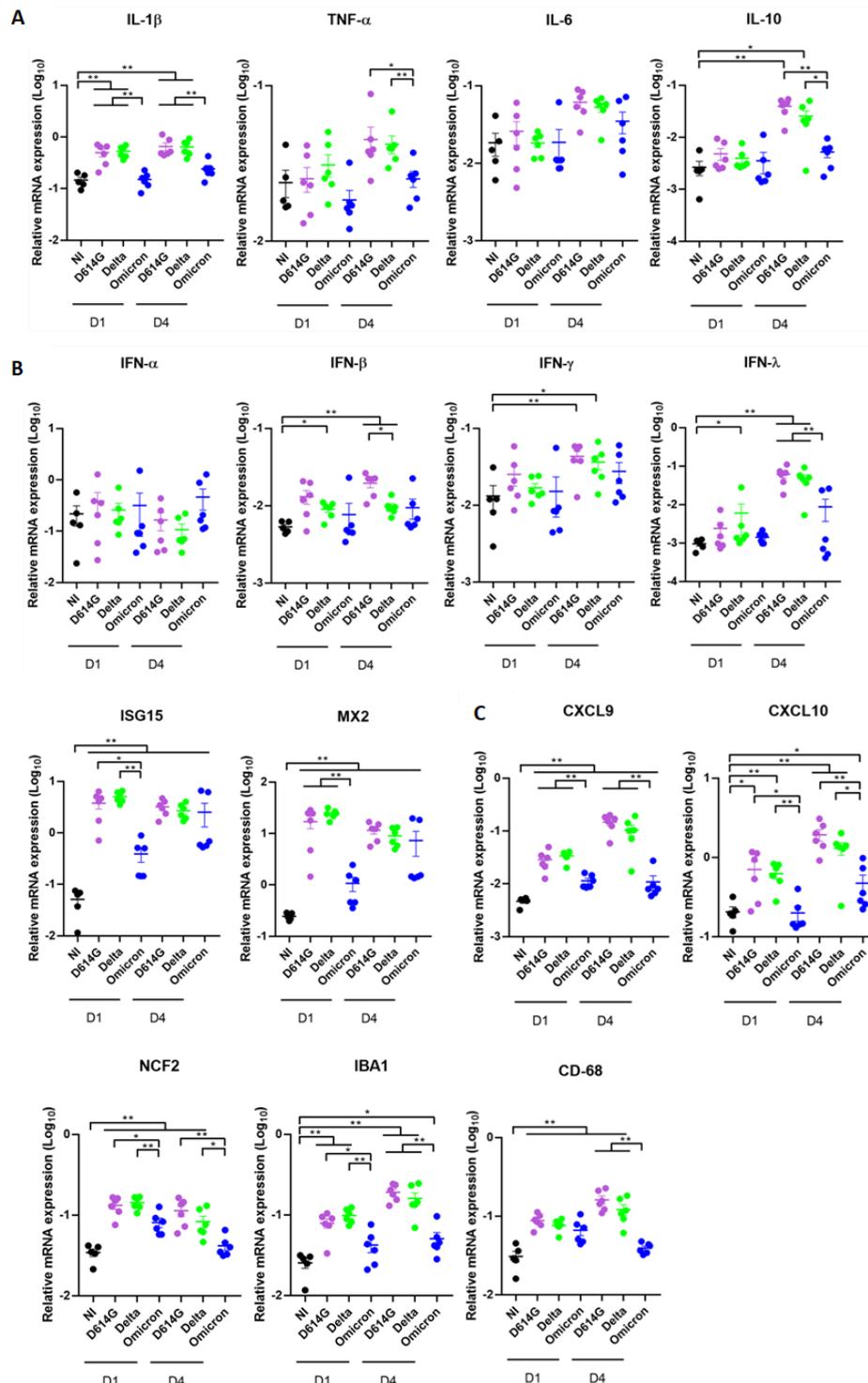


Figure S1. Inflammation markers in the lungs of infected hamsters. mRNA relative expression at 1dpi (D1) and 4dpi (D4) in the lungs from hamsters infected with D614G, Delta and Omicron (BA.1) variants **(A)** of inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6). **(B)** of markers from the IFN pathway (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , ISG15, MX2). **(C)** of leucocytes chemoattractive cytokines (CXCL9, CXCL10), neutrophils (Ncf2) and macrophages (Iba1, CD68). Results are expressed as means \pm SEM, n=, Statistical analysis were performed using Mann Whitney tests. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. NI=Non-infected

Partie 2 : Etude de la réponse IFN-I dans un modèle murin

I. Introduction

De nombreuses études ont montré que la réponse IFN-I est prédominante dans la réponse à l'infection par le SARS-CoV-2.^{193,284} Cependant cette réponse a montré être complexe et potentiellement délétère.^{193,284} En effet, plusieurs études ont montré que les niveaux d'IFN-I et III sont généralement diminués ou absents dans le sang de patients hospitalisés avec un COVID-19. Cependant, d'autres montrent qu'un haut niveau d'IFN- α , 5 à 10 jours après l'apparition des symptômes est associé à une maladie sévère et qu'une expression importante d'IFN-I et III dans les voies respiratoires inférieures est corrélée avec la sévérité de la maladie.¹⁹³ De plus, le moment et la localisation de la réponse sont des facteurs essentiels pour déterminer le rôle délétère ou non de l'IFN. Une induction rapide au niveau des voies respiratoires semble bénéfique pour le contrôle de l'infection tandis qu'une réponse systémique et retardée entrainerait plutôt une réplication virale incontrôlée et induirait une inflammation excessive.¹⁹³

Notre approche a été d'étudier la réponse inflammatoire et immunitaire à différents temps après infection dans un modèle *in vivo* déficient pour la réponse IFN-I, dans le but d'investiguer l'importance de cette réponse dans l'infection par le SARS-CoV-2. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec des souris Sv/129 déficientes pour le récepteur IFNAR.²⁸⁵ Ces souris possèdent une voie de synthèse de l'IFN fonctionnelle mais la voie de réponse à l'IFN-I est quant à elle bloquée car le récepteur IFNAR n'est pas exprimé. Les IFN-II et III ayant des récepteurs différents, ils ne sont donc pas impactés.

Nous avons infecté les souris avec un virus SARS-CoV-2 adapté au modèle murin.¹⁸⁴ Ce virus possède plusieurs mutations comme la mutation N501Y au niveau du gène codant la spike qui est essentielle pour permettre sa liaison au récepteur ACE2 murin.¹⁸⁴ Ce modèle nous permet de mimer au mieux une infection par le SARS-CoV-2 en nous abrogeant d'un possible biais expérimental que pourrait apporter des souris

exprimant de façon ubiquitaire le récepteur ACE2 humain comme les souris hACE2-K18.

Notre étude s'intéresse à l'importance de la réponse IFN-I durant une infection SARS-CoV-2 dans un modèle murin pour évaluer son effet antiviral mais aussi une éventuelle réponse inflammatoire délétère qui pourrait être en lien avec une production exagérée de l'IFN-I.

II. Matériels et méthodes

Virus

Les expériences *in vivo* ont été réalisées avec le virus SARS2-N501YMA₃₀, qui est une souche du SARS-CoV-2 adaptée au modèle murin par le Pr. S.Perlman . ¹⁸⁴

Souris

Les expériences *in vivo* ont été réalisées sur deux groupes de souris Sv/129 mâles âgées de 8 semaines. Le premier groupe est constitué de 24 souris Sv/129 déficientes pour le récepteur IFNAR (KO IFNAR). Elles ont été fournies par B. Klonjowski (ENVA). Le deuxième groupe est constitué de 24 souris SV/129 wild-type (WT) et proviennent du centre d'élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle). Toutes les expériences ont été menées dans une animalerie confinée A3. Les animaux ont été hébergés en portoir ventilé et chaque animal infecté a été manipulé sous poste de sécurité microbiologique. Dix-huit souris de chaque groupe ont été infectées par inoculation intranasale de 40µl dans chaque narine (5.10^3 TCID₅₀) sous anesthésie générale à l'isoflurane. Six souris de chaque groupe ont été euthanasiées à 0, 1, 2 et 4 jours post infection. Les poumons et la cavité nasale ont été prélevés. Toutes les expériences sur les animaux ont été agréées par le Comité d'éthique Anses/EnvA/UPEC (CE2A16) et autorisées par le ministère de la Recherche sous le numéro APAFIS# 39216-2022110414346680 v5.

Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN des cornets olfactives et d'un lobe pulmonaire a été réalisé. Après leur prélèvement, les organes ont été plongés dans de l'azote et conservé à - 80°C. Les ARN totaux ont été extraits par Trizol-Chloroforme. Pour ce faire, 1ml de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) a été ajouté à chaque échantillon avant broyage (3 cycles de 20s à 4000g). Puis, les échantillons ont été laissés 5min à température ambiante pour permettre la dissociation des complexes ribonucléoprotéiques. Les débris cellulaires ont ensuite été culotés par centrifugation à 12000g pendant 5min à 4°C. Le surnageant a été récupéré est 200ul de chloroforme y ont été ajoutés afin d'extraire les acides nucléiques. Après avoir été incubés 15min à RT, les échantillons ont été centrifugés à 16000g pendant 15min à 4°C. Environ 300 à 350ul de la phase aqueuse contenant les ARN ont été récupérés et mélangés avec 500ul d'isopropanol avant d'être incubés 10min à RT. Puis une centrifugation de 10min à 16000g à 4°C a été effectuée, un culot était alors présent. Trois rinçages de ce culot avec 1ml de d'éthanol 75% et 5min de centrifugation à 12000g à 4°C ont été effectués afin d'éliminer toute trace résiduelle d'isopropanol ou de chloroforme/trizol. Le culot a ensuite été élué avec 30 à 50ul d'eau RNase free. Un dosage des ARN par Nanodrop a ensuite été effectué.

Synthèse ADN complémentaire

L'ARN extrait a été rétrotranscrit via l'enzyme SuperScript IV (SSIV) First-Stand cDNA Synthesis Reaction (Invitrogen). 400 nanogrammes d'ARN ont été mélangés à des amorces « random hexamers » ainsi qu'à un mix de dNTP. Après incubation à 65°C pendant 10min puis mise sur glace, un mélange contenant du tampon SSIV, du DTT (Dithiothréitol), de l'inhibiteur d'ARNase et de l'enzyme SSIV a été ajouté. La rétrotranscription a ensuite été faite dans un thermocycler (Eppendorf) avec le programme suivant : 23°C pendant 10min, puis 55°C pendant 10min et enfin 80°C pendant 10min. Les ADN complémentaires (ADNc) ont ensuite été dosés par Nanodrop.

Amplification génomique et quantification

La quantification du niveau d'expression des ARN a été réalisée à partir du kit QuantiNOVA SYBR Green PCR (Qiagen) et les amorces spécifiques (tableau 4). 100 nanogrammes d'ADNc ont été ajoutés à 18µl de mélange réactionnel présent dans le kit. La réaction a été faite dans un thermocycleur (LightCycler 96 Roche) avec le programme suivant :

Etape	Nombre de cycle	Durée	Température
Activation	1	2min	95°C
Cycles	40	5sec	95°C
		10sec	60°C
Fusion	1	10sec	95°C
		60sec	65°C
		1sec	97°C

La fluorescence a été enregistrée au cours de la réaction d'amplification. De plus, afin de vérifier la capacité des amorces à amplifier correctement un produit spécifique, une courbe de fusion a été réalisée après les 40 cycles d'amplification. La mesure de l'expression relative de l'ARN a ensuite été réalisée. Premièrement l'expression de chaque gène étudié a été normalisée par rapport à la moyenne du niveau d'expression des deux gènes de ménages ActineB et HSP90, $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{ech} - Ct_{ménage})}$. Puis le ratio du $2^{-\Delta Ct}$ du gène d'intérêt de chaque échantillon a été fait par rapport à la moyenne des $2^{-\Delta Ct}$ du gène d'intérêt des non infectés, Expression relative = $2^{-\Delta Ct_{ech}} / 2^{-\Delta Ct_{Moyenne_NI}}$

Tableau 4 : Amorces utilisées pour les réactions de qPCR

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
Actine B	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATG
HSP90	TAACCTGGGAACCATTGCTAAGT	AAACTGCCCGATCATGGAGAT
SgE	CGATCTCTTG TAGATCTGTTTC	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
ISG15	GGCCACAGCAACATCTATGAG	CGCAAATGCTTGATCACTGTGC
Mx2	CAGAGAGACTGACCGCAGA	GGGCAGTGATGTCCTGGTTA
IL-6	GAGGATAACCACTCCCAACAGAC	AAAGTGCATCATCGTTGTTTCATACAA
TNF α	GAACTGGCCAGAAGAGGCACT	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
IBA1	CTGGAGGGGATCAACAAGCAAT	GTAGCTGAACGTCTCCTCGG
IFN λ 3	CAGTGGAAGCAAAGGATTGCC	GAGATGAGGTGGGACTGCAC

Analyses Immunohistochimiques : Cavité nasale

Après avoir été prélevées, les héli-têtes ont été fixées dans de la paraformaldéhyde 4% pendant 3 jours à 4°C. Puis elles ont été décalcifiées pendant 3 semaines à 4°C dans un tampon commercial Ostéosoft. Afin de limiter de potentiels dégâts liés à la congélation, l'eau a été éliminée de la cavité nasale par bain de sucre 30%. Les blocs ont ensuite été congelés à -45°C dans de l'isopentane. Des coupes coronales successives de 12 μ m ont été réalisées au Cryostat CryoStarNX50. Un immunomarquage des tissus a été effectué pour détecter différents antigènes d'intérêts. Certaines coupes ont été plongées dans un tampon citrate (pH 6, 100mM) à 95°C pendant 30min afin de réaliser un démasquage antigénique. Après rinçage, les coupes ont été perméabilisées par trois bains avec une solution de PBS, Triton 0,1%. Les coupes ont alors été incubées pendant 1h dans un tampon de saturation (PBS + Bovine Serum Albumin (BSA) 1% + Triton 0,1%). Les anticorps primaires ont été incubés sur la nuit à 4°C dans un tampon (PBS + BSA 0,2% + Triton 0,1%) (tableau 5). Les coupes ont été lavées 3 fois au PBS + Triton 0,1% avant d'être incubées avec les anticorps secondaires durant 2h à température ambiante (tableau 6). Le noyau des cellules a été marqué au Hoechst pendant 10min avant de figer les tissus dans du milieu de montage Glycergel. Les coupes ont ensuite été observées au microscope

optique 1X71 Olympus équipé d'une caméra CCD refroidie Orca ER Hamamatsu et une loupe binoculaire Lieca MDG4.

Tableau 5 : Anticorps primaires

Anticorps	Espèce	Référence	Dilution
Anti- SARS-CoV-2 Nucléocapside	Polyclonal chèvre	NeoBiotech : NB-22-73050-20	1/1000
Anti- Iba1	Monoclonal lapin	Abcam : Clone EPR16588	1/500

Tableau 6 : Anticorps secondaires

Anticorps	Espèce	Fluorescence	Référence	Dilution
Anti-chèvre	Singe	Alexa Fluor 488	Invitrogen : Molecular probes A11055	1/400
Anti-lapin	Singe	Alexa Fluor 555	Invitrogen : Molecular probes A31572	1/800

Analyses histologiques : Poumons

Un lobe pulmonaire a été prélevé pour réaliser des analyses histologiques. Le prélèvement a d'abord été fixé dans de la paraformaldéhyde 4%. Il y a ensuite eu une étape d'inclusion qui consiste dans un premier temps à déshydrater le prélèvement par passages dans des bains successifs d'éthanol de degrés alcoolique croissant (70° à 100°), les prélèvements ont ensuite été incubés dans un bain de xylène permettant d'éliminer l'alcool avant d'être inclus dans la paraffine chaude (56°C) à l'état liquide. Le bloc a alors été placé sur une plaque réfrigérante pour solidification avant d'être démoulé. Les blocs de paraffine ont été coupés grâce à un microtome afin d'effectuer des coupes d'environ 3,5µm. Après une nuit de séchage à 37°C, les coupes sont colorées à l'Hémalun-Eosine-Safran (HES) grâce à un automate de coloration (Leica ST5020/ Leica CV5030). Les coupes ont également été utilisées pour réaliser des marquages immunohistochimiques du virus et grâce à un automate (Res IHC Omni-

UltraMap HRP XT Module Discovery), en utilisant un anticorps primaire dirigé contre la Nucléocapside du SARS-CoV-2 (NovuBio NB100-56576 1/100). Des scores d'infection ont été mesurés en suivant une échelle (Figure 20) selon le niveau d'infection. Des scores de dommage ont été mesurés à partir d'une échelle allant de 0 (pas de lésion) à 2 (beaucoup de lésion).

Echelle marquage

	0	1,5	3
Alvéolaire			
Bronchiole			

Figure 20 : Echelle de marquage des coupes histologiques de poumons

Le niveau d'infection est scoré dans les alvéoles et dans les bronchioles. 0 = pas d'infection ; 1,5 = infection moyenne ; 3 = infection forte

Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été effectuée par des tests non paramétriques de Mann-Whitney via le logiciel Graphpad Prism 8. Les analyses en composantes principales ont été réalisées sur R studio ainsi que le test statistiques Adonis. Les différences significatives sont indiquées : p-value < 0.05 : *, p-value < 0.01 : **.

III. Résultats

A. L'infection par le MA30 entraîne une perte de poids des souris

Notre objectif a été d'étudier le rôle de la réponse IFN-I dans la physiopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2. Pour cela, des souris Sv/129 mâles adultes déficientes (KO) ou non (WT) pour le récepteur IFNAR ont été infectées par voie intranasale avec $5 \cdot 10^3$ TCID₅₀ de virus MA30, un virus SARS-CoV-2 adapté au modèle murin. À 1, 2 ou 4 jours post-infection, 6 souris KO et 6 souris WT ont été sacrifiées afin de prélever les poumons ainsi que les cornets olfactifs pour analyse histologique et moléculaire. Cinq souris WT et 6 souris KO contrôles ont été traitées avec du DMEM (Figure 21a). Le poids des souris a été mesuré de J0 à J4 post-infection. Quatre jours après l'infection, les souris infectées dans les deux groupes (WT et KO) présentent une perte de poids d'environ 15% comparé aux souris non infectées, sans différence mesurée entre les deux groupes (Figure 21b). Cliniquement, l'état général des souris infectées dans les deux groupes s'est fortement dégradé à partir de J3. A J4, les souris avaient le poil ébouriffé, étaient en dyspnées et hypoactives quel que soit le groupe infecté.

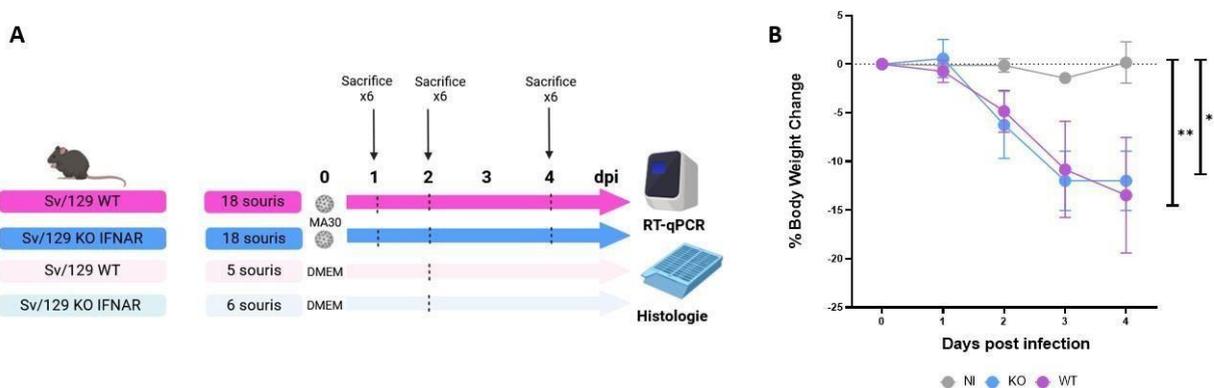


Figure 21 : Infection de souris Sv/129 WT et KO IFNAR avec un virus SARS-CoV-2 adapté au modèle murin (MA30)

A) Design expérimental. Des souris mâles Sv/129 KO (IFNAR^{-/-}) et WT ont été infectées avec $5 \cdot 10^3$ TCID₅₀ de virus SARS-CoV-2 murinisé MA30 par voie intranasale. A 1, 2 et 4 jours post infection, 6 mâles par groupe ont été euthanasiés. 5 souris WT et 6 souris KO contrôles ont été traitées avec du DMEM. Les poumons et les cornets olfactifs ont été prélevés pour des analyses par RT-qPCR et histologiques. B) Le poids des souris a été mesuré de 1 à 4 jours post infection. Des analyses statistiques par

test Anova-Two way suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey ont été réalisées. DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium ; Dpi : Days post-infection NI: non-infected. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

B. Détection du virus dans les cornets olfactifs et dans le poumon

L'ARN total a été extrait des organes et le niveau d'expression du génome viral a été quantifié par RT-qPCR. Nous avons quantifié le niveau d'expression de l'ARNm sous-génomique de la protéine d'enveloppe du virus. Dans les cornets olfactifs, nos résultats montrent une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm sous-génomique viral au cours du temps, que ce soit chez les souris WT ou KO sans différence entre les groupes à J1 et J2 post-infection, mais à J4 le niveau d'expression de l'ARNm sous-génomique viral est plus important chez les souris KO que chez les WT (Figure 22a), sans que cette différence soit statistiquement significative. De même, dans les poumons, la quantité de génome viral est similaire entre les 2 groupes à J1 et J2 post-infection mais à J4, il y a plus de virus chez les souris KO que chez les WT sans que cette différence soit statistiquement significative (Figure 22b). Le niveau d'expression de l'ARNm sous-génomique viral est plus important dans le poumon que dans les cornets olfactifs à J1 et J2 post-infection, mais contrairement à ce qui est observé dans les cornets olfactifs, la quantité de virus diminue d'environ 2 logs pour les souris WT et 1 log pour les souris KO à J4 post-infection. Ainsi, l'infection virale augmente au cours du temps dans les cornets olfactifs, tandis que dans le poumon l'infection semble être à son pic dès J1 et diminue au cours du temps. Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'impact de l'infection virale dans les cornets olfactifs dans une première partie puis aux poumons dans une seconde.

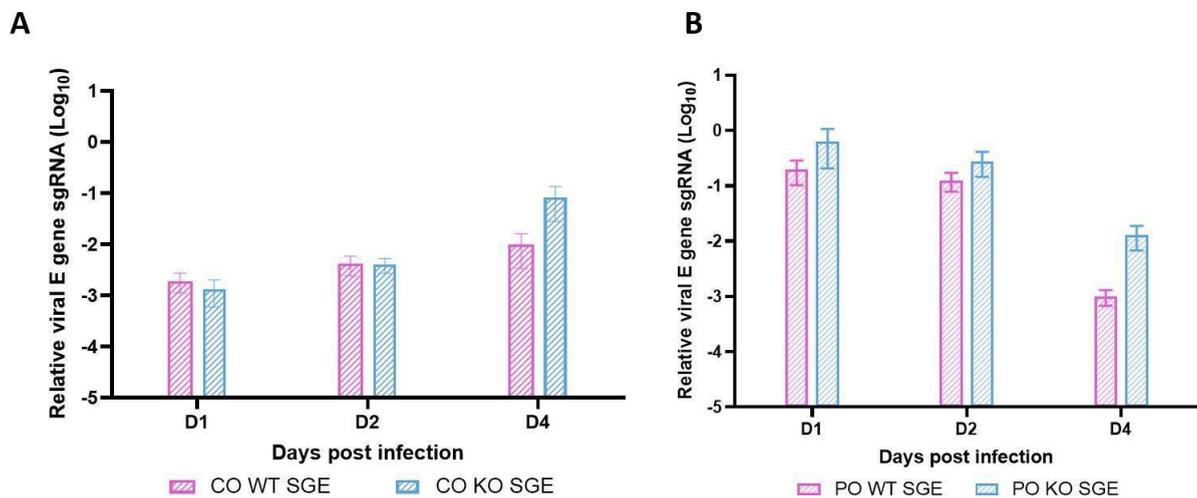


Figure 22 : Quantification de l'ARN viral sous-génomique après infection de souris Sv/129 par le MA30

Le niveau de réplication virale dans les cornets olfactifs (A) et dans le poumon (B) à 1, 2 et 4 jours post infection a été déterminé par RT-qPCR en quantifiant l'expression de l'ARN viral sous-génomique (SgRNA) par rapport au niveau d'expression des gènes de ménages β -actine et HSP90. Moyenne \pm SEM, n=6. Des analyses statistiques ont été réalisées par un test de Mann Whitney.

C. La réponse immunitaire innée associée à l'infection dans les cornets olfactifs

1. Mesure de la réponse immunitaire innée par RT-qPCR

Nous avons analysé la réponse immunitaire innée mise en place dans les cornets olfactifs des souris WT et KO après infection au cours du temps. Nous avons mesuré le niveau d'expression de l'ARNm de certains marqueurs de l'immunité innée et de la réponse inflammatoire à J1, J2 et J4 post-infection par RT-qPCR en comparaison avec des souris non-infectées WT ou KO. De manière générale, le niveau basal des différents marqueurs mesurés est plus faible chez les souris KO contrôle que chez les souris WT. Afin de pouvoir comparer les deux groupes, nos résultats de RT-qPCR ont été normalisés par rapport aux valeurs moyennes des souris contrôles de chacun des groupes WT ou KO.

Nous avons quantifié l'expression relative de l'ARNm de 2 ISG, Isg15 et Mx2, au cours du temps (Figure 23a). Le niveau d'expression de ces marqueurs est environ 10 fois plus élevé chez les souris WT que chez les KO à J1 et J2 post-infection (p-value <0,01) mais il n'y a plus de différence entre les deux groupes à J4.

Le niveau d'expression de l'ARNm de l'IFN λ 3 (IFN type III) est globalement similaire entre les deux groupes aux différents temps mesurés avec une augmentation de J1 à J4 (Figure 23a). Le niveau d'expression de ce marqueur est très légèrement supérieur à J2 et J4 chez les souris KO par rapport aux WT sans que cette différence soit statistiquement significative.

Nous avons ensuite quantifié le niveau d'expression de l'ARNm de cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire (IL-6, TNF- α) au cours du temps (Figure 23b). L'expression de l'ARNm de ces marqueurs augmentent aussi de J1 à J4 post-infection dans les deux groupes. Elle est significativement supérieure chez les souris WT par rapport au groupe KO (p-value < 0,01) dès J1 post-infection, à l'exception du niveau d'expression de l'ARNm de TNF α à J4 qui est similaire dans les deux groupes.

Pour plusieurs marqueurs (IFN- λ 3, Il-6 et TNF- α), on observe, dans le groupe des souris KO, une diminution de leur expression à J1 par rapport à leur groupe contrôle. Les animaux de ce groupe contrôle étaient plus âgés que ceux utilisés pour les infections et pourraient avoir un niveau basal d'inflammation plus élevé que les animaux plus jeunes.

Nous avons ensuite mesuré de manière indirecte la présence de macrophages résidents par la quantification du marqueur Iba1 (Figure 23c). Le niveau d'expression Iba1⁺ est significativement augmenté chez les souris KO à J2 (p-value <0,01) et J4 (p-value < 0,05) par rapport aux souris WT. Le niveau d'expression de l'ARNm d'Iba1⁺ mesuré chez les souris WT n'augmente que très légèrement au cours du temps par rapport aux souris non infectées.

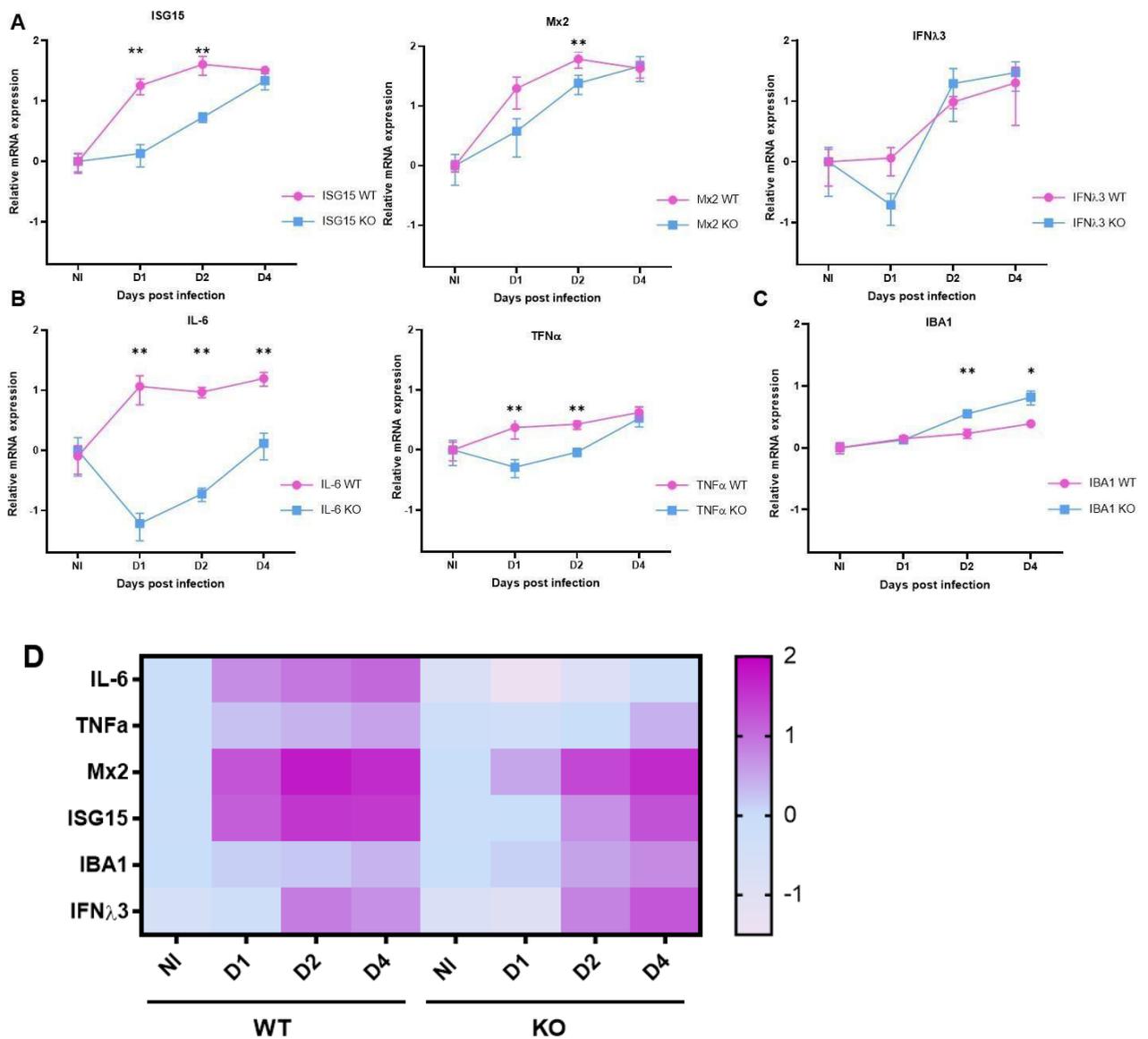


Figure 23 : Mesure des niveaux d'expression des ARNm de différents marqueurs dans les cornets olfactifs de souris Sv/129 infectées par le virus MA30.

Le niveau relatif d'expression de A) marqueurs de la voie IFN et ISG (Isg15, mx2, IFNλ3). B) de cytokines inflammatoires (IL-6, TNF-α). C) marqueurs des macrophages résidents (Iba1) à 1, 2 et 4 jours post-infection dans les cornets olfactifs de souris WT et KO. D) Représentation par heatmap du niveau d'expression de différents marqueurs. Réalisé sur Graphpad Prism. Résultats exprimés en moyenne ± SEM, n=6. Analyses statistiques par test de Mann Whitney entre les groupes WT et KO *p < 0.05; **p < 0.01.

Ainsi, nos résultats montrent une activation de la réponse immunitaire innée et inflammatoire qui est très importante dès J1 post-infection chez les souris WT dans les cornets olfactifs. Elle est activée plus tardivement dans le groupe des souris KO mais à J4 post-infection, à l'exception d'Il-6, le niveau d'expression des marqueurs mesurés est similaire dans les deux groupes. En revanche, la quantité de macrophages résidents est significativement plus importante chez les KO que chez les WT dès 2 jours post-infection (Figure 23d).

2. Analyse multivariée des quantifications du génome viral et de la réponse immunitaire innée

Nous avons réalisé des analyses en composante principale à J1, J2 et J4 post-infection des différentes données recueillies précédemment (Figure 24). Les résultats montrent une séparation distincte des groupes WT et KO dans les cornets olfactifs à J2 et J4 mais pas à J1 post-infection. Des analyses statistiques par Adonis confirment effectivement que la différence entre les groupes est significative à J2 (p-value=0,002) et J4 (p-value=0,038) mais pas à J1 (p-value=0,052). Ainsi malgré une quantité de virus similaire entre les deux groupes à J2, l'activation de la réponse immunitaire innée (Mx2, Isg15) est différente et contribue fortement à la distinction entre les deux groupes. A J4, cette distinction est surtout due à la quantification du marqueur des macrophages résidents (Iba1+), de la réponse inflammatoire (Il-6) et dans une moindre mesure à la quantité de virus.

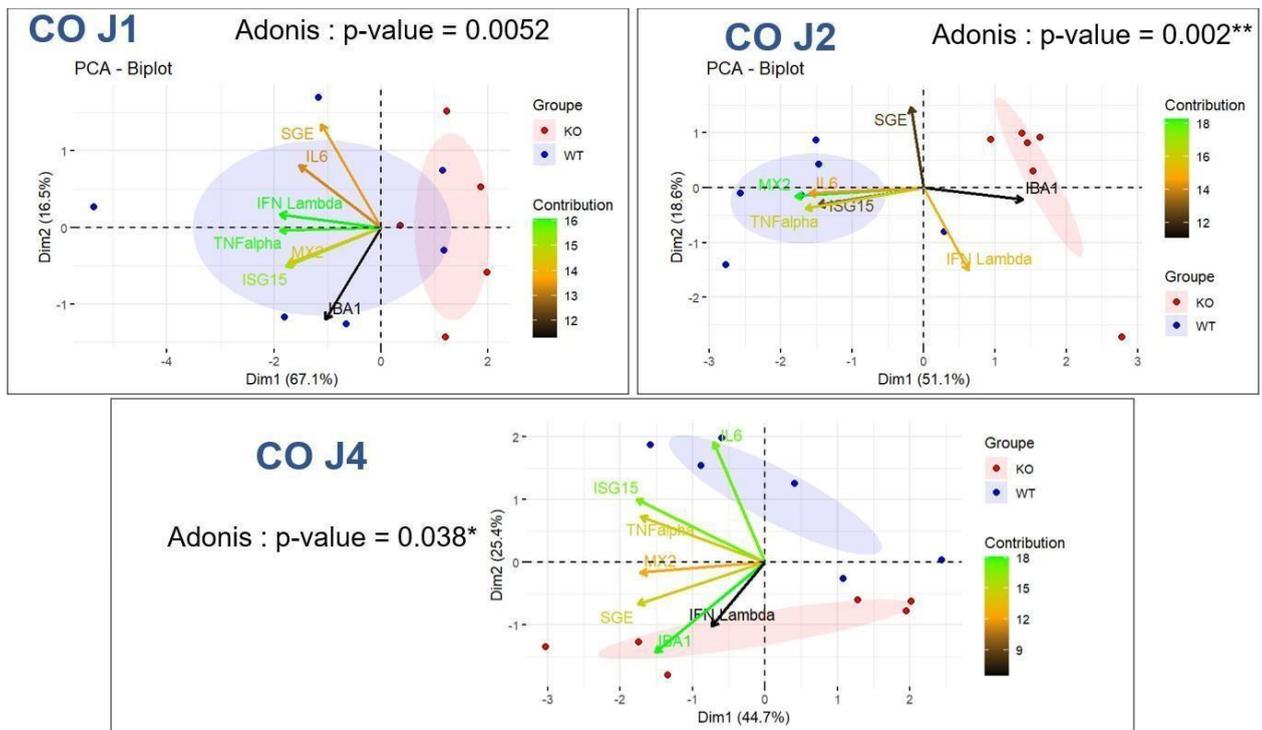


Figure 24 : Analyse en composantes principales à différents temps post infection dans les cornets olfactifs

ACP biplots des niveaux d'ARN dans les cornets olfactifs (CO) à 1, 2 et 4 jours post-infection. Chaque point représente un animal, coloré selon leur groupe (Bleu = WT ; Rouge = KO). Les ellipses représentent un intervalle de confiance de 95%. Les flèches sont colorées selon la contribution du gène correspondant. Tests statistiques Adonis * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3. Analyses histologiques dans la cavité nasale

Lors de la dissection, une hémis-tête de chaque animal a été conservée et des analyses immunohistochimiques de la cavité nasale ont pu être réalisées à J1 et J4 post-infection par l'équipe du Dr. Nicolas Meunier (VIM, INRAE Jouy-en-Josas). Des coupes histologiques ont été réalisées sur les parties antérieures et postérieures de la cavité nasale. La partie antérieure est constituée majoritairement d'épithélium respiratoire tandis que la partie postérieure est composée principalement d'épithélium olfactif (Annexe 1). Les deux épithéliums reposent sur la lamina propria qui contient des cellules basales ainsi que des cellules immunitaires dont les macrophages résidents portant le marqueur Iba1. Dans l'épithélium olfactif, la lamina propria contient également des faisceaux d'axones olfactifs et les glandes de Bowman, qui sont des

cellules productrices de mucus qui vont s'étendre de la lamina propria jusqu'à la surface apicale de l'épithélium.²⁸⁶ L'épithélium olfactif est un tissu pseudostratifié composé de neurones olfactifs et de cellules sustentaculaires, qui sont les cellules cibles de l'infection par le SARS-CoV-2.^{140,286}

Un marquage de la nucléocapside du SARS-CoV-2 et des macrophages résidents (marquage Iba1⁺) ainsi qu'un score des dommages histologiques ont été réalisés. Dans la zone antérieure de la cavité nasale (Figures 25a et b), le marquage de la nucléocapside (en rouge sur les photos) atteste de la présence du virus à J1 et J4 post-infection, dans les deux groupes sans qu'il y ait de différence significative à J1. L'infection est significativement plus importante chez les KO que chez les WT à J4 post-infection (p-value<0,05). La présence de macrophages résidents Iba1⁺ augmente légèrement entre J1 et J4 dans les deux groupes sans différence significative. A J1 post-infection, quelques lésions tissulaires ont été observées chez 5 souris sur les 6 du groupe WT tandis que dans le groupe des KO seulement 2 souris sur 6 ont présenté des lésions légères. En revanche, à J4 post-infection, les dommages tissulaires sont plus importants sans distinction statistique entre les deux groupes. Un ratio entre le score d'Iba1 par rapport au score de l'infection pour chaque animal a été réalisé et indique que la quantité de cellules Iba1⁺ par rapport au virus est significativement supérieure chez les souris WT par rapport aux KO à J1 post-infection (p-value<0,05). Ainsi, à niveau égal d'infection, la présence de cellules Iba1⁺ est supérieure chez les souris WT. La même tendance est observée à J4 mais n'est pas statistiquement significative. De plus, le ratio des dommages par rapport au virus nous indique que dans la zone antérieure à J4 on a autant de dommage que de virus et pas de différence entre les deux groupes suggérant que les dommages sont associés au niveau d'infection.

Dans la partie postérieure (Figure 25c), qui est la partie sur laquelle les analyses moléculaires ont été réalisées, l'antigène viral est essentiellement détecté à J4 post-infection, avec une présence significativement plus élevée chez les KO, comme montré dans nos analyses moléculaires. De même, les macrophages résidents Iba1⁺ sont essentiellement détectables à J4 avec une quantité plus importante dans le groupe des souris KO (p< 0,05). Les lésions tissulaires ne sont pas observées à J1

d'épithélium olfactif. D'après N. Meunier B) La nucléocapside du virus est marquée en rouge, les cellules Iba1+ en vert et les noyaux en bleu. C) Les scores d'infection, d'Iba1, de dommage de la zone antérieure et D) postérieure. Réalisé sur Graphpad. Analyses statistiques réalisées avec le test de Mann Whitney *, $p < 0.05$.

Pour résumer, les résultats obtenus au niveau des cornets olfactifs indiquent que la charge virale augmente au cours du temps dans les deux groupes avec .A J4, la charge virale un peu plus élevée chez les souris ifnar^{-/-} comparée aux souris WT, ce que confirme les résultats d'histologie. De plus, pour les souris ifnar^{-/-} un retard de l'augmentation du niveau d'expression de l'ARNm des marqueurs d'ISG et cytokiniques est observé. Nos résultats ne montrent pas de différence entre les groupes concernant le niveau d'expression de l'ARNm d' IFN λ 3. La présence des macrophages, mesurée par le marqueur Iba1⁺ augmente au cours du temps uniquement chez les souris ifnar^{-/-}.

D. La réponse immunitaire innée associée à l'infection dans les poumons

1. Mesure de la réponse immunitaire innée et inflammatoire par RT-qPCR

Pour analyser la réponse immunitaire et inflammatoire dans le poumon, nous avons utilisé la même démarche que dans les cornets olfactifs. L'expression relative des différents marqueurs a également été mesurée par RT-qPCR. Le niveau d'expression de l'ARNm des ISGs diminue au cours du temps (Figure 26a). Le niveau d'expression relatif d'Isg15 et Mx2 augmente dès J1 et jusqu'à J2, puis diminue fortement à J4 dans les deux groupes WT et KO. Pour Isg15, le niveau d'expression est significativement plus important chez les souris WT que chez les KO à J1 et J2 (p -value < 0,05 et < 0,01 respectivement) alors qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes concernant le marqueur Mx2.

Le niveau de l'expression de l'ARNm de l'IFN λ 3 augmente également dans les deux groupes dès J1 mais tandis qu'il diminue dans le groupe WT à J4, il reste élevé dans le groupe des souris KO et est alors significativement plus élevé que celui des souris WT (p -value < 0,05).

Concernant les cytokines inflammatoires (Figure 26b), le niveau d'expression de l'ARNm d'IL-6 et TNF- α augmente de J1 à J2 et tend à diminuer à J4 post-infection (particulièrement le marqueur TNF- α). Une différence significative est observée à J4

avec un niveau d'expression de l'ARNm de TNF- α plus élevé chez les souris WT que chez les souris KO (p-value<0,01).

Nous avons ensuite recherché la présence des macrophages en utilisant de nouveau le marqueur Iba1+(Figure 26c). Une augmentation du niveau d'expression de cet ARNm a été observée dans les deux groupes de J1 à J4 avec une augmentation de presque 100 fois entre J1 et J2. Contrairement à ce que nous avons observé dans les cornets olfactifs, le niveau d'expression du marqueur Iba1+ est significativement plus important chez les souris WT que chez les KO à J1 et J4 post-infection (p-value <0,05 et <0,01 respectivement).

En résumé, dans le poumon la réplication virale est élevée à J1 post- infection puis va diminuer au cours du temps avec une quantité de virus qui reste significativement plus élevée les souris KO que chez les WT (Figure 22). Les profils d'expression des ARNm des différents marqueurs de la voie IFN et de la voie inflammatoire semblent suivre cette cinétique (sauf pour IL-6) avec une expression plus élevée (notamment pour Isg15 et TNF- α) chez les souris WT que chez les souris KO. La quantité de macrophages, mesurée par le marqueur Iba1+, augmente au cours du temps et est aussi plus importante chez les souris WT que chez les KO (Figure 26d).

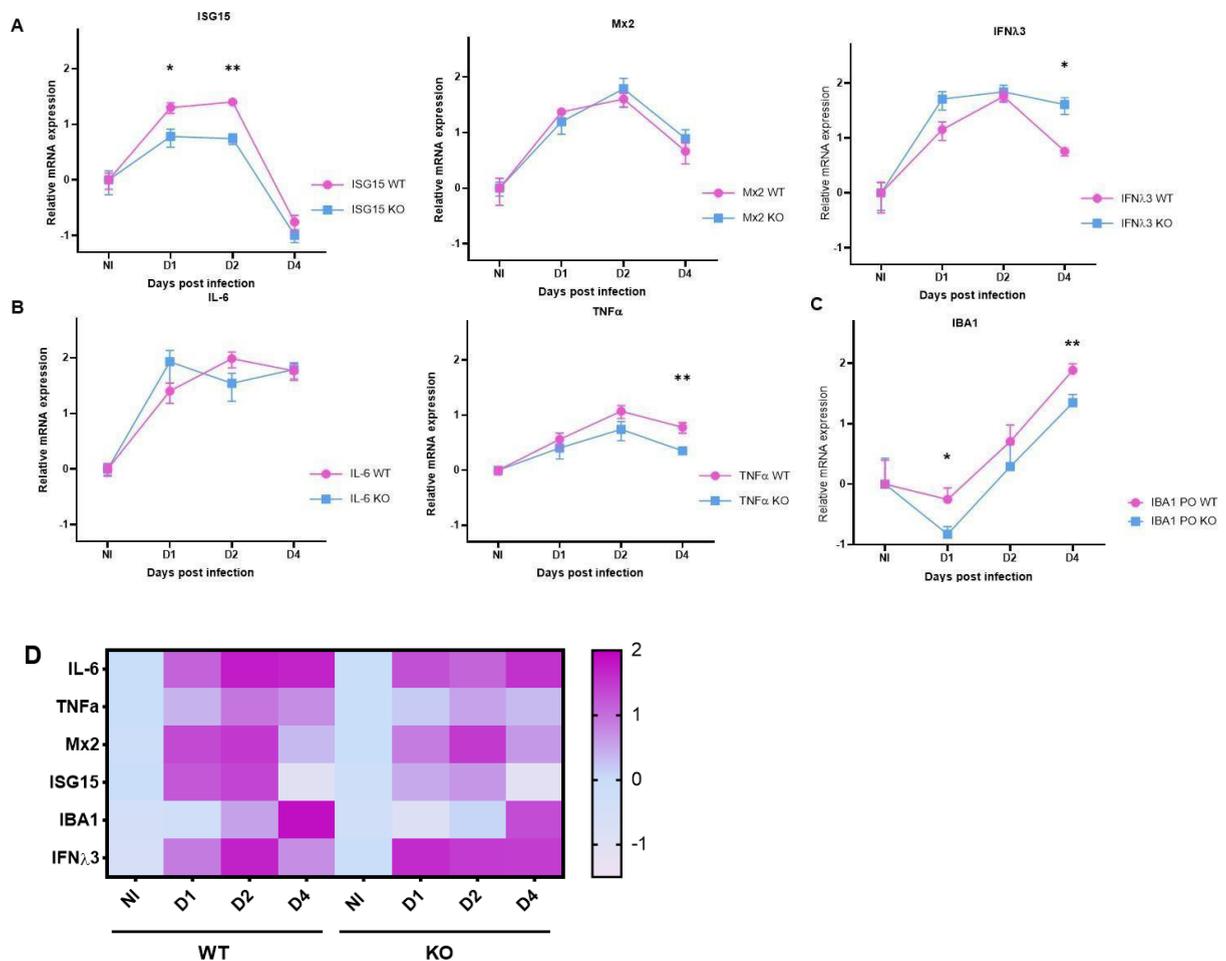


Figure 26 : Mesure des niveaux d'expression des ARNm de différents marqueurs dans le poumon de souris Sv/129 infectées par le virus MA30.

Le niveau relatif d'expression de A) marqueurs de la voie IFN (Isg15, mx2, IFNλ3). B) de cytokines inflammatoires (IL-6, TNF-α). C) de macrophages (Iba1) à 1, 2 et 4 jours post-infection dans les poumons de souris WT et KO infectées par le MA30 a été déterminé par RT-qPCR. D) Représentation par heatmap du niveau d'expression de différents marqueurs dans les poumons à 1, 2 et 4 jours post-infection. Réalisé sur Graphpad Prism. Résultats exprimés en moyenne ± SEM, n=6. Analyses statistiques réalisées avec le test de Mann Whitney *, p < 0.05; **, p < 0.01.

2. Analyse multivariée des quantifications du génome viral et de la réponse immunitaire innée

Nous avons réalisé des analyses en composantes principales à partir des données du niveau d'expression relative des transcrits viraux et marqueurs de la réponse

immunitaire innée des souris infectées issues des deux groupes à différents temps post-infection. La représentation graphique des individus par projection sur les deux axes principaux nous montre une séparation nette entre les groupes WT et KO à J1, J2 et J4 post-infection, suggérant une signature transcriptionnelle propre aux souris déficientes pour le récepteur IFNAR. Des analyses statistiques par test Adonis ont permis de montrer que ces groupes sont significativement différents particulièrement à J4 avec $p < 0,002$. A J1 et J2 la distinction entre les deux groupes est surtout due à la réponse inflammatoire ($\text{TNF-}\alpha$ et IL-6). A J4 plusieurs marqueurs contribuent fortement à la séparation de deux groupes notamment la quantité de virus, d'IFN λ 3 et de nouveau le marqueur $\text{TNF-}\alpha$ (Figure 27).

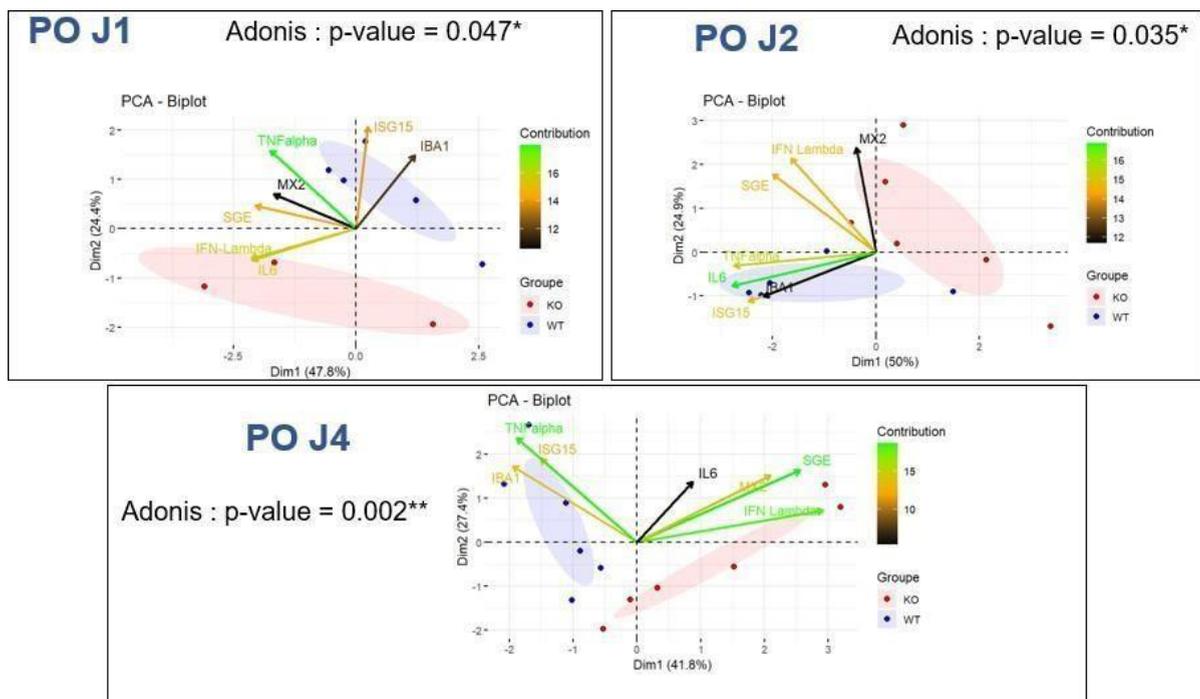


Figure 27 : Analyse en composantes principales à différents temps post infection dans le poumon

PCoA biplots des niveaux d'ARNm des différents marqueurs dans le poumon à 1, 2 et 4 jours post infection. Chaque point représente un animal, coloré selon leur groupe (Bleu = WT ; rouge =KO). Les ellipses correspondent à un intervalle de confiance de 95%. Les flèches sont colorées selon la contribution du gène correspondant. Tests statistiques Adonis réalisés *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

3. Analyses histologiques du poumon

Des analyses histologiques de coupe de poumon ont également été réalisées par le Dr.Hélène Huet et le Pr Grégory Jouvion.

Une coloration trichromique HES (Hémalun-Eosine-Safran) a permis de mettre en évidence l'impact de l'infection dans le tissu pulmonaire à J4 post-infection dans les deux groupes (Figure 28a). Les WT semblent présenter une forte inflammation de la paroi vasculaire jusqu'à l'endothélium avec une extension dans le parenchyme pulmonaire et une forte infiltration périvasculaire de cellules immunitaires. La paroi vasculaire des poumons des souris KO semble avoir moins de lésions avec une infiltration de cellules immunitaires principalement périvasculaire et un léger œdème.

Un marquage de la nucléocapside du virus (en orange) a été réalisé et des scores d'infection au niveau des bronchioles et des alvéoles ont été faits pour chaque animal des deux groupes (Figure 28b). A J1, nous pouvons voir que le virus est majoritairement retrouvé dans les bronchioles tandis qu'à J4, il est très présent dans les alvéoles. Ces résultats montrent une dissémination du virus des bronchioles vers les alvéoles au cours du temps et ce, pour les deux groupes. Cependant le virus est significativement plus présent dans les alvéoles à J4 chez les KO que chez les WT (p -value $<0,05$) (Figure 28c).

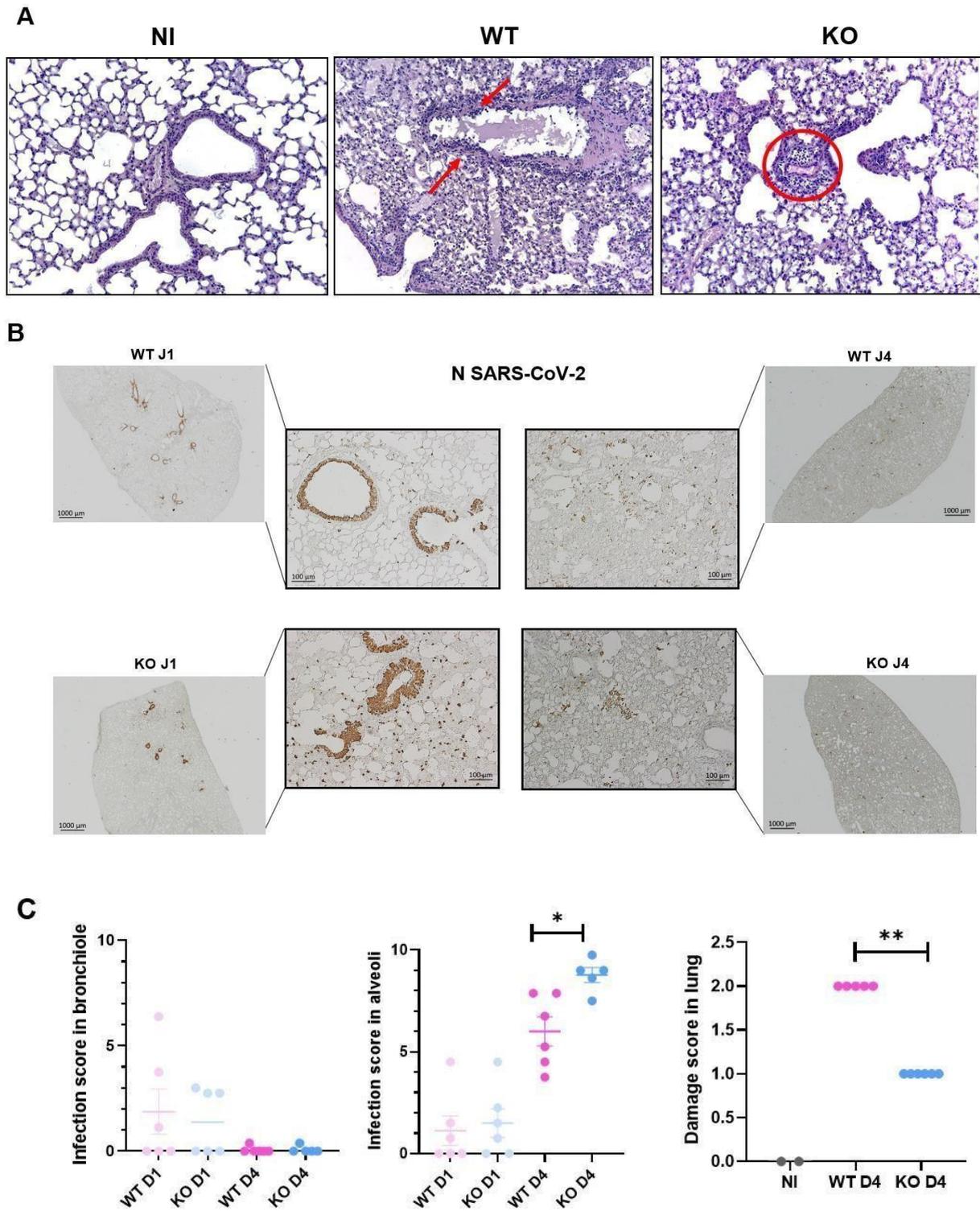


Figure 28 : Analyses histologiques des poumons de souris infectées

Des poumons de souris Sv/129 WT ou KO ont été prélevés à J1 et J4 post-infection pour analyses histologiques. A) Coloration HES à J4 au X10. En bleu les noyaux cellulaires, en violet les cytoplasmes. NI sans lésion. WT représentatif avec infiltrats

de lymphocytes, plasmocytes, granulocytes et neutrophiles principalement périvasculaires, avec inflammation de la paroi vasculaire jusqu'à l'endothélium (« endothélite » ; flèches rouges). KO représentatif des infiltrats de lymphocytes, plasmocytes, granulocytes neutrophiles principalement périvasculaires, B) Marquage de la nucléocapside virale au X1 (sur les côtés) ou X10 (au centre). C) Les scores d'infections et de dommages associés. Réalisé sur Graphpad. Analyses statistiques réalisées avec le test de Mann Whitney *, $p < 0.05$; ** $p < 0,01$

IV. Discussion

La voie IFN-I est la première réponse moléculaire du système immunitaire avec un important effet anti-viral. De nombreuses études ont montré que l'IFN-I peut jouer un double rôle, à la fois protecteur et délétère.²⁸⁴

Pour étudier le rôle de la réponse IFN-I dans la physiopathologie de l'infection à SARS-CoV-2, nous avons choisi d'utiliser le modèle souris qui offre une plus grande diversité de méthodologies dont la possibilité d'utiliser des souris transgéniques déficientes pour le récepteur de l'IFN-I (souris *ifnar* -/-). Les souches Wuhan, D614G ou Delta du SARS-CoV-2 n'infectent pas naturellement la souris. Les variants Alpha, Beta ou Omicron le peuvent mais avec des niveaux d'infection relativement faibles.^{287,288} Ogger et al ont ainsi infecté des souris *ifnar* -/- avec le variant omicron mais avec une dose 100 fois supérieure à celle que nous avons utilisée dans notre étude avec le MA30.²⁸⁹ Une autre alternative consiste à utiliser des souris *ifnar* -/- qui exprime constitutivement le récepteur humain ACE2 (souris obtenues par croisement de souris *ifnar* -/- et souris transgéniques hACE2). Cette stratégie a été adoptée par l'équipe de Chauhan *et al* mais avec une forte surexpression du récepteur ACE2 dans tous les tissus, la physiopathologie n'est pas tout à fait représentative de l'infection naturelle.²⁹⁰ Une autre méthodologie consiste à préalablement transduire les souris avec un vecteur adénovirus permettant l'expression transitoire du récepteur ACE2 humain (hACE2). Cette stratégie a été utilisée par différentes équipes comme celles de Sun *et al*, Hassan *et al*, Israelow *et al* ou encore Ogger *et al*.²⁹¹⁻²⁹⁴ Une dernière approche est d'utiliser une souche murinisée qui pourra infecter tous les types de souris. Il existe plusieurs souches murinisée du SARS-CoV-2: la souche MA-10 développée dans le laboratoire de R. Baric, la souche MA20 produite par D. Schnepf et la souche MA30

développée par S. Perlman.^{184,295,296} Cette souche a déjà été utilisée dans plusieurs études pour tester des traitements ou étudier la physiopathologie du SARS-CoV-2. Elle nous a donc paru être la plus appropriée pour infecter des souris ifnar -/-.²⁹⁷⁻²⁹⁹

Des profils d'infection différents ont été montrés avec le MA30 selon le fond génétique des souris. Le MA30 est hautement virulent et provoque une infection létale chez les souris Balb/c jeunes (6 à 10 semaines) alors que les souris C57Bl/6 jeunes ne vont pas mourir de l'infection.^{184,300} Les différentes études avec le MA30 ont été réalisées avec l'un ou l'autre fond génétique de ces souris.^{289,294,300} Il existe des souris ifnar -/- de fond génétique C57BL/6 ou Sv/129. Selon le fond génétique des souris ifnar -/-, l'issue d'une l'infection virale peut être différente comme cela a été montré avec le virus Zika.³⁰¹ Nos essais préliminaires sur souris de fond génétique C57BL/6 ayant montré une réplication virale plus faible que sur le fond génétique Sv/129, nous avons choisi de faire l'intégralité de notre étude avec ce fond génétique qui n'avait pas été étudié jusqu'à présent. Ainsi, notre étude apporte un nouveau modèle d'infection combinant le MA30 et les souris de fond génétique Sv/129.

Une originalité de notre travail a été d'étudier la physiopathologie de l'infection sur souris ifnar-/- à la fois au niveau de la cavité nasale et du poumon alors que les études précédentes ne se focalisaient que sur le poumon. Nous avons ainsi pu constater que le virus est retrouvé dans le poumon avec un taux de réplication élevé dès J1 post-infection (Figure 22) et diminue à J4 dans les deux groupes de souris étudiés. A l'inverse dans la cavité nasale, la quantité de virus augmente au cours du temps de J1 à J4. On aurait pu s'attendre à ce que le virus se réplique dans un premier temps dans la cavité nasale avant les poumons, or nos résultats montrent qu'il y a une réplication virale dans les deux sites dès J1 post-infection avec une charge virale plus importante dans les poumons. Le virus MA30 ayant été isolé et re-inoculé pendant 30 passages sur des poumons de souris¹⁸⁴, notre hypothèse est que le virus a pu s'adapter au poumon, induisant une meilleure réplication dans cet organe. Nous pourrions mesurer la charge virale des poumons à des temps plus précoces post-infection afin de voir à partir de quel moment de l'infection le virus commence à se répliquer dans le poumon. Cependant, les études de Ogger ou d'Israelow qui utilisent respectivement les souches Omicron et D614G, montrent également un niveau de réplication important dans les

poumons à J2 post-infection qui diminue à J4. ²⁹⁴ De même, une étude menée sur K18-hACE2, montre que la charge virale pulmonaire est détectée dès J1 post-infection puis diminue jusqu'à J7, renforçant l'hypothèse selon laquelle l'infection très précoce du poumon est propre au modèle souris. ¹⁸¹ Une autre hypothèse pour expliquer cette cinétique virale dans le poumon, serait un biais expérimental lors des infections. En effet, lors de l'infection, les souris sont anesthésiées et 40µl de la préparation virale sont inoculés par voie intranasale. Les souris étant des animaux très petits, il est possible que malgré les précautions prises, le virus soit directement inoculé dans le poumon. Nous pourrions vérifier cette hypothèse en inoculant un colorant bleu aux souris. S'il est détecté rapidement dans le poumon et en plus grande quantité que dans la cavité nasale, cela signifierait que le mode d'injection cause un biais dans l'étude.

Que ce soit dans la cavité nasale ou dans les poumons, la quantité de virus est supérieure à J4 chez les souris ifnar -/- avec une diffusion plus importante du virus dans la partie postérieure de la cavité nasale et dans les poumons (Figure 25 et 28). Ces résultats sont en accord avec des études utilisant d'autres modèles et confirment que la réponse IFN-I est un facteur déterminant pour la mise en place d'une réponse antivirale efficace contre l'infection. ^{290,291,293}

Dans la cavité nasale, l'induction de l'expression des ISGs et de la réponse inflammatoire paraît retardée chez les souris ifnar-/- par rapport à celle des souris WT mais devient équivalente à J4 (Figure 23). Ce retard pourrait permettre au virus de se répliquer plus facilement chez les souris KO et expliquerait la différence du niveau de réplication entre les deux groupes qui se forme au cours du temps. Dans les poumons, on retrouve la même tendance mais elle est moins marquée (Figure 26). Dans l'étude de Ogger utilisant le variant Omicron le niveau d'expression d'ISG (Mx1 et Oas1) est aussi significativement moins élevé à J2 dans le poumon lorsque les souris sont déficientes pour le récepteur IFNAR. ²⁸⁹ De même, dans leur étude utilisant la souche D614G chez des souris transduites avec un virus adeno-associé (rAAV) recombinant induisant l'expression du récepteur ACE2 humain, l'expression des ISGs étudiés n'est pas augmentée chez les souris Ifnar-/- que ce soit à J2, J4 ou J8 post-infection. ²⁹⁴

Nous nous sommes ensuite intéressés à la présence des macrophages résidents Iba1⁺, ces cellules jouent un rôle dans la survie et dans la régénération des neurones olfactifs en sécrétant des facteurs de survie. De plus, ces macrophages résidents expriment un grand nombre de PRR, leur conférant un rôle dans la détection d'agents pathogènes au niveau de la muqueuse olfactive. Ils vont également lors d'un contexte infectieux, produire des cytokines pro-inflammatoires induisant le recrutement d'autres cellules immunitaires effectrices, jouer un rôle dans la clairance virale et dans la mise en place de l'immunité adaptative. ^{334,335,336}

Dans la cavité nasale, nos résultats montrent une quantité plus importante de ces cellules dès J2 chez les souris ifnar^{-/-} qui est confirmée par le marquage immunohistochimique (Figure 25). Cependant, si l'on calcule le ratio du nombre de cellules Iba1⁺ par rapport à la quantité de virus, il y a moins de macrophages résidents chez les souris ifnar^{-/-} à J1, cette différence n'étant plus significative à J4. L'hypothèse pourrait être que chez les souris déficientes il y a un défaut de chimiotactisme qui retarde le recrutement des macrophages résidents aboutissant à un défaut d'élimination précoce du virus qui peut alors mieux se propager. Cependant en conséquence de cette multiplication virale accrue, la quantité d'Iba1⁺ va globalement devenir supérieure chez les souris ifnar^{-/-} à J4.

Concernant la mesure du marqueur Iba1⁺, nous avons une situation contradictoire entre la cavité nasale et les poumons. Dans les poumons, on observe, au contraire, une quantité supérieure de cellules Iba1⁺ chez les souris WT dès J1 post-infection. Cependant, il existe plusieurs types de macrophages dans les poumons qui pourraient exprimer le marqueur Iba1 :

- Les macrophages alvéolaires qui sont localisés dans la lumière alvéolaire et exercent principalement un rôle anti-inflammatoire ³⁰²
- Les macrophages interstitiels qui sont localisés entre les vaisseaux sanguins et les alvéoles. Ils ont un rôle pro ou anti-inflammatoire ³⁰³

Selon l'étude de Donovan *et al*, Iba1⁺ marquerait surtout les macrophages interstitiels et peu les macrophages alvéolaires. ³⁰⁴ Il faudrait donc compléter notre étude avec d'autres marqueurs des macrophages afin de faire une distinction entre ceux ayant une fonction pro-inflammatoire et ceux étant plutôt anti-inflammatoire. Il serait aussi

intéressant d'étudier l'afflux de cellules neutrophiles dans les deux groupes de souris. En effet, il a été montré que ces cellules ont un rôle primordial dans les dégâts tissulaires induits par l'infection virale dans la cavité nasale, du moins dans le modèle hamster.³⁰⁵ En utilisant le modèle d'infection de souris hACE2 transduites, Ogger et al montrent que dans le poumon le niveau de Cxcl1 est augmenté chez les souris Ifnar^{-/-} comparé à celui des souris WT à J2 et J4 post-infection. Cxcl1 est une chimiokine impliquée dans le recrutement des neutrophiles. Les auteurs ont ensuite analysé l'infiltration des neutrophiles (CD45⁺, Ly6G⁺) dans les voies respiratoires et ont montré une augmentation du niveau de cellules CD45 (leucocytes) et Ly6G.²⁹⁴ Ces résultats suggèrent qu'une déficience dans la voie IFN de type I conduit à une augmentation des neutrophiles recrutés via Cxcl1 ce qui contribue à un environnement pro-inflammatoire.²⁹⁴ L'étude d'Israelow *et al* montre aussi une quantité accrue de cellules neutrophiles dans les poumons des souris ifnar^{-/-} et une diminution des macrophages pro-inflammatoires. Cependant, il n'y a pas d'observation histologique dans cette étude qui aurait permis de mesurer les conséquences de l'absence de réponse IFN-I.²⁹³ Dans l'étude de Chauhan *et al*, un afflux de cellules neutrophiles est aussi montré dans les poumons et l'analyse histologique des poumons des souris ifnar^{-/-} est plutôt en faveur de dégâts histologiques majorés par rapport aux souris contrôles comme dans notre étude. Ces deux études n'utilisent pas le même modèle de souris (des souris transduites hACE2 pour l'étude d'Israelow et des souris doubles transgéniques hACE2, ifnar^{-/-} pour l'étude de Chauhan) et se focalisent sur des temps post-infection différents. Dans notre étude, nous avons étudié les dommages histologiques dans la cavité nasale à J1 et J4 (Figure 25). A J4 il y a globalement plus de dommages tissulaires chez les souris déficientes au récepteur IFN-I, qui pourrait corrélérer avec la quantité plus importante de cellules Iba1⁺ et de virus. Si on fait un ratio entre les scores de dommages tissulaires rapportés au score de l'infection virale, on n'observe plus de différence entre les souris WT et les souris ifnar^{-/-} même à J4. A J1, ce ratio est plutôt en faveur de lésions tissulaires proportionnellement plus importantes chez les souris WT. Il est prévu de compléter notre étude par l'observation des lésions tissulaires à J2 dans la cavité nasale. De manière intéressante et contradictoire, les poumons de souris WT présentent des lésions tissulaires plus

importantes que les poumons de souris *ifnar*^{-/-} (Figure 28). Il est possible que la forte réplication du virus dans les poumons entraîne une réponse IFN-I exacerbée dès le début de l'infection et qui pourrait induire un recrutement de cellules immunitaires *iba1*⁺ important menant à des dégâts tissulaires. La réponse IFN-I étant déficiente chez les souris *ifnar*^{-/-}, la réponse IFN met plus de temps à se mettre en place, le recrutement des cellules immunitaires *iba1*⁺ se ferait de manière moins forte et plus retardée ce qui limiterait l'orage cytokinique et la formation de lésion tissulaire. Ces résultats semblent montrer deux mécanismes différents selon le tissu infecté. Il est donc pour le moment difficile de conclure quant à l'implication de la voie IFN-I dans les dommages tissulaires, il pourrait s'agir d'un équilibre entre la quantité de virus, l'afflux de cellules de l'immunité innée et le temps post-infection auquel est fait l'observation.

Pour résumer, nos résultats montrent qu'une déficience dans l'expression du récepteur IFNAR de la voie IFN-I induit un retard de réponse par rapport à des souris WT dans les cornets olfactifs et dans le poumon, ce retard conduit à des dégâts plus importants dans la cavité nasale. Les dégâts tissulaires dans le poumon n'ont pas encore été mesurés mais cette analyse est en cours. L'induction de la réponse IFN-I est donc un élément clé dans la mise en place précoce de la réponse antivirale. Cependant, les souris *ifnar*^{-/-} présentent tout de même une réponse immunitaire innée suggérant que d'autres voies parallèles compensent ce manque. En effet, nous montrons que le niveau d'IFN λ 3 augmente de façon plus importante chez les souris *ifnar*^{-/-} que chez les WT dans le poumon (Figure 26), il est possible que cette voie compense le manque de réponse IFN-I. Ogger *et al* ont également montré un niveau significativement plus élevé à J4 post-infection du niveau d'expression dans les souris *ifnar*^{-/-} de l'IFN λ 3 qui continue d'augmenter significativement jusqu'à J8 post-infection.²⁹⁴ Pour compléter notre étude, nous pourrions réaliser les mêmes expériences mais sur des souris déficientes pour le récepteur de la voie IFN-III, ce qui nous permettrait d'étudier son rôle lors de l'infection par rapport à celui de l'IFN.

Annexe

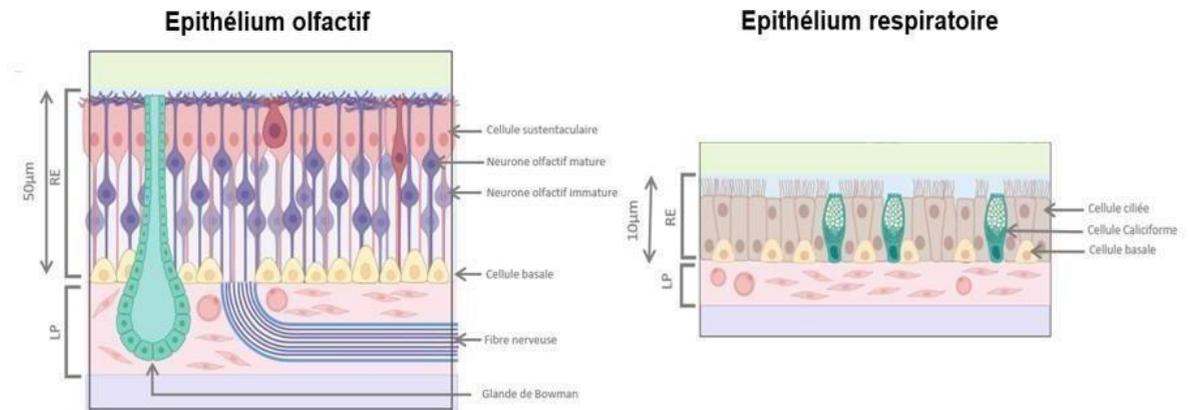


Figure S 1: Représentation de la cavité nasale d'un rongeur.

Partie 3 : Etude de l'inhibition de la voie IFN par le SARS-CoV-2 et sa conservation chez d'autres coronavirus apparentés

I. Introduction

Le SARS-CoV-2 a montré une grande capacité à franchir la barrière d'espèce et est capable d'infecter de nombreuses espèces animales. Ces infections chez les animaux sont généralement préoccupantes car le virus peut s'adapter à l'hôte, évoluer et causer de nouvelles émergences de variants chez l'Homme. Cette capacité à franchir la barrière d'espèce est permise par l'évolution rapide du virus. Des mutations au niveau de certains gènes peuvent permettre le saut d'espèce en favorisant par exemple la liaison au récepteur d'une nouvelle espèce hôte. Bien que la reconnaissance du récepteur cellulaire soit indispensable à l'infection virale, d'autres facteurs intracellulaires sont indispensables à l'accomplissement du cycle viral. Parmi ces mécanismes, l'inhibition de la réponse IFN pourrait contribuer à expliquer le tropisme d'hôte du SARS-CoV-2 et d'autres coronavirus.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons alors aux mécanismes d'évasion de la réponse IFN par le SARS-CoV-2 en cherchant à identifier des interactions directes entre certaines protéines virales et certaines protéines de la voie IFN. Nous nous sommes également intéressés à l'étude de la fonction antagoniste sur la voie IFN de ces protéines virales et de la conservation de ces mécanismes d'inhibition chez d'autres coronavirus tels que des coronavirus de chauve-souris proches du SARS-CoV-2 ainsi que d'un autre Betacoronavirus un peu plus éloigné du SARS-CoV-2, le HCoV-HKU1.

Ce chapitre s'inscrit dans le projet européen MuseCoV « Multi-scale Eco-evolution of Coronaviruses : from surveillance toward emergence prediction » dont le but est d'apporter une meilleure compréhension de l'évolution et de la circulation des coronavirus chez les animaux domestiques et sauvages européens. Cette partie de ma thèse a débuté en 2020 durant mes stages de M1 puis M2 réalisés au sein de

l'UMR VIRO, peu de temps après le début de la pandémie et à un moment où très peu de données étaient alors disponibles concernant les interactions entre le virus et la voie IFN.

II. Matériels et méthodes

Clonage par recombinaison Gateway®

A. Principe

Le clonage par recombinaison Gateway® (Invitrogen) permet de cloner un ORF d'intérêt dans des vecteurs plasmidiques par recombinaison homologue. Les ORFs d'intérêts doivent être flanqués au niveau des extrémités 5' et 3' par les sites de clonage attB1 et attB2 nécessaires pour la recombinaison. L'ajout des sites de clonage peut être réalisé par PCR. Il y a ensuite une première réaction de recombinaison homologue, appelé « réaction BP », qui permet de cloner l'ORF d'intérêt dans un vecteur dit « d'entrée ». Puis, une seconde réaction de recombinaison, appelée « réaction LR » est réalisée. Elle consiste au transfert de l'ORF du vecteur d'entrée vers un vecteur dit « de destination », compatible avec le système Gateway® et qui peut contenir des séquences codant pour des protéines « étiquettes » qui pourront être ciblées par différentes techniques de détection (Figure 29).

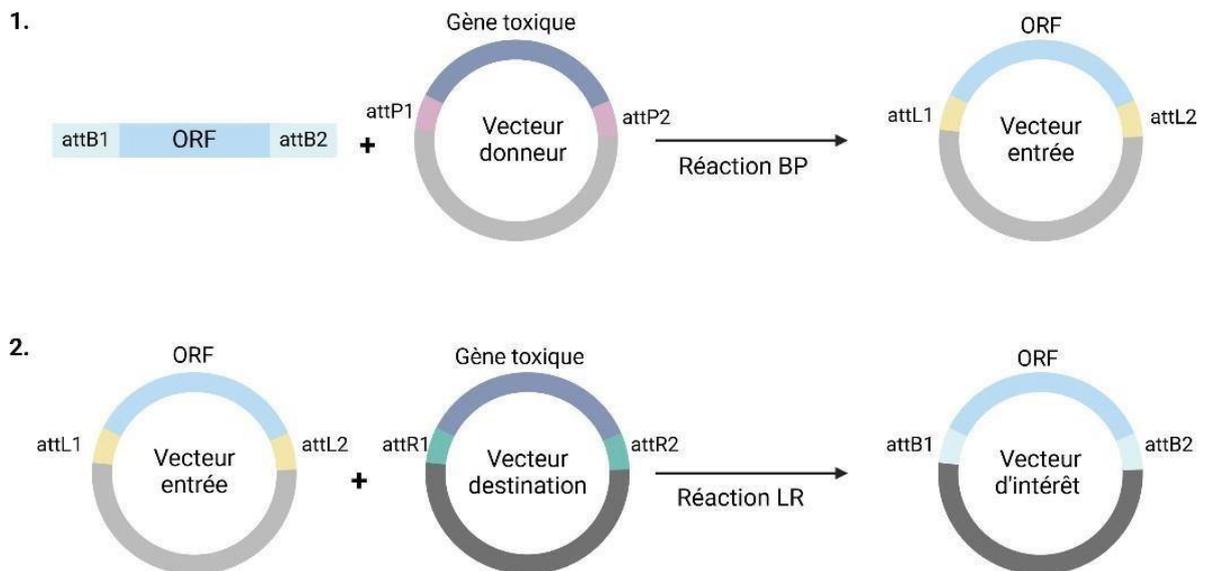


Figure 29 : Principe du clonage Gateway

Construction de plasmides d'expression par recombinaison. La réaction BP permet le transfert de l'ORF d'intérêt dans un vecteur d'entrée puis la réaction LR permet, par recombinaison, de transférer l'insert présent dans le plasmide d'entrée dans un plasmide receveur pouvant contenir différentes étiquettes. Créée avec Biorender

B. Clonage des ORFs viraux et ORFs de la voie IFN dans les vecteurs d'entrée

Une banque de plasmides d'entrée (pDONR207 ou pDONR223) contenant les 28 ORFs viraux du SARS-CoV-2 a été fournie par le Dr. Yves Jacob (Institut Pasteur). L'UMR virologie dispose d'une banque contenant les ORFs codant pour 16 protéines humaines impliquées dans la voie de signalisation et de réponse IFN (STAT1, STAT2, RIG-I, IRF3, MAVS, TRIF, TRAF3, MDA5, TBK1, PKR, IKK ϵ , STING, IRF7, NEMO, IKK α , TYK2) clonées dans les plasmides pDONR223. Les vecteurs d'entrées pDONR207 contenant les ORFs codant pour les protéines Nsp13 des coronavirus de chauve-souris BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1 ont été réalisés par prestation de service (Genecust).

c. La réaction LR pour construire les banques de plasmides d'intérêt

La recombinaison a été faite grâce au mix d'enzyme Gateway® LR Clonase® (Life technologies) contenant des Intégrases (Int), des IHF (Integration Host Factors) et des

XIS (Excisionase). 150ng de plasmide pDONR ont été mis à incuber avec 150ng de plasmide de destination et 2µl de mix LR Clonase sur la nuit. Les plasmides de destination contiennent différentes étiquettes : 3xFLAG en N-terminal, V5-HIS en C-terminal ou les sous domaines de la Nanoluciférase (Nanoluc) Luc1 et Luc2 en N-terminal ou C-terminal (Figure 30).

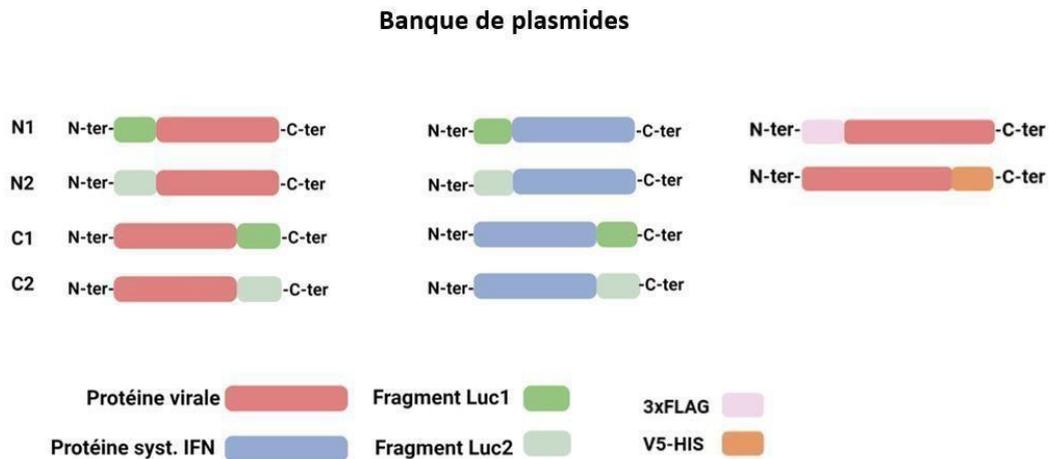


Figure 30 : Banques de plasmides d'expression construites par des réactions LR (clonage Gateway).

Deux banques de plasmides codant pour différentes protéines du SARS-CoV-2 ou du système IFN fusionnées au fragment Luc1 ou Luc2 de la Nanoluciférase ont été construites. Des plasmides contenant certains ORFs de coronavirus ou de la voie IFN fusionnés avec la séquence codant pour les étiquettes 3XFLAG ou V5-HIS ont aussi été construits. Créée avec Biorender.

D. Transformation bactérienne et extraction d'ADN plasmidique

Deux microlitres de la réaction LR ont été ajouté à 15 µl de bactéries compétentes E.Coli DH5α. Le mélange a été laissé à incuber sur glace pendant 30min et un choc thermique a été fait à 42°C pendant 45 sec, puis le mélange a été à nouveau placé sur glace pendant 2min avant l'ajout de 150µl de milieu SOCS (Super Optimal broth with catabolite repression). Les bactéries transformées ont été cultivées pendant 24h en milieu solide LB (Lysogeny Broth)-agar avec 100µg/ml d'Ampicilline à 37°C, puis une colonie a été récupérée et cultivée dans du milieu liquide LB avec 100µg/ml Ampicilline pendant 24h à 37°C sous agitation. Les plasmides donneurs sont cultivés en présence

de Gentamycine. L'ADN plasmidique a été extrait en utilisant le kit NucleoSpin plasmid Kit de Macherey-Nagel à partir de 4mL de culture liquide. Pour cela, les bactéries ont été lysées via un tampon alcalin/SDS (sodium dodecyl sulfate) puis le lysat a été purifié par liaison de l'ADN plasmidique sur une membrane de silice, les déchets cellulaires ont alors été éliminés et l'ADN a été élué grâce à un tampon légèrement alcalin. Les concentrations d'ADN ont ensuite été mesurées au Nanodrop.

Culture cellulaire

Des cellules HEK-293T (Human Embryonic Kidney 293T cell) et des cellules HeLa (Henrietta Lacks, lignées cellulaires de cancer cervical) ont été cultivées dans du milieu DMEM + Glutamax (Fisher) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF, Eurobio), 1% Pyruvate (Fisher), 1% Peni-streptomycine (Fisher) et mises en culture dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂.

Transfection cellulaire

Les cellules HEK-293T et HeLa ont étéensemencées et transfectées pour réaliser différentes expériences selon les modalités décrites dans le [tableau 7](#). Les transfections ont été réalisées en utilisant le JetPrime (Polyplus transfection, Ozyme) comme agent de transfection. Chaque mélange de plasmide a été mis à incuber 10min à température ambiante avant d'être déposé goutte à goutte sur les cellules, 24h après l'ensemencement.

Tableau 7: Ensemencement cellulaire et transfection

Expérience	Type de plaque	Densité cellulaire (par puit)	Transfection réalisées
Test d'interaction Nanoluciférase	96 puits	10 ⁵ HEK-239T dans 120µL de milieu	100ng de chaque plasmide Luc1 et Luc2 +10ng de plasmide pCMV renilla
Immunofluorescence	24 puits (Ibidi)	100 000 HeLa dans 500µL de milieu	250 ng de plasmide exprimant la protéine virale
Western Blot	6 puits	2.10 ⁶ HEK-239T dans 2mL de milieu	2µg de plasmide exprimant la protéine virale
Essai luciférase	24 puits	150 000 cellules HEK-293T dans 500µl de milieu	300ng de plasmide ISRE-Luc + 300ng de plasmide exprimant les protéines virales + 30ng de plasmide pCMV renilla

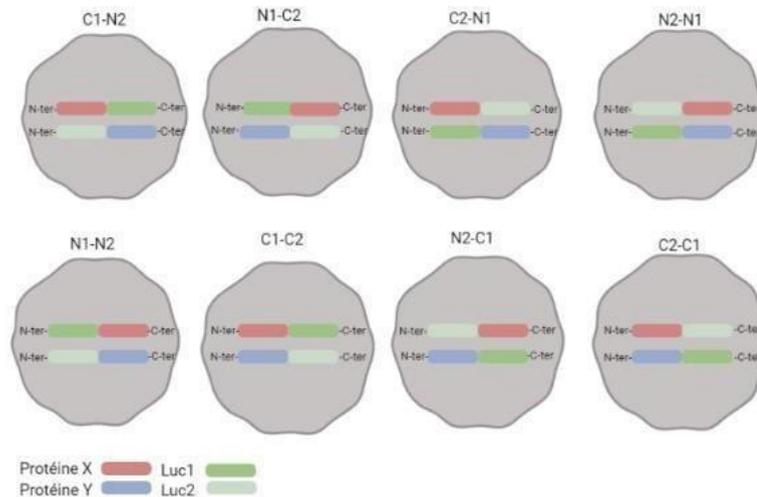
Test d'interaction basé sur la reconstitution de la Nanoluciférase

A. Principe

Le test d'interaction basé sur la reconstitution de la Nanoluc est une technique qui repose sur une petite luciférase de 19 KDa isolée chez la crevette *Oplophorus gracilirostris*. Le principe est de séparer la Nanoluc en deux fragments et de fusionner le fragment 1 (Luc1) avec la protéine X et le fragment 2 (Luc2) avec la protéine Y. Chaque fragment peut être fusionné à l'extrémité N-terminale ou à l'extrémité C-terminale. Il y a donc huit combinaisons possibles pouvant être testées en fonction du fragment fusionné et de son emplacement (Figure 31a). S'il y a une interaction entre les protéines X et Y alors la Nanoluc sera reconstituée et pourra, en présence de

substrat émettre de la bioluminescence (Figure 31b). Pour chaque interaction testée, on calcule la NLR (Normalized Luminescence Ratio) qui est le ratio de la luminescence de l'interaction testée par rapport à la somme de la luminescence des deux contrôles négatifs. On estime qu'il y a une interaction si la NLR est égale ou supérieure à 3.³⁰⁶

A



B

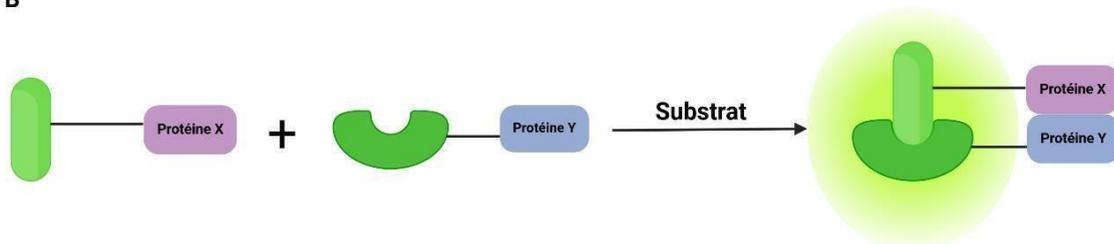


Figure 31: Principe du test d'interaction basé sur la reconstitution de la Nanoluciférase

A) Combinaisons testées lors du test d'interaction basé sur la reconstitution de la Nanoluc. Chaque protéine d'intérêt X et Y est exprimée avec le fragment 1 (Luc1) ou 2 (Luc2) de la Nanoluc au niveau de l'extrémité N-terminale ou C-terminale. Huit combinaisons peuvent alors être testées après transfection des plasmides d'expression en cellules HEK-293T. N : extrémité N-terminale/ C : extrémité C-terminale, 1 et 2 représentent les deux fragments de la luciférase. B) Deux protéines A et B sont fusionnées au fragment Luc1 ou Luc2 de la Nanoluc. Si les deux protéines interagissent alors la Nanoluc va être reconstituée et après ajout du substrat une luminescence sera émise qui pourra être détectée grâce à un luminomètre à une longueur d'onde de 480nm. Créée avec Biorender.

B. Méthode

Quarante-huit heures après la transfection avec les différentes combinaisons de plasmides (Tableau 7), le milieu des cellules HEK-293T a été totalement retiré et les cellules ont été lysées avec 50µl de passive lysis buffer (Promega) pendant 5 min sous agitation. Soixante µl d'analogue de furimazine (don du Dr Yves Jacob) ont été ajoutés avant la lecture de la luminescence à une longueur d'onde de 480nm. Pour une interaction testée, nous avons 8 contrôles négatifs correspondant à la mesure de la luminescence émise par les cellules transfectées avec le plasmide codant la protéine testée et le plasmide receveur vide codant pour les fragments Luc1 et Luc2 non fusionnés à une autre protéine. Par exemple les contrôles négatifs de la protéine X sont X-N1/N2-vide ; X-N1/C2-vide ; X-N2/N1-vide ; X-N2/C1-vide ; X-C1/N2-vide ; X-C1/C2-vide ; X-C2/N1-vide et X-C2/C1-vide. Ces contrôles négatifs nous permettent de normaliser les résultats lors du calcul de la NLR (Normalized Luminescence Ratio) en calculant le ratio de l'expression de la luminescence de l'interaction testée par rapport à la somme des contrôles négatifs

$$\text{NLR} = (\text{Luminescence X+Y}) / (\text{Luminescence X/vide} + \text{Y/vide})$$

Test double hybride en levure

A. Principe

Le principe de cette méthode se base sur la reconstitution du facteur de transcription Gal4. Un premier vecteur pPC97 permettant l'expression d'une protéine d'intérêt A est également porteur du domaine de liaison à l'ADN du promoteur Gal4 (Gal4BD), ainsi que d'un gène d'expression de la leucine. Un deuxième vecteur pPC86 permet l'expression d'une protéine d'intérêt B et est porteur du domaine d'activation de Gal4 (Gal4AD) ainsi que d'un gène d'expression du tryptophane. Les levures Y2HGold Yeast sont transformées avec ces vecteurs dans des milieux sélectifs et s'il existe une interaction entre les protéines A et B, les domaines GalDB et GalAD vont interagir et induire l'activation d'un gène rapporteur histidine, permettant la sélection des levures sur un milieu ne contenant pas cet acide aminé essentiel à leur croissance (Figure 32).

B. Méthode

Une souche de levure haploïde de *Saccharomyces cerevisiae*, Y2HGold possédant une auxotrophie à la leucine et au tryptophane a été maintenue en culture sur un milieu complet YPD (Yeast Peptone Dextrose). La première étape a consisté en la transformation de cette souche par le vecteur pPC97. Pour ce faire, la souche a été cultivée dans un milieu YPD liquide à 29°C sur la nuit. Ensuite, la densité optique (DO à 600nm) a été mesurée et les levures ont été diluées dans du YPD pour ajuster la DO à 0,4 avant d'être remise à incuber une demi-journée. Les levures sont par la suite nettoyées avec de l'eau puis avec du TeLiAc (Tris-HCl EDTA 1X pH 8, Acétate de lithium 100mM) par succession de centrifugation (5min à 2500rpm) et de re-suspension. Puis, les levures ont été re-suspendues dans du TeLiAc en présence de 250ng de vecteur pPC97 et de 2µl de sperme de saumon, préalablement mis à bouillir (sert de transporteur d'ADN plasmidique). Après avoir ajouté 120µl de TeLiAc/PEG (44% de polyéthylène glycol), les levures ont été incubées 45min à 30°C avant d'être incubées 15min dans un bain marie à 42°C. Les levures ont été ensuite déposées sur un milieu gélosé dépourvu de leucine et mis à incuber 2 jours à 29°C. Les levures pour lesquelles la transformation a fonctionné peuvent alors pousser puisque le vecteur pPC97 apporte un gène codant pour la leucine. Les clones ont alors été récupérés et mis à incuber dans du milieu YPD. Ensuite une nouvelle transformation a été réalisée mais cette fois-ci avec les constructions pPC86. Les levures ont alors été déposées sur un milieu dépourvu de leucine et de tryptophane. Après 2 jours, les levures ont été re-suspendues dans de l'eau puis déposées sur un milieu déplété en leucine, en tryptophane et en histidine mais supplémenté en 3AT (3-Amino-1,2,4-triazole) 5mM. Les levures ont ensuite été mises à incuber à 29°C.

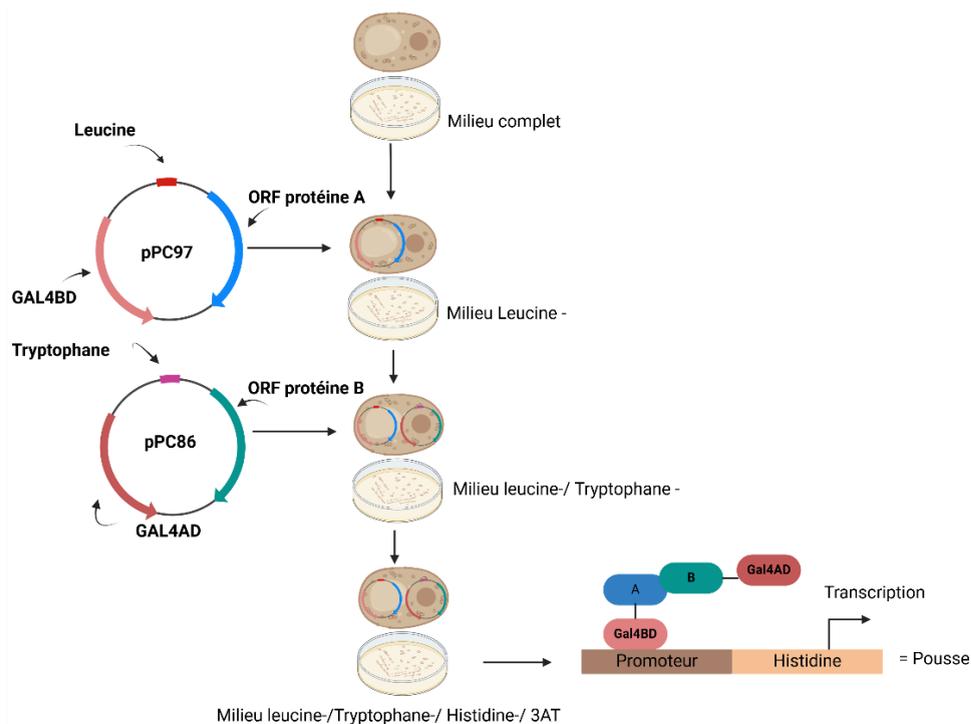


Figure 32 : Principe du double hybride en Levure

Des levures Y2HGold sont transformées avec un vecteur pPC97 codant pour l'ORF de la protéine A et le domaine Gal4BD ainsi qu'avec un vecteur pPC86 codant pour l'ORF de la protéine B et le domaine Gal4AD du facteur de transcription GAL4. Si les protéines A et B interagissent, le domaine Gal4 est reconstitué et va activer la transcription d'un gène rapporteur permettant aux levures de pousser sur un milieu sélectif. Créée avec Biorender

Tests rapporteurs Luciférase ISRE-Luc

A. Principe

Le test rapporteur luciférase ISRE-Luc permet d'évaluer l'activation de la réponse IFN en utilisant un plasmide nommé ISRE-Luc. Ce plasmide contient le gène luciférase firefly sous le contrôle d'un promoteur minimal en amont duquel ont été cloné 5 séquences ISRE (Agilent). Lorsque la voie de réponse IFN est activée, il y a alors expression de la luciférase et après ajout d'un substrat, émission de luminescence qui peut être quantifiée à l'aide d'un luminomètre (Figure 33). Cette quantité est considérée comme étant proportionnelle à l'état d'activation du promoteur. Nous utilisons également un plasmide pCMV-renilla codant pour la Renilla Luciferase qui nous permet de normaliser nos résultats afin de ne pas tenir compte des variabilités liées à l'efficacité de transfection.

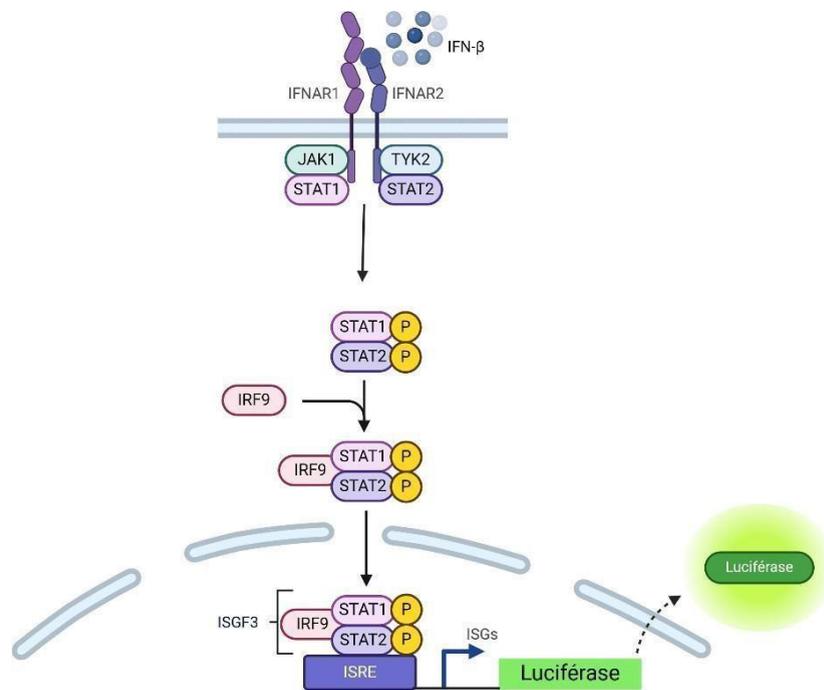


Figure 33 : Principe du test rapporteur luciférase

Des cellules HEK-293T sont transfectées avec un plasmide codant pour la protéine d'intérêt et un plasmide rapporteur composé d'un promoteur minimal en amont duquel a été cloné 5 séquences ISRE (IFN-stimulated response element). Lorsque la voie de réponse IFN est activée après l'ajout d'IFN β , il y a expression de la luciférase puis quantification de la bioluminescence. Créée avec Biorender

B. Méthode

Vingt-quatre heures après avoir été transfectées comme décrit précédemment (Tableau 7), les cellules ont été stimulées avec 2000 UI/mL d'IFN β -a humain recombinant (PBL Assay Science) pendant 8h à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite été lysées avec 200 μ L de Passive lysis buffer (Promega) avant d'être mises en présence d'un substrat spécifique de la luciférase Firefly (Bright-Glo, Promega) ou de la luciférase Renilla (Renilla-Glo, Promega). Les mesures de bioluminescence émises sont par la suite effectuées à l'aide d'un luminomètre (Glo-Max, Promega).

L'activité luciférase normalisée a ensuite été calculée pour chaque échantillon en divisant l'activité de la luciférase firefly par celle de la luciférase Renilla.

Immunofluorescence

Nous avons utilisé le marquage protéique par immunofluorescence afin de vérifier l'expression et de déterminer la localisation de certaines protéines endogènes et exogènes dans la cellule.

Des cellules HeLa ont été transfectées comme décrit précédemment ([Tableau 7](#)). Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été stimulées avec 2000 UI/mL d'IFN β -a humain recombinant (PBL Assay Science) pendant 30min à 37°C et 5% de CO $_2$. Ensuite, les cellules ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) pendant 30min à température ambiante, rincée 3 fois au PBS, puis perméabilisées avec un mélange d'éthanol et de méthanol (V/V) pendant 15min à température ambiante avant d'être à nouveau lavées 3 fois au PBS. Puis, les cellules ont été bloquées pendant 30min à température ambiante avec une solution PBS contenant 0,05% de Tween et 5% de BSA. Un marquage primaire a ensuite été réalisé en utilisant un anticorps primaire dirigé contre les étiquettes 3x-FLAG (Sigma merck F3165, dilué au 1/1000) ou V5-HIS Anti-V5, Life Technologies R96025 dilué au 1/1000) et contre la protéine pSTAT1 (Invitrogen 790349, dilué au 1/1000) pendant 1h à température ambiante. Une fois lavées trois fois avec la solution PBS ; 0,05% Tween ; 5% BSA, les cellules ont été incubées pendant une heure à température ambiante avec un anticorps anti-souris conjugué à de l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11029, dilué au 1/500) ou un anticorps anti-lapin conjugué au Dylight 550 (Invitrogen SA5-10033, dilué au 1/500). Les noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI (4',6-diamidino-2- phénylindole) (Thermo Scientific 62248, dilué au 1/1000) pendant 2min à température ambiantes puis rincés au PBS. Les marquages ont été observés au microscope à fluorescence (Axio observer Z1, Zeiss).

Western blot

Des cellules HEK-293T ont été transfectées etensemencées comme décrit précédemment ([Tableau 7](#)). Vingt-quatre heures après, les cellules ont été récoltées à l'aide de PBS. Après une centrifugation de 5min à 1500rpm, le culot cellulaire est

repris dans un tampon de lyse (50mM tris HCL, pH 7,4, 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON X-100) complétement en anti-protéase (Merck) et anti-phosphatase. Après 20 minutes de lyse, les cellules ont de nouveau été centrifugées pendant 20 minutes à 15 000rpm à 4°C. Un dosage protéique a ensuite été réalisé à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225). La même quantité de lysats protéiques ont par la suite été dénaturés pendant 5min à 95°C en bain sec avant d'être déposés sur un gel de polyacrylamide (Bolt 4-12% Bis-Tris plus, NW04120BOX, Thermo Scientific) ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (Precision plus protein, Biorad). Les protéines ont alors été séparées par électrophorèse à 120V pendant 45min environ dans du tampon de charge MES SDS (Bolt™, ThermoFisher B0002). Par la suite, les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose en milieu liquide (Transfert buffer Novex Bolt 20x (Thermofisher BT00061) + éthanol 96° 20% + antioxydant) pendant 1h à température ambiante. Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 5min dans un tampon de blocage (EveryBlot Blocking Buffer, Biorad #12010020)). Les membranes ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires dirigés contre l'étiquette 3x-FLAG (Sigma merck F3165, dilué au 1/500) ou contre l'étiquette V5-HIS directement couplé à la HRP (Horseradish Peroxidase) sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes ont été lavées trois fois avec un tampon PBS-Tween. Les membranes marquées avec l'anticorps anti-3xFLAG ont été incubées pendant 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire anti- souris-HRP (dilué au 1/5000). Les protéines ont été ensuite révélées grâce au substrat Clarity Max™ Western ECL substrate (Biorad #1705062) et au Chemidoc imaging system (Biorad)

Analyses Bio-informatiques et Statistiques

Des Tests statistiques Mann Whitney ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 8 avec une significativité : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Tous les alignements de séquences ont été réalisés avec le logiciel Serial Cloner.

III. Résultats

A. Identification des interactions par test de reconstitution de la Nanoluciférase

Dans un premier temps, nous avons voulu identifier les interactions entre les protéines virales du SARS-CoV-2 et certaines protéines de la voie IFN.

Nous avons alors construit des banques de plasmides codant pour les 28 ORFs du SARS-CoV-2 fusionnés au fragment Luc1 et Luc2 de la Nanoluc. Dans le cadre du projet « Interferactomics » dirigé par le Dr. Damien Vitour au sein de l'UMR, nous avons pu disposer d'une banque de plasmides codant pour une sélection de protéines du système IFN humain. Nous nous sommes intéressés à la protéine STAT1, qui est un composant clé de la voie de réponse à l'IFN et qui fait partie des 3 protéines les plus ciblées lors d'une infection virale. Son ORF a été clonée dans un vecteur contenant les fragments Luc1 et Luc2 en position N ou C-terminale.

Nous avons réalisé un crible Nanoluc entre 23 protéines du SARS-CoV-2 et la protéine STAT1 de la voie IFN. Ce crible nous a permis de sélectionner les protéines virales pour lesquelles il y avait au moins une configuration qui sortait comme positive pour l'interaction avec STAT1 ($NLR \geq 3$) dans 3 expériences indépendantes : Nsp2, Nsp3, Nsp5, Nsp7, Nsp8, Nsp9, Nsp12, Nsp14, Nsp15 et N (Figure 34a). Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressés à Nsp9 car la moyenne de ces 3 expériences indique une $NLR \geq 3$ pour au moins 4 configurations (Figure 34b) suggérant une interaction entre Nsp9 et STAT1. Nous avons alors réalisé des études plus approfondies afin de confirmer l'interaction entre Nsp9 et STAT1 et étudier l'impact de Nsp9 sur la voie de réponse à l'IFN.

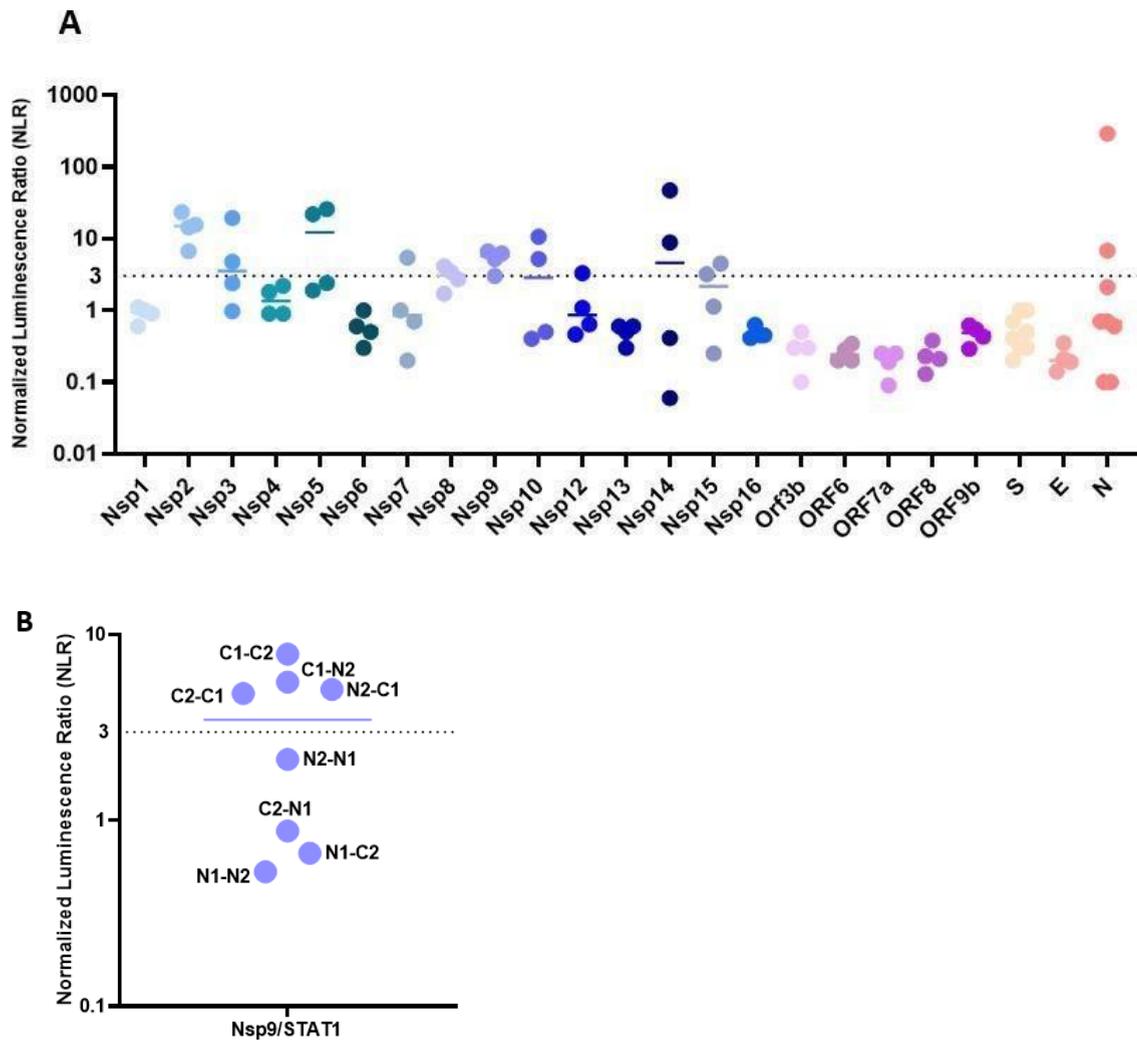


Figure 34 : Crible des interactions entre les protéines du SARS-CoV-2 et la protéine STAT1 de la voie interféron par reconstitution de la nanoluciférase.

Des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec un plasmide exprimant les différentes protéines du SARS-CoV-2 et un plasmide exprimant la protéine STAT1 humaine, les deux étant fusionnées aux fragments Luc1 ou Luc2 de la nanoluc en position N-terminale ou C-terminale ainsi que par un plasmide exprimant la renilla luciférase. 48h post transfection, les cellules ont été lysées et la lecture de la bioluminescence réalisée. A) Crible des interactions entre STAT1 et les protéines non-structurales du SARS-CoV-2. B) Crible des interactions entre Nsp9 et STAT1, la figure B représente la moyenne des résultats obtenus de 3 expériences indépendantes.

B. Autres approches méthodologiques pour évaluer l'interaction entre Nsp9 et STAT1

Nous avons réalisé plusieurs expériences afin de confirmer l'interaction identifiée par le test de reconstitution de la Nanoluc entre la protéine Nsp9 et la protéine STAT1. Dans un premier temps, nous avons effectué des tests de co-précipitation GST mais nous avons rencontré plusieurs problèmes techniques nous empêchant d'obtenir des résultats concluants. En effet, nous avons eu des problèmes pour exprimer la protéine Nsp9-GST. La protéine Nsp9 est une petite protéine de 15KDa tandis que l'étiquette GST est plus importante avec une taille de 26KDa. Il est possible que la présence de l'étiquette GST ait interféré avec l'expression de la protéine. Nous avons également dû faire face à des problèmes liés à la détection de nos protéines d'intérêts par des anticorps ainsi que des soucis de reconnaissance aspécifique. L'interaction entre la protéine Nsp9 et la protéine STAT1 n'a donc pas pu être confirmée par cette méthode.

Pour contrer ces différents blocages rencontrés, nous avons voulu confirmer l'interaction en utilisant une autre méthode, le test d'interaction par criblage en levure. Ces tests ont été réalisés avec l'aide du Dr. Juliette Dupré.

Pour ce faire, les protéines Nsp9 et STAT1 ont été clonées par recombinaison Gateway® dans un vecteur pPC97 codant pour le domaine de liaison à l'ADN Gal4 (Gal4-BD) ainsi que dans un vecteur pPC86 contenant le domaine activateur de la transcription de gal4 (Gal4-AD). Une première transformation de la souche de levure YH2 Gold a été réalisée avec les appâts, c'est-à-dire les vecteurs contenant le domaine Gal4-BD. La pousse de ces levures dans un milieu sélectif a indiqué que les levures avaient bien été transformées. Puis, une deuxième transformation de ces levures avec les proies, c'est-à-dire les vecteurs contenant Gal4-AD a été réalisée. Les levures ayant poussé ont ensuite été repiquées sur un nouveau milieu sélectif permettant de détecter la présence d'une interaction. Aucune croissance de levure n'a alors été observée lors de cette dernière étape de l'expérience (Figure 35). Les protéines Nsp9 et STAT1 ont été traitées comme des appâts et comme des proies, dans les deux sens afin d'augmenter la probabilité de confirmer l'interaction. Le résultat

de cette expérience ne permet donc pas de mettre en évidence une interaction entre la protéine Nsp9 et STAT1.

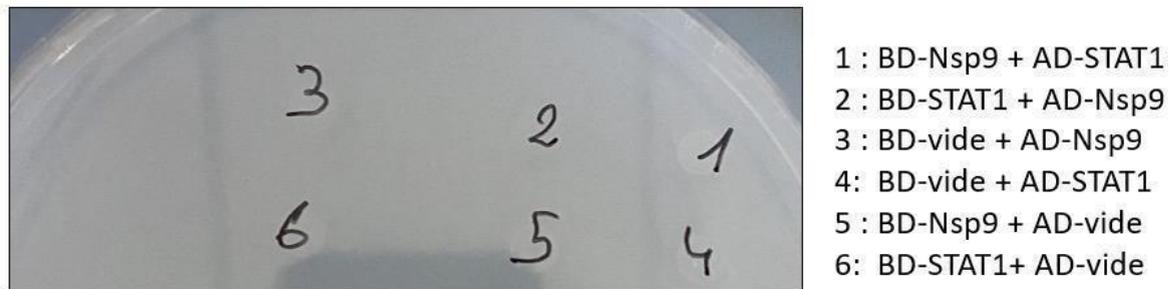


Figure 35 : Double hybride en levure pour étudier l'interaction Nsp9-STAT1

Une souche de levure YH2 Gold a été transformée avec les plasmides codant pour la protéine virale Nsp9 liées à GAL4-DB. Puis, ces levures ont été de nouveaux transformées avec un plasmide codant pour STAT1 lié au domaine GAL4-AD (l'inverse a également été fait). La présence d'une interaction entre les protéines étudiées permet la pousse des levures sur un milieu dépourvu en leucine, en tryptophane et histidine, et supplémenté en 3-AT. Les plasmides vides AD-alone et DB-alone servent de contrôles négatifs.

C. Etude de l'effet des protéines virales d'intérêt sur l'activation du promoteur ISRE

En parallèle des tests d'interaction, nous avons réalisé différentes études afin de déterminer l'effet de Nsp9, Nsp6 et Nsp13 du SARS-CoV-2 sur la fonction de STAT1. Nous nous sommes intéressés à Nsp9 car cette protéine virale a été identifiée comme interacteur potentiel de STAT1 par le test de reconstitution de la Nanoluc (Figure 34) et aux protéines Nsp6 et Nsp13 qui ont été rapportées comme étant des antagonistes de la voie IFN.^{25,235,307} Nous avons tout d'abord réalisé des tests rapporteurs luciférase nous permettant d'évaluer l'état d'activation des éléments ISRE présents dans le promoteur régulant l'expression des ISG. Ce test permet d'étudier l'impact des protéines virales sur l'activation de la voie JAK/STAT.

Les ORFs codants pour les protéines Nsp6, Nsp9 et Nsp13 du SARS-CoV-2 ont été clonés dans un vecteur porteur d'une étiquette V5-HIS en position C-terminale ainsi

que dans un vecteur porteur de l'étiquette 3xFLAG en position N-terminale. Nous avons choisi de réaliser ce premier test fonctionnel en testant les protéines d'intérêts fusionnées aux étiquettes à l'extrémité N-terminale et C-terminale au cas où l'étiquette interfèrerait avec le fonctionnement de la protéine à une des 2 extrémités. Il est également possible que des peptides signaux se trouvent en position N-terminale des protéines du SARS-CoV-2. Tout d'abord, nous avons voulu vérifier l'expression de nos protéines d'intérêt étiquetés V5-HIS par western blot (Figure 36). Nos résultats indiquent une forte expression de Nsp6 et de Nsp13 tandis que la protéine Nsp9-V5 (environ 17KDa) s'expriment moins intensément.

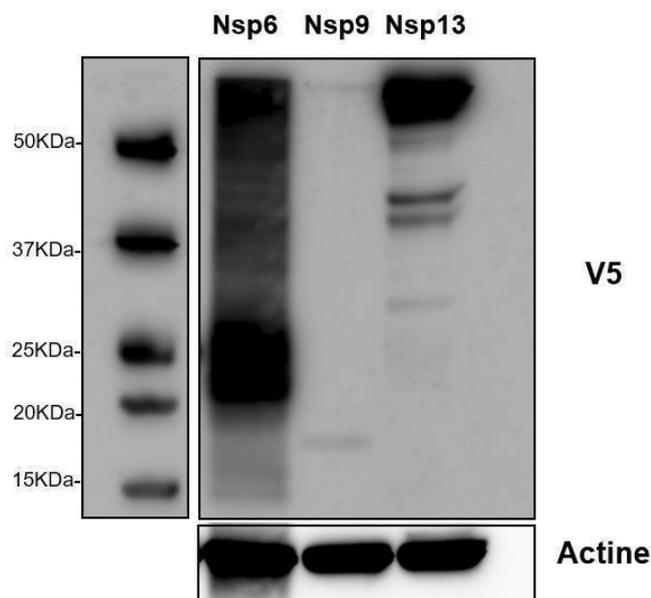


Figure 36 : Expression des protéines Nsp6, Nsp9 et Nsp13-V5-HIS

Des cellules 293T ont été transfectées avec des plasmides codants pour Nsp6, Nsp9 et Nsp13 fusionnées au tag V5-HIS en C-terminal. 24h post transfection les cellules ont été lysées et un western blot a été réalisé avec un anticorps primaire souris anti V5-HRP incubé pendant 1h.

Pour réaliser le test rapporteur luciférase, nous avons transfecté des cellules HEK-293T avec le vecteur codant pour la protéine virale d'intérêt, un vecteur rapporteur ISRE- Luc et un vecteur pCMV-Renilla. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été stimulées avec 2000UI/mL d'IFN β pendant 8h afin d'activer la voie de réponse à l'IFN (voie JAK/STAT). Nos résultats montrent que lorsque les protéines Nsp1-V5 et

Mv-V-3XFlag (protéine V de la rougeole), connues pour inhiber la réponse IFN, sont surexprimées il y a une diminution significative de l'activité du promoteur ISRE par rapport au contrôle négatif correspondant au vecteur vide (V5 ou 3x-vide).^{308,309} De plus, nos résultats montrent que la surexpression des protéines Nsp6 et Nsp13 cause une diminution significative de l'activité du promoteur ISRE par rapport au contrôle négatif correspondant au vecteur vide et ce, que les protéines portent l'étiquette en position N-terminale ou C-terminale (figure 37). Ces résultats indiquent donc que les protéines Nsp6 et Nsp13 sont des antagonistes de la voie IFN. Concernant Nsp9, nous avons eu plus de variabilité dans nos résultats mais dans la majorité des expériences réalisées, la surexpression de la protéine Nsp9 n'a pas induit de diminution de l'activité du promoteur ISRE. La protéine Nsp9 du SARS-CoV-2 ne semble donc pas capable d'antagoniser la voie IFN (figure 37). Le faible niveau d'expression de Nsp9 (Figure 36) pourrait être un frein à la détection d'un éventuel effet de Nsp9 sur la voie IFN.

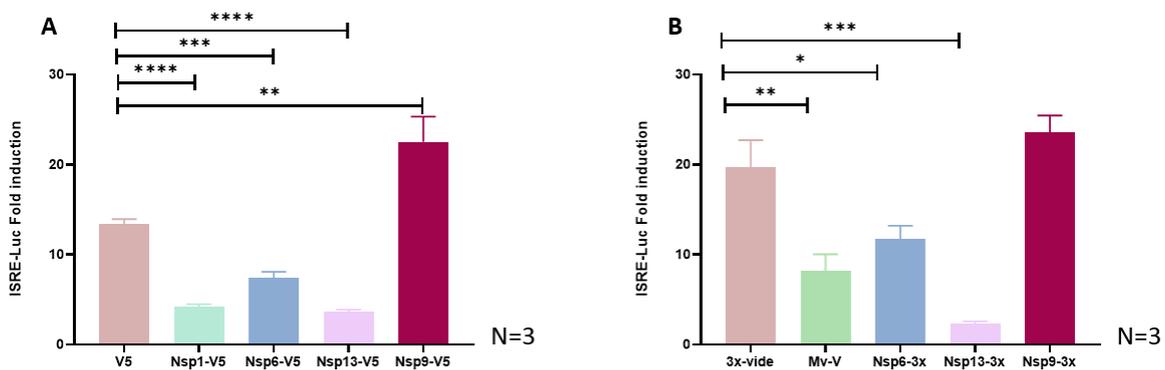


Figure 37 : Effet des protéines Nsp6, Nsp13, Nsp9 sur l'activation du promoteur ISRE

Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec des plasmides codants pour les protéines Nsp6, Nsp13, Nsp9, Nsp1, Mv-V et les vecteurs vides portant soit l'étiquette 3xFLAG en N-terminal soit l'étiquette V5-HIS en C-terminal, ainsi que par un plasmide rapporteur ISRE-Luc et un plasmide CMV renilla. 24h post transfection, les cellules ont été traitées avec 2000U/ml d'IFN β humain pendant 8h. Les cellules ont été par la suite lysées et la bioluminescence émise par la luciférase mesurée. A) Protéine tagguées en V5-HIS en position C-terminale. Nsp1 est un contrôle positif. V5 est un contrôle négatif B) Protéine tagguées en 3xFLAG en position N-terminale. MV-V est un contrôle positif. 3x-vide est un contrôle négatif. Les résultats sont exprimés en fold-induction par rapport au même plasmide non stimulé. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. Test statistique non paramétrique de Mann-Whitney ; *= p-value <0,05 ; **= p-value <0,01 ; ***= p-value <0,001 et ****=p-value <0,0001.

Les résultats obtenus avec le test rapporteur suggèrent que parmi les protéines virales étudiées, la protéine Nsp13 est celle dont l'effet antagoniste de la voie IFN est le plus important. Nous nous sommes alors concentrés plus particulièrement sur cette protéine virale.

D. Etude de l'effet des protéines virales d'intérêt sur la translocation de STAT1

Dans un premier temps, nous nous sommes demandés quelle était l'étape de la voie IFN qui était inhibée par Nsp13. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des marquages par immunofluorescence afin d'investiguer l'effet de la protéine Nsp13 sur la translocation de pSTAT1 dans le noyau. En effet, lorsque la voie IFN est activée, il y a formation du complexe STAT1-STAT2 après leur phosphorylation. Ce complexe va alors recruter IRF9 et transloquer dans le noyau.

Pour ce faire, des cellules HeLa transfectées avec des plasmides codants pour la protéine Nsp13 du SARS-CoV-2 fusionnée à l'étiquette V5-HIS en position C-ter ont été stimulées avec de l'INF β . Nous avons ensuite réalisé un marquage de la protéine Nsp13 en utilisant un anticorps primaire dirigée contre l'étiquette V5-HIS ainsi qu'un marquage dirigé contre la protéine pSTAT1 endogène.

Lorsque les cellules ne sont pas stimulées avec de l'INF β , on ne détecte pas de STAT1 phosphorylée dans la cellule (Figure 38 panel du haut). Après stimulation avec de l'INF β (Figure 38 panel du bas), les cellules transfectées avec le plasmide contrôle vide présentent une localisation de pSTAT1 qui est nucléaire (en rouge). Dans les cellules où la protéine Nsp13 est surexprimée (en vert), aucun marquage de pSTAT1 dans le noyau est observé. En accord avec la littérature, ces résultats confirment que la protéine Nsp13 interfère avec la translocation de pSTAT1 dans le noyau après stimulation de la voie JAK/STAT. ²⁴

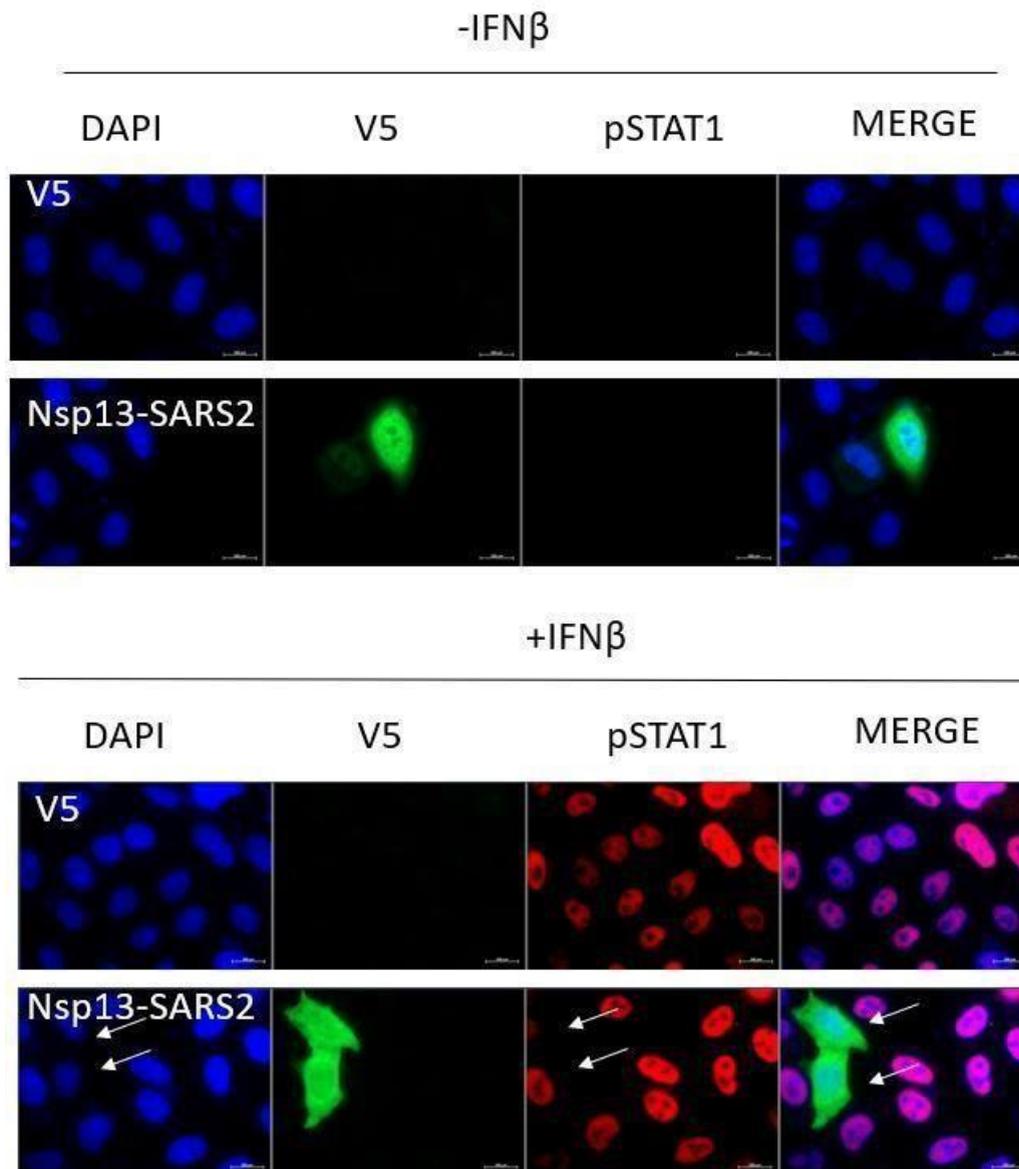


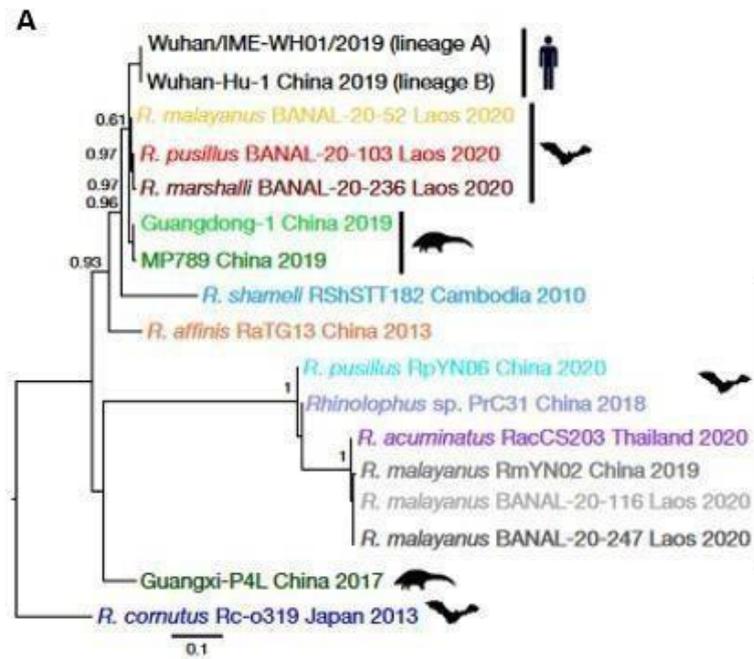
Figure 38 : Inhibition de la translocation de pSTAT1 par Nsp13 du SARS-CoV-2.

Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide vide (V5) ou un plasmide codant pour la protéine Nsp13 du SARS-CoV-2 fusionnée au tag V5. 24h post transfection, les cellules ont été stimulées avec 2000U/ml d'IFN β humain pendant 30min. Après fixation avec de la PFA 4%, l'expression des protéines a été détectée avec un anticorps primaire souris anti-V5 et lapin anti-pSTAT1 pendant 1h puis avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome 488 et anti-lapin couplé à un fluorochrome 546. Les noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI pendant 2min. Les flèches indiquent les cellules exprimant Nsp13 pour lesquelles il y a une inhibition de pSTAT1 dans le noyau.

E. Etude de la fonction antagoniste de la voie IFN de la protéine Nsp13 d'autres coronavirus

Compte tenu de l'hypothèse selon laquelle le SARS-CoV-2 a pour origine un coronavirus de chauve-souris insectivore, nous avons voulu étudier la conservation de la fonction antagoniste de la voie IFN de Nsp13 chez des coronavirus de chauve-souris proche du SARS-CoV-2. Nous nous sommes intéressés également à un coronavirus plus éloigné du SARS-CoV-2, le HCoV-HKU1 qui infecte également les humains et dont la pathogénicité est modérée.

De nombreux virus assimilés SARS-CoV ont été identifiés chez des chauves-souris « fer à cheval » de la famille des Rhinolophes en Asie entre 2010 et 2020. Parmi eux, RATG13 a été isolé chez *R. afinis* en Chine en 2013. BANAL-103 et BANAL-236 ont quant à eux été isolés respectivement chez *R. pusillus* et *R. marshalli*, en 2020 au Laos lors d'une étude sur la circulation de coronavirus animaux dans l'environnement (Figure 39).¹⁵⁶ RATG13 partage 96,1% de similarité sur le génome entier avec SARS-CoV-2. Les virus BANAL sont les coronavirus les plus proches du SARS-CoV-2 avec notamment une conservation importante du domaine RDB de la protéine Spike avec 15 à 16 acides aminés communs sur les 17 permettant la liaison avec le récepteur ACE2 humain.¹⁵⁶ Une étude a également montré que la protéine Spike de BANAL-236 est capable de médier l'entrée de particules lentivirales pseudo typées avec la S de BANAL-236 dans des cellules HEK-293T exprimant hACE2. De plus, BANAL-236 est capable d'infecter différentes lignées cellulaires comme les Calu-3, les Caco-2 et les VeroE6.¹⁵⁶



B

	Espèce de chauve-souris	Année de découverte	Pays de découverte
Banal-103	<i>R. pusillus</i>	2020	Laos
Banal-236	<i>R. marshalli</i>	2020	Laos
RATG13	<i>R. affinis</i>	2013	Chine

Figure 39 : Les coronavirus de chauve-souris apparentés au SARS-CoV « Bat-SARS-CoV-like »

A) Arbre phylogénétique des virus apparentés à SARS-CoV-2 isolés chez la chauve-souris et le pangolin. Adapté de Temmam et al, 2022. B) Tableau récapitulant les virus apparentés à SARS-CoV-2 isolés chez les chauves-souris sélectionnés pour notre étude.

Nous avons réalisé des études bio-informatiques en alignant les séquences nucléotidiques et protéiques de Nsp13 (Figure 39) afin de déterminer si la protéine virale est très conservée chez les virus proches de SARS-CoV-2 (BANAL et RATG13) mais également chez un virus plus éloigné (HKU1). D'un point de vue nucléotidique, les séquences de Nsp13 des BANAL et RATG13 sont très proches avec celles de Nsp13 du SARS-CoV-2 avec plus de 97% de d'identité (tableau 8). HCoV-HKU1 possède 63,79% d'identité . Les séquences protéiques des Nsp13 des virus BANAL et de RATG13 sont très identiques avec la Nsp13 du SARS-CoV-2. RATG13 possède une seule mutation T->A en position 505, BANAL-103 une seule mutation E->D en position 261 et BANAL-236 une seule mutation T->I en position 250. La protéine Nsp13 de HCoV-HKU1 est bien plus différente de SARS-CoV-2 avec seulement 76,50% de similarité. À noter que HCoV-HKU1 possède également des mutations aux positions 505, 261 et 250 (E261F, T250R et A505W respectivement) (Figure 40).

Tableau 8 : Identité de séquences nucléotidiques entre les protéines Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1.

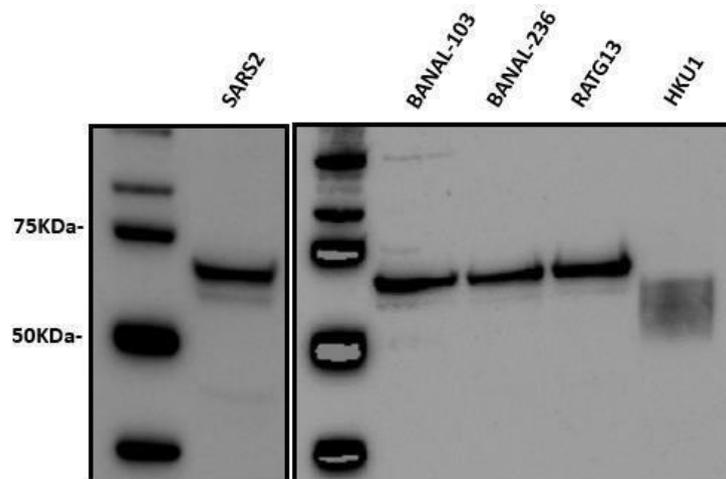
Nsp13	SARS2	BANAL-103	BANAL-236	RaTG13	HCoV-HKU1
SARS2	100				
BANAL-103	97.12	100			
BANAL-236	97.17	99.61	100		
RaTG13	98.06	97.23	97.28	100	
HCoV-HKU1	63,79	63,57	63,57	63,46	100

Figure 40 : Alignement des séquences protéiques des Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1

Les séquences protéiques des Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1, ont été alignées grâce au site Multalign.

Les ORFs des différentes Nsp13 ont été clonées dans des vecteurs pDONR207 par prestation de service (GENECUST). Nous les avons ensuite clonés dans des vecteurs d'expression portant l'étiquette V5-HIS en position C-terminale par système Gateway. Nous avons dans un premier temps vérifié que les protéines s'exprimaient correctement. Pour cela, nous avons transfecté des cellules HEK-293T avec les différents plasmides. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été lysées et l'expression des protéines a été analysées par Western Blot (Figure 41a). Comme nous pouvons le voir les protéines s'expriment correctement et à la bonne taille, soit environ 66 kDa. Nous avons également vérifié leur expression par immunofluorescence en transfectant des cellules HeLa avec les différents plasmides (Figure 41b). Les résultats montrent non seulement que les protéines s'expriment correctement mais également que le nombre de cellules exprimant les différentes protéines d'intérêts est similaire pour toutes les Nsp13.

A



B

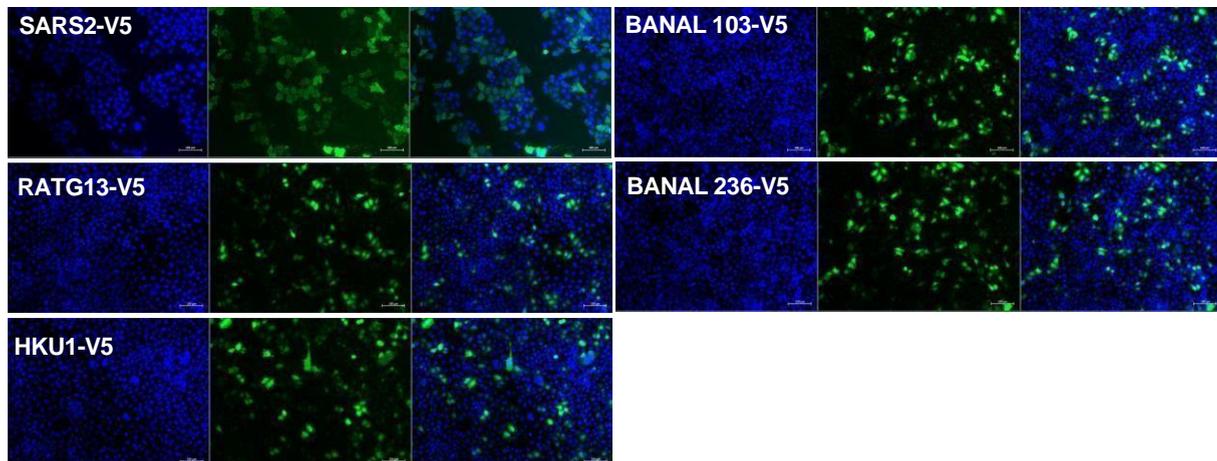


Figure 41 : Expression des protéines Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1.

A) Des cellules 293T ont été transfectées avec des plasmides codants pour les différentes protéines Nsp13 fusionnées au tag V5-HIS en C-terminal. 24h post transfection les cellules ont été lysées et un western blot a été réalisé avec un anticorps primaire souris anti V5-HRP incubé pendant 1h. B) Des cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides codants pour les différentes protéines Nsp13 fusionnées au tag V5-HIS en C-terminal. 24h post transfection les cellules ont été fixées avec de la PFA 4% et marquées avec un anticorps primaire souris anti V5 pendant 1h puis avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome Alexa 488. Les noyaux ont été marqués avec du DAPI pendant 2min.

Nous avons ensuite réalisé des tests rapporteurs luciférase afin de déterminer l'impact de Nsp13 des différents coronavirus d'intérêt sur le niveau d'activation du promoteur ISRE après stimulation par l'IFN β . Les tests ont été réalisés dans les mêmes conditions que décrites précédemment (Figure 37). Nos résultats indiquent que les protéines Nsp13 des coronavirus BANAL-103, BANAL-236 et RATG13 sont capables d'inhiber l'activation du promoteur ISRE en cellules humaines. HCoV-HKU1 est également capable de diminuer l'activation du promoteur ISRE mais de façon moins efficace (Figure 42).

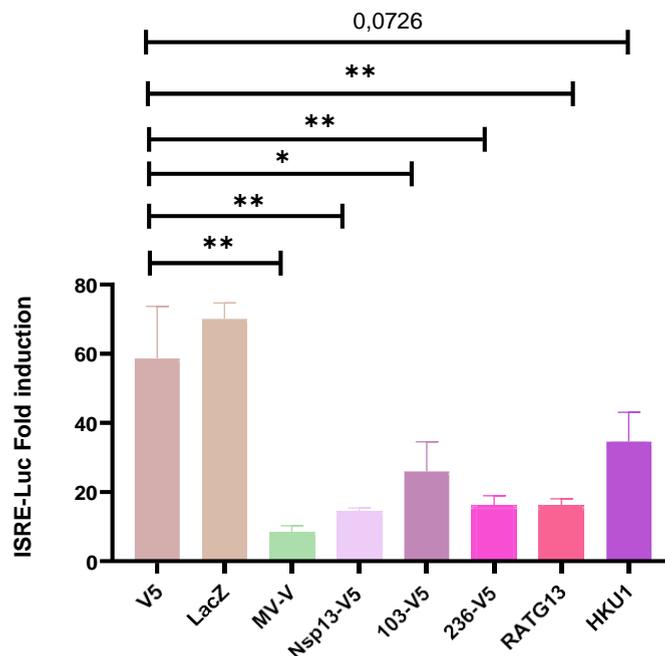


Figure 42 : Effet des protéines Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1 sur l'activation du promoteur ISRE

Des cellules 293T ont été transfectées avec des plasmides codants pour les protéines Nsp13 SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HKU1 fusionnées à l'étiquette V5-HIS en C-terminal, ainsi que par un plasmide rapporteur ISRE-Luc et un plasmide CMV renilla. 24h post transfection, les cellules ont été traitées avec 2000U/ml d'IFN β humain pendant 8h. Les cellules ont par la suite été lysées et la bioluminescence émise par la luciférase mesurée. Résultats représentatifs de 3 expériences indépendantes. Test statistique de Mann-Whitney. *= p -value $<0,05$; **= p -value $<0,01$

Par la suite, nous avons déterminé si les protéines Nsp13 des virus BANAL et de HCoV-HKU1 interféraient également avec la translocation de STAT1 phosphorylé dans le noyau. Nous avons réalisé un marquage par immunofluorescence de cellules HeLa transfectées avec les différents plasmides et stimulées avec de l'IFN β . Nous avons réalisé un comptage des cellules surexprimant les protéines et montrant un marquage nucléaire de pSTAT1 (Figure 43). Nos résultats indiquent qu'il y a une diminution significative de pSTAT1 localisée dans le noyau lorsque les cellules surexpriment les protéines Nsp13 de BANAL-103, BANAL-236, RATG13. HCoV-KHU1 montre un pourcentage de cellules ayant une localisation nucléaire de pSTAT1 diminuée par rapport au contrôle V5 avec une différence presque significative (p-value = 0,0628). Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'inhibition de la voie IFN par la protéine Nsp13 du SARS-CoV-2 est conservé chez d'autres coronavirus proche du SARS-CoV-2.

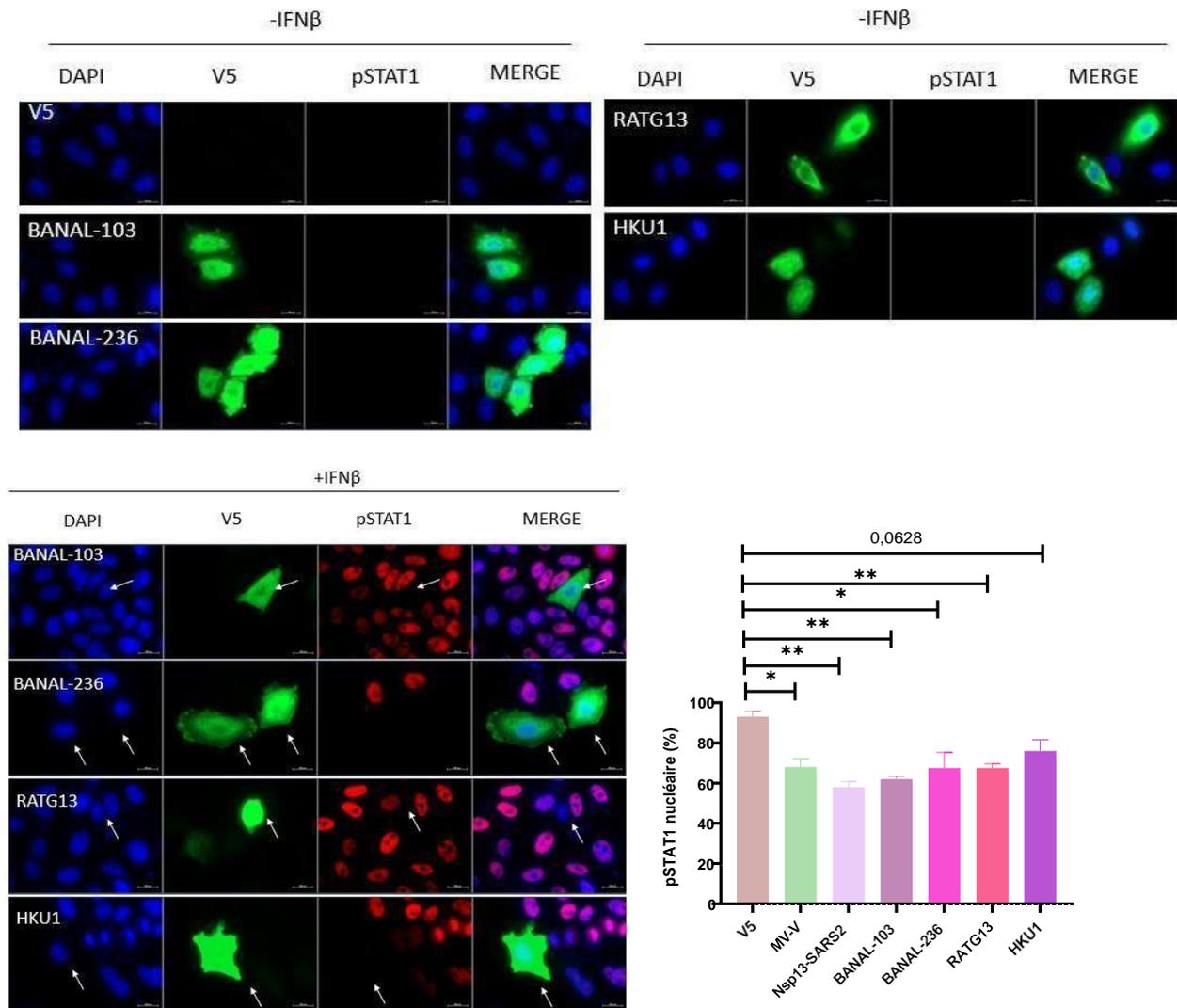


Figure 43 : Inhibition de la translocation de pSTAT1 par les protéines Nsp13 de SARS-CoV-2, BANAL-103, BANAL-236, RATG13 et HCoV-HKU1

Des cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides codants pour différentes Nsp13 fusionnées au tag V5. 24h post transfection, les cellules ont été stimulées avec 2000U/ml d'IFN β humain pendant 30min. Après fixation avec de la PFA 4%, l'expression des protéines a été détectée par un anticorps primaire souris anti-V5 et lapin anti-pSTAT1 pendant 1h puis avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome 488 et anti-lapin couplé à un fluorochrome 546. Les noyaux ont été marqués avec du DAPI pendant 2min. Les flèches indiquent les cellules exprimant Nsp13 pour lesquelles il y a une inhibition de pSTAT1 dans le noyau.

IV. Discussion

Dans cette partie de la thèse, l'objectif a été d'identifier des protéines virales du SARS-CoV-2 capables de moduler la voie de réponse à l'IFN et de déterminer si cette fonction antagoniste est conservée chez différents coronavirus.

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier des protéines du SARS-CoV-2 interagissant avec STAT1. Au début de cette thèse, peu d'études concernant les interactions entre les protéines du SARS-CoV-2 et les protéines de la réponse IFN n'avaient alors été réalisées. Nous avons utilisé une technique basée sur la reconstitution de la Nanoluc car elle permet de tester assez rapidement un grand nombre de combinaisons d'interactions potentielles. Durant mon stage de M2, nous avons testé cette technique en essayant de retrouver des interactions qui avaient déjà été décrites dans la littérature entre des protéines du SARS-CoV-2 et des protéines cellulaires : N avec RIG-I³¹⁰ et STAT1²³⁹, Nsp3 avec IRF3³¹¹ et Nsp6 et Nsp13 avec TBK1.³⁰⁷ Ces interactions ont été mises en évidence en utilisant des techniques de co-immunoprécipitation et de co-localisation des protéines par marquage en immunofluorescence. En utilisant le test Nanoluc, nous avons retrouvé une potentielle interaction entre N et RIG-I, N et STAT-1, NSP3 et IRF3 mais pas entre Nsp6 et Nsp13 et TBK1. De plus, une étude a montré qu'il n'y avait pas d'interaction entre N et les protéines MAVS et IRF3.³¹⁰ Cependant, contrairement à leurs résultats, nous avons trouvés une NLR>3 pour les quatre combinaisons testées, suggérant une interaction entre ces protéines. Ces résultats suggèrent que le test Nanoluc ne permet pas de mettre en évidence toutes les interactions et qu'il pourrait présenter des faux positifs. De plus, nous avons observé un manque de reproductibilité entre des expériences indépendantes et une grande variabilité intra-expérience, rendant l'interprétation de cette méthode difficile. Ce test peut donc être considéré comme un crible de première intention mais il est indispensable de confirmer les résultats obtenus par d'autres méthodes.

Par cette technique, nous avons montré une possible interaction entre la protéine virale Nsp9 et la protéine cellulaire STAT1 (Figure 34). De nombreuses tentatives pour

confirmer l'interaction par co-précipitation GST ont ensuite été réalisées mais n'ont pas permis de conclure à cause de problèmes techniques. Un test de double hybride en levure a été également réalisé mais n'a pas mis en évidence d'interaction entre Nsp9 et STAT1. Les résultats obtenus pour les études fonctionnelles réalisées afin de déterminer l'effet de Nsp9 sur la voie de réponse IFN sont également assez variables. En effet, nous avons eu des résultats qui montrent parfois une inhibition de la voie JAK/STAT par Nsp9 mais qui n'ont pas permis de conclure sur un effet inhibiteur. Il est possible qu'il y ait une interaction entre Nsp9 et STAT1 mais que celle-ci soit très transitoire ou de faible affinité et qu'elle soit donc difficile à détecter. De plus, l'analyse de l'expression de Nsp9 par western blot a montré une expression de faible intensité (Figure 36). Il est possible que ce faible niveau d'expression ne permette pas la détection de l'effet de Nsp9 sur la voie IFN. Si on s'intéresse à la littérature, plusieurs cribles ont été réalisés avec des tests rapporteurs luciférase afin d'identifier des protéines du SARS-CoV-2 capables de moduler la réponse IFN.^{307,312,313} Aucun ne montre un effet antagoniste de la protéine Nsp9 du SARS-CoV-2 sur la réponse IFN. Cependant, une étude réalisée en février 2024 sur le coronavirus aviaire IBV montre que la protéine Nsp9 d'IBV est capable d'inhiber la réponse IFN en interagissant avec STAT1 de manière directe, empêchant sa phosphorylation et donc sa translocation dans le noyau cellulaire dans des cellules aviaires DF-1 (fibroblastes embryonnaires de poulet).³¹⁴ Dans cette étude, les auteurs ont d'abord montré que la surexpression de Nsp9 induisait une diminution significative du niveau d'expression de l'ARNm de STAT1 (qPCR). L'interaction entre les deux protéines a ensuite été montrée par co-immunoprécipitation ainsi qu'une colocalisation entre les deux protéines par microscopie confocale. Ils montrent également par RT-qPCR une diminution du niveau d'expression de l'ARNm codant pour IRF7 et ISG20 après surexpression de Nsp9. Cependant, les protéines Nsp9 d'IBV et de SARS-CoV-2 possèdent environ 77% d'homologies de séquence et il est donc possible que ces deux protéines virales aient des fonctions différentes.

Pour le moment, il est difficile de conclure quant à une potentielle interaction entre Nsp9 du SARS-CoV-2 et STAT1 ainsi qu'à un effet antagoniste de la protéine virale sur la réponse IFN. D'autres tests doivent être réalisés pour tenter de confirmer ou

d'infirmer les résultats montrés par Nanoluc. D'autres méthodologies pourraient être utilisées comme par exemple de la co-immunoprécipitation. Nous pourrions également investiguer le niveau d'expression de certains ISG en présence de Nsp9 pour étudier l'effet de la protéine virale sur la voie de réponse à l'IFN. Nous pourrions également utiliser d'autres approches afin d'essayer d'augmenter la surexpression de Nsp9 en utilisant différentes étiquettes ou systèmes d'expression cellulaire tels que des vecteurs lentiviraux par exemple.

N'ayant pas pu confirmer une interaction entre Nsp9 du SARS-CoV-2 et STAT1, nous nous sommes intéressés à une protéine virale dont la fonction antagoniste de la voie IFN était déjà connue, Nsp13, afin d'étudier la conservation de ces mécanismes chez différents coronavirus.^{24,25,315} La protéine Nsp13, l'hélicase du SARS-CoV-2 a été montrée dans différentes études comme antagonisant la voie de signalisation et de réponse IFN via différents mécanismes.^{23,25,315} Nsp13 du SARS-CoV-2 est capable de bloquer l'activation de TBK1 en inhibant sa phosphorylation par interaction directe, de diminuer l'activation de IRF3 ainsi que de bloquer l'expression de la protéine IFIT1.²⁴ Nsp13 est également capable de diminuer le niveau d'expression de IFNAR1.²³⁸ Plusieurs études ont également montré que Nsp13 de SARS-CoV-2 est capable de prévenir la phosphorylation de STAT1 et STAT2 induite par IFN α/β . Nsp13 est capable d'interagir avec STAT1, cette interaction n'empêche pas la formation du complexe STAT1-JAK1 mais va inhiber l'activité kinase de JAK1 sur STAT1 et donc sa phosphorylation.^{23,315} De plus, l'étude de Feng et son équipe a montré que la protéine Nsp13 du SARS-CoV-2 délété du domaine 2A de la protéine (délétion à partir de la position 442) maintient son interaction avec STAT1 tandis que la délétion du domaine 1A (à partir de la position 259) ne maintient pas l'interaction avec STAT1. Ces résultats suggèrent donc que c'est la région 1A de la protéine Nsp13 qui est impliquée dans l'interaction avec STAT1.³¹⁵

Nous avons effectivement trouvé un fort effet antagoniste de Nsp13 sur l'activation du promoteur ISRE (Figure 37). Les expériences d'immunofluorescence confirment également l'effet inhibiteur de Nsp13 sur la translocation de pSTAT1 dans le noyau cellulaire (Figure 38). Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé l'interaction

Nsp13/STAT1 lorsque nous avons réalisé les tests d'interaction basé sur la Nanoluc, renforçant l'hypothèse que cette technique n'est pas toujours pertinente (Figure 34a).

Nous avons ensuite regardé si la fonction antagoniste de Nsp13 était conservée chez des coronavirus plus ou moins proche du SARS-CoV-2. Nos résultats montrent une conservation de l'effet antagoniste de Nsp13 de BANAL-103, BANAL-236 et RATG13. Concernant Nsp13-HCoV-HKU1, qui est le plus éloigné, nos résultats décrivent un effet antagoniste qui est présent mais qui semble moins fort que celui de SARS-CoV-2 (Figures 42 et 43). De plus, son expression analysée par western blot semble indiquer une possible modification post-traductionnelle ou une dégradation de la protéine (Figure 41). Il n'y a à ce jour aucune étude ayant regardé l'expression de Nsp13-HKU1. Il serait intéressant d'approfondir les études concernant les domaines de Nsp13 impliqués dans l'interaction avec STAT1, notamment la région 1A décrite dans l'étude de *Feng et al*, et de déterminer si elle est conservée chez la protéine Nsp13 de HCoV-HKU1.³¹⁵

Peu d'études ont été réalisées sur la modulation de la voie IFN par la protéine Nsp13 d'autres coronavirus. Une étude montre que Nsp13 de PEDV surexprimée dans des cellules IPEC-J2 (entérocytes intestinaux porcins) infectées par le PEDV n'a pas d'effet sur la production d'Il-6 et de TNF- α mais diminue l'expression du CMH-I.³¹⁶ Il pourrait être intéressant de regarder si Nsp13 de PEDV ou d'autres coronavirus animaux (TGEV, FIPV par exemple) ont un effet sur la voie IFN en réalisant des tests luciférase dans des cellules humaines et spécifiques de leur tropisme d'hôte, afin d'évaluer la conservation éventuelle de cette propriété de la protéine Nsp13.

Cette partie de ma thèse est encore à approfondir. De nombreuses questions restent encore sans réponse. Il serait intéressant d'identifier les régions précises de Nsp13 impliquées dans son activité antagoniste de la voie IFN et déterminer si elles sont conservées ou non chez les autres coronavirus plus ou moins proches. Nous pourrions également réaliser des co-immunoprécipitation ou d'autres techniques d'interaction pour regarder si les protéines Nsp13 des virus BANAL, de RATG13 et de HCoV-HKU1 interagissent avec STAT1 dans des cellules humaines et si leur mécanisme d'inhibition de la voie IFN sont similaires à celui de Nsp13 du SARS-CoV-2 ou non. De plus, nous

pourrions également nous intéresser aux différences entre la protéine STAT1 humaine et celles des différentes espèces de chauve-souris. En effet, si nous parvenons à identifier les domaines des Nsp13 impliquées dans l'interaction avec la protéine STAT1 humaine nous pourrions étudier s'ils permettent une interaction avec différentes STAT1 de chauve-souris et d'autres espèces animales sensibles ou résistantes à l'infection par le SARS-CoV-2.

DISCUSSION GENERALE

1. Souris et Hamsters : deux modèles d'étude de l'infection SARS-CoV-2 très différents

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé deux modèles animaux différents afin de mieux comprendre l'infection par le SARS-CoV-2 et la réponse IFN de l'hôte qui y est associée. Le hamster syrien s'infecte naturellement et est un modèle pertinent pour l'étude de l'infection. En effet, l'infection mime assez bien les manifestations cliniques qui sont observées chez l'Homme avec notamment de nombreux symptômes similaires tels que de l'anosmie et des difficultés respiratoires, mais sans provoquer une détresse respiratoire.^{173,176} La souris ne s'infecte pas naturellement par le SARS-CoV-2 hormis par certains variants possédant la mutation N501Y dans leur protéine spike et qui permet la liaison au récepteur ACE2 murin.³¹⁷ De nombreuses adaptations ont été réalisées pour permettre une infection efficace des souris. Des souris ont été génétiquement modifiées pour exprimer le récepteur ACE2 humain mais le virus a également pu être modifié comme la souche MA30 utilisée pour notre étude.

Au cours de cette thèse nous nous sommes notamment intéressés à la réponse immunitaire innée après infection avec différentes souches du SARS-CoV-2 chez ces deux modèles dans les poumons et dans les cornets olfactifs à différents jours post-infections. Si nous comparons les deux modèles dans nos études nous pouvons voir que la physiopathologie de l'infection est assez différente ([Tableau 9](#)). Les souris infectées par le MA30 ont une perte de poids beaucoup plus importante que les hamsters infectés par les variants D614G et Delta, environ 15% et 5 à 8% respectivement ([Figure 21 et figure 1 de la partie 1 des résultats](#)). De plus, les souris infectées à J4 par le MA30 étaient dans un très mauvais état général que nous n'avons jamais observé chez les hamsters. La charge virale dans les cornets olfactifs est de manière globale plus basse chez la souris que chez les hamsters infectés par tous les variants à J1 et J4. Cette charge virale augmente au cours du temps chez la souris tandis qu'elle diminue chez le hamster. Concernant la charge virale dans le poumon, il n'y a pas chez les hamsters, de présence du virus à J1 sauf avec le variant Delta mais la charge virale augmente au cours du temps tandis que dans les poumons de souris la charge virale est très élevée au début de l'infection et diminue par la suite.

De manière intéressante, chez le hamster l'infection semble avoir lieu dans un premier temps au niveau de la cavité nasale puis se déplace dans le poumon tandis que chez la souris les deux tissus (cavité nasale et poumon) sont infectés en même temps. De plus, l'infection chez le hamster par les différents variants ne va pas être létale pour l'animal. En effet il va y avoir une amélioration de leur état général avec reprise de poids environ 7 jours après l'infection.³¹⁸ Le virus MA30 est très virulent pour les souris BALB/c jeunes et C57BL/6 moyennement âgées avec un pourcentage de survie diminué 4 à 5 jours après l'infection.¹⁸⁴ Il semble aussi l'être chez les souris Sv/129 adultes même si nous n'avons pas poursuivi le cours de l'expérience au-delà de J4, nous empêchant de conclure quant au taux de létalité induit par ce virus chez ces souris. Les lésions histologiques au niveau de la cavité nasale sont très importantes dès J1 post-infection chez les hamsters infectés avec les variants Delta ou D614G mais sont relativement modérés dans notre modèle d'infection des souris. La littérature fait état aussi de lésions histologiques pulmonaires chez les hamsters infectés mais qui se résolvent.³¹⁹ Le MA30 induit aussi des lésions tissulaires pulmonaires qui pourraient expliquer les symptômes graves observés lors de notre étude. Il serait toutefois intéressant de réaliser des études complémentaires sur d'autres organes, comme par exemple le cerveau. En effet les résultats sont contradictoires selon les équipes travaillant avec le MA30. Certaines ne montrent pas d'infection du cerveau mais une inflammation persistante²⁹⁹ tandis qu'une autre suggère une infection cérébrale mais assez faible.³²⁰ Ces études ont été réalisées sur des souris de fonds génétiques différents de celui utilisé dans notre étude et il serait pertinent de vérifier ces résultats sur notre modèle.

Si nous comparons la réponse IFN et inflammatoire dans les cornets olfactifs des deux modèles, on observe chez le hamster une réponse qui est très forte et à son pic dès J1 pour les variants D614G et Delta tandis que chez la souris, WT ou ifnar^{-/-}, cette réponse augmente au cours du temps. Ce retard est retrouvé chez les hamsters infectés par le variant Omicron. Nous pouvons faire les mêmes observations concernant la réponse cytokinique avec une réponse qui est plus rapidement mise en place chez le hamster que chez la souris sauf pour les hamsters infectés par Omicron (Figure 23 et 2 de la partie 1 des résultats). La présence de macrophages résidents

Iba1⁺ est détectée dès J1 chez le hamster sauf lorsqu'ils sont infectés par Omicron et dès J2 chez la souris avec une légère augmentation au cours du temps. Au niveau des résultats obtenus en histologie, on observe des dégâts tissulaires beaucoup plus importants chez le hamster que chez la souris sauf lorsque les hamsters sont infectés par Omicron, où les lésions tissulaires sont plus modérées. Dans le poumon, on observe également des différences entre les deux modèles. La réponse ISG suit la même cinétique chez les deux modèles avec une augmentation dès le début de l'infection sauf pour les hamsters infectés par Omicron (Figure 26 et S1 de la partie 1 des résultats). La réponse cytokinique est activée plus tardivement dans le poumon du hamster que dans la souris ce qui corrèle avec la cinétique d'infection. La présence de macrophages Iba1⁺ est globalement plus importante chez la souris que chez le hamster dans le poumon.

Finalement, l'infection dans les cornets olfactifs de la souris par le virus MA30 se rapproche le plus d'une infection du hamster par le variant Omicron. Le MA30 et le variant Omicron ont plusieurs mutations en commun dans leur protéine spike comme K417N/T, E484K, Q493R, Q498R et N501Y.¹⁸⁴ Une étude réalisée en 2022 s'est intéressée à l'infection de souris 129/Sv avec le variant Omicron. Les souris ne perdent pas de poids suite à l'infection par ce virus.³¹⁷ Des niveaux d'infection virale élevés ont été montrés surtout dans les poumons de ces souris à 3 jours post-infection.³¹⁷ Il serait intéressant d'étudier la réponse inflammatoire de ces souris infectées par Omicron et de la comparer à nos résultats de souris infectées par le MA30. Cependant, lors de l'infection des souris 129/Sv par le MA30, nous avons observé une dégradation importante de leur état général en plus de la perte de poids ce qui n'est pas observé lors des infections chez les hamsters même avec les variants D614G ou Delta. Certaines mutations notamment dans les protéines non-structurales sont spécifiques du MA30, comme la mutation T295I dans la protéine Nsp4 et S76F dans la protéine Nsp8.³²¹ Il semblerait que ces mutations confèrent sa virulence au virus MA30 chez les souris. Nous pourrions tenter d'infecter les hamsters avec le virus MA30 pour en étudier sa virulence et la réponse immunitaire innée qui en découle. Cela nous permettrait de déterminer si les différences de physiopathologie observées entre nos

deux modèles sont dues à une différence de l'espèce animale ou le propre fait du virus MA30.

Tableau 9 : Comparaison de l'infection SARS-CoV-2 chez le hamster et la souris 129/Sv d'après nos études

	J1		J4	
	Hamster	Souris 129/Sv	Hamster	Souris 129/Sv
	Cavité Nasale			
Réplication virale	D/δ : ++ O : +	+	D/δ : + O : +	++
Réponse cytokine	D/δ : +++ O : +	+	D/δ : + O : ++	++
Réponse ISG	D/δ : ++ O : +	+	D/δ : ++ O : ++	++
Réponse Iba1+	D/δ : + O : -	+	D/δ : ++ O : +	+
Domages tissulaires	D/δ : ++ O : -	-	D/δ : ++ O : +	+
	Poumon			
Réplication virale	D/δ : + O : -	++	D/δ : + O : -	+
Réponse cytokine	D/δ : - O : -	++	D/δ : + O : +	++
Réponse ISG	D/δ : ++ O : +	++	D/δ : ++ O : ++	+
Réponse Iba1+	D/δ : + O : +	+	D/δ : ++ O : +	++

Ce tableau compare les réponses inflammatoires et immunitaires des hamsters infectés avec les variants D614G, Delta et Omicron et des souris infectées avec le MA30 dans la cavité nasale et le poumon à J1 et J4. - = pas d'activation ; + =

activation ou présence de dommages ; ++ = activation forte ou présence de dommages importants ; O = Omicron, D/δ = D614G/Delta

2. IFNs de type I et III : des réponses différentes mais complémentaires

Après avoir été synthétisés, les IFN-I et III vont se lier à des récepteurs différents, mais les deux vont déclencher la voie de signalisation JAK-STAT et la synthèse d'ISG. Plusieurs ISG peuvent être induits par les deux types d'IFN comme Mx1, Viperin, IFITM, IFIT et OAS. Cependant certaines études ont montré des distinctions selon les types cellulaires. Par exemple, dans les cellules épithéliales vaginales les ISGs CXL10, CXCL11, IFIT3, IFI30 et TDRD7 sont uniquement ou plus fortement induites par IFN- λ 1 et IFN- β .³²² De même dans les neutrophiles et les cellules épithéliales pulmonaires, l'induction d'ISGs par l'IFN-III semblent plus réduites ainsi que l'induction de cytokines pro-inflammatoires.²⁷¹ Il n'y a pas d'études portant sur les cellules sustentaculaires de l'épithélium olfactif de la cavité nasale bien que l'on sache que ces cellules aussi expriment le récepteur à l'IFN-III abondamment.³²³ Dans le cas d'une infection par la grippe, il est suggéré que la réponse IFN-III est plus rapide et induirait un effet antiviral avec une activation modérée de l'inflammation, alors que l'interféron de type I pourrait induire une inflammation exagérée.²⁰² Dans le cas d'une infection par le SARS-CoV-2 le modèle proposé est que le virus va infecter les cellules épithéliales respiratoires, se répliquer et produire des protéines qui vont bloquer la réponse IFN-I et III. Le virus va alors se répliquer rapidement et une charge virale importante ne pourra pas être contrôlée par les réponses IFN-I et III. Les cellules immunitaires qui ne sont pas infectées vont être stimulées par les composants viraux via les TLR et produire une quantité importante d'IFN-I sans qu'il y ait les protéines virales dans le cytoplasme pour contrer la réponse IFN-I. Ceci va induire une accumulation et une activation des monocytes et des macrophages conduisant à une production importante de cytokines inflammatoires. En parallèle, la réponse IFN-I va renforcer l'inflammation provoquée par la voie des TNF- α en perturbant la tolérance des monocytes et des macrophages à la stimulation des TLR.³²⁴ Cette hypothèse pourrait expliquer l'augmentation des dommages tissulaires que l'on observe dans la

cavité nasale à J4 chez les souris ifnar^{-/-} quand la quantité de virus devient plus importante que chez les WT.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la réponse IFN-I et III. Notre étude ainsi que d'autres études réalisées sur des modèles différents montrent que la réponse immunitaire innée précoce de type-I est un facteur déterminant pour la mise en place d'une réponse antivirale efficace contre l'infection.³²⁴ Cependant nous montrons dans notre étude sur les souris ifnar^{-/-} qu'une réponse IFN-III est également mise en place lors de l'infection et qu'elle pourrait avoir potentiellement compenser le manque de réponse IFN-I. De plus avec le modèle hamster, nous observons une mise en place très précoce de la réponse IFN-III qui est parfaitement corrélée avec l'intensité de la réplication virale, notamment au niveau de la cavité nasale (Figure 3 de la partie 1 des résultats), ce qui n'est pas le cas de la réponse IFN-I mesurée. Nous pourrions nous demander quelles sont les différences entre les deux réponses et quel est leur rôle respectif lors de l'infection par SARS-CoV-2.

Dans notre étude sur les souris, nous aurions pu nous attendre à ce qu'une réponse IFN-I délétée entraîne peut-être moins de dégâts liés à une tempête cytokinique étant donné qu'il n'y a pas une stimulation exacerbée par l'IFN-I.²⁹⁴ Une étude réalisée sur souris C57/Bl6 ifnlr^{-/-} infectées par le MA10 montre une maladie exacerbée comparé aux souris WT avec une perte de poids et une charge virale dans les poumons plus importante.³²⁵ De plus, des analyses histologiques de coupe de poumon ont montré une présence virale bien plus disséminée au niveau des voies aériennes chez les ifnlr^{-/-} que chez les WT montrant que l'IFN λ 3 contribue à limiter la propagation virale dans les poumons.³²⁵ La même tendance est montrée dans notre étude avec les souris ifnar^{-/-} mais avec une cinétique un peu différente, puisque dans l'étude sur les ifnlr^{-/-}, l'effet antiviral semble plus précoce (J2 post-infection) que dans notre étude où les différences entre nos groupes au niveau du titre et de la diffusion virale apparaissent essentiellement à J4 que ce soit dans la cavité nasale ou le poumon (Figure 21). Cela pourrait confirmer que l'effet protecteur de l'IFN-III est plus rapide que celui du type-I, ce qui avait déjà été suggéré dans des études sur la grippe.³²⁶ Leurs résultats indiquent également que l'effet protecteur de l'IFN λ n'est pas seulement dû à la production d'ISG puisque celle-ci n'est que moyennement altérée chez les souris ifnlr^{-/-}. Cependant, l'

IFN λ est nécessaire au recrutement de cellules immunitaires en augmentant la réponse T CD8 spécifique et l'accumulation de cellules dendritiques CD103+ ³²⁵, ce que ne permettrait pas la réponse IFN-I. En revanche dans cette étude, les auteurs n'ont pas évalué les dommages tissulaires chez les souris ifnlr^{-/-} en comparaison avec les WT ce qui ne permet pas de définitivement conclure sur l'effet protecteur de cet IFN-III. Une autre étude a comparé l'infection SARS-CoV-2 sur souris ifnar^{-/-} et ifnlr^{-/-} avec une souche murinisée du SARS-CoV-2 qui est non létale, et donc probablement moins virulente que celle que nous avons utilisée.²⁰⁹ Dans leur modèle, ils notent, comme nous, une charge virale augmentée dans les poumons et une augmentation des lésions tissulaires, les deux indicateurs étant plus marqués chez les souris ifnar^{-/-} que ifnlr^{-/-} mais peu de différences chez les souris ifnlr^{-/-}. De manière intéressante, les auteurs ont aussi développé un modèle hamster déficient pour le récepteur IFN-III et des hamsters déficients pour le gène stat2. Ces derniers n'ont donc ni réponse IFN-I, ni réponse IFN-III. Dans ces modèles hamsters, l'effet antiviral de l'IFN-III semble limité dans les poumons. En revanche, il y a une forte augmentation du titre viral chez les hamsters déficients stat2 mais aussi significativement moins de lésions pulmonaires. Cependant, l'expérimentation s'arrête à J4 et il aurait été intéressant de savoir si sur des temps plus longs, la très importante augmentation du titre viral ne serait pas délétère sur l'état général des animaux. Cette dernière étude en tout cas, confirme bien le rôle important des réponses IFN-I et -III dans l'établissement de lésions tissulaires, du moins au niveau pulmonaire.

Aucune des études de la littérature n'a à ce jour étudié l'impact de la réponse IFN-III sur l'infection SARS-CoV-2 dans la cavité nasale alors que les cellules sustentaculaires expriment fortement le récepteur de l'IFN-III et sont des cibles de l'infection virale. Dans un modèle grippe, il a été suggéré que l'IFN-III a un rôle majeur pour restreindre l'infection dans la cavité nasale et éviter ainsi à la fois la propagation du virus vers les poumons mais aussi limiter la transmission à des individus naïfs.³²⁶ Il serait pertinent d'étudier l'infection virale SARS-CoV-2 dans les cornets olfactifs chez des souris déficientes pour le récepteur IFN-III. Il pourrait y avoir une différence encore plus marquée que ce que nos résultats montrent entre les souris WT et ifnar^{-/-}, une

cinétique d'infection et de réponse IFN différente et nous pourrions ainsi comparer l'étude du rôle de l'IFN-III par rapport à celui de l'IFN-I.

3. SARS-CoV-2 et franchissement de barrière d'espèce

Depuis l'émergence du SARS-CoV-2 fin 2019, de nombreuses questions ont été posées. D'où provient ce virus ? Quels sont les mécanismes lui permettant de contrecarrer la réponse immunitaire de l'hôte ? Comment arrive-t-il à franchir la barrière d'espèce ? De nombreux scientifiques à travers le monde ont essayé de répondre à ces questions et énormément de publications scientifiques ont vu le jour.

Notre intérêt s'est porté sur la réponse immunitaire innée. Il s'agit de la première ligne de défense contre une infection virale. Son rôle dans la mise en place d'une protection antivirale de la cellule est prédominant. De nombreuses études ont montré que cette réponse est ciblée par de nombreuses protéines virales, que ce soit par des interactions directes ou indirectes afin de diminuer son efficacité et de permettre au virus de se répliquer.²³⁵

Nous savons également que le SARS-CoV-2 est capable de franchir les barrières d'espèces. Des études ont permis de montrer qu'il provient de la chauve-souris et qu'il y a eu un premier franchissement de barrière d'espèce éventuellement vers un hôte intermédiaire non identifié. Ensuite, plusieurs sauts de barrière d'espèce ont eu lieu puisqu'on recense une soixantaine d'espèces animales sensibles à l'infection à travers le monde, que ce soit dans la faune sauvage, les élevages ou chez les animaux domestiques.¹⁵⁷

Les coronavirus de manière générale sont des virus ayant un haut potentiel évolutif, comme nous avons pu le voir avec le SARS-CoV-2 et l'apparition rapide de variant par exemple. Ce haut potentiel évolutif par recombinaison et/ou mutations génétiques leur permet d'acquérir de nouvelles propriétés comme la capacité à infecter un nouvel hôte.

L'entrée du virus SARS-CoV-2 dans la cellule est déterminée par la reconnaissance entre la protéine virale S et le récepteur cellulaire ACE2. La séquence de celui-ci est assez bien conservée entre différentes espèces animales laissant présager des

possibilités d'infection de différents animaux.³²⁷ Ainsi le chat et le chien s'infectent naturellement, y compris par les variants Alpha et delta avec parfois de symptômes respiratoires.³²⁸ Les hamsters dorés sont sensibles aux différents variants du virus et présentent des lésions pulmonaires comme nous l'avons montré précédemment. Cependant certaines espèces comme le porc, bien qu'exprimant un récepteur ACE2 permettant l'entrée virale avec la même efficacité que le récepteur ACE2 humain, ne s'infecte pas expérimentalement par le SARS-CoV-2.^{327,329} De plus, deux études montrent que le récepteur ACE2 est exprimé dans de nombreux tissus incluant les reins, la trachée, le foie, le cœur et le poumon.^{291,330} Ces données montrent que si la reconnaissance du récepteur cellulaire est indispensable à l'infection virale, d'autres facteurs intracellulaires sont, sans aucun doute, nécessaires à l'accomplissement d'un cycle viral complet. Parmi ces mécanismes, l'inhibition précoce de la multiplication virale par la réponse IFN pourrait être déterminant dans la sensibilité à l'infection. En particulier, la nature des effecteurs engagés dans la réponse IFN, selon l'espèce animale, pourrait conditionner le contrôle ou non de l'infection. A l'échelle cellulaire, le contrôle précoce des infections virales est largement dépendant de la production des IFN. Le SARS-CoV-2 a développé des stratégies lui permettant d'échapper à la réponse de l'hôte qui reposent souvent sur des interactions directes entre des protéines virales et des protéines de la voie IFN.²³⁵ Notre objectif a été d'investiguer si ces interactions sont spécifiques de certaines espèces et si elles participent au phénomène d'adaptation et de restriction du tropisme d'hôtes. Notre hypothèse est que les franchissements de barrière d'espèces du SARS-CoV-2 ont été rendus possible grâce à la capacité du virus à déjouer les réponses antivirales intracellulaires des nouvelles espèces hôtes.

Des études ont montré que des mutations sur certaines protéines virales peuvent avoir un effet sur leur capacité à moduler la réponse immunitaire innée. Par exemple, une étude publiée en 2021 par Hayn et son équipe, montre que la protéine Nsp15 du SARS-CoV-2 antagonise la voie IFN avec 32 fois et 7,8 fois moins d'efficacité que la Nsp15 du SARS-CoV-1 ou de RATG13 respectivement.²³⁸ Nsp15 du SARS-CoV-1 possède 16 acides aminés différents du SARS-CoV-2 tandis que RATG13 n'en possède que 2. Une autre étude réalisée par Yuen et son équipe indique que la

protéine Nsp3 du SARS-CoV-1 est capable d'inhiber la voie IFN et la voie de production d'IFN induite par RIG-I tandis que cet effet est perdu avec la protéine Nsp3 du SARS-CoV-2, les deux protéines partageant 83% d'homologie.²⁵ Ces stratégies de contrôle peuvent jouer un rôle dans la pathogénicité et la virulence de ces virus et pourraient être également impliquées dans leur capacité à franchir la barrière d'espèce. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à Nsp13 et son interaction avec la protéine STAT1 ainsi qu'à sa conservation chez des coronavirus proches du SARS-CoV-2. Il serait intéressant d'approfondir cette étude et de déterminer si toutes les interactions qui ont été décrites entre le SARS-CoV-2 et la voie IFN sont conservées chez les Bat-SARS-related. Cela pourrait nous donner des éléments d'explication du passage de ces coronavirus à l'Homme. Nous pourrions émettre l'hypothèse que certains mécanismes d'inhibition ne vont pas être retrouvés chez les coronavirus de chauve-souris proches du SARS-CoV-2 et que des mutations spécifiques retrouvées chez le SARS-CoV-2 ont permis l'acquisition d'une possible interaction avec une ou plusieurs protéines de la voie IFN humaine et donc une inhibition de la réponse immunitaire permettant au virus de se répliquer efficacement chez l'Homme.

Cette hypothèse est aussi valable pour les sauts de barrières d'espèces du SARS-CoV-2 vers d'autres espèces animales. Dans ce cas-là, nous pourrions étudier la conservation des mécanismes de modulation de la voie IFN dans d'autres espèces sensibles (e.g. le chat) et résistantes (e.g. le porc) au virus et voir s'il y a une corrélation entre modulation de la voie IFN d'une espèce par le SARS-CoV-2 et sensibilité de cette espèce au virus. Nous pourrions également nous intéresser aux différences entre les protéines de la voie IFN chez les différentes espèces d'intérêts : chauve-souris, chat, porc et les comparer. Nous avons par exemple, réalisé un alignement des protéines STAT1 humaine, féline et porcine (Figure 45). On peut voir qu'elles sont assez conservées avec une différence qui est plus importante pour la STAT1 porcine avec notamment 7 acides aminés en plus au niveau de l'extrémité C-terminale. Est-ce que ce sont ces différences qui permettent au porc de ne pas être sensible à l'infection ? Nous pourrions étudier les domaines de la protéine STAT1 impliqués dans les interactions avec les protéines virales et comparer sa conservation chez les protéines STAT1 orthologues.

De plus, la voie IFN menant à la synthèse de centaines d'ISG, nous pourrions également nous intéresser aux ISG dont l'expression est induite lors de l'infection par le SARS-CoV-2 chez ces différentes espèces animales. Quels sont les différents ISG dont l'expression est modulée lors de l'infection ? Sont-ils similaires lorsque le chat et l'Homme sont infectés par exemple ? Est-ce que l'infection chez le porc induit l'expression de certains ISG spécifiques non retrouvés chez l'Homme ou le chat ou qui vont avoir une activité antivirale plus efficace, bloquant l'infection chez le porc ? Cartographier la réponse immunitaire innée mise en place dans des lignées cellulaires humaines, félines et porcines après infections par le SARS-CoV-2 pourrait nous donner des éléments de réponses.

Ce type d'étude pourrait aussi être élargi à d'autres coronavirus ayant des spécificités d'hôtes différentes comme par exemple le FIPV qui infecte le chat ou le TGEV qui infecte le porc. Peu d'études ont été réalisées sur les mécanismes d'inhibition de la voie IFN par ces virus mais nous savons par exemple, que la protéine Nsp5 de FIPV est capable d'inhiber la réponse IFN-I en clivant NEMO, un modulateur essentiel de la voie NF-kB empêchant alors la phosphorylation de IRF3 et par conséquent la production d'IFN-I.³³¹ Nous savons également que la protéine Nsp1 de TGEV et de FIPV sont capables d'inhiber la phosphorylation de STAT1.³³² Il serait intéressant de déterminer si ces stratégies de contournement de la réponse antivirale de l'hôte sont dépendantes de l'espèce impliquée et si certaines sont conservées ou diffèrent entre coronavirus.

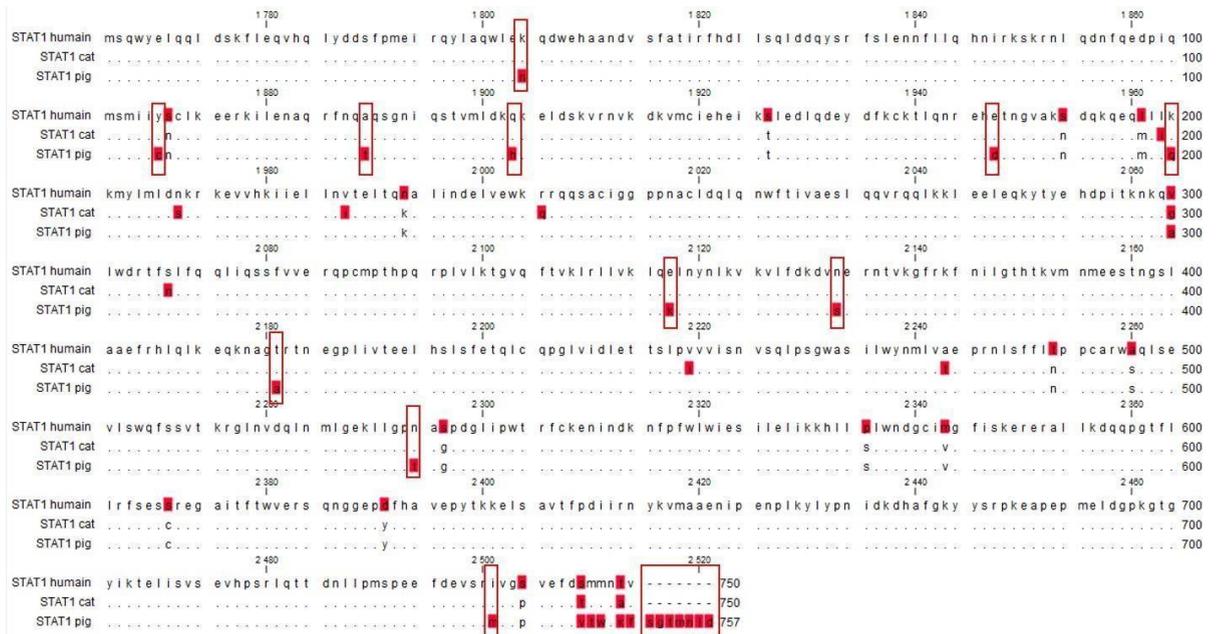


Figure 45 : Alignement des séquences d'acides aminés correspondant aux protéines STAT1 humaines, félines et porcines

CONCLUSION GENERALE

Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés à la réponse IFN lors de l'infection par le SARS-CoV-2. C'est une réponse antivirale mise en place rapidement par la cellule après l'infection mais qui peut aussi être contrecarrée par certaines protéines virales. Notre travail s'est tout d'abord basé sur deux modèles *in vivo*, pour étudier l'importance de la réponse IFN dans la physiopathologie de l'infection SARS-CoV-2. Dans le modèle du hamster syrien, qui peut être naturellement infecté par tous les variants, nous montrons que le niveau de réplication virale dans la cavité nasale, qui est le site primaire de l'infection dans ce modèle, corrèle avec l'intensité de la réponse inflammatoire et la réponse IFN, particulièrement de type III. Le variant Omicron, ayant une cinétique de réplication lente va en conséquence déclencher une réponse immunitaire innée plus modérée et les dégâts tissulaires sont moindres. Cependant, une infection de souris déficientes pour la voie IFN-I par un virus murinisé montre qu'une inhibition de cette réponse cause un retard dans le contrôle de l'infection et des dégâts tissulaires plus importants. L'effet bénéfique antiviral de la voie IFN pourrait donc dépendre de son intensité, de son activation suffisamment précoce et possiblement d'un équilibre entre les IFN-I et -III.

La réponse IFN-I pourrait aussi être déterminante dans la capacité du virus à transgresser la barrière d'espèce. Nous montrons que les protéines Nsp13 de coronavirus de chauve-souris proches du SARS-CoV-2 ; BANAL-103, BANAL-236 et RATG13 sont capables tout comme la protéine Nsp13 du SARS-CoV-2 d'inhiber l'induction de la voie IFN humaine. Ainsi, certains virus proches du SARS-CoV-2 circulant dans un réservoir animal pourraient assez facilement s'adapter à une réplication dans des cellules humaines, même si d'autres facteurs (notamment reconnaissance du récepteur cellulaire) sont aussi en prendre en compte afin d'évaluer le potentiel zoonotique de virus animaux.

Nous souhaitons maintenant étudier l'importance de l'IFN-III dans la physiopathologie de la maladie. Nous voulons également poursuivre nos études sur la conservation des fonctions de modulation de la voie IFN chez d'autres coronavirus afin d'analyser les

mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le franchissement de barrière d'espèce.

Le SARS-CoV-2 a été responsable de la plus grande pandémie du XXI^{ème} siècle. Sa capacité à muter pour donner lieu à l'émergence de nombreux variants et sa capacité à infecter plusieurs espèces animales en font un virus particulièrement intéressant et nécessaire à étudier. La compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la maladie induite par les différents variants et la transgression de la barrière d'espèce est importante pour mieux évaluer le potentiel de propagation du virus dans d'autres espèces animales, pour la surveillance d'autres coronavirus animaux dont le potentiel zoonotique pourrait émerger mais aussi pour améliorer la compréhension de la maladie et adapter au mieux les traitements antiviraux.

BIBLIOGRAPHIE

1. Steiner, S. *et al.* SARS-CoV-2 biology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **22**, 206–225 (2024).
2. Karousis, E. D. The art of hijacking: how Nsp1 impacts host gene expression during coronaviral infections. *Biochem. Soc. Trans.* **52**, 481–490 (2024).
3. Yuan, S., Balaji, S., Lomakin, I. B. & Xiong, Y. Coronavirus Nsp1: Immune Response Suppression and Protein Expression Inhibition. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
4. Cornillez-Ty, C. T., Liao, L., Yates, J. R., Kuhn, P. & Buchmeier, M. J. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Protein 2 Interacts with a Host Protein Complex Involved in Mitochondrial Biogenesis and Intracellular Signaling. *J. Virol.* **83**, 10314–10318 (2009).
5. Yamkela, M., Sitobo, Z. & Makhoba, X. H. In Silico Analysis of SARS-CoV-2 Non-Structural Proteins Reveals an Interaction with the Host's Heat Shock Proteins That May Contribute to Viral Replications and Development. *Curr. Issues Mol. Biol.* **45**, 10225–10247 (2023).
6. Oudshoorn, D. *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* **8**, 10.1128/mbio.01658-17 (2017).
7. Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W. & Buchmeier, M. J. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles. *mBio* **4**, 10.1128/mbio.00524-13 (2013).
8. Ricciardi, S. *et al.* The role of NSP6 in the biogenesis of the SARS-CoV-2 replication organelle. *Nature* **606**, 761–768 (2022).
9. Kuzikov, M. *et al.* Drug repurposing screen to identify inhibitors of the RNA polymerase (nsp12) and helicase (nsp13) from SARS-CoV-2 replication and transcription complex. *Virus Res.* **343**, 199356 (2024).

10. Yan, L. *et al.* Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex. *Nat. Commun.* **11**, 5874 (2020).
11. Shannon, A. *et al.* Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis. *Nat. Commun.* **11**, 4682 (2020).
12. Lin, S. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 nsp10 bound to nsp14-ExoN domain reveals an exoribonuclease with both structural and functional integrity. *Nucleic Acids Res.* **49**, 5382–5392 (2021).
13. Yan, L. *et al.* Coupling of N7-methyltransferase and 3'-5' exoribonuclease with SARS-CoV-2 polymerase reveals mechanisms for capping and proofreading. *Cell* **184**, 3474-3485.e11 (2021).
14. Chen, Y. *et al.* Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3484–3489 (2009).
15. Frazier, M. N. *et al.* Flipped over U: structural basis for dsRNA cleavage by the SARS-CoV-2 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* **50**, 8290–8301 (2022).
16. Deng, X. *et al.* Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E4251–E4260 (2017).
17. Deng, J. *et al.* Structural and functional insights into the 2'-O-methyltransferase of SARS-CoV-2. *Viol. Sin.* (2024) doi:10.1016/j.virs.2024.07.001.
18. Fang, S. G., Shen, H., Wang, J., Tay, F. P. L. & Liu, D. X. Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of Coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. *Virology* **379**, 175–180 (2008).
19. Deming, D. J., Graham, R. L., Denison, M. R. & Baric, R. S. Processing of open reading frame 1a replicase proteins nsp7 to nsp10 in murine hepatitis virus strain A59 replication. *J. Virol.* **81**, 10280–10291 (2007).

20. Mickolajczyk, K. J. *et al.* Force-dependent stimulation of RNA unwinding by SARS-CoV-2 nsp13 helicase. *Biophys. J.* **120**, 1020–1030 (2021).
21. Hao, W. *et al.* Crystal structure of Middle East respiratory syndrome coronavirus helicase. *PLoS Pathog.* **13**, e1006474 (2017).
22. Spratt, A. N. *et al.* Coronavirus helicases: attractive and unique targets of antiviral drug-development and therapeutic patents. *Expert Opin. Ther. Pat.* 1–12
doi:10.1080/13543776.2021.1884224.
23. Fung, S.-Y. *et al.* SARS-CoV-2 NSP13 helicase suppresses interferon signaling by perturbing JAK1 phosphorylation of STAT1. *Cell Biosci.* **12**, 36 (2022).
24. Vazquez, C. *et al.* SARS-CoV-2 viral proteins NSP1 and NSP13 inhibit interferon activation through distinct mechanisms. *PLoS ONE* **16**, e0253089 (2021).
25. Yuen, C.-K. *et al.* SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 1418–1428.
26. El-Kamand, S. *et al.* A distinct ssDNA/RNA binding interface in the Nsp9 protein from SARS-CoV-2. *Proteins* **90**, 176–185 (2022).
27. Roe, M. K., Junod, N. A., Young, A. R., Beachboard, D. C. & Stobart, C. C. Targeting novel structural and functional features of coronavirus protease nsp5 (3CLpro, Mpro) in the age of COVID-19. *J. Gen. Virol.* **102**, 001558 (2021).
28. Huang, H.-X. *et al.* Swine acute diarrhoea syndrome coronavirus (SADS-CoV) Nsp5 antagonizes type I interferon signaling by cleaving DCP1A. *Front. Immunol.* **14**, 1196031 (2023).
29. Wu, Y. *et al.* Broad antagonism of coronaviruses nsp5 to evade the host antiviral responses by cleaving POLDIP3. *PLoS Pathog.* **19**, e1011702 (2023).
30. Cottam, E. M., Whelband, M. C. & Wileman, T. Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy* **10**, 1426–1441 (2014).

31. Peng, Q. *et al.* Structural and Biochemical Characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 Core Polymerase Complex from SARS-CoV-2. *Cell Rep.* **31**, 107774 (2020).
32. Imbert, I. *et al.* A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO J.* **25**, 4933–4942 (2006).
33. Banerjee, A. K. *et al.* SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell* **183**, 1325-1339.e21 (2020).
34. Gao, Y. *et al.* Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science* **368**, 779–782 (2020).
35. Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu. Rev. Virol.* **3**, 237–261 (2016).
36. Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y. & Chen, B. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr. Opin. Virol.* **50**, 173–182 (2021).
37. Yao, Z., Zhang, L., Duan, Y., Tang, X. & Lu, J. Molecular insights into the adaptive evolution of SARS-CoV-2 spike protein. *J. Infect.* **88**, 106121 (2024).
38. Schoeman, D. & Fielding, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Viol. J.* **16**, 69 (2019).
39. Wu, Q. *et al.* The E protein is a multifunctional membrane protein of SARS-CoV. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **1**, 131–144 (2003).
40. Duart, G. *et al.* SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes. *Open Biol.* **10**, 200209 (2020).
41. Nieto-Torres, J. L. *et al.* Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* **415**, 69–82 (2011).

42. Boson, B. *et al.* The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. *J. Biol. Chem.* **296**, 100111 (2021).
43. Verdiá-Báguena, C., Aguilera, V. M., Queralt-Martín, M. & Alcaraz, A. Transport mechanisms of SARS-CoV-E viroporin in calcium solutions: Lipid-dependent Anomalous Mole Fraction Effect and regulation of pore conductance. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1863**, 183590 (2021).
44. Zhou, S. *et al.* SARS-CoV-2 E protein: Pathogenesis and potential therapeutic development. *Biomed. Pharmacother.* **159**, 114242 (2023).
45. Siu, Y. L. *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.* **82**, 11318–11330 (2008).
46. Zhang, Z. *et al.* Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat. Commun.* **13**, 4399 (2022).
47. 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* **13**, 1115 (2021).
48. Cui, L. *et al.* The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells. *J. Virol.* **89**, 9029–9043 (2015).
49. Novoa, R. R. *et al.* Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell* **97**, 147–172 (2005).
50. Matsuo, T. Viewing SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein in Terms of Molecular Flexibility. *Biology* **10**, 454 (2021).
51. Lang, Y. *et al.* Coronavirus hemagglutinin-esterase and spike proteins coevolve for functional balance and optimal virion avidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 25759–25770 (2020).

52. Lissenberg, A. *et al.* Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. *J. Virol.* **79**, 15054–15063 (2005).
53. Desforges, M., Desjardins, J., Zhang, C. & Talbot, P. J. The acetyl-esterase activity of the hemagglutinin-esterase protein of human coronavirus OC43 strongly enhances the production of infectious virus. *J. Virol.* **87**, 3097–3107 (2013).
54. Vlasak, R., Luytjes, W., Leider, J., Spaan, W. & Palese, P. The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetyl-esterase activity. *J. Virol.* **62**, 4686–4690 (1988).
55. Fang, P., Fang, L., Zhang, H., Xia, S. & Xiao, S. Functions of Coronavirus Accessory Proteins: Overview of the State of the Art. *Viruses* **13**, 1139 (2021).
56. Zandi, M. *et al.* The role of SARS-CoV-2 accessory proteins in immune evasion. *Biomed. Pharmacother.* **156**, 113889 (2022).
57. Rashid, F., Dzakah, E. E., Wang, H. & Tang, S. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 induced endoplasmic reticulum stress and mediated immune evasion by antagonizing production of interferon beta. *Virus Res.* **296**, 198350 (2021).
58. Ren, Y. *et al.* The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 881–883 (2020).
59. Si, F. *et al.* Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) ORF3 Enhances Viral Proliferation by Inhibiting Apoptosis of Infected Cells. *Viruses* **12**, 214 (2020).
60. Dveksler, G. S. *et al.* Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* **65**, 6881–6891 (1991).
61. Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N. & Whittaker, G. R. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses* **4**, 1011–1033 (2012).

62. Schwegmann-Wessels, C. & Herrler, G. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconj. J.* **23**, 51–58 (2006).
63. Li, W. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450–454 (2003).
64. Shang, J. *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* **581**, 221–224 (2020).
65. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B. & Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 3–20 (2022).
66. Tegally, H. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* **592**, 438–443 (2021).
67. Lee, I. T. *et al.* ACE2 localizes to the respiratory cilia and is not increased by ACE inhibitors or ARBs. *Nat. Commun.* **11**, 5453 (2020).
68. Hou, Y. J. *et al.* SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell* **182**, 429–446.e14 (2020).
69. Ahn, J. H. *et al.* Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. *J. Clin. Invest.* **131**, e148517, 148517 (2021).
70. Wang, Y. *et al.* A comprehensive investigation of the mRNA and protein level of ACE2, the putative receptor of SARS-CoV-2, in human tissues and blood cells. *Int. J. Med. Sci.* **17**, 1522–1531 (2020).
71. Amraei, R. *et al.* CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN Act as Receptors for SARS-CoV-2. *ACS Cent. Sci.* **7**, 1156–1165 (2021).
72. Jeffers, S. A. *et al.* CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15748–15753 (2004).

73. Wang, S. *et al.* AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Res.* **31**, 126–140 (2021).
74. Mori, Y. *et al.* KIM-1/TIM-1 is a Receptor for SARS-CoV-2 in Lung and Kidney. *MedRxiv Prepr. Serv. Health Sci.* 2020.09.16.20190694 (2022) doi:10.1101/2020.09.16.20190694.
75. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 155–170 (2021).
76. Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S. & Enjuanes, L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu. Rev. Virol.* **2**, 265–288 (2015).
77. Lu, S. *et al.* The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nat. Commun.* **12**, 502 (2021).
78. Ghosh, S. *et al.* β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell* **183**, 1520-1535.e14 (2020).
79. Ennaji, Y., Khataby, K. & Ennaji, M. M. Infectious Bronchitis Virus in Poultry: Molecular Epidemiology and Factors Leading to the Emergence and Reemergence of Novel Strains of Infectious Bronchitis Virus. *Emerg. Reemerging Viral Pathog.* 31–44 (2020) doi:10.1016/B978-0-12-814966-9.00003-2.
80. Falchieri, M., Coward, V. J., Reid, S. M., Lewis, T. & Banyard, A. C. Infectious bronchitis virus: an overview of the “chicken coronavirus”. *J. Med. Microbiol.* **73**, 001828 (2024).
81. Turlewicz-Podbielska, H. & Pomorska-Mól, M. Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art. *Virol. Sin.* **36**, 833–851 (2021).
82. Akimkin, V. *et al.* New Chimeric Porcine Coronavirus in Swine Feces, Germany, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1314–1315 (2016).

83. de Nova, P. J. G. *et al.* A retrospective study of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) reveals the presence of swine enteric coronavirus (SeCoV) since 1993 and the recent introduction of a recombinant PEDV-SeCoV in Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* **67**, 2911–2922 (2020).
84. Boniotti, M. B. *et al.* Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 83–87 (2016).
85. Mandelik, R. *et al.* First outbreak with chimeric swine enteric coronavirus (SeCoV) on pig farms in Slovakia - lessons to learn. *Acta Vet. Hung.* **66**, 488–492 (2018).
86. Chen, Y. *et al.* Transmissible Gastroenteritis Virus: An Update Review and Perspective. *Viruses* **15**, 359 (2023).
87. Kemeny, L. J. & Woods, R. D. Quantitative transmissible gastroenteritis virus shedding patterns in lactating sows. *Am. J. Vet. Res.* **38**, 307–310 (1977).
88. Zhang, F. *et al.* Prevalence and phylogenetic analysis of porcine diarrhea associated viruses in southern China from 2012 to 2018. *BMC Vet. Res.* **15**, 470 (2019).
89. Magtoto, R. *et al.* Evaluation of the Serologic Cross-Reactivity between Transmissible Gastroenteritis Coronavirus and Porcine Respiratory Coronavirus Using Commercial Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits. *mSphere* **4**, e00017-19 (2019).
90. Peng, J.-Y. *et al.* The Cell Tropism of Porcine Respiratory Coronavirus for Airway Epithelial Cells Is Determined by the Expression of Porcine Aminopeptidase N. *Viruses* **12**, 1211 (2020).
91. Song, D. & Park, B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* **44**, 167–175 (2012).
92. Hanke, D. *et al.* Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 493–496 (2015).
93. Dastjerdi, A., Carr, J., Ellis, R. J., Steinbach, F. & Williamson, S. Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2235–2237 (2015).

94. Grasland, B. *et al.* Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014. *Genome Announc.* **3**, e00535-15 (2015).
95. Theuns, S. *et al.* Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in belgium, january 2015. *Genome Announc.* **3**, e00506-15 (2015).
96. Steinrigl, A. *et al.* First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria. *BMC Vet. Res.* **11**, 310 (2015).
97. Marthaler, D. *et al.* Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1347–1350 (2014).
98. Wang, L., Byrum, B. & Zhang, Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1227–1230 (2014).
99. Boley, P. A. *et al.* Porcine Deltacoronavirus Infection and Transmission in Poultry, United States¹. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 255–265 (2020).
100. Kong, F. *et al.* Porcine Deltacoronaviruses: Origin, Evolution, Cross-Species Transmission and Zoonotic Potential. *Pathogens* **11**, 79 (2022).
101. Jung, K., Hu, H. & Saif, L. J. Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhea virus. *Arch. Virol.* **162**, 2357–2362 (2017).
102. Lednicky, J. A. *et al.* Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children. *Nature* **600**, 133–137 (2021).
103. Gong, L. *et al.* A New Bat-HKU2-like Coronavirus in Swine, China, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1607–1609 (2017).
104. Pan, Y. *et al.* Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. *Vet. Microbiol.* **211**, 15–21 (2017).

105. Zhou, L. *et al.* Retrospective detection and phylogenetic analysis of swine acute diarrhoea syndrome coronavirus in pigs in southern China. *Transbound. Emerg. Dis.* **66**, 687–695 (2019).
106. Benetka, V. *et al.* Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.* **99**, 31–42 (2004).
107. Kummrow, M. *et al.* Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 1209–1215 (2005).
108. Gao, Y.-Y. *et al.* An updated review of feline coronavirus: mind the two biotypes. *Virus Res.* **326**, 199059 (2023).
109. Feline Coronavirus Type II Strains 79-1683 and 79-1146 Originate from a Double Recombination between Feline Coronavirus Type I and Canine Coronavirus.
<https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jvi.72.5.4508-4514.1998?src=getfr>
doi:10.1128/jvi.72.5.4508-4514.1998.
110. Delmas, B., Gelfi, J., Sjöström, H., Noren, O. & Laude, H. Further characterization of aminopeptidase-N as a receptor for coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**, 293–298 (1993).
111. Hohdatsu, T., Izumiya, Y., Yokoyama, Y., Kida, K. & Koyama, H. Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Arch. Virol.* **143**, 839–850 (1998).
112. Pedersen, N. C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *J. Feline Med. Surg.* **11**, 225–258 (2009).
113. Tang, G., Liu, Z. & Chen, D. Human coronaviruses: Origin, host and receptor. *J. Clin. Virol.* **155**, 105246 (2022).
114. van der Hoek, L. *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 368–373 (2004).
115. Kesheh, M. M., Hosseini, P., Soltani, S. & Zandi, M. An overview on the seven pathogenic human coronaviruses. *Rev. Med. Virol.* **32**, e2282 (2022).

116. Zhao, Z. *et al.* Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J. Med. Microbiol.* **52**, 715–720 (2003).
117. Hui, D. S. C. & Zumla, A. Severe Acute Respiratory Syndrome. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **33**, 869–889 (2019).
118. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814–1820 (2012).
119. de Groot, R. J. *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* **87**, 7790–7792 (2013).
120. Chafekar, A. & Fielding, B. C. MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses* **10**, 93 (2018).
121. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
122. Worobey, M. Dissecting the early COVID-19 cases in Wuhan. *Science* **374**, 1202–1204 (2021).
123. Siddiqui, S., Alhamdi, H. W. S. & Alghamdi, H. A. Recent Chronology of COVID-19 Pandemic. *Front. Public Health* **10**, 778037 (2022).
124. Telenti, A., Hodcroft, E. B. & Robertson, D. L. The Evolution and Biology of SARS-CoV-2 Variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **12**, a041390 (2022).
125. covid-19-data/public/data at master · ovid/covid-19-data. *GitHub*
<https://github.com/ovid/covid-19-data/tree/master/public/data>.
126. Korber, B. *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* **182**, 812–827.e19 (2020).
127. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations - SARS-CoV-2 coronavirus / nCoV-2019 Genomic Epidemiology.

- Virological* <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> (2020).
128. Hill, V. *et al.* The origins and molecular evolution of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in the UK. *Virus Evol.* **8**, veac080 (2022).
129. Phylogenetic relationship of SARS-CoV-2 sequences from Amazonas with emerging Brazilian variants harboring mutations E484K and N501Y in the Spike protein - SARS-CoV-2 coronavirus / nCoV-2019 Genomic Epidemiology. *Virological* <https://virological.org/t/phylogenetic-relationship-of-sars-cov-2-sequences-from-amazonas-with-emerging-brazilian-variants-harboring-mutations-e484k-and-n501y-in-the-spike-protein/585> (2021).
130. Carabelli, A. M. *et al.* SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat. Rev. Microbiol.* (2023) doi:10.1038/s41579-022-00841-7.
131. Viana, R. *et al.* Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature* **603**, 679–686 (2022).
132. Gili, R. & Burioni, R. SARS-CoV-2 before and after Omicron: two different viruses and two different diseases? *J. Transl. Med.* **21**, 251 (2023).
133. Dhama, K. *et al.* Global emerging Omicron variant of SARS-CoV-2: Impacts, challenges and strategies. *J. Infect. Public Health* **16**, 4–14 (2023).
134. Farrag, M. A. *et al.* SARS-CoV-2: An Overview of Virus Genetics, Transmission, and Immunopathogenesis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, 6312 (2021).
135. Wang, W. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* **323**, 1843–1844 (2020).
136. Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J. & Prescott, H. C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA* **324**, 782–793 (2020).

137. Mehta, O. P., Bhandari, P., Raut, A., Kacimi, S. E. O. & Huy, N. T. Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive Review of Clinical Presentation. *Front. Public Health* **8**, 582932 (2021).
138. Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 363–374 (2020).
139. Tong, J. Y., Wong, A., Zhu, D., Fastenberg, J. H. & Tham, T. The Prevalence of Olfactory and Gustatory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngol. Neck Surg.* **163**, 3–11 (2020).
140. Wellford, S. A. & Moseman, E. A. Olfactory immune response to SARS-CoV-2. *Cell. Mol. Immunol.* **21**, 134–143 (2024).
141. Khan, M. *et al.* Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell* **184**, 5932-5949.e15 (2021).
142. Seehusen, F. *et al.* Neuroinvasion and Neurotropism by SARS-CoV-2 Variants in the K18-hACE2 Mouse. *Viruses* **14**, (2022).
143. Chen, M. *et al.* Evolution of nasal and olfactory infection characteristics of SARS-CoV-2 variants. *bioRxiv* 2022.04.12.487379 (2022) doi:10.1101/2022.04.12.487379.
144. Bauer, L. *et al.* In vitro and in vivo differences in neurovirulence between D614G, Delta And Omicron BA.1 SARS-CoV-2 variants. *Acta Neuropathol. Commun.* **10**, 124 (2022).
145. Lamers, M. M. & Haagmans, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 270–284 (2022).
146. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Lond. Engl.* **395**, 507–513 (2020).
147. Del Valle, D. M. *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat. Med.* **26**, 1636–1643 (2020).

148. Cardinal-Fernández, P., Lorente, J. A., Ballén-Barragán, A. & Matute-Bello, G. Acute Respiratory Distress Syndrome and Diffuse Alveolar Damage. New Insights on a Complex Relationship. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **14**, 844–850 (2017).
149. Bonaventura, A. *et al.* Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 319–329 (2021).
150. Liew, P. X. & Kubes, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol. Rev.* **99**, 1223–1248 (2019).
151. Skendros, P. *et al.* Complement and tissue factor–enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J. Clin. Invest.* **130**, 6151–6157.
152. Georg, P. *et al.* Complement activation induces excessive T cell cytotoxicity in severe COVID-19. *Cell* **185**, 493-512.e25 (2022).
153. Zhang, Z. *et al.* Transcription factor Etv5 is essential for the maintenance of alveolar type II cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 3903–3908 (2017).
154. Little, D. R. *et al.* Transcriptional control of lung alveolar type 1 cell development and maintenance by NK homeobox 2-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 20545–20555 (2019).
155. Ge, X.-Y. *et al.* Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* **503**, 535–538 (2013).
156. Temmam, S. *et al.* Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature* **604**, 330–336 (2022).
157. Qiu, X., Liu, Y. & Sha, A. SARS-CoV-2 and natural infection in animals. *J. Med. Virol.* **95**, e28147 (2023).
158. Oreshkova, N. *et al.* SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **25**, 2001005 (2020).

159. Larsen, H. D. *et al.* Preliminary report of an outbreak of SARS-CoV-2 in mink and mink farmers associated with community spread, Denmark, June to November 2020. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **26**, 2100009 (2021).
160. Wasniewski, M. *et al.* Investigations into SARS-CoV-2 and other coronaviruses on mink farms in France late in the first year of the COVID-19 pandemic. *PloS One* **18**, e0290444 (2023).
161. Pomorska-Mól, M., Włodarek, J., Gogulski, M. & Rybska, M. Review: SARS-CoV-2 infection in farmed minks – an overview of current knowledge on occurrence, disease and epidemiology. *Animal* **15**, 100272 (2021).
162. Garigliany, M. *et al.* SARS-CoV-2 Natural Transmission from Human to Cat, Belgium, March 2020. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 3069–3071 (2020).
163. Giraldo-Ramirez, S., Rendon-Marin, S., Jaimes, J. A., Martinez-Gutierrez, M. & Ruiz-Saenz, J. SARS-CoV-2 Clinical Outcome in Domestic and Wild Cats: A Systematic Review. *Animals* **11**, 2056 (2021).
164. van Aart, A. E. *et al.* SARS-CoV-2 infection in cats and dogs in infected mink farms. *Transbound. Emerg. Dis.* **69**, 3001–3007 (2022).
165. Mallapaty, S. First reported case of a person getting COVID from a cat. *Nature* (2022) doi:10.1038/d41586-022-01792-y.
166. Hale, V. L. *et al.* SARS-CoV-2 infection in free-ranging white-tailed deer. *Nature* **602**, 481–486 (2022).
167. Marques, A. D. *et al.* Multiple Introductions of SARS-CoV-2 Alpha and Delta Variants into White-Tailed Deer in Pennsylvania. *mBio* **13**, e0210122 (2022).
168. Feng, A. *et al.* Transmission of SARS-CoV-2 in free-ranging white-tailed deer in the United States. *Nat. Commun.* **14**, 4078 (2023).

169. Pickering, B. *et al.* Divergent SARS-CoV-2 variant emerges in white-tailed deer with deer-to-human transmission. *Nat. Microbiol.* **7**, 2011–2024 (2022).
170. Yen, H.-L. *et al.* Transmission of SARS-CoV-2 delta variant (AY.127) from pet hamsters to humans, leading to onward human-to-human transmission: a case study. *Lancet Lond. Engl.* **399**, 1070–1078 (2022).
171. Iwatsuki-Horimoto, K. *et al.* Syrian Hamster as an Animal Model for the Study of Human Influenza Virus Infection. *J. Virol.* **92**, e01693-17 (2018).
172. Thomas, M. A. *et al.* Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors. *Cancer Res.* **66**, 1270–1276 (2006).
173. Muñoz-Fontela, C. *et al.* Animal models for COVID-19. *Nature* **586**, 509–515 (2020).
174. Merle-Nguyen, L. *et al.* Early corticosteroid treatment enhances recovery from SARS-CoV-2 induced loss of smell in hamster. *Brain. Behav. Immun.* **118**, 78–89 (2024).
175. Osterrieder, N. *et al.* Age-Dependent Progression of SARS-CoV-2 Infection in Syrian Hamsters. *Viruses* **12**, 779 (2020).
176. Bryche, B. *et al.* Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain. Behav. Immun.* **89**, 579–586 (2020).
177. Sia, S. F. *et al.* Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* **583**, 834–838 (2020).
178. Port, J. R. *et al.* SARS-CoV-2 disease severity and transmission efficiency is increased for airborne compared to fomite exposure in Syrian hamsters. *Nat. Commun.* **12**, 4985 (2021).
179. McCray, P. B. *et al.* Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **81**, 813–821 (2007).

180. Tseng, C.-T. K. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. *J. Virol.* **81**, 1162–1173 (2007).
181. Bao, L. *et al.* The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature* **583**, 830–833 (2020).
182. Cockrell, A. S. *et al.* A mouse model for MERS coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome. *Nat. Microbiol.* **2**, 16226 (2016).
183. Sun, S.-H. *et al.* A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host Microbe* **28**, 124-133.e4 (2020).
184. Wong, L.-Y. R. *et al.* Eicosanoid signalling blockade protects middle-aged mice from severe COVID-19. *Nature* **605**, 146–151 (2022).
185. Dinno, K. H. *et al.* A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature* **586**, 560–566 (2020).
186. Leist, S. R. *et al.* A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. *Cell* **183**, 1070-1085.e12 (2020).
187. Roberts, A. *et al.* A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathog.* **3**, e5 (2007).
188. Kim, Y.-I. *et al.* Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host Microbe* **27**, 704-709.e2 (2020).
189. Richard, M. *et al.* SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat. Commun.* **11**, 3496 (2020).
190. Chen, Z. *et al.* SARS-CoV-2 immunity in animal models. *Cell. Mol. Immunol.* **21**, 119–133 (2024).

191. Yu, P. *et al.* Age-related rhesus macaque models of COVID-19. *Anim. Models Exp. Med.* **3**, 93–97 (2020).
192. Chu, H., Chan, J. F.-W. & Yuen, K.-Y. Animal models in SARS-CoV-2 research. *Nat. Methods* **19**, 392–394 (2022).
193. Harnessing the power of IFN for therapeutic approaches to COVID-19.
<https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jvi.01204-23> doi:10.1128/jvi.01204-23.
194. Jacobs, S. *et al.* Species Specificity of Type III Interferon Activity and Development of a Sensitive Luciferase-Based Bioassay for Quantitation of Mouse Interferon- λ . *J. Interferon Cytokine Res.* **38**, 469–479 (2018).
195. Qudus, M. S. *et al.* The roles of critical pro-inflammatory cytokines in the drive of cytokine storm during SARS-CoV-2 infection. *J. Med. Virol.* **95**, e28751 (2023).
196. Ngo, C., Garrec, C., Tomasello, E. & Dalod, M. The role of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in immunity during viral infections and beyond. *Cell. Mol. Immunol.* 1–28 (2024)
doi:10.1038/s41423-024-01167-5.
197. Lee, A. J. & Ashkar, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
198. Mihaescu, G. *et al.* Role of interferons in the antiviral battle: from virus-host crosstalk to prophylactic and therapeutic potential in SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.* **14**, 1273604 (2023).
199. Stanifer, M. L., Pervolaraki, K. & Boulant, S. Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1445 (2019).
200. Fuchs, S. *et al.* Tyrosine kinase 2 is not limiting human antiviral type III interferon responses. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2639–2649 (2016).

201. Kim, M.-H. *et al.* Type I, II, and III Interferon Signatures Correspond to Coronavirus Disease 2019 Severity. *J. Infect. Dis.* **224**, 777–782 (2021).
202. Galani, I. E. *et al.* Interferon- λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. *Immunity* **46**, 875-890.e6 (2017).
203. Ziegler, C. G. K. *et al.* Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. *Cell* **184**, 4713-4733.e22 (2021).
204. Kwon, J.-S. *et al.* Factors of Severity in Patients with COVID-19: Cytokine/Chemokine Concentrations, Viral Load, and Antibody Responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **103**, 2412–2418 (2020).
205. Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition | Science. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abc3545>.
206. Sposito, B. *et al.* The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19. *Cell* **184**, 4953-4968.e16 (2021).
207. Bastard, P. *et al.* Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, eabd4585 (2020).
208. Su, H. C., Jing, H., Zhang, Y. & Casanova, J.-L. Interfering with Interferons: A Critical Mechanism for Critical COVID-19 Pneumonia. *Annu. Rev. Immunol.* **41**, 561–585 (2023).
209. Boudewijns, R. *et al.* STAT2 signaling restricts viral dissemination but drives severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. *Nat. Commun.* **11**, 5838 (2020).
210. Samuel, C. E. Interferon at the crossroads of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease. *J. Biol. Chem.* **299**, 104960 (2023).
211. Jhuti, D. *et al.* Interferon Treatments for SARS-CoV-2: Challenges and Opportunities. *Infect. Dis. Ther.* **11**, 953–972 (2022).

212. Guo, K. *et al.* Interferon resistance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, e2203760119 (2022).
213. Anaeigoudari, A., Mollaei, H. R., Arababadi, M. K. & Nosratabadi, R. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: The Role of the Main Components of the Innate Immune System. *Inflammation* **44**, 2151–2169 (2021).
214. WHO Solidarity Trial Consortium *et al.* Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 - Interim WHO Solidarity Trial Results. *N. Engl. J. Med.* **384**, 497–511 (2021).
215. Hung, I. F.-N. *et al.* Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* **395**, 1695–1704 (2020).
216. Monk, P. D. *et al.* Nebulised interferon- β 1a (SNG001) in hospitalised COVID-19: SPRINTER phase III study. *ERJ Open Res.* **9**, 00605–02022 (2023).
217. Monk, P. D. *et al.* Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir. Med.* **9**, 196–206 (2021).
218. Jagannathan, P. *et al.* Safety and efficacy of inhaled interferon- β 1a (SNG001) in adults with mild-to-moderate COVID-19: a randomized, controlled, phase II trial. *EClinicalMedicine* **65**, 102250 (2023).
219. Feld, J. J. *et al.* Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Respir. Med.* **9**, 498–510 (2021).
220. Jagannathan, P. *et al.* Peginterferon Lambda-1a for treatment of outpatients with uncomplicated COVID-19: a randomized placebo-controlled trial. *Nat. Commun.* **12**, 1967 (2021).
221. Bessièrè, P. *et al.* Intranasal type I interferon treatment is beneficial only when administered before clinical signs onset in the SARS-CoV-2 hamster model. *PLoS Pathog.* **17**, e1009427 (2021).

222. Zheng, M. *et al.* TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **22**, 829–838 (2021).
223. Isazadeh, A. *et al.* Pattern-recognition receptors (PRRs) in SARS-CoV-2. *Life Sci.* **329**, 121940 (2023).
224. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs - Choudhury - 2020 - Journal of Medical Virology - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.25987>.
225. Zhao, Y. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Res.* **31**, 818–820 (2021).
226. Paludan, S. R. & Mogensen, T. H. Innate immunological pathways in COVID-19 pathogenesis. *Sci. Immunol.* **7**, eabm5505 (2022).
227. Sheahan, T. *et al.* MyD88 is required for protection from lethal infection with a mouse-adapted SARS-CoV. *PLoS Pathog.* **4**, e1000240 (2008).
228. Totura, A. L. *et al.* Toll-Like Receptor 3 Signaling via TRIF Contributes to a Protective Innate Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *mBio* **6**, e00638-15 (2015).
229. Loske, J. *et al.* Pre-activated antiviral innate immunity in the upper airways controls early SARS-CoV-2 infection in children. *Nat. Biotechnol.* **40**, 319–324 (2022).
230. Thorne, L. G. *et al.* SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. *EMBO J.* **40**, e107826 (2021).
231. Yin, X. *et al.* MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep.* **34**, 108628 (2021).
232. Deng, J. *et al.* SARS-CoV-2 NSP7 inhibits type I and III IFN production by targeting the RIG-I/MDA5, TRIF, and STING signaling pathways. *J. Med. Virol.* **95**, e28561 (2023).

233. Thoms, M. *et al.* Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science* **369**, 1249–1255 (2020).
234. Yang, Z. *et al.* Suppression of MDA5-mediated antiviral immune responses by NSP8 of SARS-CoV-2. 2020.08.12.247767 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.08.12.247767> (2020).
235. Oh, S.-J. & Shin, O. S. SARS-CoV-2-mediated evasion strategies for antiviral interferon pathways. *J. Microbiol.* **60**, 290–299 (2022).
236. Han, L. *et al.* SARS-CoV-2 ORF9b antagonizes type I and III interferons by targeting multiple components of the RIG-I/MDA-5–MAVS, TLR3–TRIF, and cGAS–STING signaling pathways. *J. Med. Virol.* **93**, 5376–5389 (2021).
237. Hsu, J. C.-C., Laurent-Rolle, M., Pawlak, J. B., Wilen, C. B. & Cresswell, P. Translational shutdown and evasion of the innate immune response by SARS-CoV-2 NSP14 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, e2101161118 (2021).
238. Hayn, M. *et al.* Systematic functional analysis of SARS-CoV-2 proteins uncovers viral innate immune antagonists and remaining vulnerabilities. *Cell Rep.* **35**, 109126 (2021).
239. Mu, J. *et al.* SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2. *Cell Discov.* **6**, 65 (2020).
240. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020).
241. Zhou, B. *et al.* SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nature* **592**, 122–127 (2021).
242. Callaway, E. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. *Nature* **595**, 17–18 (2021).
243. Willett, B. J. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron is an immune escape variant with an altered cell entry pathway. *Nat. Microbiol.* **7**, 1161–1179 (2022).
244. WHO. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (2021).

245. Twohig, K. A. *et al.* Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) compared with alpha (B.1.1.7) variants of concern: a cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **22**, 35–42 (2022).
246. Lin, L., Liu, Y., Tang, X. & He, D. The Disease Severity and Clinical Outcomes of the SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front. Public Health* **9**, 775224 (2021).
247. Mlcochova, P. *et al.* SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature* **599**, 114–119 (2021).
248. Saxena, S. K. *et al.* Characterization of the novel SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant of concern and its global perspective. *J. Med. Virol.* **94**, 1738–1744 (2022).
249. Sarkar, A. *et al.* The relative prevalence of the Omicron variant within SARS-CoV-2 infected cohorts in different countries: A systematic review. *Hum. Vaccines Immunother.* **19**, 2212568 (2023).
250. Tamura, T. *et al.* Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XBB variant derived from recombination of two Omicron subvariants. *Nat. Commun.* **14**, 2800 (2023).
251. Ledford, H. How severe are Omicron infections? *Nature* **600**, 577–578 (2021).
252. McMahan, K. *et al.* Reduced pathogenicity of the SARS-CoV-2 omicron variant in hamsters. *Med N. Y. N* **3**, 262-268.e4 (2022).
253. Suzuki, R. *et al.* Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature* **603**, 700–705 (2022).
254. Rissmann, M. *et al.* Pulmonary lesions following inoculation with the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 (B.1.1.529) variant in Syrian golden hamsters. *Emerg. Microbes Infect.* **11**, 1778–1786 (2022).
255. Nyberg, T. *et al.* Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) and delta (B.1.617.2) variants in England: a cohort study. *Lancet Lond. Engl.* **399**, 1303–1312 (2022).

256. Halfmann, P. J. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. *Nature* **603**, 687–692 (2022).
257. Muñoz-Fontela, C. *et al.* Animal models for COVID-19. *Nature* **586**, 509–515 (2020).
258. Bryce, B. *et al.* Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain. Behav. Immun.* **89**, 579–586 (2020).
259. Bryce, B. *et al.* Respiratory syncytial virus tropism for olfactory sensory neurons in mice. *J. Neurochem.* e14936 (2019) doi:10.1111/jnc.14936.
260. Bourgon, C. *et al.* Neutrophils play a major role in the destruction of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection in hamsters. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **79**, 616 (2022).
261. Lin, L., Liu, Y., Tang, X. & He, D. The Disease Severity and Clinical Outcomes of the SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front. Public Health* **9**, 775224 (2021).
262. Liu, X. *et al.* The Delta SARS-CoV-2 Variant of Concern Induces Distinct Pathogenic Patterns of Respiratory Disease in K18-hACE2 Transgenic Mice Compared to the Ancestral Strain from Wuhan. *mBio* **13**, e0068322 (2022).
263. Shahbaz, S. *et al.* Analysis of SARS-CoV-2 isolates, namely the Wuhan strain, Delta variant, and Omicron variant, identifies differential immune profiles. *Microbiol. Spectr.* **11**, e0125623 (2023).
264. Saito, A. *et al.* Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature* **602**, 300–306 (2022).
265. Rajah, M. M. *et al.* SARS-CoV-2 Alpha, Beta, and Delta variants display enhanced Spike-mediated syncytia formation. *EMBO J.* **40**, e108944 (2021).
266. Shuai, H. *et al.* Attenuated replication and pathogenicity of SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron. *Nature* **603**, 693–699 (2022).

267. Armando, F. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron variant causes mild pathology in the upper and lower respiratory tract of hamsters. *Nat. Commun.* **13**, 3519 (2022).
268. Halfmann, P. J. *et al.* Long-term, infection-acquired immunity against the SARS-CoV-2 Delta variant in a hamster model. *Cell Rep.* **38**, 110394 (2022).
269. Yuan, S. *et al.* Pathogenicity, transmissibility, and fitness of SARS-CoV-2 Omicron in Syrian hamsters. *Science* **377**, 428–433 (2022).
270. Lozhkov, A. A. *et al.* The Key Roles of Interferon Lambda in Human Molecular Defense against Respiratory Viral Infections. *Pathog. Basel Switz.* **9**, 989 (2020).
271. Ye, L., Schnepf, D. & Staeheli, P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 614–625 (2019).
272. Baker, J. R. *et al.* Early Th2 inflammation in the upper respiratory mucosa as a predictor of severe COVID-19 and modulation by early treatment with inhaled corticosteroids: a mechanistic analysis. *Lancet Respir. Med.* **10**, 545–556 (2022).
273. Banerjee, A. *et al.* Experimental and natural evidence of SARS-CoV-2-infection-induced activation of type I interferon responses. *iScience* **24**, 102477 (2021).
274. Meehan, G. R. *et al.* Phenotyping the virulence of SARS-CoV-2 variants in hamsters by digital pathology and machine learning. *PLoS Pathog.* **19**, e1011589 (2023).
275. Uraki, R. *et al.* Characterization of SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75 clinical isolates. *Nat. Commun.* **14**, 1620 (2023).
276. Tamura, T. *et al.* Comparative pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron subvariants including BA.1, BA.2, and BA.5. *Commun. Biol.* **6**, 772 (2023).
277. Qu, P. *et al.* Immune evasion, infectivity, and fusogenicity of SARS-CoV-2 BA.2.86 and FLip variants. *Cell* S0092-8674(23)01400–9 (2024) doi:10.1016/j.cell.2023.12.026.

278. Thébault, S. *et al.* Biosynthetic proteins targeting the SARS-CoV-2 spike as anti-virals. *PLOS Pathog.* **18**, e1010799 (2022).
279. Marzi, A. *et al.* A hamster model for Marburg virus infection accurately recapitulates Marburg hemorrhagic fever. *Sci. Rep.* **6**, 39214 (2016).
280. Schountz, T. *et al.* Differential Innate Immune Responses Elicited by Nipah Virus and Cedar Virus Correlate with Disparate In Vivo Pathogenesis in Hamsters. *Viruses* **11**, (2019).
281. Zivcec, M., Safronetz, D., Haddock, E., Feldmann, H. & Ebihara, H. Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Immunol. Methods* **368**, 24–35 (2011).
282. Atkins, C. *et al.* Natural History and Pathogenesis of Wild-Type Marburg Virus Infection in STAT2 Knockout Hamsters. *J. Infect. Dis.* **218**, S438–S447 (2018).
283. Toth, K. *et al.* STAT2 Knockout Syrian Hamsters Support Enhanced Replication and Pathogenicity of Human Adenovirus, Revealing an Important Role of Type I Interferon Response in Viral Control. *PLoS Pathog.* **11**, e1005084 (2015).
284. Andreakos, E. Type I and type III interferons: From basic biology and genetics to clinical development for COVID-19 and beyond. *Semin. Immunol.* **72**, 101863 (2024).
285. Muller, U. *et al.* Functional Role of Type I and Type II Interferons in Antiviral Defense. **264**, (1994).
286. Chamanza, R. & Wright, J. A. A Review of the Comparative Anatomy, Histology, Physiology and Pathology of the Nasal Cavity of Rats, Mice, Dogs and Non-human Primates. Relevance to Inhalation Toxicology and Human Health Risk Assessment. *J. Comp. Pathol.* **153**, 287–314 (2015).
287. Chen, Q. *et al.* Comparative characterization of SARS-CoV-2 variants of concern and mouse-adapted strains in mice. *J. Med. Virol.* **94**, 3223–3232 (2022).

288. Chong, Z. *et al.* Nasally delivered interferon- λ protects mice against infection by SARS-CoV-2 variants including Omicron. *Cell Rep.* **39**, 110799 (2022).
289. Ogger, P. P. *et al.* SARS-CoV-2 strains bearing Omicron BA.1 spike replicate in C57BL/6 mice. *Front. Immunol.* **15**, 1383612 (2024).
290. Chauhan, N. R. *et al.* Transgenic mouse models support a protective role of type I IFN response in SARS-CoV-2 infection-related lung immunopathology and neuroinvasion. *Cell Rep.* **42**, 113275 (2023).
291. Sun, K., Gu, L., Ma, L. & Duan, Y. Atlas of ACE2 gene expression reveals novel insights into transmission of SARS-CoV-2. *Heliyon* **7**, e05850 (2020).
292. Hassan, A. O. *et al.* A SARS-CoV-2 Infection Model in Mice Demonstrates Protection by Neutralizing Antibodies. *Cell* **182**, 744-753.e4 (2020).
293. Israelow, B. *et al.* Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J. Exp. Med.* **217**, e20201241 (2020).
294. Ogger, P. P. *et al.* Type I interferon receptor signalling deficiency results in dysregulated innate immune responses to SARS-CoV-2 in mice. *Eur. J. Immunol.* **52**, 1768–1775 (2022).
295. Dinnon, K. H. *et al.* SARS-CoV-2 infection produces chronic pulmonary epithelial and immune cell dysfunction with fibrosis in mice. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabo5070 (2022).
296. Beer, J. *et al.* Impaired immune response drives age-dependent severity of COVID-19. *J. Exp. Med.* **219**, e20220621 (2022).
297. Li, K. *et al.* Adaptation of SARS-CoV-2 to ACE2H353K mice reveals new spike residues that drive mouse infection. *J. Virol.* **98**, e0151023 (2024).
298. Verma, A. K., Zheng, J., Meyerholz, D. K. & Perlman, S. SARS-CoV-2 infection of sustentacular cells disrupts olfactory signaling pathways. *JCI Insight* **7**, e160277.

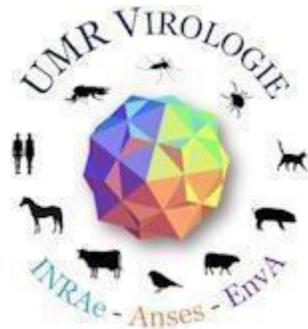
299. Verma, A. K. *et al.* Persistent Neurological Deficits in Mouse PASC Reveal Antiviral Drug Limitations. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2024.06.02.596989 (2024) doi:10.1101/2024.06.02.596989.
300. Ellsworth, C. R. *et al.* Natural Killer Cells Do Not Attenuate a Mouse-Adapted SARS-CoV-2-Induced Disease in Rag2^{-/-} Mice. *Viruses* **16**, 611 (2024).
301. Manet, C. *et al.* Genetic Diversity of Collaborative Cross Mice Controls Viral Replication, Clinical Severity, and Brain Pathology Induced by Zika Virus Infection, Independently of Oas1b. *J. Virol.* **94**, e01034-19 (2020).
302. Allard, B., Panariti, A. & Martin, J. G. Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection. *Front. Immunol.* **9**, 1777 (2018).
303. Misharin, A. V. *et al.* Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J. Exp. Med.* **214**, 2387–2404 (2017).
304. Donovan, K. M. *et al.* Allograft Inflammatory Factor 1 as an Immunohistochemical Marker for Macrophages in Multiple Tissues and Laboratory Animal Species. *Comp. Med.* **68**, 341–348 (2018).
305. Bourgon, C. *et al.* Neutrophils play a major role in the destruction of the olfactory epithelium during SARS-CoV-2 infection in hamsters. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **79**, 616 (2022).
306. Choi, S. G. *et al.* Maximizing binary interactome mapping with a minimal number of assays. *Nat. Commun.* **10**, 3907 (2019).
307. Xia, H. *et al.* Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep.* **33**, 108234 (2020).
308. Kumar, A. *et al.* SARS-CoV-2 Nonstructural Protein 1 Inhibits the Interferon Response by Causing Depletion of Key Host Signaling Factors. *J. Virol.* **95**, e0026621 (2021).
309. Caignard, G. *et al.* Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology* **383**, 112–120 (2009).
310. Chen, K. *et al.* SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Interacts with RIG-I and Represses RIG-Mediated IFN- β Production. *Viruses* **13**, 47 (2020).

311. Moustaqil, M. *et al.* SARS-CoV-2 proteases PLpro and 3CLpro cleave IRF3 and critical modulators of inflammatory pathways (NLRP12 and TAB1): implications for disease presentation across species. *Emerg. Microbes Infect.* **10**, 178–195 (2021).
312. Lu, Y., Michel, H. A., Wang, P.-H. & Smith, G. L. Manipulation of innate immune signaling pathways by SARS-CoV-2 non-structural proteins. *Front. Microbiol.* **13**, 1027015 (2022).
313. Lei, X. *et al.* Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* **11**, 3810 (2020).
314. Xia, T., Xu, S., Li, X. & Ruan, W. Avian coronavirus infectious bronchitis virus Beaudette strain NSP9 interacts with STAT1 and inhibits its phosphorylation to facilitate viral replication. *Virology* **590**, 109944 (2024).
315. Feng, K. *et al.* Interactome profiling reveals interaction of SARS-CoV-2 NSP13 with host factor STAT1 to suppress interferon signaling. *J. Mol. Cell Biol.* **13**, 760–762 (2021).
316. Shi, P. *et al.* PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation. *Virus Res.* **265**, 57–66 (2019).
317. Halfmann, P. J. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. *Nature* **603**, 687–692 (2022).
318. Chan, J. F.-W. *et al.* Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2428–2446 (2020).
319. Imai, M. *et al.* Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 16587–16595 (2020).
320. Ge, Q. *et al.* SARS-CoV-2 neurotropism-induced anxiety/depression-like behaviors require Microglia activation. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2023.10.02.560570> (2023).

321. Pan, R., Li, P., Meyerholz, D. K. & Perlman, S. Mutations in nonstructural proteins essential for pathogenicity in SARS-CoV-2-infected mice. *J. Virol.* e0058424 (2024) doi:10.1128/jvi.00584-24.
322. Lazear, H. M., Schoggins, J. W. & Diamond, M. S. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity* **50**, 907–923 (2019).
323. Linden, J. *et al.* Interferon- λ Receptor Expression: Novel Reporter Mouse Reveals Within- and Cross-Tissue Heterogeneity. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **40**, 292–300 (2020).
324. Kim, Y.-M. & Shin, E.-C. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Exp. Mol. Med.* **53**, 750–760 (2021).
325. Solstad, A. D. *et al.* IFN- λ uniquely promotes CD8 T cell immunity against SARS-CoV-2 relative to type I IFN. *JCI Insight* **9**, e171830 (2024).
326. Klinkhammer, J. *et al.* IFN- λ prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. *eLife* **7**, e33354 (2018).
327. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271–280.e8 (2020).
328. Jones, S. *et al.* SARS-CoV-2 in Domestic UK Cats from Alpha to Omicron: Swab Surveillance and Case Reports. *Viruses* **15**, 1769 (2023).
329. Vergara-Alert, J. *et al.* Pigs are not susceptible to SARS-CoV-2 infection but are a model for viral immunogenicity studies. *Transbound. Emerg. Dis.* **68**, 1721–1725 (2021).
330. Nelli, R. K. *et al.* Enhanced apoptosis as a possible mechanism to self-limit SARS-CoV-2 replication in porcine primary respiratory epithelial cells in contrast to human cells. *Cell Death Discov.* **7**, 1–10 (2021).
331. Chen, S. *et al.* Feline Infectious Peritonitis Virus Nsp5 Inhibits Type I Interferon Production by Cleaving NEMO at Multiple Sites. *Viruses* **12**, 43 (2019).

332. Shen, Z. *et al.* Structural and Biological Basis of Alphacoronavirus nsp1 Associated with Host Proliferation and Immune Evasion. *Viruses* **12**, 812 (2020).
333. A. N. Vlasova et L. J. Saif, « Bovine Coronavirus and the Associated Diseases », *Front. Vet. Sci.*, vol. 8, p. 643220, mars 2021, doi: 10.3389/fvets.2021.643220
334. Borders AS, Getchell ML, Etscheidt JT, Rooijen NVAN, Cohen DA, Getchell T V. Macrophage Depletion in the Murine Olfactory Epithelium Leads to Increased Neuronal Death and Decreased Neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2007;501:206-218. doi:10.1002/cne
335. Borders AS, Hersh MA, Getchell ML, et al. Macrophage-mediated neuroprotection and neurogenesis in the olfactory epithelium. *Physiol Genomics.* 2007;31:531-543. doi:10.1152/physiolgenomics.00008.2007.
336. Getchell T V., Shah DS, Partin J V., Subhedar NK, Getchell ML. Leukemia inhibitory factor mRNA expression is upregulated in macrophages and olfactory receptor neurons after target ablation. *J Neurosci Res.* 2002;67:246-254. doi:10.1002/jnr.10090

UMR VIROLOGIE



Services communs

Loeffler & Icube

MAMOUNI Aurélia (Anses)
VIDEAU Dominique (Anses)

Bressou

MATA Lauren (Anses)

PAVIO Nicole, *Directrice d'Unité (Anses)*

RICHARDSON Jennifer, *Directrice Adjointe (INRAE)*
KLONKOWSKI Bernard, *Directeur Adjoint (ENVA)*

Gestionnaire

SOUISSI Bahia (Anses)

Équipe BIOPIC

Responsable :

BAKKALI-KASSIMI Labib (Anses)*

Responsable Adjointe :

BLAISE-BOISSEAU Sandra (Anses)*

Chercheurs et enseignants chercheurs

GIRAULT Guillaume (Anses)
BERNELIN-COTTET Cindy (Anses)

ITA

ROMEY Aurore (Anses)
RELMY Anthony (Anses)
SALOMEZ Anne-Laure (Anses)

Gestionnaire LRUE FA

KOUKA MAYOLA Hervé (Anses)

Équipe BIOR

Responsables :

VITOUR Damien (Anses)*

CAIGNARD Gregory (INRAE)*

Chercheurs et enseignants chercheurs

BREARD Emmanuel (Anses)*
SAILLEAU Corinne (Anses)
ZIENTARA Stéphan (Anses)

ITA

FABLET Aurore (Anses)
POSTIC Lydie (Anses)
TURPAUD Mathilde (Anses)
TONEATTI Philippine (CDD Anses)

Post Doctorant

LEMESLE Marine (CDD Anses)

Thèse d'université

DUJARDIN Pascal (ENVA)

Équipe ZEN

Responsables :

COULPIER Muriel (INRAE)*

GONZALEZ Gaëlle (Anses)*

Chercheurs et enseignants chercheurs

MARTIN-LATIL Sandra (Anses)*
MIGNE Camille (Anses)
GONDARD Mathilde (Anses)

ITA

PIUMI François (INRAE)
MAGNIEZ Aurélie (INRAE)
DUMAREST Marine (Anses)
GORNA Kamila (Anses)
MARITERAGI-HELLE Teheipaura (CDD Anses)

Thèse d'université

MATHEWS-MARTIN Laure (Anses)
CHAILLOT Valentine (EnvA)
CHEVRIER Manon (Anses)

Équipe VEBE

Responsables :

LEPODER Sophie (EnvA)*

DOCEUL Virginie (INRAE)*

Chercheurs et enseignants chercheurs

PAVIO Nicole (Anses)*
GUERIN Virginie (EnvA)

ITA

HUET Héliène (EnvA)
PELLERIN Marie (Anses)
CDD ANRS (EnvA)
CDD ANRS (EnvA)

Post Doctorant

GELLENONCOURT Stacy (INRAE)

Thèse d'université

GAMBINO Adèle (EnvA)
MARCADET-HAUSS Ailona (INRAE)
SOUDAN Chloé (EnvA)

Équipe InViT

Responsables :

RICHARDSON Jennifer (INRAE)*

KLONKOWSKI Bernard (EnvA)

ATTOUI Houssam (INRAE)*

Chercheurs et enseignants chercheurs

CORDONNIER Nathalie (EnvA)
LACOUR Sandrine (Anses)
SOURISSEAU Marion (INRAE)
MAUREY Christelle (EnvA)
BEGUIN Jeremy (EnvA)
MONSION Baptiste (INRAE)

ITA

UNTERFINGER Yves (EnvA)
COSTA Fleur (ENVA)

Post Doctorant

WU CHUANG Alejandra (EnvA)

Thèse d'université

GROT Axel (EnvA)
THIBAudeau Sarah (INRAE)

Hygiène & Sécurité : Loeffler & Icube : SAILLEAU Corinne, RELMY Anthony; **Icube ZO** : LACOUR Sandrine; Bressou : COSTA Fleur, UNTERFINGER Yves, GORNA Kamila, MAGNIEZ Aurélie

Biosécurité : KLONKOWSKI Bernard Loeffler & Icube : Icube FA : BAKKALI-KASSIMI Labib; **Icube ZO** : LACOUR Sandrine, Gonzalez Gaëlle; Bressou : ATTOUI Houssam

Qualité / Métrologie : Loeffler & Icube : Aurore ROMÉY, Marine DUMAREST; Bressou : PIUMI François, FABLET Aurore, Mata Lauren, Pellerin Marie, SOUISSI Bahia / COSTA Fleur

Green Team : BERNELIN Cindy, COSTA Fleur, DUMAREST Marine, PELLERIN Marie, RICHARDSON Jennifer, TURPAUD Mathilde, VIDEAU Dominique

Réunion Vie de Labo : FABLET Aurore, GELLENONCOURT Stacy, MONSION Baptiste

STUDY OF THE ROLE OF INNATE IMMUNITY IN THE PATHOPHYSIOLOGY AND TRANSGRESSION OF THE SPECIES BARRIER BY SARS-COV-2 IN DIFFERENT ANIMAL SPECIES

SARS-CoV-2 is a virus from the Coronaviridae family, Betacoronavirus genus, which is believed to have originated from a closely related virus found in a species of bat. Its emergence in China at the end of 2019 and the appearance of numerous variants have led to the largest viral pandemic of the 21st century. The infection causes the disease COVID-19, characterized by respiratory symptoms ranging from mild to severe, with pneumonia that can sometimes be fatal. The innate immune response is the first line of defense against a viral infection and allows for the synthesis of interferons (IFN), which induce the production of hundreds of antiviral molecules (Interferon-stimulated genes, ISG). It can also contribute to potentially harmful inflammation. We aimed to study the involvement of the IFN response in the pathophysiology of SARS-CoV-2 through two approaches: in Syrian hamsters infected with SARS-CoV-2 variants (D614G, Delta, Omicron) of different pathogenicity and in a mouse model deficient or not for the IFN-I receptor. We show in the Syrian hamster model a positive correlation on the first day post-infection of the nasal cavity between the intensity of viral replication, the IFN-III response, and the synthesis of inflammatory cytokines. The Delta variant causes tissue damage earlier in the olfactory epithelium, associated with very strong IFN and inflammatory responses. The Omicron variant, the least pathogenic, induced a delayed interferon response with a reduced inflammatory response. However, in the mouse model, we showed that the IFN-I response is necessary to control viral replication. If at very early times of infection, the lack of induction of the IFN-I pathway does not seem harmful, on the 4th day post-infection, linked to increased viral replication and dissemination, the level of inflammatory cytokines is ultimately similar to that of control mice, and we observed an increase in tissue lesions in the nasal cavity. The IFN response can also be a determining factor in a virus's ability to cross the species barrier. Indeed, a virus's ability to counteract the IFN response of different potential hosts could facilitate crossing the species barrier. Some SARS-CoV-2 proteins can inhibit the induction of ISGs in human cells, and we wondered if the viral orthologs of bat SARS-CoV-like viruses retain this property. We showed that, like SARS-CoV-2, the viral protein Nsp13 of the viruses BANAL-236, BANAL-103, and RATG13, which infect bats, also inhibit the induction of the human IFN pathway. Thus, the induction of the interferon pathway has multiple consequences during viral infection, and viruses like SARS-CoV-2 can counteract its induction in various ways, which confers a replicative advantage. Its study remains important to better understand the pathophysiology of the disease and to better adapt antiviral treatments, but also to detect animal viruses that could easily circumvent the antiviral responses of human cells and thus have zoonotic potential.

KEYWORDS: SARS-CoV-2, Interferon, pathophysiology, animal models, species barrier, bats, variants

ETUDE DU ROLE DE L'IMMUNITE INNEE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE ET DANS LA TRANSGRESSION DE LA BARRIERE D'ESPECES PAR LE SARS-COV-2 CHEZ DIFFERENTES ESPECES ANIMALES

Le SARS-CoV-2 est un virus de la famille des *Coronaviridae*, genre *Betacoronavirus* qui aurait pour origine un virus proche provenant d'une espèce de chauve-souris. Son émergence en Chine fin 2019 ainsi que l'apparition de nombreux variants ont donné lieu à la plus grande pandémie virale du XXI^{ème} siècle. L'infection par le SARS-CoV-2 engendre la maladie COVID-19 qui est caractérisée par des symptômes respiratoires pouvant être de légers à sévères avec une pneumonie parfois fatale. La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense contre une infection virale et permet la synthèse d'interférons (IFN) qui vont induire la production de centaines de molécules antivirales (Interferon-stimulated genes, ISG). Elle peut aussi contribuer à l'établissement d'une inflammation possiblement délétère. Nous avons souhaité étudier l'implication de la réponse IFN dans la physiopathologie du SARS-CoV-2 par deux approches : chez des hamsters syriens infectés par des variants (D614G, Delta, Omicron) du SARS-CoV-2 de pathogénicité différente et dans un modèle de souris déficientes ou non pour le récepteur de l'interféron de type I. Nous montrons dans le modèle du hamster Syrien, une corrélation positive au premier jour post-infection de la cavité nasale entre l'intensité de la réplication virale, la réponse IFN de type III et la synthèse de cytokines inflammatoires. Le variant Delta cause des dommages tissulaires plus précocement dans l'épithélium olfactif associés à des réponses IFN et inflammatoires très fortes. Le variant Omicron, le moins pathogène, est celui qui induit plus lentement une réponse interféron avec une réponse inflammatoire amoindrie. Cependant, dans le modèle murin, nous montrons que la réponse IFN-I est nécessaire pour contrôler la réplication virale. Si à des temps très précoces de l'infection, le défaut d'induction de la voie IFN-I ne semble pas délétère, au 4^{ème} jour post-infection, en lien avec la réplication et diffusion accrue du virus, le niveau des cytokines inflammatoires est au final similaire à celui des souris contrôles et nous observons dans la cavité nasale une augmentation des lésions tissulaires. La réponse IFN peut aussi être un facteur déterminant dans la capacité d'un virus à franchir la barrière d'espèce. En effet, l'aptitude d'un virus à contrecarrer la réponse IFN de différents hôtes potentiels pourrait favoriser le franchissement de la barrière d'espèce. Certaines protéines du SARS-CoV-2 sont capables d'inhiber la voie d'induction des ISGs dans les cellules humaines et nous nous sommes demandés si les orthologues viraux des virus SARS-CoV-like de chauve-souris conservent cette propriété. Nous montrons ainsi que comme pour le SARS-CoV-2, la protéine virale Nsp13 des virus BANAL-236, BANAL-103 et RATG13 qui infectent les chauves-souris, inhibent aussi l'induction de la voie IFN humaine.

Ainsi, l'induction de la voie interféron a de conséquences multiples au cours de l'infection virale et les virus, comme le SARS-CoV-2 peuvent de diverses manières contrecarrer son induction ce qui confère un avantage réplicatif. Son étude reste importante pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et adapter au mieux les traitements antiviraux mais aussi pour détecter des virus animaux qui pourraient détourner facilement les réponses antivirales des cellules humaines et avoir ainsi un potentiel zoonotique.

MOTS CLÉS : SARS-CoV-2, Interféron, physiopathologie, modèles animaux, barrière d'espèces, chauve-souris, variants