

Université de Montréal

Production, quantification et détection des coronavirus

Par

Christopher Savoie

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Biochimie

Août 2022

© Christopher Savoie, 2022

Université de Montréal

Biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Production, quantification et détection des coronavirus

Présenté par

Christopher Savoie

Évalué par un jury composé des personnes suivantes

Nikolaus Heveker

Président

Roger Lippé

Directeur de recherche

Naglaa Shoukry

Membre du jury

Résumé

Les coronavirus tels que le SARS-CoV-2 représentent un danger pour la santé publique, mobilisant la science pour le développement d'outils. Considérant les risques du SARS-CoV-2, celui doit être manipulé en laboratoire de niveau de sécurité 3, limitant la recherche. Le coronavirus OC43 représente un modèle utile manipulable en niveau de sécurité 2, mais peu de méthodes standardisées existent pour celui-ci. La première partie de cette étude consiste au développement de modèle de culture cellulaire pour la production et la titration de OC43. Mes travaux démontrent l'utilité des lignées MRC-5 et HRT-18 ainsi que la sensibilité de la titration par *Tissue Culture Infectious Dose 50 Immunoperoxidase Assay* (TCID50-IPA). La seconde partie emploie une méthode de pointe en virologie qui n'a pas encore été démontrée pour les coronavirus, soit la virométrie en flux. Celle-ci permet la quantification absolue de particules virales, ce qui est un avantage aussi bien pour la recherche que pour une potentielle méthode diagnostique. J'ai ainsi développé une méthode de purification et de concentration du coronavirus OC43 pour permettre son étude en virométrie en flux avec un bruit de fond négligeable. Un marquage efficace de ~99% des particules virales a été démontré avec les marqueurs Syto 13 et Syto 62. De plus, le marquage par un anticorps contre la protéine S permet de d'évaluer la présence de virus. Finalement, les nouvelles méthodes développées ici permettront des études plus poussées sur les coronavirus.

Mots-clés : Coronavirus, OC43, TCID50, ultracentrifugation, virométrie en flux, Syto13, Syto62.

Abstract

Coronaviruses such as SARS-CoV-2 represent a danger for public health, mobilizing science for the development of new tools. Considering the risks of SARS-CoV-2, a biosecurity level 3 laboratory is required for their studies, which limits scientific research. The coronavirus OC43 represents a useful model that can be safely manipulated in biosecurity level 2 facilities but existing methods to study this virus are not well standardized or optimized. Therefore, I firstly developed a cell culture model for the production and titration of OC43. My data demonstrate the importance of the cell lines MRC-5 and HRT-18 and the sensitivity of the titration method called *Tissue Culture Infectious Dose 50 Immunoperoxidase Assay* (TCID50-IPA). Secondly, I explored a cutting-edge virometry method called flow virometry which allows the absolute quantification of intact viral particles, which is advantageous for many studies or as a potential diagnostic tool. I hence put together a protocol to purify and concentrate OC43 for this application with minimal background noise. Moreover, labeling the virus with Syto dyes (Syto 13, Syto 62) is very efficient with ~99% of viral particles marked. Furthermore, an antibody against the S protein of OC43 can mark the virus efficiently enough to evaluate the presence of viral particles. Finally, the optimization and development of these methods for coronavirus will enable further research.

Keywords : Coronavirus, OC43, TCID50, ultracentrifugation, flow virometry, Syto13, Syto62.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des Figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Chapitre 1 - Introduction.....	1
Chapitre 1.1 - Les Coronavirus.....	1
1.1.1. Historique.....	1
1.1.2. Classification.....	1
1.1.3. Morphologie des virions.....	2
1.1.4. Organisation du génome.....	3
1.1.5. Évolution.....	5
1.1.6. Protéines structurales.....	5
1.1.6.1 Protéine de spicule (S).....	5
1.1.6.2. Protéine hémagglutinine-estérase (HE).....	6
1.1.6.3 Protéine de la nucléocapside (N).....	7
1.1.6.4. Protéine de membrane (M).....	7
1.1.6.5. Protéine d'enveloppe (E).....	7
1.1.7. Protéines non structurales et accessoires.....	8
1.1.8. Cycle de réplication.....	8
1.1.9. Récepteur et protéases.....	9

1.1.10. Origine et zoonose	12
1.1.11. Transmission et épidémiologie	14
1.1.12. Pathologie et pathogenèse	14
1.1.13. Réponse immunitaire	15
1.1.14. Thérapeutiques et prophylactiques	16
Chapitre 1.2 - Techniques de production et d'analyse	17
1.2.1. Méthodes d'isolation	17
1.2.2. Modèles <i>in vitro</i>	18
1.2.3. Modèles <i>in vivo</i>	19
1.2.4. Méthodes de production	20
1.2.5. Méthodes de titration	21
1.2.6. Méthodes de détection.....	22
Chapitre 1.3 - Tests moléculaires cliniques.....	23
1.3.1. Considérations générales	23
1.3.1.1. Types d'échantillons.....	23
1.3.1.2. Spécificité et sensibilité.....	24
1.3.1.3. Limitations générales des méthodes	24
1.3.2. Tests d'acides nucléiques (NATs)	24
1.3.2.1 Méthodes PCR.....	24
1.3.2.2 Autres méthodes NATs.....	25
1.3.3 Tests sérologiques et antigéniques.....	26
1.3.3.1 Tests sérologiques.....	26
1.3.3.2. Méthodes antigéniques	27
1.3.4. Autres types de tests.....	27

1.3.4.1 Tests basés sur CRISPR	28
Chapitre 1.4 - Virométrie en flux.....	30
1.4.1. Historique et principe général	30
1.4.2. Application du cytomètre en flux pour la virométrie	30
1.4.3. Application aux coronavirus.....	32
Chapitre 2 - Hypothèse et objectifs.....	33
Chapitre 3 - Résultats	34
Préface.....	34
<i>Chapitre 3.1 - Optimizing human Coronavirus OC43 growth and titration</i>	<i>35</i>
3.1.1 Abstract	36
3.1.2 Introduction.....	37
3.1.3 Materials and Methods	39
<i>Cell Lines</i>	<i>39</i>
<i>Viral strains and stocks.....</i>	<i>39</i>
<i>Viral infections.....</i>	<i>40</i>
<i>Virus Titration by TCID₅₀.....</i>	<i>40</i>
<i>Flow Cytometry</i>	<i>41</i>
<i>Statistics</i>	<i>41</i>
3.1.4 Results	42
The human lung cell line MRC-5 is a good model to propagate HCoV-OC43	42
Optimal growth at 33 °C.....	42
Serum levels during the propagation does not alter viral yields	44
Sonication may be helpful.....	46

The TCID50-IPA method is the most sensitive and practical approach to titer HCoV-OC43	46
Variation in tropism among HCoV-OC43 isolates	49
3.1.5 Discussion	55
Chapitre 3.2 - Virométrie en flux du coronavirus OC43	58
3.2.1 Introduction.....	58
3.2.2 Matériel et méthodes	59
<i>Production de virus</i>	59
<i>Purification et concentration de virus</i>	60
<i>Titration des virus</i>	61
<i>Marquages des échantillons</i>	61
<i>Analyse par virométrie en flux</i>	61
3.2.3 Résultats	62
La purification et la concentration de virus permettent d’obtenir de hauts titres viraux	62
L’élimination du bruit de fond et de l’autofluorescence du virus est réalisable	64
Le marquage du virus par les colorants Syto est efficace	65
Le marquage du virus par anticorps est possible, mais sous-optimal	68
3.2.4 Discussion	70
3.2.5 Annexe.....	74
Chapitre 4 - Conclusion	78
Références bibliographiques.....	80

Liste des tableaux

Partie 1: Optimisation de la croissance et de la titration du coronavirus humain OC43 (*Optimizing human Coronavirus OC43 growth and titration*)

Table 1. – HCoV-OC43 variants.....52

Liste des Figures

Introduction

Figure 1. – Classification des hCoVs d’après l’International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).	2
Figure 2. – Structure, taille et ratio des protéines structurales du virion.....	3
Figure 3. – Organisation du génome des hCoVs.	4
Figure 4. – Mécanisme de transcription discontinue pour la production des sgARNm.	5
Figure 5. – Cycle de réplication des CoVs.....	9
Figure 6. – (A) Attachement du virus à l’aide d’acides sialiques et la liaison au récepteur. (B) Domaines de la protéine de spicule et sites de clivage des protéases.....	10
Figure 7. – Emplacement de différentes protéases dans le cycle de réplication. Les protéases représentées par les ciseaux ont un code de couleur.	11
Figure 8. – Arbre phylogénique des CoVs.	12
Figure 9. – Modèle de l’origine des hCoVs.....	13
Figure 10. – Méthodes de marquages en virométrie en flux.....	31

Partie 1: Optimisation de la croissance et de la titration du coronavirus humain OC43 (Optimizing human Coronavirus OC43 growth and titration)

Figure 1. – HCoV-OC43 grows best on the MRC-5 and Huh7.5 cell lines.	44
Figure 2. – Optimal propagation of HCoV-OC43 at 33 °C.....	45
Figure 3. – HCoV-OC43 can be grown in serum free media.	48
Figure 4. – Effect of sonication of viral titers.....	48
Figure 5. – Optimal TCID50 method for the titration of HCoV-OC43.....	51
Figure 6. – The VR-1558 HCoV-OC43 variant has an increased tropism.	51

Partie 2: Virométrie en flux du coronavirus OC43

Figure 1. – Purification et concentration du virus par ultracentrifugation.	63
Figure 2. – Diminution du bruit de fond de fluorescence à température pièce.	65
Figure 3. – Virométrie en flux du virus avec marquage par Syto.	67
Figure 4. – Virométrie en flux du virus avec marquage par anticorps.	69
Figure S1. – La filtration à 0.22 μm n'affecte pas le titre virus.	74
Figure S2. – La resuspension du virus pendant 2h versus 24h donne un meilleur rendement.....	75
Figure S3. – La purification de virus donne des titres semblables pour HRT-18 et MRC-5..	76
Figure S4. – Diminution du bruit de fond par filtration à 0.1 μm	77

Liste des sigles et abréviations

ADN : acide **dé**soxyribonucléique

APN : *aminoPeptidase N*

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique **m**essenger

BSL-2: *biosecurity level 2*

BSL-3: *biosecurity level 3*

CCoV: *canine coronavirus disease*

CoV: coronavirus

CPE : cytopathogenic effect / effets cytopathogéniques

Cryo-EM : *cryoelectronic microscopy* / cryomicroscopie Électronique

DMV : *double-membrane vesicles* / vésicules double membrane

DPP4 : *dipeptyl peptidase-4*

ERGIC : *endoplasmic-reticulum-golgi intermediate compartment* / compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique-Golgi

FACS: *fluorescence activated cell sorting*

FIPV: *feline infectious peritonitis virus*

hCoV : *human coronavirus* / coronavirus humain

HKU1 : coronavirus « *Hong Kong University 1* »

HLA-C: *human leukocyte antigen*

HSV-1 : *herpes simplex virus 1*

IBV : *infectious bronchitis virus* / virus de la bronchite infectieuse aviaire

IF: *immunofluorescence*

LFA: *lateral flow assay*

MERS : *middle east respiratory syndrome* / syndrome respiratoire du Moyen-Orient

MHV : *mouse hepatitis virus* / virus de l'hépatite murine

NATs : *nucleic acid tests*

NL63 : coronavirus « **N**etherlands **63** »

NSP : *non-structural protein*

NSP : *non-structural protein* / protéine non structurale

OC43 : Coronavirus « *organ culture 43* »

PFU : *plaque forming units*

POC: *point-of-care*

RBD : *receptor binding domain* / domaine de liaison au récepteur

RdRp : *RNA-dependent RNA polymerase* / ARN polymérase ARN-dépendante

RTC : *replication and transcription complex*

RT-PCR : *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*

SARS : *severe acute respiratory syndrome* / syndrome respiratoire aigu sévère

SARS-CoV-2 : *severe acute respiratory syndrome 2* / syndrome respiratoire aigu sévère 2

sgmRNA : *sub-genomic messenger RNA* / ARN sous génomique messenger

SNPs: *single nucleotides polymorphisms*

TCID50: *tissue-culture infectious dose 50*

TGEV : transmissible gastroenteritis coronavirus / coronavirus de la gastro-entérite transmissible porcine

TRS: *transcriptional regulatory sequence*

VIH : virus de l'immunodéficience humain

VLP: *virus-like particle*

VOCS: *variants of concerns*

Chapitre 1 - Introduction

Chapitre 1.1 - Les Coronavirus

1.1.1. Historique

Les coronavirus (CoVs) ont été en premier isolés à partir d'animaux dans les années 1930-1940 comme agents causant des bronchites chez le poulet (*Infectious bronchitis virus*, IBV) [1], des gastroentérites chez le porc (*Transmissible gastroenteritis virus*, TGEV) [2] et des hépatites et déficits neurologiques chez la souris (*Mouse Hepatitis Virus*, MHV) [3]. Puis, dans les années 1960, les premiers CoVs affectant l'humain (*Human Coronavirus*, HCoV) ont été isolés comme agents causatifs de rhumes (OC43 et 229E) [4]. Le premier CoV d'envergure a été découvert suite à l'épidémie de SARS en 2002-2004 [5] ce qui a poussé la recherche et mené à la découverte des hCoVs HKU-1 et NL63 similaires à OC43 et 229E respectivement [6, 7]. Finalement, il y a eu des épidémies du *Middle Eastern Respiratory Syndrome* (MERS) en 2012 [8] et une pandémie de SARS-CoV-2 en 2019 [9].

1.1.2. Classification

Les CoVs sont des virus à simple brin et simple fragment d'ARN sens positif et font partie de l'ordre *Nidovirales* [10]. Le nom *Nido* (*nid*) est donné selon le mécanisme de production des ARN sous-génomiques [11]. Ils font partie de la sous-famille *Coronaviridae* qui est divisée en quatre types : α , β , γ et δ [12]. Seulement les α -CoVs et les β -CoVs se retrouvent chez l'humain. Les β -CoVs clivent leur protéine de spicule (S) en deux parties (S1, S2) grâce à des protéases contrairement aux α -CoVs. Les CoVs ont aussi été classifiés antigéniquement en groupe I (α -CoVs), groupe II (β -CoVs) et groupe III (coronavirus animaux) [13, 14]. Le groupe II est quelquefois séparé en sous-genres 2a (*embecovirus*, incluant OC43 et HKU1), 2b (*sarbecovirus*, incluant SARS et SARS-CoV-2) et d'autres sous-genres pour des CoVs animaux (voir Figure 1).

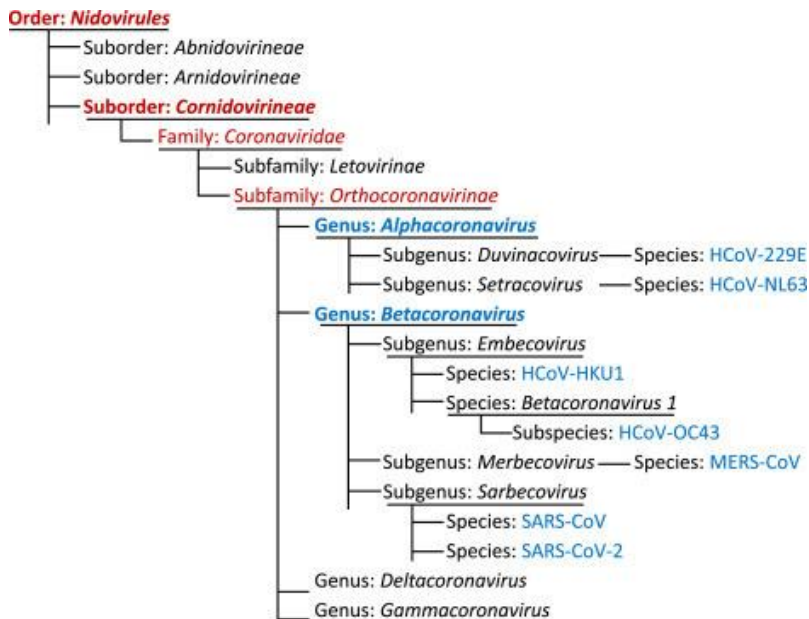


Figure 1. – Classification des hCoVs d’après l’International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Tiré de [15] avec permission.

1.1.3. Morphologie des virions

Chez les HCoV, il existe 4 ou 5 protéines structurales formant le virion, soit la protéine S, la protéine de la nucléocapside (N), la protéine de la membrane (M), la protéine de l’enveloppe (E) et la protéine hémagglutinine estérase (HE) qui est uniquement retrouvée chez OC43 et HKU1. Le ratio de ces protéines par virion est estimé à 100:1000:2000:20:40 respectivement pour S, N, M, E, HE (voir Figure 2) [16, 17]. Les virus sont enveloppés et généralement sphériques, mais peuvent être pléomorphiques [10, 18]. Ils ont des diamètres moyens de 80-120 nm avec des extrêmes de 50 nm à 200 nm [10, 16, 19]. Ils possèdent des projections de la protéine S en surface d’environ 9-21 nm, donnant l’impression de couronnes solaires ainsi donnant le nom **coronavirus** [10, 18, 20, 21]. De plus courtes projections d’environ 8 nm de la protéine HE se retrouvent aussi en surface [10, 21, 22]. Le génome viral lié à la protéine N est à l’intérieur de l’enveloppe et forme une symétrie d’hélice [10]. Il a été démontré par cryomicroscopie électronique (cryo-EM) que celui-ci est peu entassé et qu’ainsi des protéines non structurales, des protéines accessoires et des protéines de l’hôte sont incorporées dans certains virions [10, 23-25]. L’élucidation de leur fonction nécessite plus d’études, mais l’importance de ce phénomène a été démontré pour d’autres virus comme l’influenza, l’herpès simplex-1 (HSV-1) et le VIH [26-28]. Finalement, les

virions produits peuvent être défectifs; par exemple, en ayant des génomes tronqués, mais sont rarement vides [29-31].

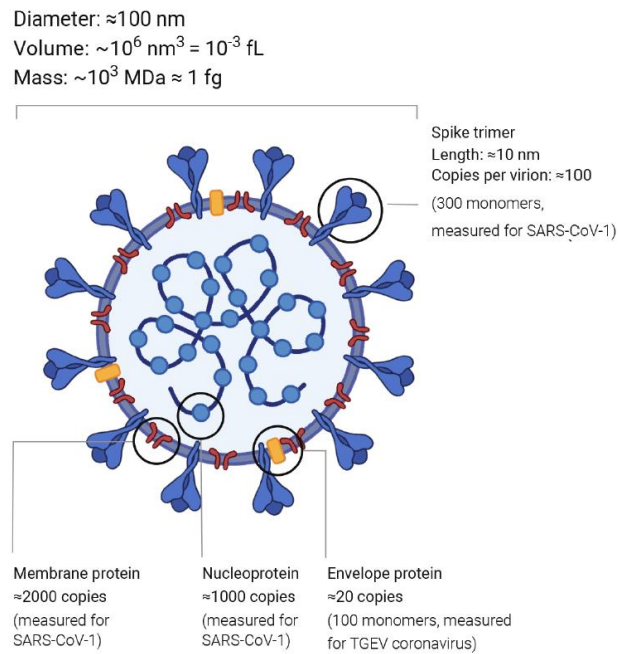


Figure 2. – Structure, taille et ratio des protéines structurales du virion. Tiré de [16] avec permission.

1.1.4. Organisation du génome

Le génome des CoVs est un des plus grands des virus à ARN avec une longueur entre 26-32 kb. L'ARN viral agit d'abord comme ARN messager (ARNm) pour la traduction des ORF1a/ORF1b qui produisent les polyprotéines pp1a/pp1ab. Le clivage de pp1a/pp1b par ses protéases auto-activantes (*Papain-like protease* PLpro/nsp3 et *3-chymotrypsin protease* 3CLpro/nsp5) forme les *non-structural proteins* (nsps) [32]. Celles-ci constituent le complexe de réplication qui permet de faire la transcription des ARNm des protéines structurales et accessoires depuis l'ARN viral brin positif. Les protéines accessoires ne sont pas conservées entre les CoVs et sont numérotées en ordre du plus petit transcrit au plus gros. Ainsi, leurs noms ne sont pas équivalents entre les différents CoVs. Par contre, pour tous les CoVs, les autres gènes possèdent un ordre invariant, soit : 5'-ORF1a/ORF1b-(HE)-S-E-M-N-3' (voir Figure 3) [10].

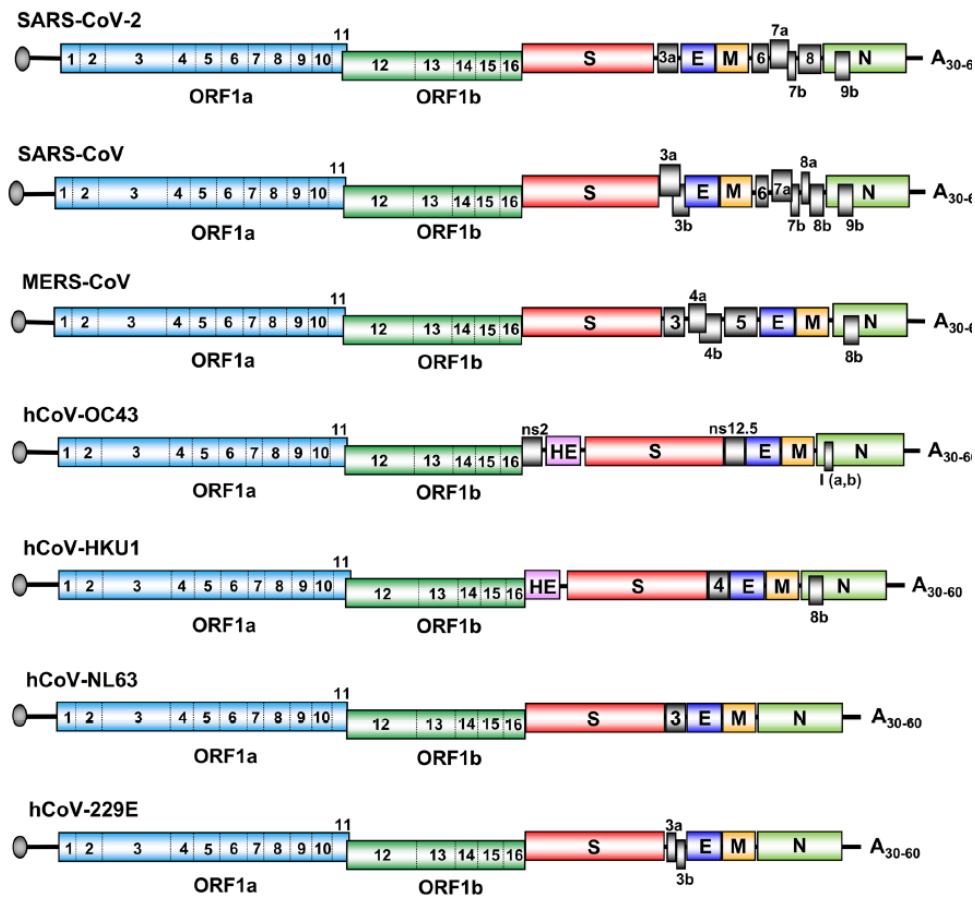


Figure 3. – Organisation du génome des hCoVs. Les nsps sont issues des transcrits bleus et verts et les protéines accessoires des transcrits gris. Tiré de [32] avec permission.

L'ARN viral est coiffé en 5' et polyadénylé en 3' de manière similaire à l'ARNm de l'hôte. Il possède aussi une séquence nommée dirigeante (*leader*) en 5' qui est importante pour le mécanisme de transcription discontinue unique pour les virus de l'ordre *nidovirales*. Brièvement, la transcription se fait du 3' au 5' du brin positif et le complexe de réplication (RTC) pause à l'aide d'une séquence régulatrice de transcription (TRS) et entame un *template switch* pour se lier à la séquence dirigeante et la transcrire à l'extrémité 3' de l'ARNm brin négatif (voir Figure 4). On les appelle donc des ARNm sous-génomiques (sgmRNA) et ils sont nichés en 3' par la séquence *leader* ce qui donne le nom *nido-* [10, 32]. Ce mécanisme facilite l'étude de la transcription des CoVs puisque les sgmRNA sont produits seulement après la transcription du génome viral. Ainsi, on peut cibler spécifiquement les sgmRNA par RT-PCR avec des sondes recouvrant la bordure du gène et la séquence dirigeant [33].

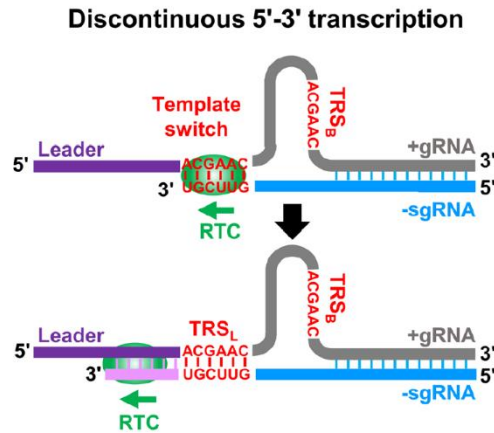


Figure 4. – Mécanisme de transcription discontinue pour la production des sgARNm. TRS : transcription-regulating sequence. RTC : replication/transcription complex. Tiré de [32] avec permission.

1.1.5. Évolution

Les CoVs sont des virus qui évoluent rapidement grâce à un taux de mutation élevé causé par des erreurs de transcription et grâce à une recombinaison fréquente (1% par 1.3 kb) [10]. De plus, la machinerie de modification d'ARN de l'hôte (i.e. APOBEC, ADAR deaminase, etc.) contribue à l'évolution et la diversité du génome [10, 32, 34]. Cependant, il existe un mécanisme de relecture pour la correction d'erreur qui est fait par l'exonucléase virale (ExoN) [35]. Ceci permet de maintenir l'intégrité du génome tout en préservant une capacité d'évolution rapide. D'autre part, la recombinaison de séquences retrouvée chez l'hôte ou d'autres espèces virales serait à l'origine des protéines accessoires; si bien que, ces protéines aient souvent des rôles redondants avec les autres protéines virales, sont adaptées spécifiquement à certains hôtes ou tissus et elles ne sont donc pas nécessaires pour la réplication en culture cellulaire [36].

1.1.6. Protéines structurales

1.1.6.1 Protéine de spicule (S)

La protéine S est une glycoprotéine transmembranaire virale de fusion de classe I d'environ 128-160 kDa qui, sous forme de trimère, permet l'attachement du virus à son récepteur [10]. Elle possède deux sous-unités : S1 et S2. La liaison du récepteur se fait par le domaine de liaison au

récepteur (*RBD*) de S1 [37]. Cela mène à un changement de conformation qui permet à S2 d'initier le rapprochement des membranes et la fusion. De plus, une partie de la protéine S est trafiquée vers la membrane cellulaire ce qui peut permettre la fusion cellule-cellule [10].

La protéine S est un facteur majeur de virulence et est très importante pour le tropisme (changement de récepteur, changement d'hôte, d'organe, de tissu, etc.) [10, 37-41]. Le remplacement d'une protéine S par une autre fait par la modification du génome confère au virus le tropisme de sa nouvelle protéine S [10]. Ainsi, des mutations simples de la protéine S chez le MHV peuvent augmenter l'efficacité du virus à se disséminer dans le système central nerveux et peuvent entraîner de nouvelles pathologies [42, 43]. C'est pourquoi un grand nombre de mutations et de *variants of concern* (VOCs) se retrouvent dans la protéine S. En outre, la sous-unité S1 est très variable et moins conservée que la sous-unité S2 et peut même varier à l'intérieur d'un isolat (quasiespèces). Ceci reflète également les pressions évolutives diverses, particulièrement puisque la protéine S est la cible la plus importante des anticorps [44, 45].

1.1.6.2. Protéine hémagglutinine-estérase (HE)

L'hémagglutinine-estérase est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 48 kDa [10]. Elle est importante pour la liaison aux acides sialiques 9-O-acétylés par son domaine lectine et inversement pour leur désacétylation par son activité acétyle-estérase pour le relâchement du virus [21]. Les acides 9-O-acétylsialique sont des sucres présents à la surface des cellules qui peuvent être liées à des oligosaccharides, des glycolipides ou glycoprotéines. Ils sont aussi présents dans les sécrétions des voies respiratoires (mucus) inhibant le déplacement du virus [22]. Ainsi, l'activité de désacétylation pourrait être un avantage pour la propagation du virus.

Les acides sialiques 9-O-acétylés servent également de récepteur pour la liaison de la protéine S de OC43 et HKU1. Chez les CoVs, la partie lectine de HE joue normalement un rôle de co-facteur pour S; cependant, les hCoVs ont acquis progressivement des mutations rendant inactive l'activité de la portion lectine avec en contrepartie une adaptation de la protéine S. Ceci semble être une adaptation au sialoglycome humain après le transfert zoonotique de ces virus (voir section 1.10) [22, 46]. Ceci suggère que l'équilibre entre les deux fonctions de HE est nécessaire pour l'infection et le tropisme du virus [21, 22, 47]. Une autre démonstration de cet équilibre est au niveau du

tropisme des organes. Chez MHV, les virus conservant une HE sont neurotropique, alors que sans HE, ils sont hépatotropiques [48].

L'implication de ces fonctions est importante aussi en culture cellulaire puisque la portion acétyl-estérase de HE est requise pour la production de particules virales infectieuses pour certains virus comme OC43 car son absence mène à une agrégation de particules virus [49].

1.1.6.3 Protéine de la nucléocapside (N)

La protéine N est une phosphoprotéine de 43-50 kDa qui lie l'ARN d'une manière *bead on a string* pour former la nucléocapside en forme d'hélice et se lie à la protéine M [10]. Elle pourrait également être importante pour la réplication et la transcription de l'ARN [50]. Cette protéine serait également impliquée dans l'inhibition de l'interféron pour protéger les ARN de la dégradation [50].

1.1.6.4. Protéine de membrane (M)

La protéine M est une glycoprotéine transmembranaire polytopique de 25-30 kDa qui est importante pour l'assemblage du virus et pour donner la forme de l'enveloppe [18]. Elle est considérée comme l'organisatrice centrale de l'assemblage grâce à ses interactions avec d'autres protéines notamment la N, la E et la S. Ainsi, l'interaction des protéines E et M est suffisante pour produire des VLPs [51]. De plus, elle contribue à la sélectivité du processus d'assemblage entre autres en excluant des protéines membranaires de l'hôte [52, 53]. Finalement, cette protéine pourrait être importante pour le tropisme et l'interaction avec le récepteur [54] en plus de contribuer à l'inhibition de l'interféron [55].

1.1.6.5. Protéine d'enveloppe (E)

La protéine E est une protéine membranaire de 8-12 kDa agissant comme une viroporine sous sa forme oligomérisée [52]. Elle peut structurellement former des pores permettant le transport de Na^+/K^+ en plus d'interagir avec diverses protéines [56]. Elle est donc impliquée dans plusieurs fonctions telles que la morphogénèse, l'assemblage, le trafic et la sécrétion des virions [52, 56]. Par ailleurs, elle est très peu incorporée dans le virion ce qui semble indiquer que sa fonction a principalement lieu en amont de la voie de sécrétion (voir Figure 5) [56, 57]. Également, elle peut

être impliquée dans l'inhibition de la réponse au stress, l'activation de l'inflammasome et d'autres mécanismes [31, 58]

L'importance de la protéine E dépend du CoV. Celle-ci peut être non-essentiel (MHV), son absence peut réduire l'infectivité (SARS) ou même empêcher la propagation (MERS) [56]. Ceci est expliqué par une compensation de certaines protéines accessoires qui varient entre les CoVs (e.g. 3a et 8a pour SARS) [59].

1.1.7. Protéines non structurales et accessoires

Il existe environ 16 protéines non structurales et plusieurs protéines accessoires. D'abord, les protéines non structurales ont comme fonction première de constituer la réplicase qui est le complexe nécessaire pour la réplication. Ceci inclue la Nsp3 (PL^{pro}), Nsp5 (3CL^{pro}), Nsp13(hélicase), Nsp12 (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRdp) et Nsp14 (ExoN) [35]. Ainsi, ces protéines sont les plus conservées du génome des CoVs [33]. De plus, certaines nsps sont importantes pour l'inhibition la réponse immunitaire innée (e.g. Nsp3) et la diminution de l'autophagie des cellules infectées (e.g. Nsp6) [23, 60].

Les protéines accessoires ont des rôles souvent associés à l'inhibition de la réponse immunitaire ou ont des fonctions encore inconnues [61, 62]. Puisque ces protéines ne sont pas conservées, leurs rôles peuvent être spécifiques pour chaque virus; par exemple, la protéine accessoire 7a uniquement retrouvé chez SARS est incorporé dans les virions et a un rôle dans la pathogenèse en induisant l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de cytokines pro-inflammatoires [52]. En somme, aucune protéine accessoire n'est nécessaire pour la réplication en culture cellulaire [10].

1.1.8. Cycle de réplication

Le cycle de réplication est intracytoplasmique et commence par l'entrée du virus soit par la liaison du virus à son récepteur, causant le rapprochement des membranes et sa fusion directe, ou par un mécanisme d'endocytose, mais de façon moins efficace [63-65]. De plus, la fusion cellule-cellule est aussi une méthode de propagation du virus [10]. À la suite de la fusion des membranes, le génome du virus est relâché pour permettre directement la traduction de pp1a/pp1ab puisque

l'ARN est de polarité positive. Ensuite, la transcription se fait à l'intérieur de *double-membrane vesicles (DMVs)* associées au ER qui sont induits par différentes protéines (e.g. nsp3, 4 et 6) [66]. Les protéines structurales et accessoires sont traduites par des ribosomes libres ou associés au ER (protéines transmembranaires) [15]. Les virions sont assemblés avec l'ARN viral positif transcrit depuis un brin négatif ainsi qu'avec les protéines structurales. L'assemblage et l'enveloppement du virion se font au niveau de l'ERGIC et la sécrétion du virus se fait par cargo vésiculaire et exocytose de petites vésicules ou exocytose lysosomale (voir Figure 5) [56, 57, 67, 68].

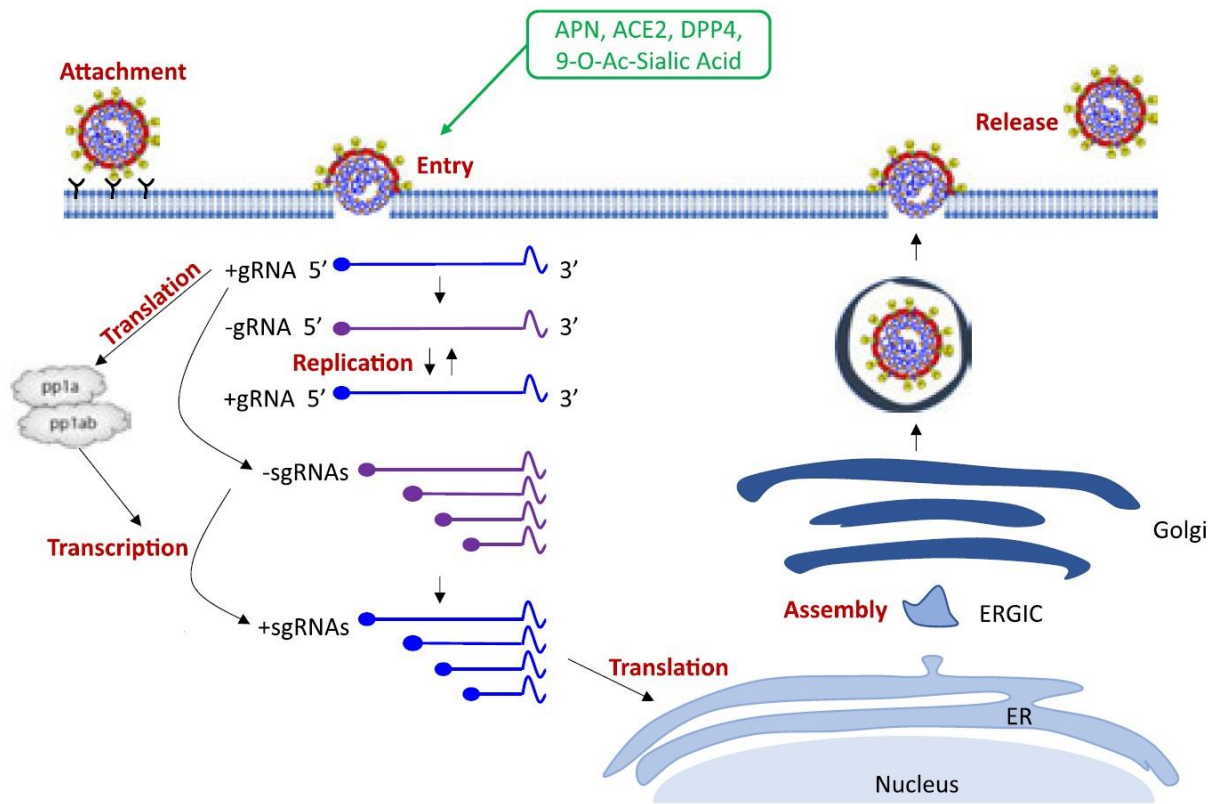


Figure 5. – Cycle de réplication des CoVs. Les récepteurs sont indiqués en vert. Tiré de [15] avec permission.

1.1.9. Récepteur et protéases

Il existe divers récepteurs chez les CoVs. Pour OC43 et HKU1, le récepteur est le *N-acetyl-9-acetylneuraminic acid* (cible commune chez les mammifères) [69], pour 229E l'*aminopeptidase N* (APN)[70], pour MERS le *dipeptyl peptidase 4* (DPP4)[69] et pour NL63, SARS et SARS-CoV-2,

l'angiotensin I converting enzyme 2 (ACE2) [54, 71]. Récemment, le récepteur neuropilin-1 a été découvert chez SARS-CoV-2 et d'autres molécules pourraient agir comme récepteur tel que CD147 et CD209L [72-74]. Également, certaines études semblent supporter l'hypothèse que HKU-1 et OC43 pourraient utiliser le *human leukocyte antigen C* (HLA-C) comme récepteur [75, 76]. Finalement, le récepteur est crucial pour l'infection puisque l'expression du récepteur suffit à rendre des cellules susceptibles au CoV [10].

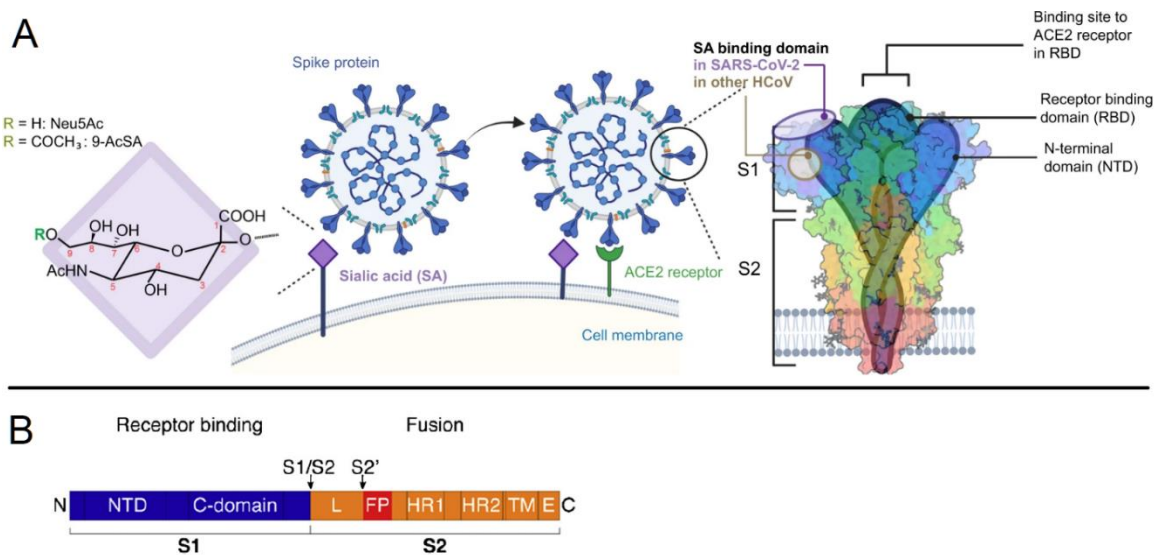


Figure 6. – (A) Attachement du virus à l'aide d'acides sialiques et la liaison au récepteur. (B) Domaines de la protéine de spicule et sites de clivage des protéases. Adapté de [46] et [77] avec permission.

En addition au récepteur, des protéases sont impliquées que cela soit pour l'entrée du virus par récepteur ou par endocytose. La protéine S possède deux sites majeurs de clivage, le S1-S2 et S2' (Figure 6B). Le site S1-S2 est généralement clivé dans la cellule au niveau de la sortie du virus alors que le site S2' est généralement clivé de façon extracellulaire au niveau de l'attachement du virus [10]. Ce clivage est critique pour l'initiation de la fusion des membranes entre le virus et la cellule. Différentes protéases peuvent cliver et à différents endroits dans la cellule tels que la furine, la TMPRSS2, TMPRSS11A/D/E, la trypsine, l'élastase et la cathepsine (voir Figure 7) [12, 71, 73, 78].

La TMPRSS2 est particulièrement importante dans le cas de SARS et SARS-CoV-2 et elle est colocalisée et liée avec le récepteur ACE2 [71, 78-80].

Ces protéases sont importantes pour l'infection et le tropisme. Le premier point est démontré par l'effet du nouveau site de clivage pour la furine de SARS-CoV-2 qui augmente son infectiosité [81]. Le deuxième point est démontré par la capacité de surmonter la barrière d'espèce par l'ajout de trypsine en culture cellulaire [65, 81, 82].

Des facteurs d'attachements (e.g. héparane sulfate, acides sialiques) peuvent également aider le virus à s'attacher au tissu cible avant sa liaison au récepteur si bien que des inhibiteurs dérivés des acides sialiques démontrent un potentiel de blocage de liaison du virus aux cellules [46].

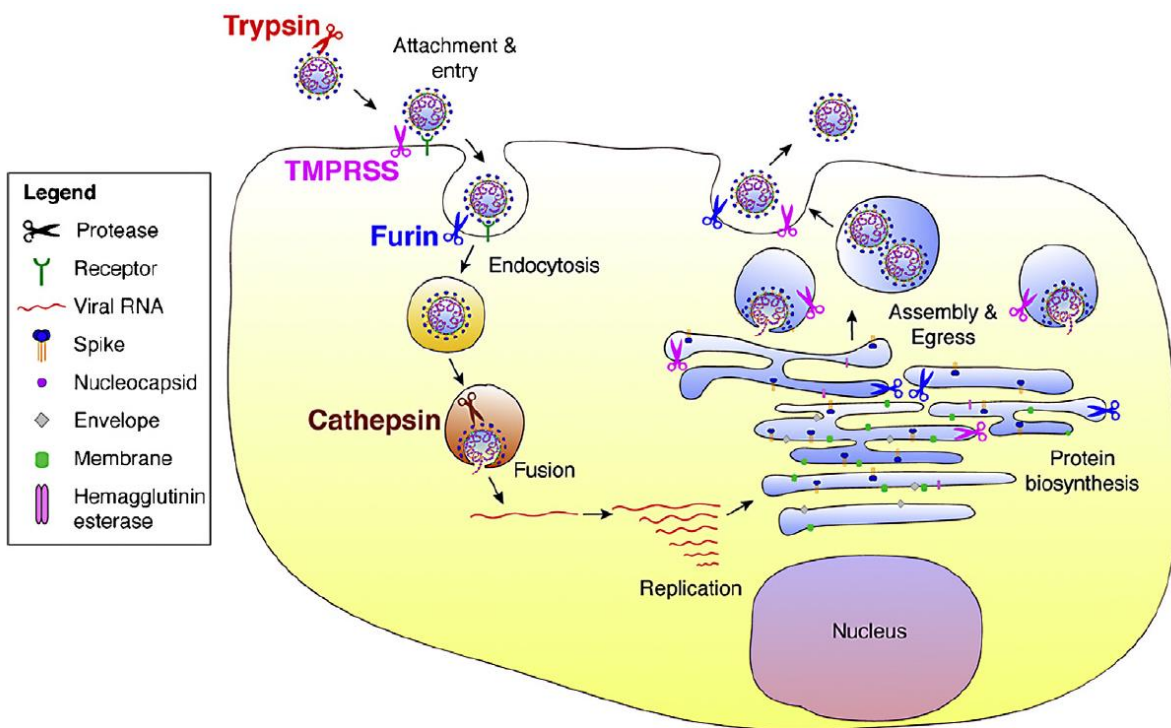


Figure 7. – Emplacement de différentes protéases dans le cycle de réplication. Les protéases représentées par les ciseaux ont un code de couleur. Tiré de [77] avec permission.

1.1.10. Origine et zoonose

Les CoVs MERS et SARS ont démontré la capacité de zoonose des coronavirus [83]. Il n'y a pas de consensus concernant l'origine phylogénique des CoVs et des hôtes intermédiaires (voir Figure 8 et 9 comme exemple). Il semblerait que tous les coronavirus humains seraient cependant le résultat de zoonose, e.g. le coronavirus OC43 depuis le bovin [84], le MERS depuis le dromadaire [85], le HKU-1 depuis les rats [36] et, les 229E, NL-63, SARS et SARS-CoV-2 depuis les chauves-souris [86, 87]. D'autres hôtes intermédiaires ont été suggérés pour certains coronavirus comme le pangolin pour SARS-CoV-2 [88] et le civette palmiste de l'Himalaya [89] ainsi que le chien viverrin pour SARS [90]. Certaines études démontrent que les hCoV ont tous phylogéniquement comme ancêtres des CoV de chauve-souris, ce qui ferait en sorte que les autres organismes seraient que des intermédiaires [33, 91].

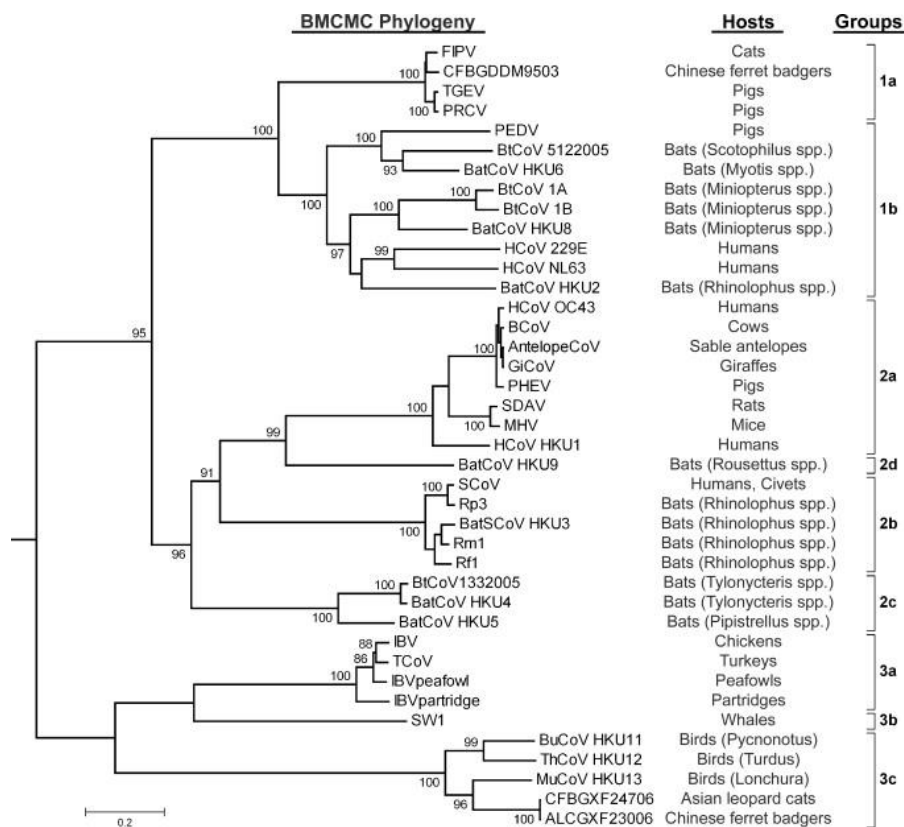


Figure 8. – Arbre phylogénique des CoVs. Tiré de [92] avec permission.

Ceci serait supporté par notre compréhension des divers réservoirs animaux qui permettent la zoonose et la zoonose inverse. Les chauves-souris ont le plus grand réservoir diversifié des CoVs

[33, 91]. Ces virus seraient constamment en croissance dans les populations de chauve-souris alors que chez les autres animaux ils démontrent un patron d'épidémies [91, 93]. Dans les deux cas, les CoV peuvent être maintenus à long terme sous forme entérique [10]. Finalement, l'origine exacte du SARS-CoV-2 est un sujet particulièrement actif de recherche et la séquence la plus similaire provient d'un CoV chez la chauve-souris, le RaTG13 (96.2% similarité) [9]. Ainsi, il est particulièrement important de détecter les nouveaux CoVs issus de transmission zoonotique des chauves-souris.

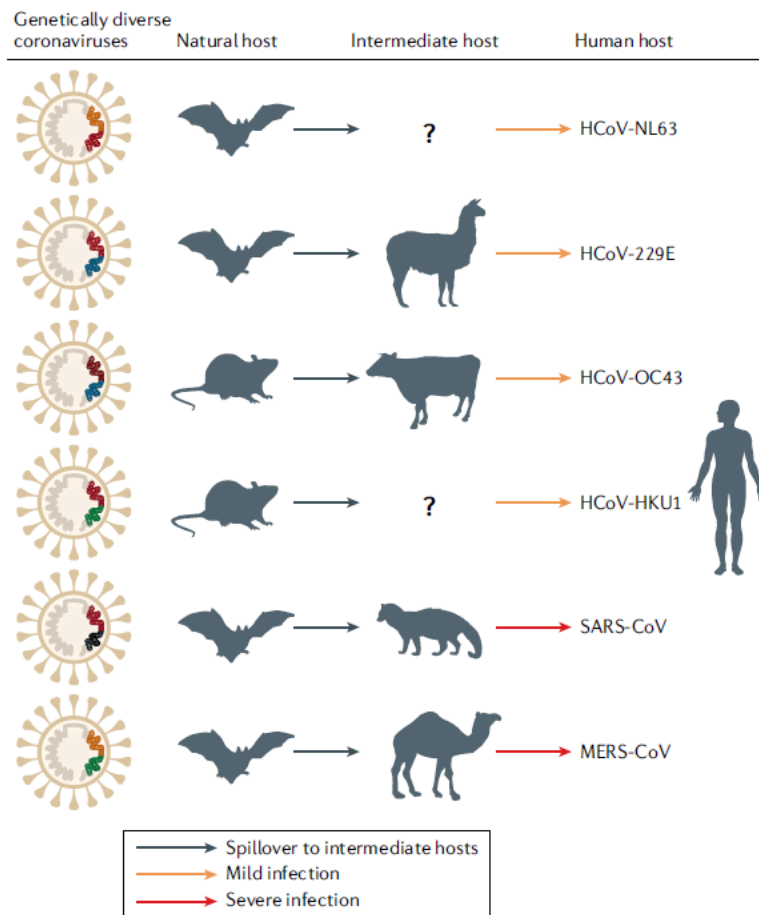


Figure 9. – Modèle de l'origine des hCoVs. Adapté de [94] avec permission.

1.1.11. Transmission et épidémiologie

Les CoVs peuvent se transmettre par la voie respiratoire, la voie fécale orale, par fomites et par gouttelettes et/ou aérosols [95, 96]. La période d'incubation des hCoVs serait de l'ordre de 3 jours et pourrait s'étendre jusqu'à deux semaines pour le SARS et SARS-CoV-2 [4, 97, 98]. L'efficacité de transmission chez un patient est généralement associée à la sévérité de la maladie, mais la transmission asymptomatique et les *superspreaders* sont des phénomènes importants [99, 100]. Les CoVs OC43, 229E, HKU1 et NL63 sont endémiques depuis leur apparition avec des pics d'infections se produisant entre janvier et mars avec des éclosions plus importantes aux 2 à 4 ans et des infections répétées au cours de la vie [101, 102]. Le SARS-CoV-2, après avoir causé une pandémie, est maintenant probablement endémique [103]. En contrepartie, le SARS est disparu soudainement à la suite des efforts de confinement, probablement grâce au fait que les symptômes apparaissent rapidement laissant peu de temps pour la transmission asymptomatique en plus de la sévérité et du haut taux de mortalité [12]. Quant à lui, le MERS se propage seulement par zoonose puisqu'il ne permet pas une transmission communautaire soutenue [69].

1.1.12. Pathologie et pathogenèse

Les pathologies entraînées par les CoV peuvent affecter une multitude de systèmes incluant le système respiratoire, cardiovasculaire, digestif, hépatique, rénal, musculaire et immunitaire [10, 73, 104]. Il faut aussi considérer que le tropisme d'un CoV peut changer rapidement. Pour les HCoVs, le site principal d'infection est soit les voies respiratoires supérieures (OC43, 229E, NL63, HKU1) ou inférieures dans le cas de virus plus létaux (SARS, MERS, SARS-CoV-2) [104]. Ces premiers sont responsables d'environ 30% des rhumes et causent rarement des maladies graves sauf chez les personnes vulnérables tels que les jeunes enfants ou les personnes immunodéprimées [4, 12, 101, 105, 106]. Ces derniers sont caractérisés par des lésions alvéolaires diffuses qui entraîne des lésion pulmonaire aiguë (ALI) menant au syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS) et à la mort [9]. Les taux de mortalité pour ces virus sont estimés à plus de 9% pour SARS en moyenne [107, 108], plus de 30% pour MERS [12] et plus de 1% pour SARS-CoV-2 [16]. La réponse immunitaire est importante pour la pathogenèse et elle peut être exacerbée et dysfonctionnelle. On constate souvent une lymphopénie et une tempête

de cytokines [109, 110]. Particulièrement pour SARS-CoV-2, ceci pourrait expliquer la sévérité moindre de la maladie chez les enfants qui ont un système immunitaire moins réactif [111]. SARS-CoV-2 posséderait également une séquence d'un superantigène au niveau de la protéine S qui amplifierait son impact sur le système immunitaire [38, 112, 113]. Mais encore, le neurotropisme des coronavirus OC43 et SARS-CoV-2 a été démontré et pourrait être impliqué dans des maladies neurodégénératives ou dans le covid long [114-116]. Finalement, les conséquences à long terme des infections, particulièrement pour le SARS-CoV-2, pourraient s'avérer importantes, mais demeurent pour le moment que partiellement connus [112].

Outre les effets de l'infection virale et de la réponse immunitaire déclenchée, la protéine S aurait une importance primaire dans la pathogenèse, ce qui est particulièrement apparent pour SARS-CoV-2. D'abord, sa liaison aux récepteurs serait en cause des altérations cardiovasculaires en déplaçant ACE2 qui est crucial dans le contrôle de la pression artérielle et en infectant les péricytes par CD147 [74, 117, 118]. En plus, elle est en cause de changements pathologiques au niveau du système nerveux incluant des dommages à l'épithélium et l'affectation de la barrière hématoencéphalique et aussi particulièrement au niveau des neurones olfactifs menant à la perte de l'odorat [114, 119]. Il est également connu que la protéine S seule peut entraîner différentes réponses de stress cellulaire [115, 120, 121].

1.1.13. Réponse immunitaire

Il semble avoir une faible corrélation entre le début et la fin des symptômes et l'excrétion virale, surtout pour SARS-CoV-2, celle-ci pouvant commencer quelques jours avant les symptômes et perdurer jusqu'à plusieurs mois dans de rares cas, ce qui démontre une activation de la réponse immunitaire tardive et potentiellement une infection chronique [100, 122]. Les CoVs peuvent activer et inhiber plusieurs composants de la réponse immunitaire. Par exemple, ils peuvent activer l'apoptose [109, 115, 123], l'autophagie [124, 125], inhiber la production d'interféron (IFN), inhiber la présentation d'antigènes et affecter la réponse immunitaire innée et acquise par plusieurs autres mécanismes [50, 55, 126]. Les anticorps produits sont faits principalement contre la protéine S et en moindre partie contre les protéines E et N [127], mais d'autres anticorps contre d'autres protéines (M, HE, etc.) peuvent contribuer [48]. Finalement, la réactivité croisée des

anticorps entre les hCoVs est faible et l'immunité à long terme est incertaine avec plusieurs cas de réinfections confirmés pour différents CoVs [112, 128].

1.1.14. Thérapeutiques et prophylactiques

Les premiers antiviraux et anticorps approuvés chez les humains ont été développés pour SARS-CoV-2. Ceci inclut des anticorps monoclonaux (Sotrovimab, Casirivimab/imdevimab, tixagevimab/cilgavimab, bamlanivivab, etc.), des plasmas convalescents et des antiviraux basés sur plusieurs mécanismes tels que l'inhibition de la réplication ou l'introduction d'erreurs de copie par des analogues des nucléosides agissant sur la *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) (remdesivir, favipiravir, molnupiravir), l'inhibition de la protéase 3CL (nirmatrelvir/ritonavir) ainsi que des modulateurs immunitaires (baricitinib) [129-131]. Précédemment à SARS-CoV-2, aucun vaccin pour les humains n'existait, mais des vaccins pour des CoVs animaux tels que pour IBV, TGEV, *feline infectious peritonitis* (FIPV) et *canine coronavirus disease* (CCoV) avaient déjà été fréquemment utilisées et des vaccins avaient été testés chez les souris pour MERS et SARS [10, 132, 133]. Plusieurs vaccins ont été approuvés au Canada pour SARS-CoV-2 tel que les vaccins par vecteur viral comme *ChAdOx1-s* d'AstraZeneca et *AD26.COV2.S* de Johnson & Johnson, les vaccins par ARNm tel que *Spikevax* de Moderna et *BNT162b2* de Pfizer/BioNTech, le vaccin par *virus-like particles* (VLPs) Covifenz de Medicago et le vaccin protéique Nuvavaxid de Novavax [129]. D'autres vaccins par virus inactivés existent tels que Sinovac [134]. Cependant, en absence de doses additionnelles, leur efficacité à long terme est questionnable, principalement en raison des variants [131]. Certaines thérapies symptomatiques existent (corticostéroïdes, oxyde nitrique, oxygène), mais les cas graves de SARS-CoV-2 restent difficiles à traiter [130, 131]. Aucun thérapeutique ou prophylactique ne sont approuvés pour tous les autres hCoVs. Ceci représente un problème persistant surtout à cause des conséquences à long terme d'infections répétées, des souches mutantes échappant aux anticorps, de la résistance aux antiviraux et du potentiel zoonotique des CoVs [112, 113, 123, 135, 136]. Ainsi, il est critique de développer un arsenal d'outils nous permettent d'étudier les CoVs incluant des modèles rigoureux *in vitro* et *in vivo* en plus de méthodes de détections de pointe pour en faire leur surveillance.

Chapitre 1.2 - Techniques de production et d'analyse

1.2.1. Méthodes d'isolation

Les premiers coronavirus humains ont été isolés à partir de lavages nasaux et cultivés par culture cellulaire (229E sur la lignée cellulaire MRC-5) ou sur culture d'organes (OC43 sur des tissus nasaux ou des trachées d'embryon) [137-139]. D'autres lignées cellulaires ont aussi été utilisées comme la lignée Huh7 (cellules d'hépatome de foie humain) pour l'isolation de OC43 et 229E ou la lignée LLC-MK2 (cellules épithéliales de rein de singe rhésus) pour NL63 [6, 102]. Ces méthodes sont laborieuses avec de hauts taux d'échecs. Par exemple, l'utilisation de multiples lignées cellulaires, de tissus neuronaux et l'inoculation de souris n'ont pas été suffisants pour isoler HKU1 [7]. Les CoVs plus virulents (SARS, SARS-CoV-2) ont été isolés de lavages bronchoalvéolaires et sont plus faciles à isoler en culture cellulaire, mais en pratique le taux de réussite n'est que de 20% [7, 20]. Par exemple, SARS peut être isolé de plusieurs lignées cellulaires de plusieurs types d'organismes incluant les lignées LLC-Mk2, Vero, VeroE6 (cellules épithéliales de rein de singe vert d'Afrique), HEK-293 (cellules épithéliales de rein humain), Huh7 et RK13 (cellules épithéliales de rein de lapin) [140]. Dans le cas de virus difficilement isolables, certains modèles d'épithélium cilié des voies respiratoires humaines en croissance sur supports perméables de type *Transwell* ont été utilisés avec succès comme pour HKU1 [75]. De façon intéressante, les virus sont expulsés seulement du côté apical et les cellules préservent leur intégrité. Ce modèle semble robuste et pourrait récapituler mieux un contexte réel d'infection des voies respiratoires [75, 141]. De plus, pour répondre à certains besoins, la génération de nouvelles lignées cellulaires est possible à partir de cellules primaires. Par exemple, un modèle permissif à des coronavirus de chauve-souris a été obtenu par l'isolation de cellules primaires de chauve-souris, leur immortalisation grâce à des vecteurs viraux (i.e. hTERT et Bmi-1) et leur passage en série [33]. Une autre méthode qui peut être nécessaire pour l'isolation de CoVs est l'utilisation de protéases extracellulaires comme la trypsine [81, 82]. Ceci démontre le manque de modèles standards et la nécessité d'optimisation de ces modèles.

La propagation du virus peut causer l'accumulation de plusieurs mutations et modifier la composition des quasiespèces comparativement à des échantillons cliniques [142]. En

contrepartie, le passage en série est une méthode utilisée pour adapter le virus en culture cellulaire et augmenter les titres ou les effets cytopathologiques (CPE) comme la formation de syncytium [65, 143]. Le passage en série *in vitro* tend à atténuer le virus *in vivo* et vice-versa. Ceci pourrait être causé par l'altération de la voie d'entrée lors du passage en série des CoVs en privilégiant la voie d'entrée endosomale par cathepsine L pour les souches adaptées *in vitro* versus la voie d'entrée par le récepteur et les protéases extracellulaires *in vivo* [144]. Il est donc important de considérer que les souches adaptées aux modèles peuvent différer des souches cliniques [38].

En absence d'isolat clinique, il est possible de séquencer le virus (RT-PCR, séquençage de nouvelle génération *de novo*, etc.) et de le reconstruire synthétiquement, mais ceci représente une méthode laborieuse [9, 36, 75, 142, 145, 146]. Par ailleurs, plusieurs projets de *viromics* dans le monde ont permis d'identifier des milliers de coronavirus chez divers animaux dans diverses régions sans obtenir d'isolats [93, 147]. Cette information peut être utilisée pour modifier génétiquement des isolats préexistants en ajoutant des mutations ou par recombinaison.

1.2.2. Modèles *in vitro*

Il existe différentes limitations pour les modèles *in vitro*. Les CoVs ne produisent pas toujours d'effet cytopathique (CPE) dans les lignées cellulaires. Ceci n'est pas seulement vrai pour les virus moins virulents (i.e. : OC43, 229E, NL63, HKU1) mais aussi en moindre partie pour les plus virulents (i.e. : SARS) [140, 148]. En effet, le CPE n'est pas déterminé par la gravité clinique [139] et il peut même y avoir du CPE en absence de réplication virale [33]. Le CPE est également affecté par le contexte cellulaire (e.g. : nombre de passages de la lignée cellulaire, milieu de culture, confluence, etc.) [139]. Par exemple, deux laboratoires utilisant la même lignée cellulaire ont obtenu d'un côté du CPE transitoire pendant 2 jours et d'un autre côté du CPE pendant 11 jours avec SARS [140]. Conséquemment, le CPE est une mesure non fiable et pose un problème pour certaines méthodes de titration (voir section 2.5) [140, 148]. Une autre limitation importante est la récapitulation de la réponse immunitaire qui est incomplète *in vitro*. Ceci est cependant un avantage pour la production de virus. Par exemple, les cellules Vero, qui sont déficientes en

interféron du groupe I, mais pas du groupe II (e.g. interféron γ), permettent une plus grande production de virus après un *knock-out* du gène ou du récepteur de l'interféron γ par CRISPR [149].

Plusieurs modifications génétiques de lignées cellulaires peuvent augmenter la production de virus dans des modèles *in vitro* incluant la surproduction du récepteur (e.g. ACE2) ou l'ajout de gènes de protéases (e.g. TMPRSS2, furine) [79, 80, 150]. Bref, ceci permet aux modèles *in vitro* d'être particulièrement utiles pour la production de virus une fois optimisés.

1.2.3. Modèles *in vivo*

Plusieurs modèles animaux ont été testés et utilisés pour l'étude des coronavirus incluant les souris et souris transgéniques humanisées (i.e. : hACE2) [151, 152]. Plusieurs caractères ont pu être récapitulés chez la souris incluant : la susceptibilité selon l'âge, la récupération de virus dans les tissus et sécrétions respiratoires, l'infection de cellules comme les pneumocytes, les cellules bronchiales et épithéliales ainsi que la détection du génome viral dans le sang et tissu extrapulmonaire [153]. Cependant, la symptomatologie et la progression de la maladie peuvent varier. Plusieurs paramètres peuvent être importants incluant la présence de co-infection, le stress, la différence entre les sous-espèces ainsi que la souche virale utilisée [153]. Cependant, certains animaux peuvent supporter la réplication du virus sans toutefois avoir des symptômes de la maladie ou supporter la réplication virale, ce qui peut être surmonté par le passage en série [154]. Par exemple, le SARS peut être adapté pour causer des infections létales chez la souris après 15 passages et aussi peu que 6 substitutions d'acides aminés dans l'ORF 1ab et l'ORF de S et de M [153]. De façon similaire, le OC43 peut induire des maladies neurologiques après seulement un passage et des encéphalites létales après aussi peu que 2-4 passages [38] et peut causer des maladies respiratoires mortelles après 9 passages apportant 9 mutations dans l'ORF 1ab et l'ORF de S et de N) [154]. Cependant, les α -CoVs tels que le 229E, peuvent difficilement franchir la barrière des espèces même avec des modèles humanisés, ce qui peut parfois être surmonté par l'utilisation d'animaux immunodéficients [10, 155]. En somme, les modèles

animaux sont utiles pour récapituler l'immunité et les symptômes, ce qui permet l'évaluation des traitements potentiels, mais ils nécessitent plus d'optimisation pour les CoVs [154, 156].

1.2.4. Méthodes de production

Les avantages décrits ci-haut font en sorte que les modèles *in vitro* avec des lignées cellulaires sont généralement utilisés pour la production de virus. Le virus est récolté soit dans la fraction extracellulaire (milieu de culture) ou à la fraction cellulaire (culot de cellule). La cinétique de l'infection fait en sorte que le pic de virus produits dans la fraction extracellulaire peut être décalé de plusieurs heures versus la fraction cellulaire [157]. Selon l'application (i.e. : protéomique, virométrie en flux, etc.), des méthodes de purification et de concentration peuvent être utilisées. Celles-ci consistent généralement à la centrifugation des virus à haute vitesse (e.g. 80 000 x g) avec ou sans coussin de sucrose et quelquefois l'ajout d'une étape de précipitation préalable (e.g. polyéthylène glycol, sulfate d'ammonium) pour obtenir un culot de virus qui peut être resuspendu dans un volume minimal [18, 48, 158, 159]. Ces méthodes peuvent permettre d'obtenir jusqu'à 10^{10} virions par mL pour certains CoVs [159]. Ces méthodes ne semblent pas purifier des virions vides en ARN, car la protéine N est nécessaire pour la formation du virion et celle-ci est liée directement à l'ARN viral [56]. Cependant, un problème potentiel est la perte du domaine S1 (*shedding*) de la protéine S durant la purification, car cette protéine est sensible aux forces mécaniques ou chimiques [17, 118, 159]. Puisque cette protéine est cruciale pour l'infection, cela peut rendre les virions non infectieux. Certaines méthodes telles que la virométrie en flux ou l'EM permettent d'estimer le nombre de particules défectives [29, 160].

La stabilité des CoVs varie en suspension à température pièce (72h pour 229E, plus de 9 jours pour SARS et plus de 14 jours pour NL63) [161-163]. À 4°C, le virus peut être stable pendant longtemps (56 jours pour NL63) [162]. Un fait intéressant à noter est que certaines méthodes de préparations comme la lyophilisation peuvent induire des agrégats de virus et la conservation des échantillons pendant de longues périodes à 4°C permet de dissoudre les agrégats. Les agrégats posent un problème dans la préparation des CoVs par ultracentrifugation ou par précipitation. Un échantillon mal homogénéisé entrainer des erreurs pour diverses applications incluant la

titration. Cependant, pour de longues périodes, les échantillons sont conservés à -80°C après les avoir congelés dans de l'azote liquide. Également, il est important de limiter le nombre de cycles de congélation et décongélation ce qui peut réduire le titre viral. Finalement, selon l'application, différentes méthodes de fixations (formaldéhyde, méthanol, etc.) sont utilisées pour rendre l'échantillon non infectieux et maintenir sa stabilité [161].

1.2.5. Méthodes de titration

Les deux méthodes les plus utilisées pour faire la titration de virus sont les essais de plaques et le TCID₅₀. Cette première méthode consiste à l'infection de cellules et l'utilisation d'un milieu visqueux pour limiter la propagation du virus en solution (agarose, méthylcellulose, etc.). Au cours de l'infection, les virus (lytiques) devraient causer la mort cellulaire et produire ainsi des plaques. Ces plaques sont observables au microscope et peuvent être comptées après avoir enlevé le milieu et avec l'utilisation d'un colorant comme le *crystal violet* [164]. Certains colorants comme *Neutral Red* sont des colorants vitaux ce qui permet de distinguer des cellules mortes même en absence de CPE ce qui peut rendre l'essai plus sensible [157]. Selon la dilution utilisée et le nombre de plaques, cela permet de calculer une valeur dénommée *plaque forming units* (PFU). La limitation majeure comme démontré plus loin, est la production de plaque circonscrite qui correspond bien à un virus unique. Par exemple, les MRC-5 ne produisent pas de plaques visibles avec 229E, mais la génération de clones permissifs de MRC-5 a permis l'obtention de petites plaques de moins de 1 mm [139]. Cependant, certains isolats de 229E et OC43 peuvent eux produire de larges plaques (15 mm), mais avec des bordures mal définies [4, 157, 165]. Une deuxième méthode, par TCID₅₀, utilise plutôt des dilutions en série et l'observation du CPE ou l'utilisation d'anticorps spécifiques pour déterminer la présence d'infection dans un puit. La valeur obtenue est alors donnée en *tissue-culture infectious dose* (TCID₅₀). Puisque cette dernière valeur correspond à un nombre de virus pour obtenir une infection de 50% des puits, ce nombre peut être comparé au PFU par une relation mathématique en multipliant le TCID₅₀ par 0.7 [166]. Ces méthodes quantifient le nombre de virions infectieux produisant une infection visible (CPE) ou détectable par un anticorps. Puisque le titre viral dépend du contexte cellulaire (type de cellule

productrice, type de cellule infectée, milieu de culture, temps d'infection, MOI, etc.) et du type de marquage (soit par CPE ou par anticorps), il n'y a pas de consensus sur la définition de titre viral. Sachant que les différentes lignées cellulaires et isolats peuvent être plus ou moins permissives, il est donc vital d'avoir un modèle optimisé de titration. Par exemple, certains clones cellulaires moins permissifs peuvent démontrer des titres apparents de $<10^3$ *Plaque forming units* (PFU)/mL ce qui ne représente pas le vrai titre viral [33]. Le modèle devrait être le plus sensible possible et permettre le plus grand tropisme pour le virus en question. Finalement, une utilité majeure de ces méthodes de titration est le criblage d'antiviraux [143, 165].

1.2.6. Méthodes de détection

Outre les méthodes de titration, il est également possible de détecter les CoVs par d'autres approches dont des tests de fixation du complément, des essais de neutralisation, des essais d'hémagglutination pour les virus possédant une HE [22], des ELISA [10] et pour la détection de l'ARN viral, la RT-PCR. De plus, les méthodes en microscopie incluent l'immunofluorescence (IFA), le marquage par sondes nucléiques fluorescentes (FISH, smiFISH), l'utilisation de système CRISPR avec des gRNA fluorescents et le marquage de Cas9 [167]. Les méthodes de microscopie électronique inclut l'EM, la cryo-EM (détection des virions) ainsi que l'immuno-EM et la cryo-immuno-EM (détection des protéines virales sur les virions grâce à l'utilisation d'anticorps) [168]. De plus, l'utilisation de virus recombinants compétents exprimant des protéines fluorescentes de la réplicase ou de la protéine S est possible [169-171].

Les méthodes de détections sont importantes pour le développement de tests moléculaires cliniques. Or, il existe une multitude de méthodes et certaines peuvent manquer de sensibilité ou être trop laborieuses. Notamment, une autre méthode de pointe qui pourrait répondre aux lacunes des méthodes énoncées est la virométrie en flux, sera discutée plus loin à la section 4.

Chapitre 1.3 - Tests moléculaires cliniques

1.3.1. Considérations générales

Une des mesures prioritaires durant une épidémie est la détection des cas de personnes infectées pour permettre de les isoler, d'effectuer une recherche des contacts et, ultimement, de les traiter. Le diagnostic clinique prend en considération le profil clinique et la probabilité ou le risque estimé d'avoir contracté la maladie. La symptomatologie est limitante puisque beaucoup de cas asymptomatiques existent pour les coronavirus humains [172]. Pour le SARS-CoV-2, une radiographie thoracique peut avoir une sensibilité jusqu'à 97% au site des éclosions, mais ne peut pas être considérée comme unique déterminant du diagnostic [173]. Les tests diagnostiques moléculaires sont essentiels. Pour les CoVs, il existe deux grandes catégories de méthodes soit les tests à acide nucléique (NATs) détectant l'ARN viral et les tests par détection de protéines comme les protéines virales (antigéniques) ou les anticorps produits (sérologiques). Les types de tests varient selon leur sensibilité, spécificité, l'échantillon analysé, le coût, le temps et la facilité de la méthode.

1.3.1.1. Types d'échantillons

Les échantillons collectés pour les tests NATs et les tests antigéniques rapides sont généralement pris des voies respiratoires supérieures (nasopharyngées, oropharyngées, salive) ou inférieures (expectorations, aspirations endotrachéales, lavages bronchoalvéolaires) [174]. Le type d'échantillon affecte la sensibilité de la méthode avec les lavages bronchoalvéolaires plus sensibles que l'oropharyngé par exemple [173]. Les tests NATs peuvent aussi être appliqués pour les échantillons de selles, particulièrement pour la surveillance épidémiologique dans les eaux usées [175, 176]. Il a aussi été démontré que ces tests pouvaient détecter la présence de génomes viraux de SARS-CoV-2 jusqu'à 4 semaines après l'infection dans les selles, indiquant la chronicité potentielle et la transmission durable des hCoVs [177]. En revanche, les tests sérologiques dépendent d'échantillons sanguins puisqu'ils détectent les anticorps produits suivant une infection.

1.3.1.2. Spécificité et sensibilité

La spécificité et la sensibilité sont des facteurs importants pour réduire le nombre de faux positifs et de faux négatifs respectivement [172]. La détermination de ceux-ci peut être faite *in vitro* avec un analyte purifié (i.e. génome viral) ou avec de vrais échantillons de patients dopés avec l'analyte ou positif. Dans les deux cas, il y a des considérations importantes. Dans le cas d'un analyte purifié ou d'un échantillon dopé, ceci ne représente pas nécessairement la condition réelle. Dans le cas d'échantillons de patients positifs, ils doivent être classifiés préalablement par une autre méthode *gold standard* comme le séquençage [172]. Ainsi, les valeurs de spécificité et sensibilité des tests peuvent être surestimées. Pour augmenter notre confiance, plusieurs tests et de types de tests peuvent être utilisés en plus de combiner plusieurs types d'échantillons [178, 179].

1.3.1.3. Limitations générales des méthodes

Tous les tests communément utilisés à ce jour possèdent une limitation importante du fait qu'ils détectent des produits du virus ou de la réponse aux virus et non les virions eux-mêmes. Donc, ceux-ci ne nous informent pas sur la présence de virions infectieux. Par exemple, la détection du virus par NATs dans les selles ne peut pas nous informer sur la voie de transmission en absence d'information sur l'infectiosité [175]. De plus, il est possible d'obtenir des virus cultivables chez un patient plusieurs semaines après une infection sans pouvoir détecter les antigènes [10]. Ceci est important pour mieux comprendre la dose minimale infectieuse, la transmission virale, pour élucider la dynamique virale et la sévérité en relation au cycle de réplication du virus, ce qui peut être très important en termes de pathologie [172]. Une méthode de détection basée sur la virométrie en flux pourrait pallier certaines lacunes en quantifiant directement le nombre total de virions, en utilisant divers marqueurs démontrant l'intégrité des particules et en permettant leur tri pour une étude plus poussée de leur infectiosité. Les limitations spécifiques des méthodes sont présentées brièvement dans les prochaines sections.

1.3.2. Tests d'acides nucléiques (NATs)

1.3.2.1 Méthodes PCR

Les tests d'acides nucléiques qui permettent de détecter les séquences spécifiques d'ARN viral sont faits principalement par RT-qPCR, une méthode considérée comme le *gold standard*.

Plusieurs contrôles positifs et négatifs existent tel que pour l'extraction d'ARN (utilisation d'une séquence aléatoire d'ARN), pour l'amplification (plasmide avec un gène du virus) ou pour la non-spécificité (séquences d'autres CoVs, échantillons de patients en santé) [175, 180]. Le résultat est exprimé en copies d'ARN/mL qui est estimé selon seuil de cycle (Ct). La valeur de Ct mesure le nombre de copies d'une séquence viral (e.g. gènes N, S, RdRp, etc.) qui n'est pas nécessairement égal au nombre de copies du génome [174, 178, 180]. De plus, cette valeur peut s'avérer élevée même chez des patients asymptomatiques [181].

Selon la conception des amorces en ciblant des séquences plus ou moins conservées, il est possible de limiter le test à des variants ou de l'élargir à plusieurs CoVs. Des systèmes multiplexes RT-PCR basé sur ce principe existent aussi, ce qui peut augmenter la sensibilité [182]. La PCR nichée est une variante qui permet aussi d'augmenter la sensibilité. Finalement, pour obtenir une quantification absolue et augmenter la sensibilité, il existe le PCR digital (ddPCR) basée sur la dilution des particules dans des nanogouttelettes [183, 184]. Leur spécificité et sensibilité varient significativement selon le test. La spécificité est autour de 95% et la sensibilité de 71-98% avec une limite de détection de <10 copies/réaction [180]. Le temps et les conditions de la collection jusqu'à l'analyse sont importants pour le succès du test et certaines formalités peuvent affecter les tests NATs telles que l'inhibition de la PCR par des contaminants [174].

1.3.2.2 Autres méthodes NATs

Des alternatives au PCR peuvent exiger moins d'appareil et de techniciens spécialisés en performant une réaction isotherme. Ceci permet leur application directement au point de service (point-of-care, POC). Ceci inclue la *loop-mediated isothermal amplification* (RT-LAMP), la *rolling circle amplification* (RCA), la *nicking endonuclease amplification reaction* (NEAR) et la recombinaise polymerase amplification (RPA) [185]. RT-LAMP utilise de multiples sondes en boucles qui permet de cibler un gène formant des structures en forme d'haltères qui permettent de produire des concatémères par amplification isothermique dans un seul tube et la réaction est détecté par turbidité et fluorescence [178]. La RCA est basée sur l'amplification du génome viral par des sondes circulaires spécifiques et une ADN polymérase qui permet le déplacement du brin. La réaction dépend de l'efficacité de ligation [178]. La RPA utilise une recombinaise et une protéine se liant à l'ADN simple brin pour déplacer la séquence et permettre la liaison de la sonde

et l'amplification de la séquence [178]. Quoique ces tests sont généralement moins coûteux et plus rapides, leur spécificité et sensibilité peuvent être comparables au PCR, mais sont souvent inférieures, surtout en termes de détection de variants.

1.3.3 Tests sérologiques et antigéniques

1.3.3.1 Tests sérologiques

Ces tests permettent l'identification d'anticorps du patient. Ils peuvent être utilisés pour déterminer la présence d'une infection passée et sont donc rétrospectifs puisque le sérum convalescent peut prendre 2-4 semaines pour être produit. De plus, un échantillon avant infection peut être nécessaire puisque la réactivité croisée avec d'autres CoV est possible [174]. La durabilité des anticorps contre les coronavirus n'est pas bien étudiée, mais est estimée à 2-3 ans pour SARS et d'autres coronavirus [16].

Certaines méthodes de type ELISA permettent la détection des anticorps de séroconversion (IgG, IgM, IgA, etc.) sur des microplaques recouvertes d'antigènes spécifiques et la détection se fait par anticorps secondaire couplé, par exemple, à la *horseradish peroxidase* [180]. L'étude de la réponse immunitaire du virus peut être étudiée par ces méthodes avec les IgM étant les premiers produits (3-7 jours), les IgA ensuite (7-25 jours) et finalement les IgG. Ces premiers déclinent rapidement, mais le maintien des IgG peut durer jusqu'à 100 jours [180, 186]. Cette méthode peut être multiplex avec différents antigènes produits par protéines recombinantes. La spécificité de la méthode peut alors être élevée pour les IgM et IgG respectivement (100%, 90.9%) alors que la sensibilité peut être faible (85%, 75-93%). La sensibilité varie beaucoup selon la période d'analyse avec les deux premières semaines post-infection étant les plus sensibles [180]. De plus, la précision de la méthode peut varier, car les antigènes utilisés ne représentent pas toujours l'antigène dans sa forme native chez une infection. Par exemple, la glycosylation peut manquer lors de la production chez des systèmes non mammifères [180]. Ainsi, ces méthodes peuvent être coûteuses, lentes et nécessiter des réactifs et du matériel spécifique.

1.3.3.2. Méthodes antigéniques

Ces méthodes permettent de faire des tests rapides avec une bonne spécificité, mais une très faible sensibilité. Elles sont basées sur l'utilisation d'anticorps détectant les antigènes viraux et sont généralement adaptées sur un *lateral flow assay* (LFA). Le LFA consiste à une chromatographie sur papier où l'échantillon est déposé et migre progressivement d'un côté jusqu'à l'autre en passant par une région qui contient un anticorps qui peut faire sa capture et donner un signal tel qu'une coloration [187]. L'anticorps peut aussi bien détecter un antigène viral qu'un anticorps produit en réponse aux antigènes viraux. L'avantage principal est que cela peut être fait au POC par l'utilisateur [180] mais le désavantage est que cette méthode est généralement peu sensible [187]. D'autres méthodes antigéniques ou sérologiques pour la détection des coronavirus incluent des *microarrays* pour la détection d'épitopes spécifiques, des essais de neutralisation viraux, l'immunobuvardage pour la détection de protéines virales, et l'immunofluorescence (IF) [185]. Cependant, ces méthodes sont généralement utilisées en recherche et non pour le diagnostic.

1.3.4. Autres types de tests

Il existe d'autres tests qui ne sont pas classiquement attribués aux deux catégories précédentes. Par exemple, le séquençage complet du virus apporte une information complète sur les mutations et permet d'identifier les variants importants (VOCs), mais est dispendieux et laborieux. Cette méthode est cependant utilisée pour la surveillance épidémiologique avec plus de 17 000 génomes du SARS-CoV-2 identifiés peu après la pandémie [180]. De plus, la culture de virus en laboratoire permet réellement l'isolation de virus infectieux, mais cette méthode est très variable et n'est donc pas utilisée pour le diagnostic [174]. La méthode de micro RMN est aussi en développement pour le test diagnostic. Finalement, une méthode promettante est le *proximity ligation assay* (PLA) qui utilise plusieurs aptamères marqués par de l'ADN ou des anticorps pour permettre l'amplification de la séquence seulement lorsque la cible est liée. Cette méthode est particulièrement intéressante puisqu'elle permet être faite sur des virions intacts quoiqu'elle ne permette pas leur distinction [178].

1.3.4.1 Tests basés sur CRISPR

Ceux-ci représentent une autre catégorie de tests émergents basée sur la spécificité du système CRISPR (*clustered regularly short palindromic repeats*) sur la détection d'une séquence d'acide nucléique. Celui-ci consiste en un guide d'ARN (gRNA) et la protéine Cas (*CRISPR-associated protein*) qui permet, selon le type de guide et de protéine, de reconnaître des séquences d'acide nucléiques telles que l'ARN et l'ADN et d'effectuer différentes réactions enzymatiques telles que la ligation ou la dégradation. Deux méthodes importantes ont été développées nommées DETECTR et SHERLOCK. La programmabilité de ces systèmes permet une résolution à une seule paire de bases pour la détection des variants ou pour la détection de séquences conservées chez les CoVs. DETECTR (*DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter*, Mammoth Bioscience), développé par le groupe de Jennifer Doudna a précédemment été utilisé pour la détection de différents virus tels que HPV. Cette méthode utilise la Cas12a, qui a comme activité collatérale la dégradation d'ADN à proximité, ce qui permet l'utilisation d'une sonde d'ADN reportrice contenant un quencher et un fluorophore qui change de conformation après la liaison à la cible [188]. Cette méthode est rapide (30 mins), peu coûteuse et peut être implémentée comme LFA [189]. Elle peut être combinée à une méthode de RT-LAMP isotherme avec des sondes spécifiques à la séquence en question [189]. SHERLOCK (*Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing*, Sherlock Bioscience) a été développé par le groupe de Zhang Feng en 2018 au *Broad Institute* du MIT et a précédemment été utilisé pour le virus du Zika, dengue, diverses bactéries et même la détection de *single nucleotides polymorphism* (SNPs) [188, 190]. Cette méthode est similaire à DETECTR, mais utilise une Cas13 nucléase qui reconnaît l'ARN viral et clive une sonde d'ARN reportrice. SHERLOCKv2 a permis l'avancement de cette méthode en multiplexant la méthode en utilisant des Cas13 de différentes espèces avec des préférences pour des motifs permettant différentes sondes reportrices avec différents fluorophores. Cette méthode est également rapide, peut être implémentée en LFA et en POC [191, 192]. Ces méthodes sont en théorie ultra-sensibles en termes de détection de l'acide nucléique, mais en clinique cette sensibilité varie. Les sensibilité et spécificité de ces méthodes varient de 93.1-95% et 98.5-100% respectivement [191, 193]. D'autres méthodes basées sur Cas9 avec des PAMer ou Cas10 pourraient aussi être utilisées

cliniquement dans le futur [167, 194]. Ainsi, ces méthodes représentent des alternatives qui peuvent être supérieures aux tests antigéniques rapides.

Chapitre 1.4 - Virométrie en flux

1.4.1. Historique et principe général

La cytométrie en flux a d'abord été développée en 1965 comme analyseur et trieur de particules et a ensuite trouvé son application principale pour l'analyse des cellules (cyto-) en solution. Ceci a mené à une méthode utilisant la fluorescence (*fluorescence activated cell sorting, FACS*) [195, 196]. La virométrie en flux est l'analyse des particules virales plutôt que des cellules. Celle-ci, ainsi que l'analyse des particules extracellulaires ou exosomes, est incluse sous l'appellation cytométrie en flux à l'échelle nanométrique (*nanoscale flow cytometry*) [197, 198]. Elle a été développée en premier en 1979 pour l'étude des bactériophages [199]. Avec le temps, les méthodes ont été raffinées et plusieurs virus ont été analysés incluant entre autres le HSV-1 [200], le HIV, le Nipah, le Junin, le dengue et le CoV *mouse hepatitis virus* (MHV) [201, 202]. L'avantage principal des méthodes en flux est l'analyse quantitative à haut débit de populations de particules avec une résolution qui permet l'étude de sous-populations, ou même de particules uniques, ce qui n'est pas permis par les méthodes traditionnelles [203]. Ainsi, les méthodes biochimiques analysent généralement une population complète sans pouvoir analyser les particules individuelles et les méthodes de microscopie permettent l'analyse de cellules ou particules individuelles, mais sans pouvoir nous informer sur la population complète [204]. Cet avantage des méthodes en flux permet, par exemple, l'identification des types de capsides chez le HSV-1 [26, 205] et le *single-virus genomics* [206]. L'analyse de différentes particules est faite par marquage fluorescent spécifique (i.e.: anticorps) ou non spécifique (e.g. marqueur ADN/ARN), ce qui peut être utilisé pour le compte, le tri et la purification de virus [200, 201, 207, 208] ainsi que l'analyse des antigènes et protéines de l'hôte [204]. Ceci peut nous informer sur les quasiespèces de virus générés durant une infection ainsi que de quantifier les particules virales défectives [204].

1.4.2. Application du cytomètre en flux pour la virométrie

Les virus ont généralement des tailles trop faibles pour pouvoir être détectées facilement avec les seuils de la plupart des cytomètres en flux (300-500 nm) à cause du bruit de fond [201, 209,

210]. Certains appareils spécifiquement développés pour les particules nanométriques sont équipés de détecteur FSC avec grand angle réduit (*reduced wide-angle FSC*) qui permet de réduire le bruit de fond en détectant les angles de 15°-70° et excluant les angles de 0°-15°, des lasers plus puissants, de meilleures méthodes d'amplification du signal pour les détecteurs (PMT haute-performance ou DFS) et des cellules d'analyses plus petites [29, 201, 211-213]. Il est aussi possible d'adapter l'utilisation de cytomètres communs en utilisant une pression réduite avec un plus grand *nozzle* (130 μm vs 100 μm) et de réduire le bruit de fond en filtrant le *sheath fluid* et en lavant la tubulure [201]. Ensuite, la fluorescence peut être utilisée par plusieurs méthodes incluant des colorants non spécifiques marquant une panoplie de cibles communes telles que les enveloppes lipidiques (DiD, DiO, etc.), les acides nucléiques (Série Syto, SYBR-green, etc.) ou grâce à des méthodes spécifiques telles que la modification génétique du virus pour l'expression de protéines fluorescentes ou des anticorps couplés à des molécules fluorescentes (voir Figure 10) [201]. Ainsi, il est possible d'analyser des virus allant de 40 nm jusqu'au virus géant (1 μm).

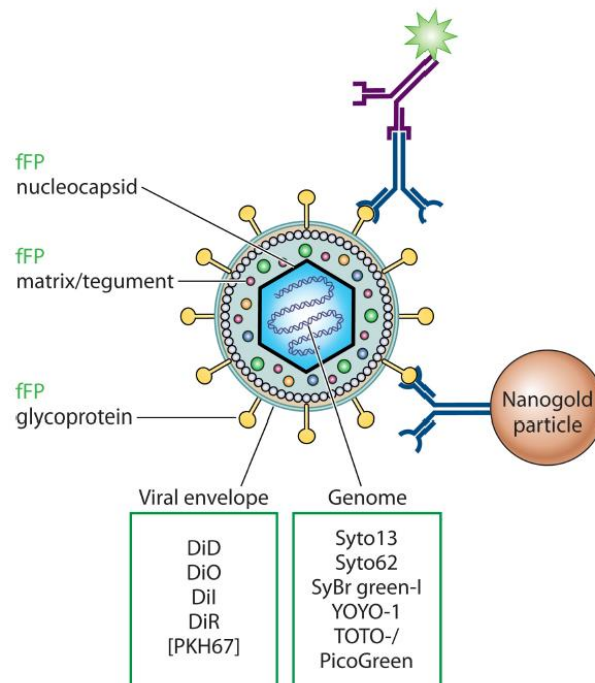


Figure 10. – Méthodes de marquages en virométrie en flux. Tiré de [201] avec permission.

Plusieurs contrôles peuvent être utilisés pour valider la virométrie. Ceci inclut la dilution en série de l'échantillon et le mélange de virus marqués par différents fluorophores pour vérifier la présence de doublets (deux ou plusieurs particules étant comptés comme un seul événement) ou l'utilisation de la microscopie électronique pour estimer la quantité de particules dans l'échantillon. Des méthodes de standardisations peuvent aussi être utilisées pour rendre reproductibles les résultats sur différentes machines avec l'utilisation de billes standardisées ou de particules biologiques de référence [198]. Cela mène à l'établissement d'une méthode reproductible et quantitative pour différents échantillons sur différentes plateformes de cytométrie.

1.4.3. Application aux coronavirus

Les CoVs sont de bons candidats pour l'application de la virométrie en flux. Ils ont des tailles supérieures à la limite de détection précédemment testée en virométrie en flux (~100 nm versus 40 nm) [10, 16, 19, 214], ils incorporent un génome d'ARN qui peut en principe être marqué par certains colorants de type Syto [215, 216]. En outre, les CoVs possèdent une ou deux protéines en surface qui peuvent être marquées par des anticorps, soit la protéine S qui forme des protrusions atteignant 9-21 nm et la protéine HE avec des protrusions atteignant 8 nm. La virométrie en flux est une méthode qui est utile pour l'analyse des virus. La méthode peut être utile pour compter, trier et caractériser les virus. Par exemple, cette méthode a été utilisée pour établir la pureté, faire l'analyse d'agrégats de particules virales et de quantifier l'expression de protéines en surface tel que la protéine S dans des préparations de virus pour des vaccins [217]. Il est également possible d'étudier la composition des particules défectives et l'hétérogénéité des virus (sous-populations virales) [200]. Finalement, une application innovatrice appelée le *single-virus genomics* est également en développement. Celle-ci permet d'identifier des virus sans faire leur isolation dans plusieurs types d'échantillons en plus de pouvoir séquencer chaque particule virale individuelle [206]. Aucune application clinique de cette méthode n'a encore été développée quoique celle-ci pourrait mener à une méthode de diagnostic pour quantifier le nombre de particules virales et potentiellement les identifier par des anticorps ou par le *single-virus genomics*.

Chapitre 2 - Hypothèse et objectifs

Les CoVs sont des pathogènes importants comme démontré par SARS-CoV-2. Les outils actuels pour l'étude des CoVs possèdent certaines limitations.

Premièrement, les hCoVs plus virulents, incluant SARS-COV-2, nécessitent un laboratoire de biosécurité niveau 3 (BSL-3) alors que les moins virulents nécessitent seulement un laboratoire de biosécurité niveau 2 (BSL-2). Ainsi, ces derniers sont attrayants comme modèle alternatif. De ceux-ci, seulement OC43 et HKU1 sont du même genre que SARS-CoV-2, soit du genre β -CoV. Puisque OC43 a été plus étudié et dispose d'une plus grande littérature que HKU1, celui-ci représente le meilleur choix. En premier lieu, nous avons testé et comparé avec la littérature plusieurs modèles *in vitro* et plusieurs méthodes de titration et de production de virus. Considérant la variabilité obtenue par ces méthodes, nous avons émis l'hypothèse qu'elles nécessitent une optimisation pour être rigoureuses. En comparant différentes lignées cellulaires, variants de O43 et les paramètres de différentes méthodes, nous avons établi une méthodologie rigoureuse et sensible pour la titration et la production de virus.

Deuxièmement, les méthodes courantes de détection et de tests moléculaires cliniques ne permettent pas l'analyse des particules virales complètes. Considérant que la virométrie en flux est une méthode de pointe permet l'analyse et la quantification des particules virales et qu'elle est utilisées pour d'autres virus, nous avons émis l'hypothèse que cette méthode pourrait être utile aux CoVs. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord développé des méthodes pour la purification et la concentration de OC43 servant d'échantillon pour la virométrie en flux. Ensuite, nous avons testé différents marqueurs, ce qui nous a permis d'identifier spécifiquement les particules virales et de les quantifier.

Chapitre 3 - Résultats

Préface

La section résultats est hybride. La première partie est un article publié nommé *Optimizing human Coronavirus OC43 growth and titration* qui réponds à notre premier objectif en établissant des modèles de titration et de production du virus OC43. La deuxième partie porte sur le développement d'une méthode de purification et de concentration de virus et son étude en virométrie en flux à l'aide de différents marqueurs.

Chapitre 3.1 - Optimizing human Coronavirus OC43 growth and titration [148]

Christopher Savoie¹ and Roger Lippé^{1,2}

¹Centre de Recherche du CHU-Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Pathology and Cell biology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Published in PeerJ the 8th July 2022.

Christopher Savoie conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared Figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.

Roger Lippé conceived and designed the experiments, analyzed the data, prepared Figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the article, funding, and approved the final draft.

Funding

This work was supported by funds provided by the University of Montreal Faculty of medicine and the CHU-Sainte-Justine Foundation as well as the Canadian Institutes of Health Research (MOP 82921). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors: University of Montreal Faculty of medicine. CHU-Sainte-Justine Foundation. Canadian Institutes of Health Research: MOP 82921.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We are indebted to Drs. Pierre Talbot and Marc Desforges for providing HCoV-OC43 reagents, protocols, expertise and the latter for his critical reading of the manuscript. We also wish to thank Drs. Hugo Soudeyins and Ariane Larouche for sharing the Huh7.5 cell line and Drs. Greg McCormick and Nathalie Grandvaux for their coronavirus expertise. We wish to highlight the support of Marie-Josée Lacombe, Catherine Vandal and Sandrine Marqueteau for producing viral stocks.

3.1.1 Abstract

Coronaviruses have been at the forefront of the news for the last 2 years. Unfortunately, SARS-CoV-2, the etiologic agent for the COVID-19 pandemic, must be manipulated in biosecurity level 3 settings, which significantly limits research. Meanwhile, several less pathogenic human coronaviruses (HCoV) exist and can be studied in much more common biosafety level 2 laboratories. Among them, HCoV-OC43 is a good surrogate candidate for SARS-CoV-2 since both are phylogenetically related human Betacoronaviruses. However, one issue has been the lack of standardized means among laboratories to propagate and titer this less virulent coronavirus. The present study probes the optimal parameters to propagate HCoV-OC43. First, testing of five different cell lines (MRC-5, Huh7.5, Vero, HCT-8, HRT-18) indicated that the physiologically relevant MRC-5 human lung cell line produced among the highest viral titers. HRT-18 may however be an interesting alternative as they are quick growing cells that also led to higher viral titers and a better tropism for various HCoV-OC43 variants. We also probed the impact of serum and temperature during viral expansion and confirmed that the normal temperature of the upper respiratory track (33 °C) improves viral yields over the typical 37 °C used to grow many other viruses. Meanwhile, we did not notice any evidence that serum concentrations significantly affected the virus but interestingly noted that the virus grew quite efficiently in a serum-free media formulation. Meanwhile sonication of viral stocks somewhat improved viral titers. Four titration methods (plaque assays, TCID50-CPE, TCID50-IFA and TCID50-IPA) were also probed using two cell lines (VeroE6 and HRT-18). In our hands, plaque assays proved unreliable and quantification of the virus by scoring CPE positive wells was significantly less sensitive than antibody-based assays (IFA and IPA). While the latter methods were equally sensitive, we favor the TCID50-IPA method since simpler, faster and cheaper than the IFA protocol. Moreover, the HRT-18 cells appeared more sensitive to quantify the virus. Perhaps most importantly, these optimized protocols routinely led to high titer viral stocks in the order of 10^8 TCID50/ml magnitude, which should fulfill the requirements of most experimental settings.

3.1.2 Introduction

The COVID-19 pandemic reminds us of the importance of developing tools and methods to study coronaviruses. Among them are the endemic human coronaviruses HCoV-229E, -NL63, -OC43 and -HKU1 that have long been associated with mild respiratory diseases but also neurodegenerative diseases [38, 128, 218]). These belong to the same family as the more pathogenic and more recently characterized MERS-CoV, SARS-CoV and SARS-CoV-2, with which they share a similar viral life cycle. Unfortunately, these clinically critical coronaviruses require biosafety level 3 facilities, which is limiting. Meanwhile other human coronaviruses can be manipulated in widely available biosafety level 2 laboratories. Most interestingly, HCoV-OC43 is phylogenetically highly related to SARS-CoV-2 and belong to the same Betacoronavirus genera[88]. It has thus been considered an appropriate surrogate virus for SARS-CoV-2[29, 165, 219].

Despite years of research, HCoV-OC43 remains a somewhat difficult virus to grow so that optimized growth conditions and standardized titration methods are still lacking. Consequently, diverse cell lines have been tested including, but not limited to: FT (diploid fetal tonsil)[157], RD (heteroploid rhabdomyosarcoma) [157, 165, 220], BS-C-1 (monkey kidney)[165], HCT-8 and HRT-18 (both human adenocarcinoma)[29, 79, 221], MRC-5 (human lung fibroblast)[29, 165, 220], Mv1Lu (mink lung epithelia)[220], Vero [79] and VeroE6 [29, 79]. Those studies also explored the optimal temperature to grow HCoV-OC43 and the impact of adding 1 to 8% of serum to the media during viral propagation. They also probed various titration methods including plaque assays using various overlays (agarose, avicel, methylcellulose) or the median tissue culture infectious dose (TCID50) based on the cytopathic effects (TCID50-CPE), immunofluorescence assays (TCID50-IFA) or immunoperoxidase assays (TCID50-IPA). Unfortunately, given the lack of recognizable cytopathic effects in many cell lines, it can be difficult to visually monitor the progression of the infection and quantify the virus by plaque assays (Hirose et al. 2021; Lambert et al. 2008c; Schmidt et al. 1979). The present work seeks to compare and optimize the current protocols and define the best and most sensitive means to detect HCoV-OC43. Our finding indicates that MRC-5 and HRT-18 cells are among the best cells to produce the virus and confirm that the cells produce more virus at 33°C than 37°C. Interestingly, the data revealed that it is possible to produce HCoV-OC43 in serum-free conditions as efficiently as in media containing up

to 10% serum, which may be an advantage for some applications. Comparing four titration methods on two cell lines, we finally show that an indirect immunoperoxidase based TCID50 assay (TCID50-IPA) is the most practical and sensitive assay to monitor the virus and that the HRT-18 cells are better suited than the widely used VeroE6 cell line for titrations of coronaviruses. Most importantly, these optimized conditions routinely led to high titer viral stocks in the 10^8 TCID50/ml order of magnitude.

3.1.3 Materials and Methods

Cell Lines

MRC-5 human male lung cells (ATCC CCL-171) were maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) complemented with 10% HI-FBS, 1X non-essential amino acids (Gibco, Waltham, MA, USA), 1 mM sodium pyruvate (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) and 100 U/mL Penicillin & 100 µg/mL Streptomycin (Milipore Sigma, Burlington, MA, USA) (1X P/S). The HCT-8 human male ileocecal adenocarcinoma cell line (ATCC CCL-244) was maintained in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) with 10% heat inactivated fetal bovine serum (HI-FBS), 1X L-Glu and 1X P/S. The HRT-18 male human ileocecal adenocarcinoma (Gift from Dr. Talbot, INRS, QC, Canada [222], distinct from ATCC CCL-244 which is listed as HCT-8/HRT-18) and Huh7.5 male human hepatoma (Gift from Dr. Soudeyns, CRCHUSJ) cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) completed with 10% HI-FBS (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada), 2 mM L-Glutamine (Milipore Sigma, Burlington, MA, USA) (1X) and 1X P/S. African green monkey kidney Vero (ATCC CCL-81) and VeroE6 (Gift from Dr. Liang, McGill University) female cell lines were maintained in DMEM containing 5% heat-inactivated (HI) bovine growth serum (BGS) (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada), 1X L-Glu and 1X P/S.

Viral strains and stocks

The original Betacoronavirus 1 HCoV-OC43 VR-759 and the HCoV-OC43 rOC/US183-2 double S protein mutant (H183R & Y241H) derived from VR-759 (herein described as VR-759 dm; gifts from Dr. Talbot, INRS, QC, Canada) were passaged twice on HRT-18 cells and harvested as previously described[115]. The HCoV-OC43 variant VR-1558 (ATCC, Manassas, VA, USA) was passaged twice on MRC-5 cells to obtain a working P3 stock. P3 viral stocks were independently prepared from the supernatant and the cell-associated fractions. Hence, cells were scraped and centrifuged at low speed (500×g, 10 min, 4 °C) to separate extracellular and cell-associated viruses. Extracellular virions were next concentrated by ultracentrifugation (60,000×g, 1 h, 4 °C) and resuspended in a minimal volume of DMEM while the intracellular viruses were released by two rounds of freeze-thawing. Both fractions were sonicated 15 times for 1s at a power of 8 of a Sonic Dismembrator

Model 100 using a cup-horn setting (Fischer Scientific, Hampton, NH, USA), flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . These stocks were then used to infect cells as described below.

Viral infections

Unless otherwise specified, infections were carried on cells seeded in six-well plates grown to 80% confluence in maintenance media. The media was removed and a viral dilution of 500 μL per well, corresponding to a MOI of 0.7 (TCID₅₀-IPA method), was added. Plates were incubated at 37°C , 5% CO_2 on a shaker for 1 h and 2 mL of infection media (DMEM 2% FBS, 1X L-Glu, 1X P/S) was added per well and the plate incubated at 33°C , 5% CO_2 for 3 days. The viruses released into the supernatant were then harvested and quantified as is, i.e., without ultracentrifugation.

Virus Titration by TCID₅₀

Two hundred thousand VeroE6 or fifty thousand HRT-18 cells were seeded per well in 96-well plates and incubated at 37°C , 5% CO_2 until 80% confluent (1 or 3 days after seeding, respectively), leading to similar confluencies on the day of the infection. The media was removed and cells inoculated with 50 μL of a serial 10-fold dilution of samples (4 to 6 replicates) and incubated at 37°C , 5% CO_2 on a shaker for 1 h for viral adsorption. To each well, 50 μL of infection media (DMEM 2% FBS, 1X L-Glu, 1X P/S) was added and plates incubated at 33°C , 5% CO_2 for 4 days. For cytopathogenic effect (CPE), plates were read on an Evos XL Core microscope with a 20X objective (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Thereafter, immunoperoxidase staining and revelation with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (TCID₅₀-IPA method) or immunofluorescence staining (TCID₅₀-IFA method) was performed as previously described but without washing the cells in 1X PBS prior to fixation [29, 221]. The primary antibody used for these staining methods was the 4.3E4 hybridoma antibody against the HCoV-OC43 S protein (Gift from Dr. Talbot, INRS, QC, Canada) diluted 1:50 in 1X PBS and the secondary antibodies were respectively the peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) diluted 1:2000 in 1X PBS and the Chicken anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) diluted 1:40 in 1X PBS. A fresh stock of DAB was prepared by dissolving the pellets in Milli-Q water with HCl then diluted in 1X PBS to a final concentration of 30–40 mg/100 mL. DAB-stained plates were read after 15 min of staining as described above for

CPE. Fluorescent-stained plates were read on a Leica DMI8 fluorescence microscope. The median tissue culture infectious dose (TCID₅₀) is defined as the dilution of the virus necessary to infect 50% of cell cultures. It was calculated according to the Spearman & Karber method [166, 223] with the following formula:

$$\text{TCID}_{50} = \log(\text{highest dilution giving 100\% positive wells}) + 0.5 - \frac{\text{total number of positive wells}}{\text{number of wells per dilution}}$$

These values differ from the plaque forming units (PFU), but it can be mathematically estimated from the Poisson distribution by multiplying the TCID₅₀ by 0.7 [224].

Flow Cytometry

Infected MRC-5 cells were harvested 3 days post-infection (dpi) and fixed/permeabilized with the BD Cytofix/Cytoperm™ kit using undiluted 4.3E4 primary antibody (provided by Dr Pierre Talbot) and 1:40 diluted Chicken anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Data was collected using a BD FACS Canto II and analyzed with FlowJo™ 10.6.1.

Statistics

All statistics were done on GraphPad Prism 9. One-way ANOVAs with Dunnett multiple comparisons were used to compare multiple conditions. Student's t-tests were used to analyze other data. The difference between the experimental conditions were considered statistically significant when the p-value was less than 0.05.

3.1.4 Results

The human lung cell line MRC-5 is a good model to propagate HCoV-OC43

HCoV-OC43 is a slow growing virus that requires several days to reach its peak [29, 79, 165, 221]. To first evaluate what might constitute a good host to propagate this virus, four susceptible cell lines were infected and examined over the course of several days. This included the African green monkey Vero cell line used to titer many viruses [225], the HCT-8 human ileocecal adenocarcinoma cell line recommended by ATCC to grow HCoV-OC43, the physiologically more relevant MRC-5 human lung cell line [29, 165, 220] and the Huh7.5 human hepatoma cell line given their high susceptibility to the related SARS-CoV-2 and the impact of that virus on the liver [226, 227]. As control, cells were mock infected to monitor their state over that same time span. [Figure 1A](#) shows that not all cell lines exhibited CPE. For instance, Vero and HCT-8 cells exhibited limited signs of infection up to 5 days post-infection (dpi). In contrast, both MRC-5 and Huh7.5 cells had significantly reduced confluency along with increased cell rounding, vacuolization and shrinking by 3 dpi, which subsisted but did not increase by day 5. Quantification of virions released in the supernatant by the TCID50-IPA method showed that viral titers peaked on the third day for all but the HCT-18 cell line, which required two more days to reach similar levels ([Fig. 1B](#)). Interestingly, MRC-5 and Huh7.5 cells produced nearly two more logs of virus on the third day (2.0×10^8 and 1.7×10^8 TCID50/ml respectively) than that obtained with Vero and HCT-8 cells (4.3×10^6 and 3.6×10^6 TCID50/ml respectively; [Fig. 1C](#)). Given the higher relevance of the MRC-5 (lung rather than liver cells) and their prevalence in the literature to grow, study and even isolate coronaviruses [125, 138, 139], we opted to continue most of our experiments with the MRC-5 human lung cells, unless otherwise indicated. Moreover, MRC-5 infected cells were highly susceptible to HCoV-OC43, as determined by FACS using an antibody against HCoV-OC43, which indicated that 99% of the cells score positive for the virus ([Fig. 1D](#)).

Optimal growth at 33 °C

Human viruses typically grow best at the cell body temperature of 37 °C. However, several publications have reported that coronaviruses and other respiratory viruses better propagate at

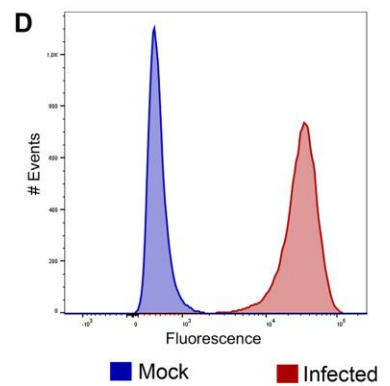
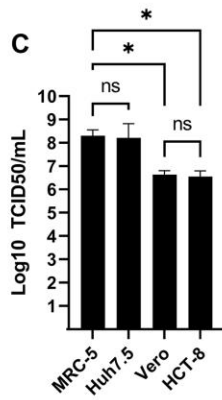
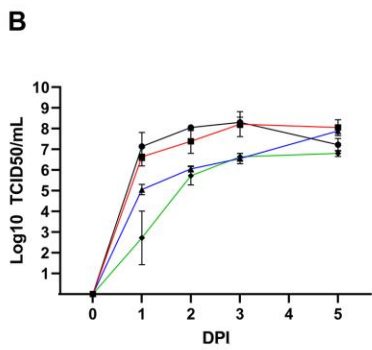
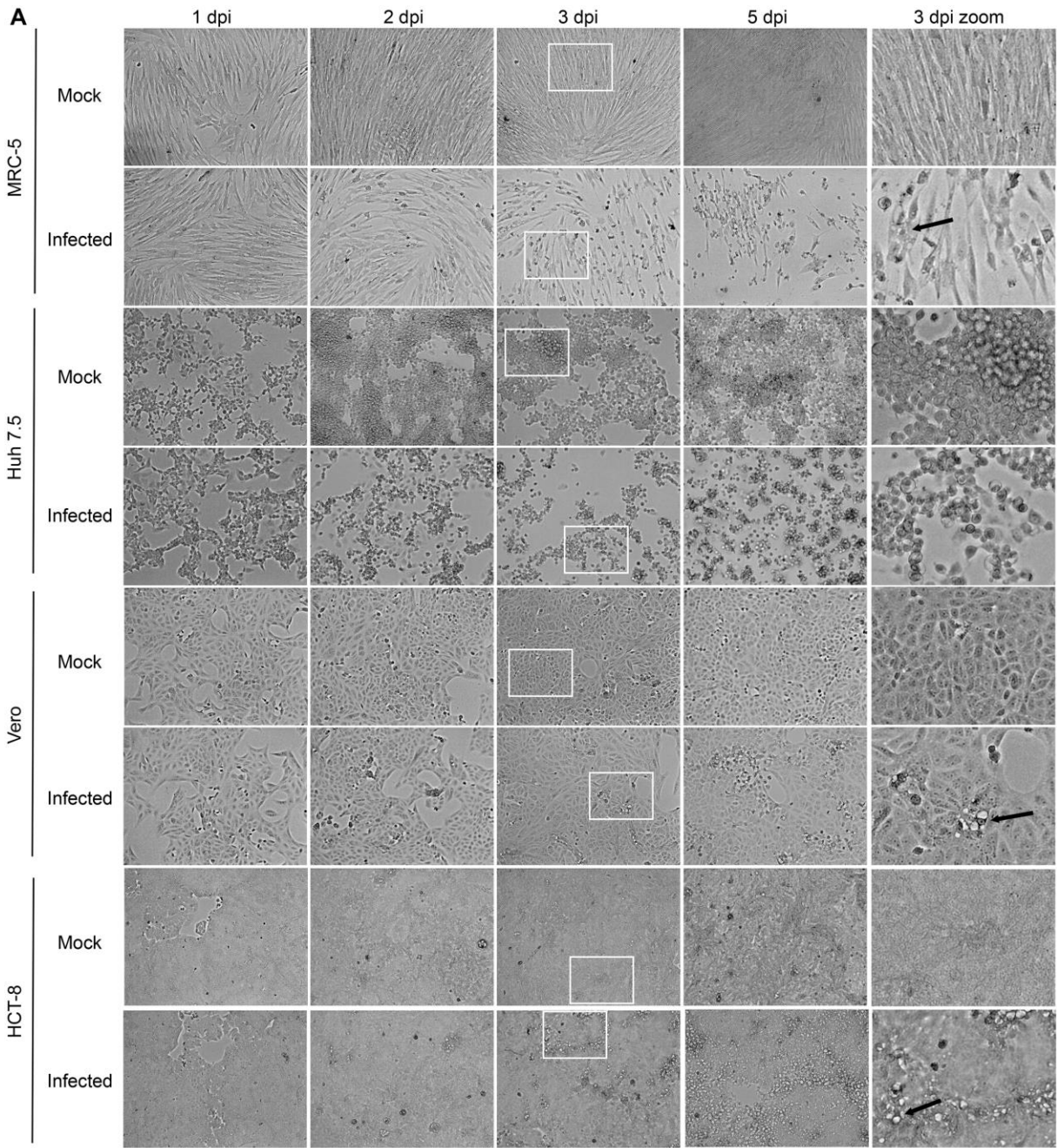


Figure 1. – HCoV-OC43 grows best on the MRC-5 and Huh7.5 cell lines.

For all panels, MRC-5, Huh7.5, Vero and HCT-8 cells were grown to 80% confluence on six-well plates then mock treated or infected with at an MOI of 0.7. The cells were then incubated for up to 5 days at 33 °C in DMEM containing 2% serum. (A) CPE was monitored by bright field microscopy at the indicated days post infection (dpi). The right panels show a zoom view of CPE observed at 3 dpi. (B) To quantify the kinetics of propagation of HCoV-OC43, the extracellular virus produced by infected MRC-5 cells was quantified on HRT-18 cells using the TCID50 immunoperoxidase assay (TCID50-IPA) of Talbot and colleagues (see Materials and Methods). (C) MRC-5 cells infected for 3 dpi were fixed, permeabilized and HCoV-OC43 positive cells scored using viral specific antibodies (see Materials and Methods). (D) To compare viral yield among the cell lines, the extracellular virus harvested at 3 dpi was titered as above. Error bars represent SEM (n = 3 biological replicates). The titers were calculated with the Spearman and Karber method. Statistical analyses were done by one-way ANOVA with Dunnett multiple comparisons (*p < 0.05).

33 °C, which matches the temperature of the upper respiratory track [141, 220, 228, 229]. To confirm the importance of temperature, MRC-5 cells were therefore infected with CoV-OC43 and incubated for 3 days at either 33 °C or 37°C. Upon examination by bright field microscopy, CPE was readily apparent at the lower temperature but absent at the higher temperature ([Fig. 2A](#)). Quantification of the viral yields in the tissue culture supernatant ([Fig. 2B](#)) confirmed this observation and were over a log greater at 33 °C (6.6×10^7 TCID50/ml) than 37 °C (4.3×10^6 TCID50/ml), which was statistically significant (p = 0.027). This indicated that HCoV-OC43 has adapted to the temperature of the upper respiratory tract and propagates better at 33 °C.

Serum levels during the propagation does not alter viral yields

In the literature, serum is used at concentrations in the tissue culture media from 1% to 8% [220, 221]. To probe whether this is a critical parameter, MRC-5 cells were mock treated or infected with HCoV-OC43 and incubated for 3 days in DMEM complemented with decreasing concentrations of serum (10%, 2% and 0%) or in SFM-Optipro, a commercial serum-free formulation adapted to tissue culture. Daily inspection of the uninfected cells by bright-field

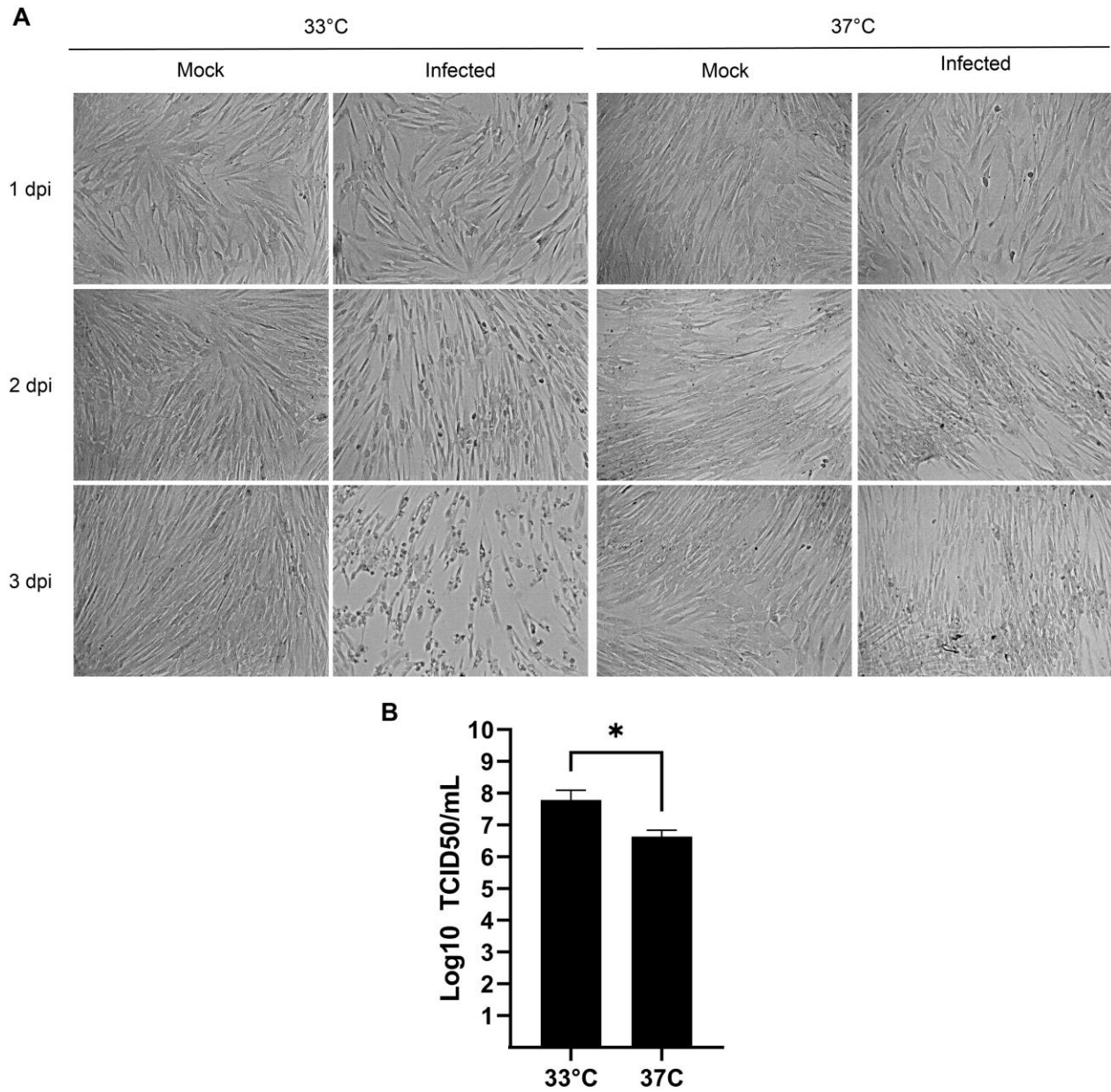


Figure 2. – Optimal propagation of HCoV-OC43 at 33 °C.

MRC-5 cells were grown to 80% confluence on 6-well plates before being mock treated or infected at an MOI of 0.7 and grown for 3 days at either 33 °C or 37 °C in DMEM supplemented with 2% serum. (A) Monitoring of the cells by bright field microscopy over time. Note that the infection leads to more CPE at 33 °C compared to 37 °C. (B) Extracellular virus harvested at 3 dpi were titered by the TCID₅₀-IPA method as in Fig. 1. Error bars represent SEM (n = 3 biological replicates). Statistical analyses were done with a Student t-test (*p < 0.05).

microscopy revealed that they remained formulation adapted to tissue culture. Daily inspection of the uninfected cells by bright-field microscopy revealed that they remained healthy over the 3 days of the experiments even without serum ([Fig. 3A](#)). Using the SFM-Optipro also yielded equally healthy and abundant cells, though they grew slightly slower and required passaging at lower dilutions. Albeit 2% serum was consistently slightly better, no statistically significant effect was noted on viral yields with titers ranging between 1.7×10^7 and 7.7×10^7 TCID50/ml ([Fig. 3B](#)). We conclude that the level of serum is not a significant factor when producing HCoV-OC43 and that growing cells in SFM-Optiprep may be advantageous in conditions when one wishes to limit contamination, for example, by exogenous proteins, antibodies or exosomes.

Sonication may be helpful

Sonication is often used to dissociate viral particle aggregates to obtain optimal viral stocks. Sonication of virions released into the tissue culture supernatant was therefore explored using a sonicator equipped with a micro cup horn that we routinely use for preparation of other viruses[200]. Note that such gentler conditions are critical as sonication probes that dip into the samples are too powerful and disintegrate viruses. The non-concentrated tissue culture media harvested 3 days post-infection from MRC-5 infected cells were therefore split in half and treated or not by sonication prior to flash freezing the samples and subsequent titration. Albeit the difference between sonicated and non-sonicated samples was not statistically significant, minor improvements averaging 0.25 log were noted in the viral titers upon sonication ([Fig. 4](#)). Clearly, mild sonication did not harm the virus and may in fact be beneficial to get mono-dispersed viral preparations.

The TCID50-IPA method is the most sensitive and practical approach to titer HCoV-OC43

Various methods have been proposed to quantify coronaviruses, including plaque assays under different semisolid conditions as well as TCID50 assays based on CPE or immuno-detection. In our hands, limited CPE was observable under the microscope on the commonly used VeroE6 cells to quantify coronaviruses and plaque assays using various concentrations of agarose or methylcellulose or dyes (crystal violet, neutral red) were not reproducible as they led to either small or poorly defined plaques without signs of infection at their margins making the technique

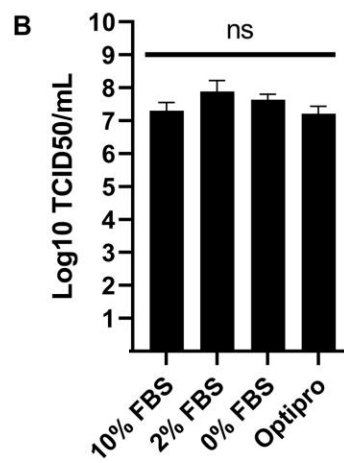
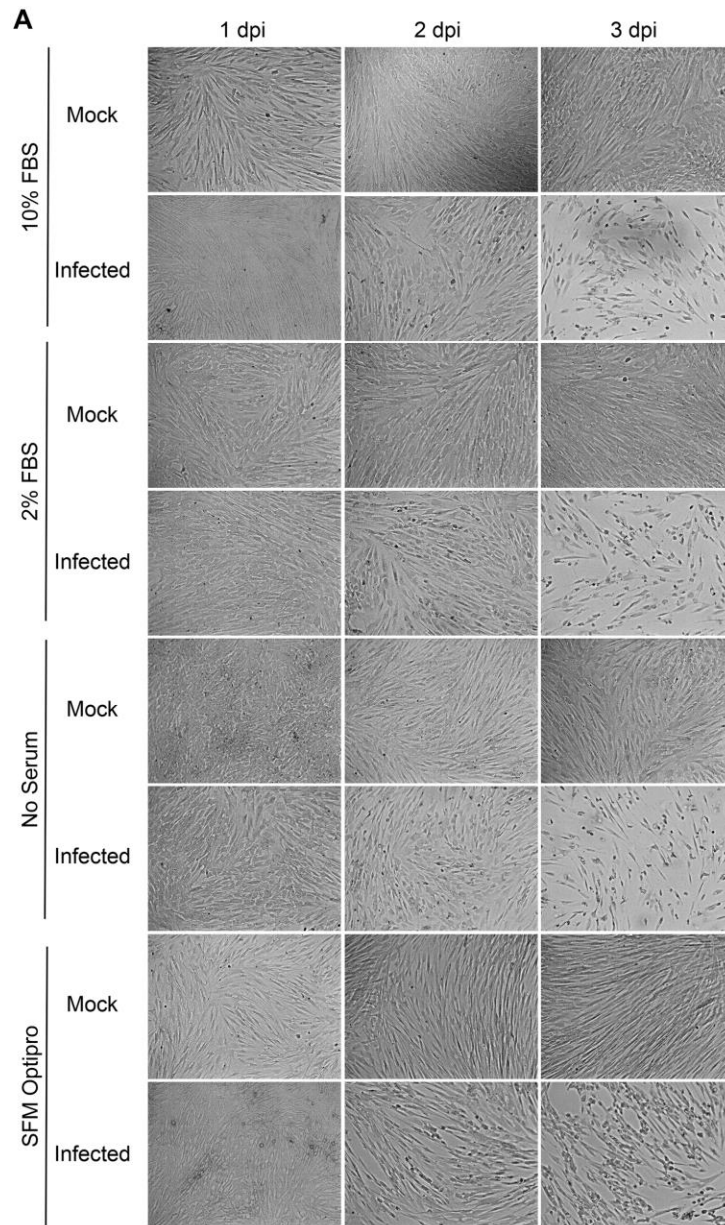


Figure 3. – HCoV-OC43 can be grown in serum free media.

MRC-5 cells were grown to 80% confluence on six-well plates then mock treated or infected at an MOI of 0.7 in serum free media. After a 1h adsorption period, cells were incubated for up to 3 days at 33 °C in the presence of EMEM containing different concentrations of serum (0%, 2% or 10%) or Optipro, a serum-free media (SFM-Optipro). (A) Bright field monitoring over the course of the infection indicated the lack of noticeable effect of the serum. (B) Extracellular virus harvested on at 3 dpi were titered by the TCID50-IPA method. Error bars represent SEM. Statistical analyses were done by one-way ANOVA with Dunnett multiple comparisons (n = 3 biological replicates).

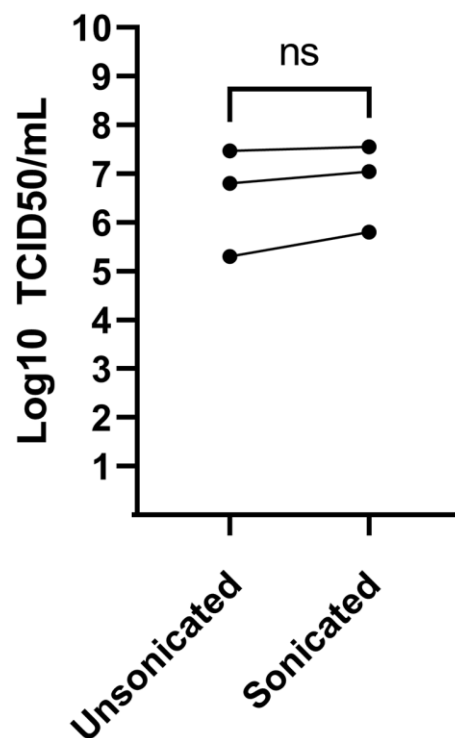


Figure 4. – Effect of sonication of viral titers.

The media was harvested at 3 dpi from MRC-5 infected cells and were split into two and one of the samples sonicated while the other was kept on ice (see Materials and Methods). Viral titers were then determined by the TCID50-IPA method. Three independent experiments are shown individually in the Figure (the line indicates the paired samples). Statistical analyses were done by a paired Student t-test. N = 3 are biological replicates.

difficult to use ([Fig. 5A](#)). This was consistent with several reports where plaques were tiny or irregular in shape with poor contrast [4, 29, 139, 157, 220]. In contrast, detection of the virus by a TCID₅₀ assay based on CPE (TCID₅₀-CPE) was feasible because it relies on a plus/minus scoring under the microscope rather than counting plaques ([Fig. 5A](#)). Similarly, it was possible to reveal HCoV-OC43 infected cells with primary antibodies targeting the virus and secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase and the addition of 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (TCID₅₀-IPA) or secondary antibodies coupled to a fluorophore (TCID₅₀-IFA; [Fig. 5A](#)). We therefore sought to compare the efficacy of the three techniques using the same viral stocks. To this end, titrations were performed with the widely used VeroE6 but also the HRT-18 cells, a cell line of choice to monitor HCoV-OC43 [221]. In all cases, manual scoring by individually examining the 96 well plates by microscopy was achieved. This only required a few minutes and was therefore readily amenable to most small to mid-scale experiments. Upon titration on HRT-18 cells, CPE consistently and statistically under evaluated the number of infectious viral particles whereas both immuno-based detection assays were similar (8.9×10^7 TCID₅₀/ml for the CPE, 4.0×10^8 TCID₅₀/ml for the IPA and 3.3×10^8 TCID₅₀/ml for IFA; [Fig. 5B](#)). HRT-18 cells also outperformed and proved approximately two logs more sensitive than VeroE6 cells (9.3×10^5 TCID₅₀/ml CPE and 4.3×10^6 for IPA). Altogether, this indicated that TCID₅₀-IPA or IFA assays on HRT-18 cells represent the most sensitive mean to detect the virus.

Variation in tropism among HCoV-OC43 isolates

The VR-1558 HCoV-OC43 variant is the only ATCC available HCoV-OC43 isolate nowadays. That newer variant was passaged in mice then adapted in tissue culture from a previously available ATCC VR-759 HCoV-OC43 viral isolate, which was originally isolated from infected organ cultures. Furthermore, the HCoV-OC43 rOC/US183-2 double mutant (VR-759 dm), among other HCoV-OC43 mutants, is derived from the VR-759 variant and contains two mutations within its spike protein that increases its virulence[115]. To see if any of these HCoV-OC43 isolates were more suitable, MRC-5 or HRT-18 cells were infected and the virus released into the media titrated on HRT-18 cells. In this set of experiments, all three HCoV-OC43 isolates propagated similarly on HRT-18 cells (VR-759: 6.9×10^7 ; VR-759 double mutant: 3.5×10^8 ; V-1558: 9.8×10^7 TCID₅₀/ml) ([Fig. 6](#)). These titers were slightly and significantly reduced when MRC-5 cells were used to grow the

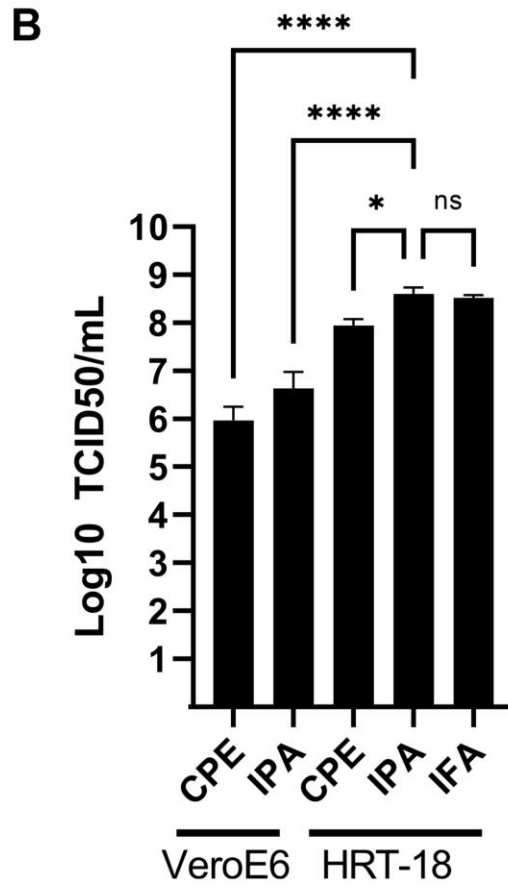
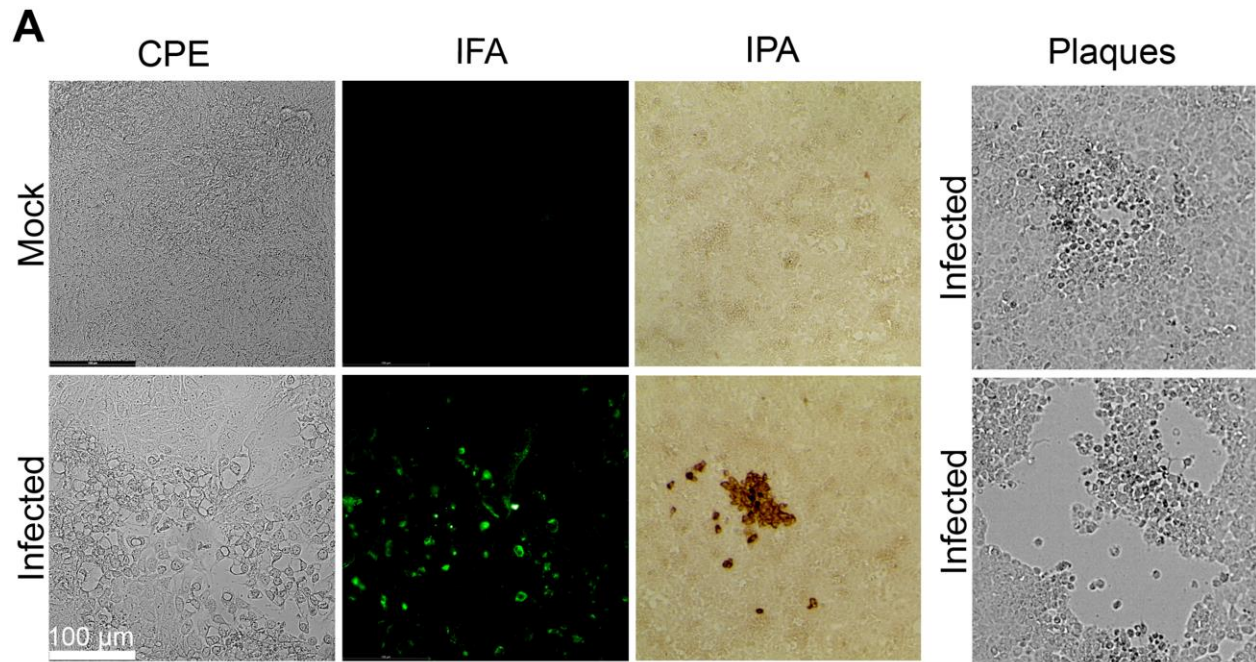


Figure 5. – Optimal TCID50 method for the titration of HCoV-OC43.

A common viral stock produced on MRC-5 cells was used to infect VeroE6 or HRT-18. (A) Typical images of the infected cells by bright field (CPE, IPA) or fluorescence microscopy (IFA). (B) Quantification of the viral yields by TCID50-CPE, TCID50-IPA and TCID50-IFA. Error bars represent SEM (n = 3 biological replicates). Statistical analyses were done by one-way ANOVA with Dunnett multiple comparisons (*p < 0.05; ****p < 0.0001).

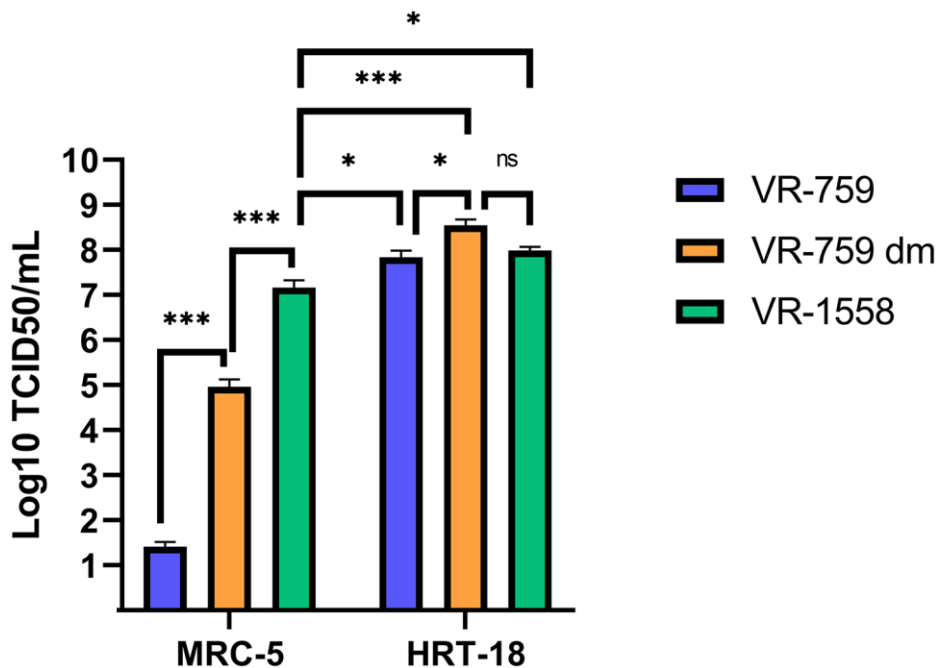


Figure 6. – The VR-1558 HCoV-OC43 variant has an increased tropism.

MRC-5 and HRT-18 cells were grown to 80% confluence on 6-well plates then infected at an MOI of 0.7 with three HCoV-OC43 variants (VR-759, the HCoV-OC43 rOC/US183-2 double mutant (VR-759 dm) and VR-1558). Three days later, the media was harvested and titered by the TCID50-IPA method on HRT-18 cells. Error bars represent SEM (n = 3 biological replicates). Statistical analyses were done by one-way ANOVA with Dunnett multiple comparisons (*p < 0.05, ***p < 0.001).

VR-1558 isolate (1.5×10^7 TCID50/ml) so HRT-18 cells are yet a better cell line to propagate HCoV-OC43. Oddly, the VR-759 isolate very poorly propagated on MRC-5 cells or at all as the observed titer of 2.6×10^1 TCID50/ml may well be the input virus, while the VR-759 double mutant

displayed an intermediate titer (9.2×10^4 TCID₅₀/ml). To delineate differences between these viral isolates, the VR-759 and VR-1558 viral genomes were retrieved from NCBI (NC_006213.1) and ATCC respectively and aligned. As expected, this revealed their close relationship with 99.76% nucleic acid identity with 42 different mutations, including 34 non-silent mutations and three indels ([Table 1](#)). Interestingly, VR-1558 harbored the double mutations present in the S protein of the VR-759 double mutant, along with several mutations in the spike and replicase protein, which presumably contribute to the wider tropism of VR-1558. Thus, the current VR-1558 ATCC isolate may be a good choice to grow high titer stocks in a broader range of cell lines, while the VR-759 isolate may be more appropriate to study host restrictions.

Table 1. – HCoV-OC43 variants.

Sequences obtained from NCBI (VR-759 NC_006213.1) and ATCC (VR-1558) were aligned pairwise with BLAST. Forty-two mutations were found, including the 34 non-synonymous mutations or indel shown below. The numbers refer to the VR-759 amino acid sequences. The mutations in the VR-739 double mutant are from the reference below the table.

Gene Product	OC43 VR-759 (rOC/US183-241)*	OC43 VR-1558 (ATCC)
<i>Replicase Polyprotein</i>		317 Arg -> Cys
<i>Replicase Polyprotein</i>		344 Ala -> Val
<i>Replicase Polyprotein</i>		572 Phe -> Ser
<i>Replicase Polyprotein</i>		1684 His -> Tyr
<i>Replicase Polyprotein</i>		2488 Ser -> Phe
<i>Replicase Polyprotein</i>		2926 Asn -> Ser
<i>Replicase Polyprotein</i>		3782 Arg -> Ser
<i>Replicase Polyprotein</i>		5544 Val -> Glu
<i>Replicase Polyprotein</i>		6059 Met -> Leu
<i>NS2a protein</i>		214 Val -> Leu
<i>HE protein</i>		382 Leu -> Ser
<i>HE protein</i>		383 Pro -> Ser
<i>S protein</i>		150 Thr -> Ile

<i>S protein</i>	185 His -> Arg	185 His -> Arg
<i>S protein</i>	243 Tyr -> His	243 Tyr -> His
<i>S protein</i>		264 Asn -> Asp
<i>S protein</i>		371 Ser -> Gly
<i>S protein</i>		394 Gly -> Ala
<i>S protein</i>		762 Arg -> Ile
<i>S protein</i>		877 Leu -> Cys
<i>S protein</i>		XXX del VNAY
<i>S protein</i>		982 Trp -> Leu
<i>S protein</i>		987 Gly -> Arg
<i>S protein</i>		1118 Met -> Ile
<i>S protein</i>		1221 Val -> Gly
<i>N protein</i>		33 Phe -> Val

3.1.5 Discussion

Unlike more pathogenic coronaviruses, HCoV-OC43 has been around for several decades but less studied owing to its milder medical footprint. Given its phylogenetic link with SARS-CoV-2, it nonetheless constitutes an interesting model to study the basic biology of coronaviruses. Unfortunately, various laboratories propose different protocols to expand and titer HCoV-OC43. The present study addressed this point by comparing four different cell lines (MRC-5, Huh7.5, Vero, HCT-8) and three distinct conditions (temperature, serum, sonication) to produce the virus and by probing the impact of sonication once the virus is harvested. We found that MRC-5, a relevant cell type derived from the lung, is among the best cells to produce the virus. Subsequent testing indicated that HRT-18 cells proved even better than MRC-5 to propagate all tested HCoV-OC43 variants but their colorectal origin makes them a slightly less attractive model. Interestingly, work by [29] showed that MRC-5 produced high-quality stocks (ratio of 1.2:1 defective to infectious particles) compared to HRT-18 stocks (102:1) at 3 dpi [29], making the former the optimal cell line to make viral stocks. Nonetheless, as MRC-5 cells are rather slow growing, HRT-18 cells may be a useful alternative to rapidly produce viral stocks to subsequently infect relevant cells, with possible caveats for some applications. While sonication of viral stocks did not have any major impact on viral yields, a small increase in titers was noted. As mild sonication (cup-horn) is often used to dissociate viral particle aggregates, this is not surprising and recommendable, but more aggressive sonication (tip) should be avoided as it can denature proteins and break up viral particles. Our data confirmed previous observations that HCoV-OC43 grows better at 33 °C than 37 °C, presumably because the virus adapted to the lower temperature of the upper respiratory airways. In tissue culture, that lower temperature may also confer an advantage as the slow replication rate of coronaviruses allows healthy uninfected cells to outgrow infected cells at 37 °C (our own observations). In contrast, we found no evidence that serum played any significant role in the propagation of the virus, testing concentrations up to 10%, which is used to culture most cell lines. This was somewhat unexpected given the impact of serum concentration on cellular metabolism and division rate. However, while lower serum concentrations may partially impede cell growth, this could benefit HCoV-OC43 in a similar way as the lower temperature by slowing down the cells. Moreover, our findings are consistent with

the literature that suggests a broad range of serum concentrations from 1% to up to 8% to grow HCoV-OC43 [79, 220, 221]. In fact, viral spread in cells grown in serum-free conditions (EMEM without added serum or commercial serum-free formulation Optipro) proved to be equally efficient at supporting viral propagation. It should be noted that all cell lines look perfectly fine for a few passages in these media and we even successfully adapted VeroE6 to Optipro. Of interest, this commercial formulation is spiked with recombinant insulin and epithelial growth factor according to the manufacturer. On the other hand, it is interesting that serum deprivation normally induces autophagy, but coronaviruses seemingly benefit from that pathway[124, 125]. Hence, serum-free conditions may be quite useful for some studies, for example, those that take into consideration the impact of extracellular vesicles that are abundant in serum. Overall, this suggests that MRC-5 and HRT-18 are good models to grow the virus at 33 °C and that reduced serum concentrations could be more cost-effective. An essential factor in generating viral stocks is the availability of sensitive means to quantify them. To address this, four titration methods were considered, namely plaque assays, TCID50-CPE, TCID50-IFA and TCID50-IPA. Although plaque assays are the gold standard for lytic viruses, they proved unreliable for HCoV-OC43 as poorly defined plaques were only occasionally detected with poor correlations along serial dilutions of the virus. At issue is the CPE limited to a few cells, leading to tiny plaques that are poorly visible despite staining them or large ones that do not show evidence of infection at their edges. As mentioned above, the ability of non-infected cells to outgrow infected ones during viral propagation is problematic. For instance, growing the virus up to 10 days did not lead to increased plaque size (our own observations). These findings corroborated the fact that many studies rely on TCID50 assays to monitor coronaviruses, including SARSCoV-2. One possible alternative around poorly defined plaques is to score CPE positive wells under the microscope to estimate TCID50 titers. However, we found that CPE significantly underestimated viral titers compared to IFA and IPA antibody-based detection assays. Since it is important to rely on sensitive assays to properly quantify the virus, IFA and IPA were clearly better than CPE. While the present study relied on a non-commercial antibody generously provided by the Talbot laboratory [115], others have shown that commercial HCoV-OC43 antibodies (e.g., Anti-OC43 N nucleoprotein clone 5427D from Milipore Sigma; Milipore Sigma, Burlington, MA, USA) also perform very well [29]

making such approach available to all. The IPA and IFA antibody-based assays were similar in yields to one another but we found the IPA assay easier to use because a simple tissue culture microscope is sufficient and avoids delays and costs associated with fluorescence microscopy. Revealing with DAB is also cheaper than fluorescently tagged secondary antibodies and thus IPA is a more convenient assay than IFA. Finally, the currently available ATCC VR-1558 HCoV-OC43 viral variant clearly has a wider tropism than the original VR-759 variant, presumably owing to the presence of several mutations including the VR-759 double mutations in the spike protein. As with most viruses, the repeated passage of the virus in tissue culture is likely responsible for this change and may even change their preferential route of entry, as for the HCoV-229E coronavirus[144]. Consequently, choosing the right viral variant may be critical depending on the purpose of the studies.

Chapitre 3.2 - Virométrie en flux du coronavirus OC43

3.2.1 Introduction

La virométrie en flux représente une méthode de pointe pour l'étude des virus. Cette méthode a précédemment été utilisée à différentes fins incluant la quantification et l'évaluation de la qualité d'échantillons viraux [29, 230, 231], l'étude quantitative des protéines de virus [207] ainsi que des protéines de l'hôte incorporées dans les virus [204] et finalement le tri de particules virales [200, 205]. Cependant, aucune méthode de virométrie en flux n'a encore été développée pour les CoVs. Considérant que les CoVs comme SARS-CoV-2 représentent un risque majeur pour la santé publique, il est essentiel de mettre au point une méthode rigoureuse de virométrie en flux aussi bien pour les différentes applications en recherche que pour le diagnostic moléculaire clinique.

Le développement de la virométrie en flux nécessite l'optimisation et la mise au point de plusieurs étapes. Premièrement, la préparation d'échantillons de virus purs et concentrés représente une étape utile pour le développement et l'évaluation de la virométrie en flux. Plusieurs méthodes de concentration et de purification de virus existent. Elles consistent généralement à l'utilisation de l'ultracentrifugation pour culoter le virus, mais peuvent également inclure une précipitation par sulfate d'ammonium ou polyéthylène glycol [158, 159, 200]. Certaines méthodes récentes utilisent également l'ultrafiltration par flux tangentielle ou des résines de chromatographie (e.g. Capto Core 700) [217]. Aucune méthode de purification des CoVs a été établie pour la virométrie en flux. Deuxièmement, différentes stratégies de marquage peuvent être employées en virométrie en flux incluant l'utilisation de marqueurs d'acides nucléiques et d'anticorps fluorescents [201]. Les marqueurs d'acides nucléiques de type Syto sont particulièrement intéressants puisqu'ils sont perméables aux membranes, permettent le marquage de l'ADN et l'ARN et ont précédemment été utilisés pour l'analyse de microparticules et de virus [200, 205, 215, 216, 231]. Il existe plusieurs colorants Syto s'étendant sur différentes longueurs d'onde (bleu, vert, orange, rouge) permettant leur combinaison avec d'autres marqueurs [232, 233].

Également, l'utilisation d'anticorps spécifiques fluorescents a déjà été décrite. Par exemple, des anticorps fluorescents contre la protéine de surface S de SARS-CoV-2 ont été utilisés en virométrie en flux pour l'analyse de pseudovirus ou de complexes de protéines S [213, 217]. Cependant, l'utilisation seule d'un marqueur d'acide nucléique ne permet pas d'établir l'identité de la particule avec certitude. En effet, plusieurs contaminants biologiques tels que les vésicules extracellulaires peuvent contenir des acides nucléiques et peuvent être co-purifiés avec le virus [234]. De même, l'utilisation seule d'un anticorps spécifique pourrait également porter problème puisque des exosomes pourraient avoir à leur surface la protéine S [235, 236]. Ceci démontre l'importance de l'utilisation de contrôles appropriés en plus d'une stratégie de marquage multiple pour le développement d'une méthode de virométrie en flux robuste. Pour répondre à ces besoins, nous avons d'abord établi un modèle de production du β -CoV-OC43 qui est un choix répandu comme modèle substitut du SARS-CoV-2 car il peut être manipulé en laboratoire avec un niveau de biosécurité 2 (BSL-2) plutôt que 3 (BSL-3). Afin de répondre à ces défis, nous avons testé différentes méthodes de purification de ces virus par ultracentrifugation et avons réussi à obtenir des échantillons concentrés ne démontrant pratiquement aucun bruit de fond pour la virométrie en flux. Ensuite, nous avons testé plusieurs marqueurs et leur combinaison incluant le Syto 13, le Syto 62 et un anticorps fluorescent contre la protéine S de OC43. Le marquage par Syto est très efficace et a permis la séparation complète de la population virale marquée de notre contrôle non marqué. Cependant, l'anticorps fluorescent démontre un marquage sous-optimal. En somme, nous avons fait la preuve de concept de l'application de la virométrie en flux aux CoVs.

3.2.2 Matériel et méthodes

Production de virus

Des cellules HRT-18 (don de Dr. Talbot, INRS, QC, Canada) ou des cellules MRC-5 (ATCC CCL-171) sont ensemencées sur des plaques carrées de 500 cm² avec une dilution de 1:15 ou 1:5 respectivement pour obtenir une confluence d'environ 70% après 3 jours d'incubation à 37°C et 5% CO₂. Un milieu de culture DMEM sans phénol rouge (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) est utilisé avec 10% de sérum fétal bovin inactivé par chaleur (HI-FBS) (Wisent, Saint-Jean-

Baptiste, QC, Canada), 100 U/mL Pénicilline & 100 µg/mL Streptomycine (Milipore Sigma, Burlington, MA, USA) (1X P/S) et 2 mM L-Glutamine (Milipore Sigma, Burlington, MA, USA) (1X). Le milieu est retiré et une dilution de virus de 12 mL par plaque fait dans du Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) avec 0.1 % Bovine Serum Albumine (BSA) équivalente à une MOI de 0.1 du CoV-OC43 (VR-1558) est ajoutée sur le tapis cellulaire. L'adsorption du virus se fait pendant 1h en incubant à 37°C et 5% CO₂ sur une plaque agitatrice. Un milieu de culture identique au précédent, mais réduit en sérum (2% FBS) est ajouté au volume de 48 mL par plaque pour obtenir un total de 60 mL de liquide par plaque. Les plaques sont incubées à 33°C et 5% CO₂ pendant 3-4 jours ou jusqu'à l'apparition de CPE modéré sans mort cellulaire généralisée.

Purification et concentration de virus

Le surnageant (milieu de culture) est collecté et clarifié par centrifugation à 500 x g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est filtré à 0.22 µm et aliquoté et équilibré dans des tubes stériles épais de polyallomère de capacité de 20 mL. La préparation est ultracentrifugé à 60 000 x g (19 450 RPM) pendant 1h à 4 °C dans une centrifuge Hitachi CP90WX avec le rotor à godet oscillant P28S2. L'échantillon est immédiatement retiré à la fin du cycle de centrifugation, le surnageant est enlevé et le tube est inversé plusieurs secondes pour se débarrasser de l'entière du liquide. La solution tampon MNT (30 mM MES, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) est préalablement préparée, autoclavée et ensuite prétraitée par l'ajout de la RNase A (Sigma) (2mg/mL) et la DNase I (Promega) (500 U/mL) et incubée à 37°C pendant 15 minutes. Cette solution tampon prétraitée est filtrée à 0.1 µm et conservée à 4°C. Le culot de virus est resuspendu en ajoutant un volume minimal (e.g. 100 µL par tube) de solution cette solution tampon prétraitée. Le culot est resuspendu pendant 24 heures à 4°C. L'échantillon est alors collecté et soniqué 10 cycles de 1 seconde avec une puissance de 8 sur le *Sonic Dismembrator Model 100* avec l'adaptateur en cornet (Fischer Scientific, Hampton, NH, USA) pour défaire les agrégats. L'échantillon est *flash frozen* dans le l'azote liquide et conservé à -80°C pour la virométrie en flux. Un aliquot est également conservé pour la titration.

Titration des virus

La titration est faite tel que décrite dans l'article précédent par la méthode de TCID₅₀-IPA en utilisant des quadruplicats.

Marquages des échantillons

Les marqueurs Syto 13 (5 µM, pic d'excitation/émission 491/514 nm, Thermofisher) et Syto 62 (5 µM, pic d'excitation/émission 628/645 nm, Thermofisher) sont dilués 1:100 et l'anticorps polyclonal contre la protéine S de OC43 conjugué à FITC (Abbexa, abx106705) est dilué 1:10 dans le tampon MTN préalablement prétraité. Un volume de virus correspondant à une concentration finale de 2×10^8 TCID₅₀/mL est incubé avec 0.6 µL de marqueur Syto 1:100 (concentration finale de 120 nM) ou avec 1.3 µL de l'anticorps dilué 1:10 (concentration finale de 8 µg/mL) pendant 45 minutes à température pièce dans le noir (recouvert de papier d'aluminium). Le double marquage a été fait en additionnant chaque marqueur avec leurs volumes ci-haut. Le virus marqué est ensuite dilué dans du tampon MNT prétraité pour obtenir un volume de 250 µL ou plus pour pouvoir réaliser les analyses au cytomètre en flux.

Analyse par virométrie en flux

L'analyse est réalisée sur un trieur à cellule Sony MA9000 muni d'une cellule (chip) jetable de 130 µm. Plusieurs lavages d'eau distillée et d'eau de javel sont faits pour obtenir un nombre négligeable d'événements lors de l'analyse du tampon. L'autocalibration de l'appareil est faite grâce aux billes *automatic setup beads* de Sony. Les lasers 488 nm et 638 nm sont utilisés. Les paramètres de la machine sont les suivants : *sample pressure 9, BSC threshold 0.5%, FSC 30%, BSC 30%, FITC 35%, APC 50%*. La durée de l'analyse est typiquement de 30 s et le débit est estimé à 0.8 µL/s. Les données sont analysées par FlowJoTM 10.6.1. Une première *gate* est appliqué en FSC et SSC pour exclure les gros agrégats et autres particules. Une seconde *gate* est appliquée en SSC et fluorescence comparant le virus non marqué au virus marqué avec une tolérance d'environ 1%.

3.2.3 Résultats

La purification et la concentration de virus permettent d'obtenir de hauts titres viraux

La préparation d'un échantillon de virus pur et concentré est utile pour la mise au point de la virométrie en flux. Différentes méthodes de purification et de concentration ont été décrites pour plusieurs virus [159, 200, 217]. Nous avons d'abord évalué le rendement d'une méthode précédemment utilisée au laboratoire pour HSV-1 [200]. Le virus OC43 a été produit sur des cellules HRT-18 avec les paramètres optimaux pour la production virale tels que décrits à la partie 1. Cependant, certaines modifications ont été apportées pour augmenter la qualité de l'échantillon pour la virométrie en flux. D'abord, le bruit de fond a pu être diminué en préparant le tapis cellulaire avec plusieurs lavages au PBS 1X et par l'utilisation d'un milieu de culture sans phénol rouge (un composé qui ajoute du bruit de fond en fluorescence). De plus, la filtration du milieu extracellulaire avec un filtre de 0.22 μm plutôt que 0.45 μm a permis de réduire le bruit de fond sans perte de virus (Figure S1, données préliminaires). Ensuite, la resuspension du culot du virus a été testée à deux différents temps, soit 2h ou 24h, à 4°C. Au départ, la resuspension de virus pendant 2h semblait octroyer un meilleur rendement (Figure S2). Toutefois, cette méthode produisait un nombre significatif d'agrégats viraux de taille suffisante pour interférer avec l'analyse de l'échantillon en virométrie en flux. Ainsi, la préparation par resuspension pendant 24h a été privilégiée. Notre méthode de purification et concentration a permis de passer de 8.2×10^7 TCID₅₀/mL à 1.5×10^9 TCID₅₀/mL en moyenne, ce qui est significativement plus concentré ($p < 0.01$) (voir Figure 1). On observe également que le surnageant issue de l'ultracentrifugation est déplétée en virus avec un titre viral moyen de 5.6×10^6 TCID₅₀/mL qui est significativement plus faible que le milieu extracellulaire ($p < 0.01$) et que le culot resuspendu ($p < 0.001$). Ceci démontre que le virus est bien culoté par l'ultracentrifugation. En termes de récupération, la préparation contenait en moyenne un total de 4.9×10^9 TCID₅₀ de virus extracellulaire pour une plaque de 500 cm² avec 60 mL de milieu. Le culot resuspendu permet de recouper en moyenne 5.3×10^8 TCID₅₀. Cette différence n'est pas statistiquement significative ($p = 0.095$). En pourcentage, on obtient en moyenne 23 % du virus dans le culot et 12 % du virus dans le surnageant issu de l'ultracentrifugation. De plus, la préparation de virus par cette même méthode sur les cellules MRC-5 a permis d'obtenir des résultats semblables (Figure S3). Puisque les cellules HRT-18

représentent un modèle de choix (voir partie 1) et qu'elles ont une croissance plus rapide que les MRC-5, elles ont été privilégiées pour la préparation de virus en virométrie en flux. Finalement, d'autres méthodes de préparation faisant usage de précipitation par polyéthylène glycol et d'ultracentrifugation sur coussin de sucrose [159] ont été testées et ont été écartées puisqu'elles augmentaient considérablement le bruit de fond. En conclusion, la préparation de virus par notre méthode permet d'obtenir un échantillon significativement concentré avec un bon taux de récupération. Cette préparation a été faite pour tous les échantillons analysés en virométrie en flux.

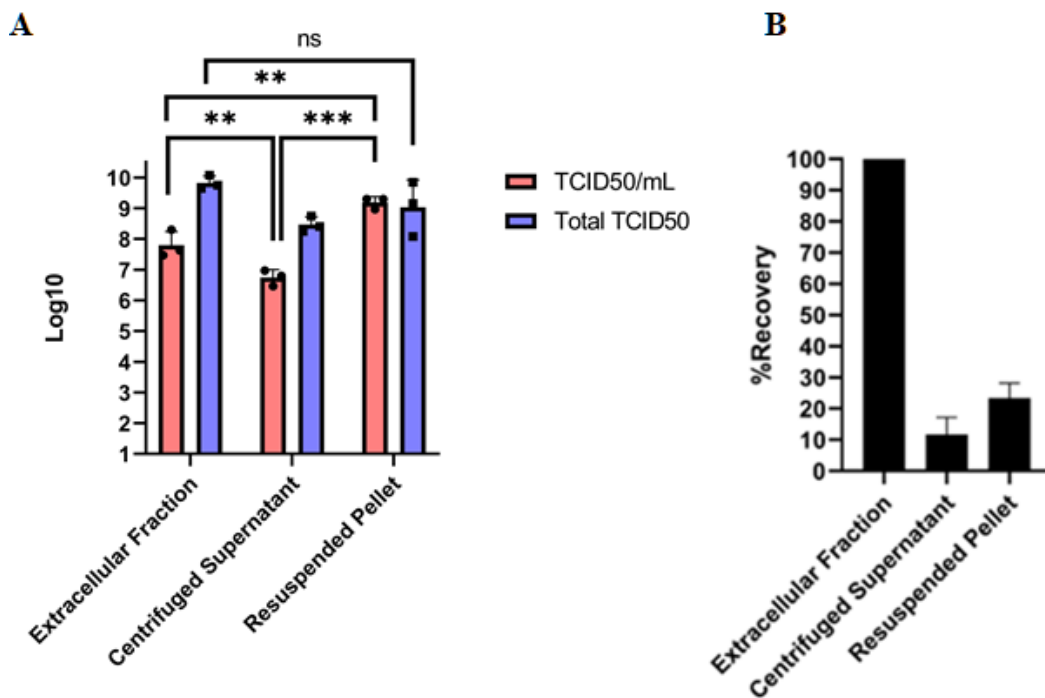


Figure 1. – Purification et concentration du virus par ultracentrifugation.

La portion extracellulaire du virus OC43 produit sur HRT-18 a été récoltée, clarifiée, filtrée et ultracentrifugée. (A) Les titres viraux ont été obtenus par TCID50-IPA. (B) Le pourcentage de récupération a été calculé en normalisant sur la fraction extracellulaire. Le total d'unités TCID₅₀ est donné pour la préparation d'une plaque de 500 cm² contenant 60 mL de milieu de culture. Les barres d'erreurs représentent le SEM (n = 3 répliques biologiques). Les titres sont calculés par la méthode *Spearman & Karber*. L'analyse statistique est faite par une ANOVA unidirectionnelle et une correction de comparaison multiple Dunnet (** p < 0.01, *** p < 0.001).

L'élimination du bruit de fond et de l'autofluorescence du virus est réalisable

L'élimination du bruit de fond est un défi majeur en virométrie en flux [204, 237]. Bien que la purification du virus joue un rôle important pour le bruit de fond, plusieurs autres paramètres doivent être optimisés concernant la préparation des échantillons marqués et de l'appareil. D'abord, la solution tampon prétraitée utilisée pour la resuspension du virus et la dilution des marqueurs a été filtrée à 0.1 μm , ce qui a permis de réduire considérablement le bruit de fond, passant de 513 à 19 événements, soit une diminution de 96 % (Figure S4). Ensuite, les marqueurs sont centrifugés pour éviter le prélèvement d'agrégats. Mais encore, un facteur crucial est la propreté de l'appareil de cytométrie en flux. L'utilisation d'une cellule jetable (Sony MA9000), d'une tubulure dédiée à la virométrie ainsi qu'un nettoyage préalable rigoureux à l'aide d'eau distillée et d'eau de javel a permis d'éliminer presque complètement le bruit de fond. Ainsi, pour une analyse de 30 secondes avec un volume estimé de 24 μL , nous obtenons seulement 4 événements durant l'analyse de la solution de tampon, 8 événements durant l'analyse d'une solution tampon marquée par Syto 13, 5 événements durant l'analyse d'une solution tampon marqué part Syto 62 et seulement 17 événements pour une solution tampon contenant une haute concentration de l'anticorps contre OC43 (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finalement, la température de l'échantillon lors de l'analyse est très importante pour le bruit de fond en fluorescence. L'analyse du virus incubé et conservé à 4°C démontre un bruit de fond en fluorescence beaucoup plus élevé qu'à la température pièce avec un *mean fluorescence intensity* (MFI) de 9317 versus 494 respectivement. Ceci est assez significatif pour empêcher la séparation des particules marquées versus non marqués (voir Figure 2). Ainsi, grâce à notre méthode, le bruit de fond des solutions, de l'appareil et l'autofluorescence du virus a pu être éliminée.

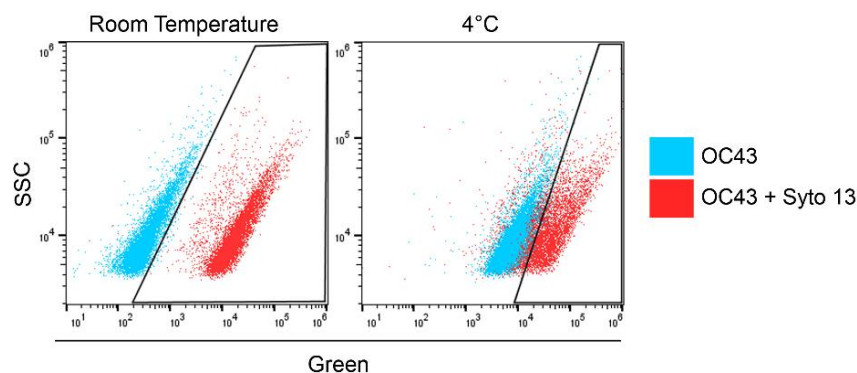


Figure 2. – Diminution du bruit de fond de fluorescence à température pièce.

Le virus OC43 a été analysé après avoir été marqué et conservé soit à la température pièce ou à 4°C. Données représentatives de N = 3 réplicats techniques et N = 2 réplicats biologiques.

Le marquage du virus par les colorants Syto est efficace

Les colorants Syto 13 et Syto 62 ont déjà été utilisés pour le marquage d'autres virus [200, 231]. Pour confirmer leur marquage du CoV-OC43, nous avons en premier analysé comme contrôles des échantillons *mock* provenant de cellules non infectées (Figure 3, A-B-C) et des échantillons de virus sans marquage (Figure 3, D-E-F). Puis, des échantillons de virus avec marquage par Syto 13 (Figure 3, G, H, I), par Syto 62 (Figure 3, K-L-M) ou par double marquage avec Syto 13 et Syto 62 (Figure 3, O-P-Q-R) ont été analysés. La comparaison sur un seul graphique du virus sans marquage versus marquage par Syto 13 (Figure 3, J) ou par Syto 62 (Figure 3, N) est aussi présentée. D'abord, on obtient 245 événements pour l'échantillon *mock* (Figure 3, A) comparativement aux 7532 événements de l'échantillon de virus non marqué (Figure 3, D), représentant moins que 2 % de particules contaminantes. De ceux-ci, seulement 98 des 245 événements se retrouvent dans la *gate* des particules virales de FSC et SSC (Figure 3, A), dont 71 événements également dans la *gate* de Syto 13 (Figure 3, B) ou 84 événements dans la *gate* de Syto 62 (Figure 3, C). Bien que ces contaminants puissent être détectés tels que des virus, ceux-ci représentent seulement 1.2 % de la population virale identifiée par Syto 13 et 1.3 % par Syto 62, ce qui ne présente pas un problème lors de l'analyse du virus. Ensuite, en comparant les virus non marqués aux virus marqués, on observe une bonne efficacité de marquage aussi bien avec Syto 13 (99.9%) (Figure 3, E versus H) que Syto 62 (98.3%) (Figure 3, M versus F). Dans les deux cas, la

population de virus marqué est bien définie et séparable de la population non marquée (Figure 3, J-N). Cependant, le marqueur Syto 13 est supérieur au Syto 62 avec une augmentation de presque 3 logs du MFI pour Syto 13 (MFI du virus non marqué de 22 vs 21 164 pour le virus marqué) comparativement à environ 1.5 log pour Syto 62 (MFI du virus non marqué de 1 598 versus 48 046 pour le virus marqué). Par ailleurs, le signal en rouge à la suite du marquage par Syto 13 (0.9%) est similaire au virus non marqué (1%) et constitue donc le bruit de fond (Figure 3, I versus F). De façon similaire, le bruit de fond en vert à la suite du marquage par Syto 62 (3.5%) est faible, bien que légèrement plus élevée par rapport au virus non marqué (1%) (Figure 3, L versus E). Le double marquage par Syto 13 et Syto 62 permet un marquage similaire en vert (99.7% versus 99.9% pour le marquage par Syto13 seul) (Figure 3, P versus H) et en rouge (98.4% versus 98.3% pour le marquage par Syto 62 seul). Ceci démontre une bonne séparation du signal et peu d'interférence entre le Syto 13 et le Syto 62. On observe ainsi que 99.5 % des particules sont doubles marquées (Figure 3, R). En sommes, ceci démontre que le marquage du virus est efficace avec Syto 13 et Syto 62 et que les contaminants cellulaires sont négligeables dans notre préparation virale.

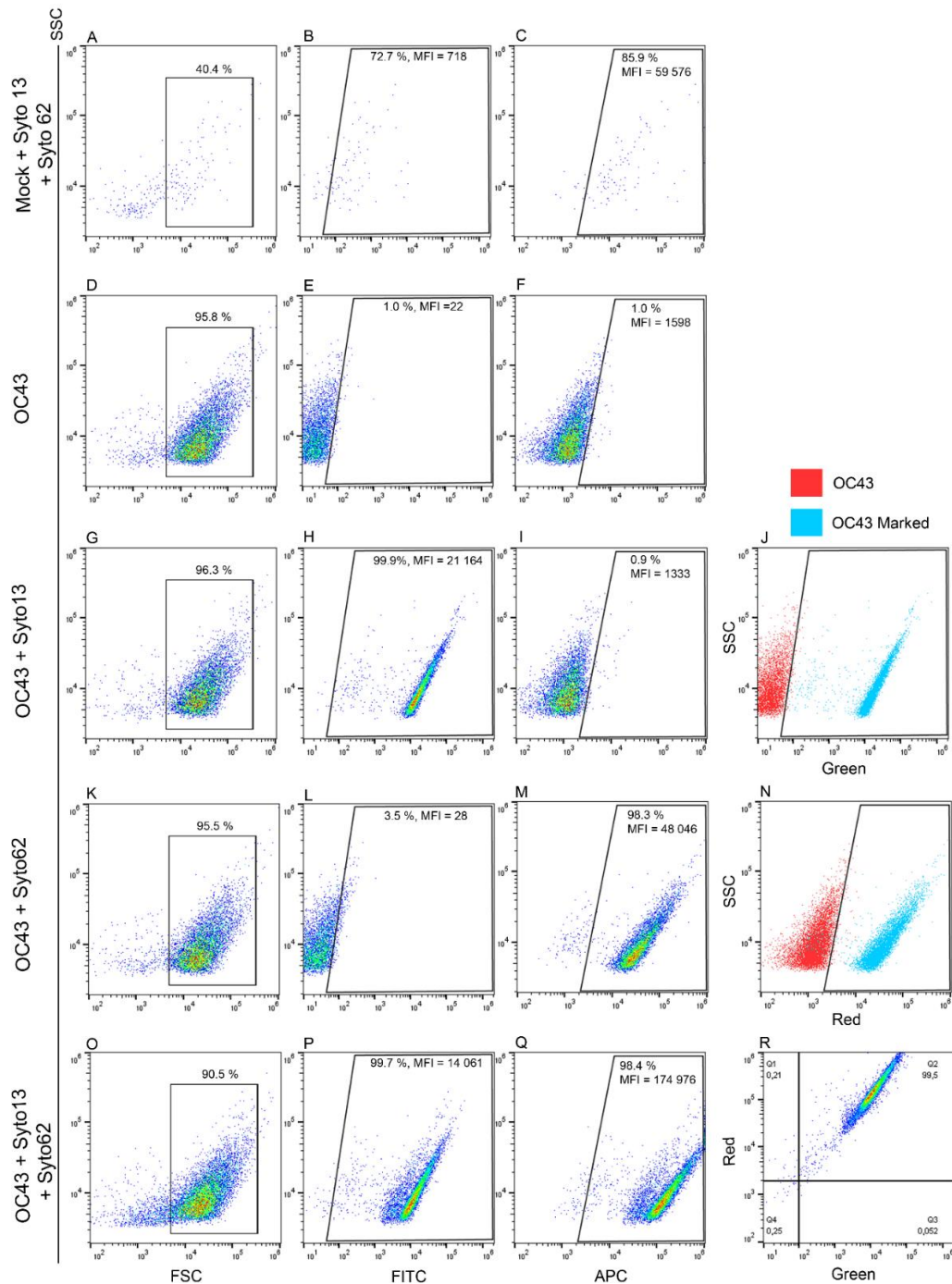


Figure 3. – Virométrie en flux du virus avec marquage par Syto.

Le virus OC43 a été analysé sans marquage (D, E, F), avec marquage par Syto 13 (G, H, I, J), avec marquage par Syto 62 (K, L, M, N) ou par double marquage avec Syto 13 et Syto 62 (O, P, Q, R). Un échantillon de milieu extracellulaire de cellules non infectées marqué par Syto 13 et Syto 62 a été utilisé comme contrôle (A, B, C). Données représentatives de N = 3 réplicats techniques.

Le marquage du virus par anticorps est possible, mais sous-optimal

Le marquage par anticorps des virions du coronavirus pour son analyse en virométrie a déjà été proposé, mais jamais démontré [214]. Deux contraintes importantes pour le marquage par anticorps sont la difficulté à réaliser des étapes de nettoyage après l'incubation avec l'anticorps primaire et secondaire et l'accessibilité des épitopes en surface. Pour surmonter ces contraintes, nous avons opté pour l'utilisation d'un anticorps polyclonal contre la protéine de surface S de OC43 couplé au FITC (vert). Comme contrôle, le virus HSV-1 a été marqué par l'anticorps ciblant la protéine S (Figure 4, A, B). Seulement 0.45 % des particules de HSV-1 ont été marquées par l'anticorps, démontrant une bonne spécificité. Pour le OC43, le marquage a permis de distinguer 43% des particules virales comparativement au virus non marqué (Figure 4, C versus D) avec une augmentation d'environ 1 log de fluorescence (MFI du virus non marqué de 18 versus 184 pour le virus marqué). De plus, le double marquage avec Syto 62 et l'anticorps indique que 57.5 % des particules virales sont marqués par Syto 62 mais pas par l'anticorps (Figure 4, E). Ainsi, l'efficacité de l'anticorps est plus faible qu'avec les colorants Syto et ne permet pas de séparer complètement les populations de virus marqués et non marqués (Figure 4, F vs G). En somme, le marquage par anticorps a permis d'identifier la présence de virus, mais pas de différencier complètement la population, ce qui est sous-optimal. Cet aspect gagnerait donc à être optimisé.

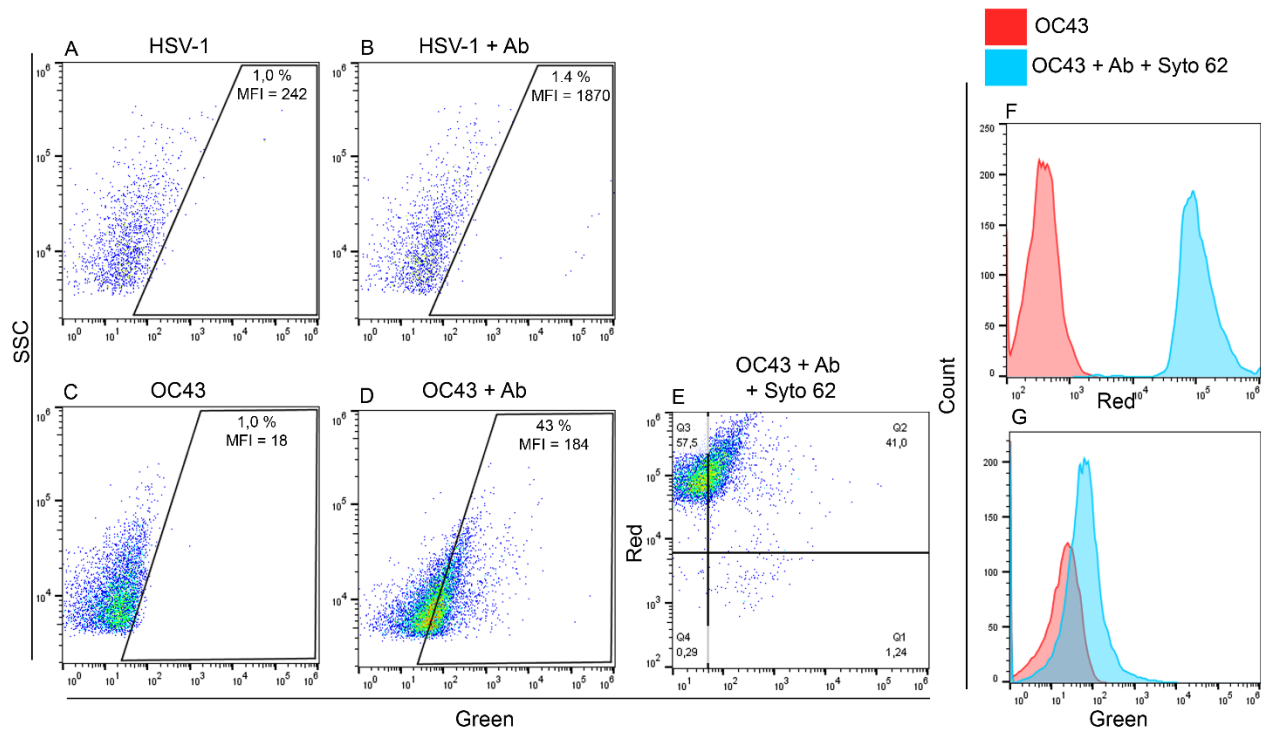


Figure 4. – Virométrie en flux du virus avec marquage par anticorps.

Le virus OC43 a été analysé sans marquage (C), avec marquage par anticorps (D) ou avec double marquage par anticorps et Syto 62 (E). Le virus HSV-1 a été analysé sans (A) ou avec marquage par l'anticorps (B) comme contrôle. (F, G) histogrammes combinés du virus non marqué et marqué par anticorps (vert) ou Syto 62 (rouge). Données représentatives de N = 3 réplicats techniques.

3.2.4 Discussion

Le développement d'outils pour l'étude des CoVs est primordial dans le contexte de la pandémie de SARS-CoV-2. La virométrie en flux est un outil de pointe en virologie qui a comme application potentielle le diagnostic moléculaire clinique. Cela comporterait des avantages par rapport aux méthodes actuelles puisqu'elle permet la quantification de particules virales intactes et leur tri pour d'autres applications. Considérant que la virométrie en flux a déjà été utilisée pour différents virus et pour différentes applications, mais jamais pour les CoVs, nous avons voulu faire la démonstration de l'applicabilité de cette méthode à ceux-ci. D'abord, nous avons utilisé le modèle substitut du OC43 pour démontrer le concept chez les CoVs. Puisque tous les CoVs possèdent une morphologie similaire avec une protéine S en surface, notre méthode pourrait être étendue aux autres CoVs tout dépendants de la disponibilité d'anticorps. Nous avons précédemment publié un modèle de production de virus efficace entre autres grâce à l'utilisation de cellules MRC-5 et HRT-18. Nous avons testé notre méthode aussi bien sur des virus produits sur MRC-5 et HRT-18 sans différence notable entre les deux en termes de purification ou de détection. Les cellules HRT-18 ont comme avantage d'avoir une croissance cellulaire plus rapide. Ceci est une considération importante puisque la préparation des échantillons pour l'analyse en virométrie en flux nécessite une grande quantité de virus. Ainsi, nous avons pu obtenir rapidement par notre méthode une grande quantité de virus avec des titres viraux élevés. Mais encore, si une plus grande quantité de virus devient nécessaire, il est possible d'utiliser des bioréacteurs pour une production à grande échelle, qui offrent en plus des avantages comme la mesure de différents paramètres tels que le pH, l'automatisation de récolte ou l'ajustement du milieu de culture pour optimiser la production virale [238]. Par ailleurs, notre rendement moyen se situe à 23 %, ce qui apparaît faible. Cependant, on n'a pas pu établir une différence statistique significative entre la quantité totale de virus extracellulaire initiale et la quantité de virus dans le culot resuspendu. Ceci peut être dû à la grande variabilité durant la production et la titration du virus qui rend difficile l'exclusion de l'hypothèse nulle. Ainsi, l'obtention d'un pourcentage de rendement fiable semble difficile.

Un enjeu important lors de la purification de CoVs est la perte du domaine S1 [127]. Celui-ci est sensible aux forces mécaniques ou chimiques incluant le pipetage ou des concentrations de sel

élevées [239]. Même la conservation du virus à 4°C peut causer sa perte [217]. Le domaine S1 est nécessaire pour l'infection donc cela peut rendre les virions non infectieux. Il est alors important de considérer ce paramètre dans l'interprétation des résultats de virométrie en flux sur les particules virales défectives. Des anticorps spécifiques à S1 ou à S2 ont déjà été utilisés pour évaluer la perte de S1 chez SARS-CoV-2 [217]. Dans notre étude, nous avons utilisé un anticorps polyclonal qui en théorie pourrait se lier aussi bien sur S1 que S2. Ainsi, la perte du domaine S1 pourrait mener à une réduction du marquage. L'utilisation d'anticorps fluorescents spécifiques à S2 serait une alternative pour éviter ce problème, mais n'est pas actuellement disponible pour OC43. D'autre part, il est connu que le domaine S1 libre par lui seul est pathogénique [118]. Ainsi, cela représente une opportunité de recherche intéressante puisque la virométrie en flux pourrait être utilisée pour évaluer la perte de S1 chez des patients et l'effet sur la pathogénèse à l'aide d'anticorps fluorescents spécifiques à S1 ou à S2.

À notre surprise, il a été possible d'obtenir un bruit de fond presque nul grâce à notre méthodologie incluant la filtration du tampon MNT prétraité par RNase et DNase à 0.1 µm, l'utilisation d'une cellule jetable et d'un tubage réservé pour la virométrie en flux en plus d'un nettoyage rigoureux de l'appareil. Il a également été reporté que l'endonucléase peut être une enzyme ajoutée au tampon pour éviter la présence d'acides nucléiques, ce qui représente une alternative possible [217], mais qui ne semble pas nécessaire dans nos travaux. De plus, nos données confirment que notre préparation mène également à peu de contaminants malgré que les conditions de centrifugation pourraient permettre le culottage de certains exosomes. Il est connu que le FBS contient beaucoup de vésicules extracellulaires (EVs) de source bovine et que cela peut impacter l'analyse de petites particules [240]. L'ultracentrifugation à 73 000 x g pendant 24h du FBS permet de se débarrasser par culottage de son contenu en EVs [204]. Il semble que le nombre d'EVs est limité et/ou que notre méthode de purification déplete un certain nombre de ces EVs, même si notre ultracentrifugation est faite à une vitesse semblable (60 000 x g) bien que pendant un temps beaucoup plus court (1h). Cela est en concordance avec l'observation que la préparation de CoV de façon similaire pour l'analyse en EM mène à peu de EVs [24]. De plus, l'utilisation de marqueurs d'EVs tels que CD63 ou CD9 pourrait nous informer sur ce phénomène [241]. Mais encore, des milieux sans sérum tel que précédemment testé (voir partie 1)

permettent d'obtenir des titres viraux similaires et pourraient réduire le nombre de contaminants. En somme, cela ne représente pas un problème important pour l'analyse de virus purifiés, mais pourrait être un enjeu lors de l'analyse d'échantillons non purifiés.

Un phénomène problématique pour l'analyse en virométrie en flux est la présence d'agrégats. Nous avons observé que la resuspension du virus pendant seulement 2h produisait des agrégats interférant avec l'analyse en virométrie en flux. Bien que la resuspension pendant 24h n'a pas causé ce problème, la présence d'agrégats pourrait être évaluée par différentes méthodes pour s'assurer de la qualité des échantillons produits. Les méthodes actuelles incluent la *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) et la *Dynamic Light scattering* (DLS) [242]. En plus, ces méthodes peuvent évaluer la distribution de la taille des virus, ce qui serait intéressant considérant que les CoVs sont reportés comme pléomorphiques. En effet, il semble y avoir une certaine distribution obtenue en SSC et en fluorescence dans la population de virus analysée (Figures 2, 3 et 4). Finalement, il est possible de réduire la viscosité de la préparation de virus et possiblement réduire la propension à former des agrégats. D'abord, les sialoglycans produits par les cellules (e.g. HRT-18) peuvent se lier aux virus pour agir comme leurre [21]. L'ajout d'hémagglutinine-estérase peut réduire ce phénomène à tel point que la propagation du virus est augmentée en culture cellulaire [21]. Ensuite, l'utilisation d'un milieu de culture sans sérum peut aussi diminuer la viscosité de l'échantillon obtenu par ultracentrifugation [239].

Un paramètre qui s'est avéré important pour l'analyse en virométrie en flux est la température d'incubation du virus lors de l'analyse. En effet, les virus non marqués incubés à 4 °C ont démontré une autofluorescence élevée comparativement aux virus incubés à température pièce. Nous n'avons pu examiner la raison exacte de l'autofluorescence des particules. Par contre, il est connu que l'augmentation de la température diminue l'efficacité quantique et donc une basse température peut augmenter la fluorescence [243]. Mais encore, les marqueurs Sytos ne semblent pas bénéficier de cet effet. De plus, il ne semble pas que cela soit dû à l'agrégation, car les particules possèdent les mêmes profils en FSC et SSC aux différentes températures. Cependant, nous ne pouvons exclure d'autres mécanismes tels que l'effet de la température sur les protéines virales. Ce phénomène ne semble pas avoir été reporté précédemment pour d'autres virus en virométrie en flux.

Les marqueurs Syto nous ont permis d'avoir un marquage complet de pratiquement toutes les particules virales. Le Syto 13 a d'abord été utilisé puisqu'il a été démontré pour la virométrie en flux avec HSV-1 [200]. Bien que les deux Syto démontrent un excellent marquage, il semble que le Syto 13 soit supérieur, probablement à cause de son meilleur rendement quantique de toute la série de Syto vert et rouge. De plus, on observe que le Syto 62 augmente très légèrement la fluorescence en vert et que la combinaison de Syto 13 et Syto 62 augmente le MFI en rouge. Ces phénomènes pourraient être expliqués par un chevauchement des spectres de fluorescence. Par ailleurs, l'ajout d'un anticorps contre la protéine S déjà conjuguée à un fluorophore est un moyen simple de marquer spécifiquement le virus, mais ne s'est pas révélé aussi efficace que les marqueurs Syto. Puisqu'aucun autre anticorps couplé contre la protéine S de OC43 est disponible, cela a limité notre étude. Cependant, l'utilisation d'anticorps primaires et d'anticorps secondaires fluorescents pourrait être faite par l'utilisation de billes magnétiques, comme cela a été fait pour d'autres virus [201]. Des anticorps contre d'autres protéines de surface pourraient également s'avérer utiles. Par exemple, la protéine HE pourrait être une cible pour les CoVs OC43 et HKU1. Mais encore, il a été reporté pour le virus enveloppé dengue qu'une température de 37°C peut entraîner un changement de conformation du virus (*virus breathing*) et permettre l'accessibilité d'épitopes qui sont normalement inaccessibles à température pièce [244, 245]. Ainsi, une température plus élevée pourrait augmenter l'efficacité de marquage quoiqu'en réduisant possiblement le titre viral à cause de la dégradation du virus. Toutefois, même si notre population de virus marqué n'a pas pu être complètement séparée, il reste possible de distinguer l'échantillon contenant le virus grâce à l'augmentation du MFI. Ce principe a déjà été démontré pour SARS-CoV-2 [213]. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps sous-optimal pourrait quand même avoir un potentiel d'utilisation pour un test diagnostique, mais ne peut pas nous informer précisément sur la quantité de particules virales. Ultiment, de meilleurs anticorps seraient souhaitables.

Finalement, nous avons prouvé que la virométrie en flux peut être utilisée pour détecter le CoV-OC43. Il serait intéressant de reproduire ces résultats chez SARS-CoV-2 et chez différents CoVs. En fin, diverses méthodes de calibration pourraient être utilisées pour permettre des applications cliniques sur différentes plateformes de cytométrie en plus d'automatiser l'analyse pour mener à une application clinique [237, 246]

3.2.5 Annexe

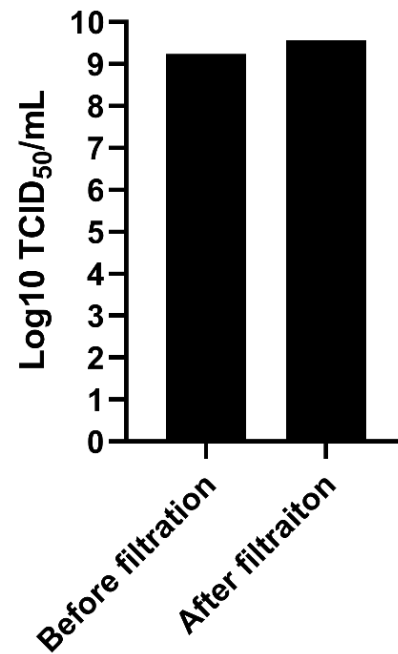


Figure S1. – La filtration à 0.22 μm n’affecte pas le titre virus.

La portion extracellulaire du virus OC43 produit sur HRT-18 a été récoltée, clarifiée et titré avant ou après filtration à 0.22 μm . Les titres viraux ont été obtenus par TCID₅₀-IPA et calculés par la méthode *Spearman & Karber*. Données préliminaires (n = 1).

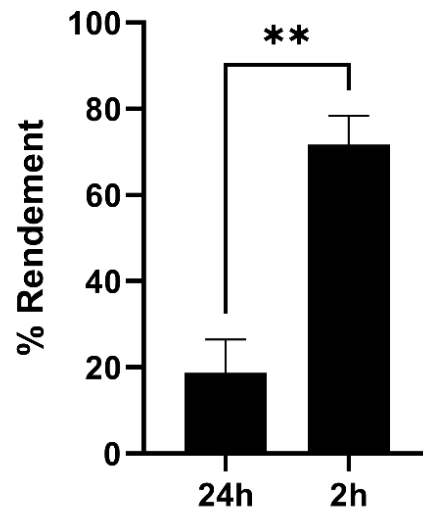


Figure S2. – La resuspension du virus pendant 2h versus 24h donne un meilleur rendement. La portion extracellulaire du virus OC43 produit sur HRT-18 a été récoltée, clarifiée, filtrée et centrifugée. Le culot a été resuspendu pendant soit 2h ou 24h à 4 °C. Les titres viraux ont été obtenus par TCID50-IPA et calculés par la méthode *Spearman & Karber*. Les barres d’erreurs représentent le SEM (n = 3 réplicats biologiques). L’analyse statistique est faite par un *student t-test* (** p < 0.01).

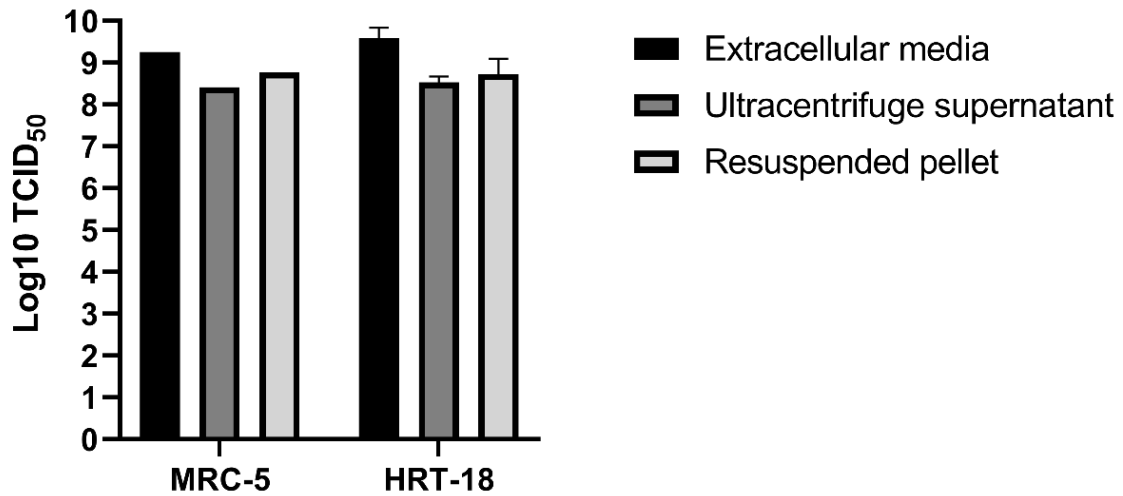


Figure S3. – La purification de virus donne des titres semblables pour HRT-18 et MRC-5. Les portions extracellulaires du virus OC43 produit sur MRC-5 (n = 1) ou sur HRT-18 (n = 3) ont été récoltées, clarifiées, filtrées et ultracentrifugées. Le culot a été resuspendu pendant 2h ou 24h à 4 °C. Les titres viraux ont été obtenus par TCID50-IPA et calculés par la méthode *Spearman & Karber*. Les barres d’erreurs représentent le SEM (n = 3 réplicats biologiques).

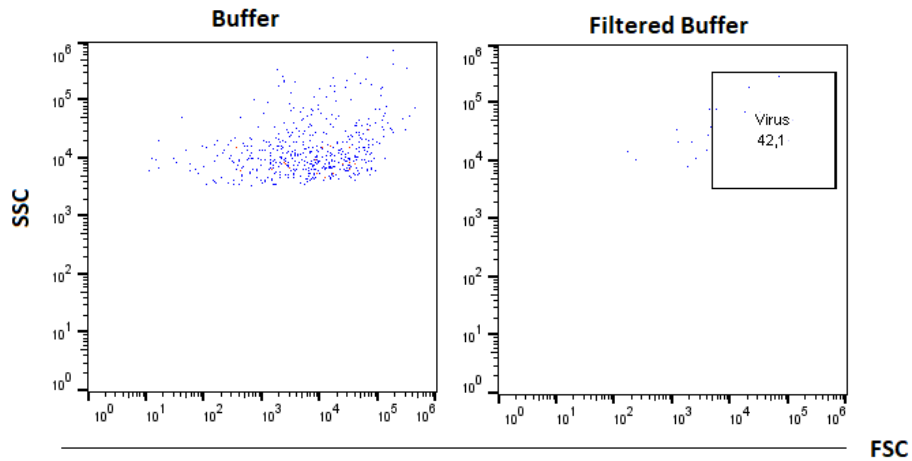


Figure S4. – Diminution du bruit de fond par filtration à 0.1 μm . Le tampon prétraité à la RNase et la DNase a été analysé en virométrie en flux avant et après filtration à 0.1 μm pendant 1 minute. Le nombre d'événements pour le tampon non filtré est de 513 versus 19 pour le tampon filtré, soit une diminution de 96 %. Données représentatives de N = 3 réplicats techniques.

Chapitre 4 - Conclusion

Les CoVs, comme le SARS-CoV-2, représentent un risque grave pour la santé publique à cause de leurs réservoirs animaux et transmissions zoonotique, de leur potentiel pandémique et de leur mutation rapide. Les outils dont nous disposons pour combattre ces virus autant du point de vue des méthodes d'études, des méthodes diagnostiques ou même thérapeutiques sont insuffisants. Le CoV-OC43 est un des hCoV manipulables en BSL-2 qui a été le plus étudié. Cependant, il existe quand même relativement peu de littérature sur celui-ci. Cela fait en sorte que les méthodes de bases incluant les modèles cellulaires et la titration virale sont peu développés et n'ont pas de consensus. Nous avons d'abord pu établir un modèle solide pour la production et la titration du CoV-OC43. Cette démarche a été nécessaire pour pouvoir produire des échantillons purifiés et concentrés de virus qui peuvent être analysés par diverses techniques, dont la virométrie en flux.

Bien que la virométrie en flux représente une méthode de pointe avec le potentiel d'étudier à haut débit les populations virales ainsi qu'effectuer leur tri, celle-ci est peu développée et utilisée. Les raisons principales sont les difficultés techniques rencontrées lors de sa mise au point. Nous avons démontré la possibilité de mettre au point cette méthode pour le hCoV-OC43 avec un très faible bruit de fond et un excellent marquage sur un cytomètre en flux Sony MA9000. Cet appareil se démarque par l'utilisation d'une puce micro fluïdique jetable et d'une tubulure qui peut être changée et autoclavé au besoin, rendant son utilisation plus facile et reproductible. Ainsi, l'adoption de la virométrie en flux par plusieurs laboratoires de recherche est simplifiée et peut-être faite sur une plateforme commune en s'assurant d'obtenir une tubulure dédiée au projet de recherche en question pour éviter le bruit de fond de contaminants.

Nous envisageons un futur où la virométrie en flux est systématiquement utilisé pour rapidement compter et étudier l'hétérogénéité des particules virales à l'aide de différents marqueurs (acides nucléiques, lipidiques, anticorps contre des protéines de surface, etc.). En recherche, l'identification de différentes populations virales et leur tri ouvrira la porte à des études haut débit comme le *single-virus genomics* qui nous permet de comprendre les virus en termes de populations. En clinique, une méthode diagnostique permettant un compte viral précis et rapide

en plus de s'appuyer sur différents marqueurs qui pourraient être informatifs sur la population virale permettra d'avoir une méthode de diagnostic plus informative. Compte tenu du manque de compréhension de plusieurs phénomènes cruciaux chez les virus et particulièrement chez les CoVs, comme les routes de transmissions, les *superspreaders*, l'évolution de la maladie ou la dynamique des populations virales, l'utilisation de la virométrie en flux aussi bien en recherche qu'en clinique pourra nous éclairer.

Références bibliographiques

1. S, M.N., et al., *Infectious Bronchitis Coronavirus Infection in Chickens: Multiple System Disease with Immune Suppression*. Pathogens, 2020. **9**(10).
2. Jung, K., L.J. Saif, and Q. Wang, *Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control*. Virus research, 2020. **286**: p. 198045-198045.
3. Wang, F.-I., S.A. Stohlman, and J.O. Fleming, *Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated*. Journal of Neuroimmunology, 1990. **30**(1): p. 31-41.
4. Reed, S.E., *The behaviour of recent isolates of human respiratory coronavirus in vitro and in volunteers: evidence of heterogeneity among 229E-related strains*. Journal of medical virology, 1984. **13**(2): p. 179-192.
5. World Health Organization (WHO). *Severe Acute Respiratory Syndrome – Singapore, 2003*. 2003; Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/949371/retrieve>.
6. van der Hoek, L., et al., *Identification of a new human coronavirus*. Nature Medicine, 2004. **10**(4): p. 368-373.
7. Woo, P.C.Y., et al., *Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia*. Journal of Virology, 2005. **79**(2): p. 884-895.
8. Zaki, A.M., et al., *Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(19): p. 1814-1820.
9. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*. Nature, 2020. **579**(7798): p. 270-273.
10. Fields, *Virology*. 6th Edition ed. Vol. 1. 2013: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.
11. Wu, H.Y. and D.A. Brian, *Subgenomic messenger RNA amplification in coronaviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12257-62.
12. Lim, Y.X., et al., *Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions*. Diseases (Basel, Switzerland), 2016. **4**(3): p. 26.
13. de Haan, C.A., et al., *Cleavage of group 1 coronavirus spike proteins: how furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation*. J Virol, 2008. **82**(12): p. 6078-83.
14. Jackwood, M.W., et al., *Emergence of a group 3 coronavirus through recombination*. Virology, 2010. **398**(1): p. 98-108.
15. Ding X., L., L. Jia, and F. To., *Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae)*. Encyclopedia of Virology, 2021.
16. Bar-On, Y.M., et al., *SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers*. eLife, 2020. **9**: p. e57309.
17. Lissenberg, A., et al., *Luxury at a Cost? Recombinant Mouse Hepatitis Viruses Expressing the Accessory Hemagglutinin Esterase Protein Display Reduced Fitness In Vitro*. Journal of Virology, 2005. **79**(24): p. 15054-15063.
18. Neuman, B.W., et al., *A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology*. Journal of Structural Biology, 2011. **174**(1): p. 11-22.

19. Ke, Z., et al., *Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions*. Nature, 2020.
20. Zhu, N., et al., *A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019*. N Engl J Med, 2020. **382**(8): p. 727-733.
21. 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, 2020. **117**(41): p. 25759-25770.
22. Bakkers, M.J.G., et al., *Betacoronavirus Adaptation to Humans Involved Progressive Loss of Hemagglutinin-Esterase Lectin Activity*. Cell Host & Microbe, 2017. **21**(3): p. 356-366.
23. Serrano, P., et al., *Nuclear magnetic resonance structure of the nucleic acid-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 3*. J Virol, 2009. **83**(24): p. 12998-3008.
24. Neuman, B.W., et al., *Proteomics Analysis Unravels the Functional Repertoire of Coronavirus Nonstructural Protein 3*. Journal of Virology, 2008. **82**(11): p. 5279-5294.
25. Neuman, B.W., et al., *Supramolecular Architecture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Revealed by Electron Cryomicroscopy*. Journal of Virology, 2006. **80**(16): p. 7918-7928.
26. El Bilali, N., et al., *Quantitative Evaluation of Protein Heterogeneity within Herpes Simplex Virus 1 Particles*. J Virol, 2017. **91**(10).
27. Burnie, J. and C. Guzzo, *The Incorporation of Host Proteins into the External HIV-1 Envelope*. Viruses, 2019. **11**(1): p. 85.
28. Shaw, M.L., et al., *Cellular Proteins in Influenza Virus Particles*. PLOS Pathogens, 2008. **4**(6): p. e1000085.
29. Schirtzinger, E.E., Y. Kim, and A.S. Davis, *Improving human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) research comparability in studies using HCoV-OC43 as a surrogate for SARS-CoV-2*. J Virol Methods, 2021. **299**: p. 114317.
30. MÉNdez, A.N.A., et al., *Molecular Characterization of Transmissible Gastroenteritis Coronavirus Defective Interfering Genomes: Packaging and Heterogeneity*. Virology, 1996. **217**(2): p. 495-507.
31. Nieto-Torres, J.L., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome*. Virology, 2015. **485**: p. 330-339.
32. Brant, A.C., et al., *SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication*. Cell Biosci, 2021. **11**(1): p. 136.
33. Huynh, J., et al., *Evidence Supporting a Zoonotic Origin of Human Coronavirus Strain NL63*. Journal of Virology, 2012. **86**(23): p. 12816-12825.
34. Xia, X., *Extreme Genomic CpG Deficiency in SARS-CoV-2 and Evasion of Host Antiviral Defense*. Molecular Biology and Evolution, 2020. **37**(9): p. 2699-2705.
35. Robson, F., et al., *Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting*. Molecular Cell, 2020. **79**(5): p. 710-727.
36. Forni, D., et al., *Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes*. Trends in Microbiology, 2017. **25**(1): p. 35-48.
37. Tortorici, M.A., et al., *Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors*. Nat Struct Mol Biol, 2019. **26**(6): p. 481-489.

38. Butler, N., et al., *Murine encephalitis caused by HCoV-OC43, a human coronavirus with broad species specificity, is partly immune-mediated*. *Virology*, 2006. **347**(2): p. 410-421.
39. McRoy, W.C. and R.S. Baric, *Amino acid substitutions in the S2 subunit of mouse hepatitis virus variant V51 encode determinants of host range expansion*. *J Virol*, 2008. **82**(3): p. 1414-24.
40. Qu, X.X., et al., *Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(33): p. 29588-95.
41. Wu, K., et al., *Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(12): p. 8904-11.
42. Ontiveros, E., et al., *Enhanced Virulence Mediated by the Murine Coronavirus, Mouse Hepatitis Virus Strain JHM, Is Associated with a Glycine at Residue 310 of the Spike Glycoprotein*. *Journal of Virology*, 2003. **77**(19): p. 10260-10269.
43. Brison, E., et al., *Glutamate Excitotoxicity Is Involved in the Induction of Paralysis in Mice after Infection by a Human Coronavirus with a Single Point Mutation in Its Spike Protein*. 2011. **85**(23): p. 12464-12473.
44. Greaney, A.J., et al., *Complete Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain that Escape Antibody Recognition*. *Cell Host & Microbe*, 2021. **29**(1): p. 44-57.e9.
45. Starr, T.N., et al., *Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding*. *Cell*, 2020. **182**(5): p. 1295-1310.e20.
46. Petitjean, S.J.L., et al., *Multivalent 9-O-Acetylated-sialic acid glycoclusters as potent inhibitors for SARS-CoV-2 infection*. *Nature Communications*, 2022. **13**(1): p. 2564.
47. Hurdiss, D.L., et al., *Cryo-EM structure of coronavirus-HKU1 haemagglutinin esterase reveals architectural changes arising from prolonged circulation in humans*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 4646.
48. Yokomori, K., et al., *Hemagglutinin-esterase-specific monoclonal antibodies alter the neuropathogenicity of mouse hepatitis virus*. *J Virol*, 1992. **66**(5): p. 2865-74.
49. Desforges, M., et al., *The acetyl-esterase activity of the hemagglutinin-esterase protein of human coronavirus OC43 strongly enhances the production of infectious virus*. *J Virol*, 2013. **87**(6): p. 3097-107.
50. Ye, Y., et al., *Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist*. *J Virol*, 2007. **81**(6): p. 2554-63.
51. Mortola, E. and P. Roy, *Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system*. *FEBS Lett*, 2004. **576**(1-2): p. 174-8.
52. Schoeman, D. and B.C. Fielding, *Coronavirus envelope protein: current knowledge*. *Virology Journal*, 2019. **16**(1): p. 69.
53. Haan, C.A.M.d., H. Vennema, and P.J.M. Rottier, *Assembly of the Coronavirus Envelope: Homotypic Interactions between the M Proteins*. *Journal of Virology*, 2000. **74**(11): p. 4967-4978.
54. Naskalska, A., et al., *Membrane Protein of Human Coronavirus NL63 Is Responsible for Interaction with the Adhesion Receptor*. *Journal of Virology*, 2019. **93**(19): p. e00355-19.

55. Siu, K.L., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3.TANK.TBK1/IKKepsilon complex*. J Biol Chem, 2009. **284**(24): p. 16202-16209.
56. Ruch, T.R. and C.E. Machamer, *The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond*. Viruses, 2012. **4**(3): p. 363-382.
57. Venkatagopalan, P., et al., *Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly*. Virology, 2015. **478**: p. 75-85.
58. DeDiego, M.L., et al., *Inhibition of NF- κ B-mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival*. Journal of virology, 2014. **88**(2): p. 913-924.
59. Castaño-Rodríguez, C., et al., *Role of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporins E, 3a, and 8a in Replication and Pathogenesis*. mBio, 2018. **9**(3): p. e02325-17.
60. Cottam, E.M., M.C. Whelband, and T. Wileman, *Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion*. Autophagy, 2014. **10**(8): p. 1426-1441.
61. Narayanan, K., C. Huang, and S. Makino, *SARS coronavirus accessory proteins*. Virus Research, 2008. **133**(1): p. 113-121.
62. Redondo, N., et al., *SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns*. Frontiers in Immunology, 2021. **12**.
63. Simmons, G., et al., *Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry*. 2005. **102**(33): p. 11876-11881.
64. Kawase, M., et al., *Simultaneous Treatment of Human Bronchial Epithelial Cells with Serine and Cysteine Protease Inhibitors Prevents Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry*. Journal of Virology, 2012. **86**(12): p. 6537-6545.
65. Kim, Y., et al., *Trypsin enhances SARS-CoV-2 infection by facilitating viral entry*. Arch Virol, 2022.
66. Angelini, M.M., et al., *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles*. mBio, 2013. **4**(4): p. e00524-13.
67. Eymieux, S., et al., *Secretory Vesicles Are the Principal Means of SARS-CoV-2 Egress*. Cells, 2021. **10**(8): p. 2047.
68. Chen, D., et al., *ORF3a of SARS-CoV-2 promotes lysosomal exocytosis-mediated viral egress*. Developmental Cell, 2021. **56**(23): p. 3250-3263.e5.
69. Reusken, C.B.E.M., et al., *Cross host transmission in the emergence of MERS coronavirus*. Current Opinion in Virology, 2016. **16**: p. 55-62.
70. Lau, S.K.P., et al., *Molecular Evolution of Human Coronavirus 229E in Hong Kong and a Fatal COVID-19 Case Involving Coinfection with a Novel Human Coronavirus 229E Genogroup*. mSphere, 2021. **6**(1).
71. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor*. Cell, 2020. **181**(2): p. 271-280 e8.
72. Cantuti-Castelvetri, L., et al., *Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity*. Science, 2020. **370**(6518): p. 856-860.
73. Raghav, P.K., K. Kalyanaraman, and D. Kumar, *Human cell receptors: potential drug targets to combat COVID-19*. Amino Acids, 2021. **53**(6): p. 813-842.

74. Avolio, E., et al., *The SARS-CoV-2 Spike protein disrupts human cardiac pericytes function through CD147 receptor-mediated signalling: a potential non-infective mechanism of COVID-19 microvascular disease*. *Clinical Science*, 2021. **135**(24): p. 2667-2689.
75. Pyrc, K., et al., *Culturing the Unculturable: Human Coronavirus HKU1 Infects, Replicates, and Produces Progeny Virions in Human Ciliated Airway Epithelial Cell Cultures*. *Journal of Virology*, 2010. **84**(21): p. 11255-11263.
76. Collins, A.R., *HLA Class I Antigen Serves as a Receptor for Human Coronavirus OC43*. *Immunological Investigations*, 1993. **22**(2): p. 95-103.
77. Millet, J.K. and G.R. Whittaker, *Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis*. *Virus Res*, 2015. **202**: p. 120-34.
78. Bestle, D., et al., *TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells*. *Life science alliance*, 2020. **3**(9): p. e202000786.
79. Hirose, R., et al., *A Cytopathic Effect-Based Tissue Culture Method for HCoV-OC43 Titration Using TMPRSS2-Expressing VeroE6 Cells*. *mSphere*, 2021. **6**(3): p. e00159-21.
80. Matsuyama, S., et al., *Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells*. 2020. **117**(13): p. 7001-7003.
81. Menachery, V.D., et al., *Trypsin Treatment Unlocks Barrier for Zoonotic Bat Coronavirus Infection*. 2020. **94**(5): p. e01774-19.
82. Storz, J., R. Rott, and G. Kaluza, *Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment*. 1981. **31**(3): p. 1214-1222.
83. Graham, R.L., E.F. Donaldson, and R.S. Baric, *A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses*. *Nature Reviews Microbiology*, 2013. **11**(12): p. 836-848.
84. Vijgen, L., et al., *Complete Genomic Sequence of Human Coronavirus OC43: Molecular Clock Analysis Suggests a Relatively Recent Zoonotic Coronavirus Transmission Event*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(3): p. 1595-1604.
85. Cotten, M., et al., *Spread, circulation, and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus*. *mBio*, 2014. **5**(1).
86. Li, W., et al., *Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses*. *Science*, 2005. **310**(5748): p. 676-9.
87. Pfefferle, S., et al., *Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana*. *Emerg Infect Dis*, 2009. **15**(9): p. 1377-84.
88. Lu, R., et al., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding*. *Lancet*, 2020. **395**(10224): p. 565-574.
89. Shi, Z. and Z. Hu, *A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus*. *Virus Res*, 2008. **133**(1): p. 74-87.
90. Guan, Y., et al., *Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China*. *Science*, 2003. **302**(5643): p. 276-8.
91. Vijaykrishna, D., et al., *Evolutionary Insights into the Ecology of Coronaviruses*. *Journal of Virology*, 2007. **81**(8): p. 4012-4020.
92. Yip, C.W., et al., *Phylogenetic perspectives on the epidemiology and origins of SARS and SARS-like coronaviruses*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009. **9**(6): p. 1185-1196.
93. Gloza-Rausch, F., et al., *Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany*. *Emerg Infect Dis*, 2008. **14**(4): p. 626-31.

94. Cui, J., F. Li, and Z.L. Shi, *Origin and evolution of pathogenic coronaviruses*. Nat Rev Microbiol, 2019. **17**(3): p. 181-192.
95. van Doremalen, N., et al., *Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1*. 2020. **382**(16): p. 1564-1567.
96. Salian, V.S., et al., *COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies*. Molecular Pharmaceutics, 2021. **18**(3): p. 754-771.
97. Vabret, A., et al., *Coronavirus humains (HCoV)*. Pathologie Biologie, 2009. **57**(2): p. 149-160.
98. Xin, H., et al., *The Incubation Period Distribution of Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-analysis*. Clinical Infectious Diseases, 2021. **73**(12): p. 2344-2352.
99. Lemieux Jacob, E., et al., *Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 in Boston highlights the impact of superspreading events*. Science, 2021. **371**(6529): p. eabe3261.
100. Arons, M.M., et al., *Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility*. N Engl J Med, 2020. **382**(22): p. 2081-2090.
101. MCINTOSH, K., et al., *SEROEPIDEMIOLOGIC STUDIES OF CORONAVIRUS INFECTION IN ADULTS AND CHILDREN1*. American Journal of Epidemiology, 1970. **91**(6): p. 585-592.
102. Gerna, G., et al., *Genetic variability of human coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients*. Journal of Medical Virology, 2006. **78**(7): p. 938-949.
103. Veldhoen, M. and J.P. Simas, *Endemic SARS-CoV-2 will maintain post-pandemic immunity*. Nature Reviews Immunology, 2021. **21**(3): p. 131-132.
104. Lamers, M.M. and B.L. Haagmans, *SARS-CoV-2 pathogenesis*. Nature Reviews Microbiology, 2022. **20**(5): p. 270-284.
105. Bradburne, A.F., M.L. Bynoe, and D.A. Tyrrell, *Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers*. Br Med J, 1967. **3**(5568): p. 767-9.
106. McIntosh, K., et al., *Coronavirus Infection in Acute Lower Respiratory Tract Disease of Infants*. The Journal of Infectious Diseases, 1974. **130**(5): p. 502-507.
107. Fehr, A.R. and S. Perlman, *Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis*, in *Coronaviruses: Methods and Protocols*, H.J. Maier, E. Bickerton, and P. Britton, Editors. 2015, Springer New York: New York, NY. p. 1-23.
108. Sørensen, M.D., et al., *Severe acute respiratory syndrome (SARS): development of diagnostics and antivirals*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1067**(1): p. 500-505.
109. Yang, Y., et al., *Bcl-xL inhibits T-cell apoptosis induced by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors*. Biochemical Journal, 2005. **392**(1): p. 135-143.
110. Zanza, C., et al., *Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy*. Medicina, 2022. **58**(2): p. 144.
111. Filippatos, F., E.-B. Tatsi, and A. Michos, *Immune response to SARS-CoV-2 in children: A review of the current knowledge*. Pediatric Investigation, 2021. **05**(03): p. 217-228.
112. Desforges, M., et al., *Uncertainty around the Long-Term Implications of COVID-19*. Pathogens, 2021. **10**(10): p. 1267.
113. Hamdy, A. and A. Leonardi, *Superantigens and SARS-CoV-2*. Pathogens, 2022. **11**(4): p. 390.

114. Meinhardt, J., et al., *Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19*. *Nature Neuroscience*, 2021. **24**(2): p. 168-175.
115. Favreau, D.J., et al., *A human coronavirus OC43 variant harboring persistence-associated mutations in the S glycoprotein differentially induces the unfolded protein response in human neurons as compared to wild-type virus*. *Virology*, 2009. **395**(2): p. 255-267.
116. Zarei, M., et al., *Long-term side effects and lingering symptoms post COVID-19 recovery*. *Reviews in Medical Virology*, 2022. **32**(3): p. e2289.
117. Ming, Y. and L. Qiang, *Involvement of Spike Protein, Furin, and ACE2 in SARS-CoV-2-Related Cardiovascular Complications*. *SN Compr Clin Med*, 2020. **2**(8): p. 1103-1108.
118. Letarov, A.V., V.V. Babenko, and E.E. Kulikov, *Free SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Particles May Play a Role in the Pathogenesis of COVID-19 Infection*. *Biochemistry (Moscow)*, 2021. **86**(3): p. 257-261.
119. Theoharides, T.C., *Could SARS-CoV-2 Spike Protein Be Responsible for Long-COVID Syndrome?* *Molecular Neurobiology*, 2022. **59**(3): p. 1850-1861.
120. Versteeg, G.A., et al., *The Coronavirus Spike Protein Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Upregulation of Intracellular Chemokine mRNA Concentrations*. *Journal of Virology*, 2007. **81**(20): p. 10981-10990.
121. Kim, E.S., et al., *Spike Proteins of SARS-CoV-2 Induce Pathological Changes in Molecular Delivery and Metabolic Function in the Brain Endothelial Cells*. *Viruses*, 2021. **13**(10): p. 2021.
122. He, X., et al., *Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19*. *Nature Medicine*, 2020. **26**(5): p. 672-675.
123. Leonardi, A.J. and R.B. Proenca, *Akt-Fas to Quell Aberrant T Cell Differentiation and Apoptosis in Covid-19*. *Frontiers in Immunology*, 2020. **11**.
124. Shroff, A. and T.Y. Nazarko, *The Molecular Interplay between Human Coronaviruses and Autophagy*. *Cells*, 2021. **10**(8): p. 2022.
125. Min, J.S., et al., *Kurarinone Inhibits HCoV-OC43 Infection by Impairing the Virus-Induced Autophagic Flux in MRC-5 Human Lung Cells*. *Journal of Clinical Medicine*, 2020. **9**(7): p. 2230.
126. Zhang, Y., et al., *The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-Iota*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. **118**(23).
127. Macnaughton, M.R., et al., *Antibody to virus components in volunteers experimentally infected with human coronavirus 229E group viruses*. *Infection and Immunity*, 1981. **31**(3): p. 845-849.
128. Hicks, J., et al., *Serologic Cross-Reactivity of SARS-CoV-2 with Endemic and Seasonal Betacoronaviruses*. *Journal of Clinical Immunology*, 2021. **41**(5): p. 906-913.
129. Health Canada. *Drug and vaccine authorizations for COVID-19: List of authorized drugs, vaccines and expanded indications*. 2022 [cited 2022-08-05; Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/covid19-industry/drugs-vaccines-treatments/authorization/list-drugs.html#wb-auto-4>].
130. Robinson, P.C., et al., *COVID-19 therapeutics: Challenges and directions for the future*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022. **119**(15): p. e2119893119.

131. Basu, D., V.P. Chavda, and A.A. Mehta, *Therapeutics for COVID-19 and post COVID-19 complications: An update*. Current Research in Pharmacology and Drug Discovery, 2022. **3**: p. 100086.
132. Volz, A., et al., *Protective Efficacy of Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Delivering Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein*. J Virol, 2015. **89**(16): p. 8651-6.
133. Zhou, P., et al., *Research progress and challenges to coronavirus vaccine development*. Journal of Medical Virology, 2021. **93**(2): p. 741-754.
134. World Health, O., *Background document on the inactivated vaccine Sinovac-CoronaVac against COVID-19: background document to the WHO Interim recommendations for use of the inactivated COVID-19 vaccine, CoronaVac, developed by Sinovac, 24 May 2021*. 2021, World Health Organization: Geneva.
135. Focosi, D., et al., *Very low levels of remdesivir resistance in SARS-CoV-2 genomes after 18 months of massive usage during the COVID19 pandemic: A GISAID exploratory analysis*. Antiviral Research, 2022. **198**: p. 105247.
136. Kumakamba, C., et al., *Coronavirus surveillance in wildlife from two Congo basin countries detects RNA of multiple species circulating in bats and rodents*. PLOS ONE, 2021. **16**(6): p. e0236971.
137. Tyrrell, D.A. and M.L. Bynoe, *CULTIVATION OF A NOVEL TYPE OF COMMON-COLD VIRUS IN ORGAN CULTURES*. British medical journal, 1965. **1**(5448): p. 1467-1470.
138. Larson, H., S.E. Reed, and D. Tyrrell, *Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults*. Journal of medical virology, 1980. **5**(3): p. 221-229.
139. Phillpotts, R.J., *Clones of MRC-C cells may be superior to the parent line for the culture of 229E-like strains of human respiratory coronavirus*. J Virol Methods, 1983. **6**(5): p. 267-9.
140. Kaye, M., *SARS-associated coronavirus replication in cell lines*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(1): p. 128-33.
141. V'kovski, P., et al., *Disparate temperature-dependent virus–host dynamics for SARS-CoV-2 and SARS-CoV in the human respiratory epithelium*. PLOS Biology, 2021. **19**(3): p. e3001158.
142. Chiara, M., et al., *Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities*. Briefings in Bioinformatics, 2020. **22**(2): p. 616-630.
143. Ramirez, S., et al., *Overcoming Culture Restriction for SARS-CoV-2 in Human Cells Facilitates the Screening of Compounds Inhibiting Viral Replication*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2021. **65**(7): p. e00097-21.
144. Shirato, K., M. Kawase, and S. Matsuyama, *Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry*. Virology, 2018. **517**: p. 9-15.
145. Thi Nhu Thao, T., et al., *Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform*. Nature, 2020. **582**(7813): p. 561-565.
146. Lam, L.T., et al., *WHOLE-GENOME SEQUENCING AND *DE NOVO* ASSEMBLY OF A 2019 NOVEL CORONAVIRUS (SARS-COV-2) STRAIN ISOLATED IN VIETNAM*. bioRxiv, 2020: p. 2020.06.12.149377.
147. Letko, M., A. Marzi, and V. Munster, *Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses*. Nat Microbiol, 2020. **5**(4): p. 562-569.

148. Savoie, C. and R. Lippe, *Optimizing human coronavirus OC43 growth and titration*. PeerJ, 2022. **10**: p. e13721.
149. Kim, S., et al., *Integrated CRISPR-Cas9 System-Mediated Knockout of IFN- γ ; and IFN- γ ; Receptor 1 in the Vero Cell Line Promotes Viral Susceptibility*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(15): p. 8217.
150. Conde, J.N., et al., *Recombinant ACE2 Expression Is Required for SARS-CoV-2 To Infect Primary Human Endothelial Cells and Induce Inflammatory and Procoagulative Responses*. mBio, 2020. **11**(6): p. e03185-20.
151. Bao, L., et al., *The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice*. Nature, 2020. **583**(7818): p. 830-833.
152. Yuan, L., et al., *Animal models for emerging coronavirus: progress and new insights*. Emerg Microbes Infect, 2020. **9**(1): p. 949-961.
153. Roberts, A., et al., *A Mouse-Adapted SARS-Coronavirus Causes Disease and Mortality in BALB/c Mice*. PLOS Pathogens, 2007. **3**(1): p. e5.
154. Xie, P., et al., *A Mouse-Adapted Model of HCoV-OC43 and Its Usage to the Evaluation of Antiviral Drugs*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 845269.
155. Wentworth, D.E., et al., *Cells of human aminopeptidase N (CD13) transgenic mice are infected by human coronavirus-229E in vitro, but not in vivo*. Virology, 2005. **335**(2): p. 185-197.
156. Keyaerts, E., et al., *Antiviral Activity of Chloroquine against Human Coronavirus OC43 Infection in Newborn Mice*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**(8): p. 3416-3421.
157. ORTWIN W. SCHMIDT, M.K.C., GEORGE E. KENNY, *Plaque Assay and Improved Yield of Human Coronaviruses in a Human Rhabdomyosarcoma Cell Line*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1979.
158. Ge, X.Y., et al., *Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor*. Nature, 2013. **503**(7477): p. 535-8.
159. Dent, S. and B.W. Neuman, *Purification of coronavirus virions for Cryo-EM and proteomic analysis*. Methods Mol Biol, 2015. **1282**: p. 99-108.
160. Makino, S., F. Taguchi, and K. Fujiwara, *Defective interfering particles of mouse hepatitis virus*. Virology, 1984. **133**(1): p. 9-17.
161. Rabenau, H.F., et al., *Stability and inactivation of SARS coronavirus*. Medical Microbiology and Immunology, 2005. **194**(1): p. 1-6.
162. Florek, D., et al., *Stability of infectious human coronavirus NL63*. Journal of Virological Methods, 2014. **205**: p. 87-90.
163. Muller, A., et al., *Stability of human metapneumovirus and human coronavirus NL63 on medical instruments and in the patient environment*. J Hosp Infect, 2008. **69**(4): p. 406-8.
164. Herzog, P., C. Drosten, and M.A. Muller, *Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells*. Virol J, 2008. **5**: p. 138.
165. Hu, Y., C. Ma, and J. Wang, *Cytopathic Effect Assay and Plaque Assay to Evaluate in vitro Activity of Antiviral Compounds Against Human Coronaviruses 229E, OC43, and NL63*. Bio Protoc, 2022. **12**(3): p. e4314.
166. Lei, C., et al., *On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity*. Virol Sin, 2021. **36**(1): p. 141-144.

167. O'Connell, M.R., et al., *Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9*. Nature, 2014. **516**(7530): p. 263-6.
168. Stertz, S., et al., *The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus*. Virology, 2007. **361**(2): p. 304-315.
169. Das Sarma, J., et al., *Enhanced green fluorescent protein expression may be used to monitor murine coronavirus spread in vitro and in the mouse central nervous system*. Journal of NeuroVirology, 2002. **8**(5): p. 381-391.
170. Bosch, B.J., C.A.M.d. Haan, and P.J.M. Rottier, *Coronavirus Spike Glycoprotein, Extended at the Carboxy Terminus with Green Fluorescent Protein, Is Assembly Competent*. Journal of Virology, 2004. **78**(14): p. 7369-7378.
171. Xing, N., et al., *Engineering and Characterization of Avian Coronavirus Mutants Expressing Fluorescent Reporter Proteins from the Replicase Gene*. Journal of Virology, 2022. **96**(14): p. e00653-22.
172. Watson, J., P.F. Whiting, and J.E. Brush, *Interpreting a covid-19 test result*. BMJ, 2020. **369**: p. m1808.
173. Cao, Y., et al., *Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis*. 2020. **92**(9): p. 1449-1459.
174. WHO. *Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases*. 2020 11/4/2020]; Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
175. Foladori, P., et al., *SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review*. Science of The Total Environment, 2020. **743**: p. 140444.
176. Shah, S., et al., *Wastewater surveillance to infer COVID-19 transmission: A systematic review*. Science of The Total Environment, 2022. **804**: p. 150060.
177. Li, X., et al., *The role of children in transmission of SARS-CoV-2: A rapid review*. Journal of global health, 2020. **10**(1): p. 011101-011101.
178. Pokhrel, P., C. Hu, and H. Mao, *Detecting the Coronavirus (COVID-19)*. ACS Sens, 2020. **5**(8): p. 2283-2296.
179. Boger, B., et al., *Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19*. Am J Infect Control, 2020.
180. D'Cruz, R.J., A.W. Currier, and V.B. Sampson, *Laboratory Testing Methods for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)*. 2020. **8**(468).
181. Zou, L., et al., *SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients*. 2020. **382**(12): p. 1177-1179.
182. Dikdan, R.J., et al., *Multiplex PCR Assays for Identifying all Major Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants*. The Journal of Molecular Diagnostics, 2022. **24**(4): p. 309-319.
183. Alteri, C., et al., *Detection and quantification of SARS-CoV-2 by droplet digital PCR in real-time PCR negative nasopharyngeal swabs from suspected COVID-19 patients*. PLOS ONE, 2020. **15**(9): p. e0236311.
184. Mello, C.J., et al., *Absolute quantification and degradation evaluation of SARS-CoV-2 RNA by droplet digital PCR*. 2020: p. 2020.06.24.20139584.
185. Weissleder, R., et al., *COVID-19 diagnostics in context*. 2020. **12**(546): p. eabc1931.

186. Hsueh, P.R., et al., *Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2004. **10**(12): p. 1062-1066.
187. Hsiao, W.W.-W., et al., *Recent Advances in Novel Lateral Flow Technologies for Detection of COVID-19*. *Biosensors*, 2021. **11**(9): p. 295.
188. Mustafa, M.I. and A.M. Makhawi, *SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas Systems as Potential Rapid Diagnostic Tools for Emerging Infectious Diseases*. 2020: p. JCM.00745-20.
189. Broughton, J.P., et al., *CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2*. *Nature Biotechnology*, 2020. **38**(7): p. 870-874.
190. de Puig, H., et al., *Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants*. *Sci Adv*, 2021. **7**(32).
191. Joung, J., et al., *Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing*. 2020. **383**(15): p. 1492-1494.
192. Joung, J., et al., *Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics*. medRxiv, 2020.
193. UCSF Health Clinical Laboratories, U.C.L.a.C.B., *ACCELERATED EMERGENCY USE AUTHORIZATION (EUA) SUMMARY SARS-COV-2 RNA DETECTR ASSAY*. 2020.
194. Santiago-Frangos, A., et al., *Intrinsic signal amplification by type III CRISPR-Cas systems provides a sequence-specific SARS-CoV-2 diagnostic*. *Cell Rep Med*, 2021. **2**(6): p. 100319.
195. Fulwyler, M., "Particle Separator".
196. Fulwyler, M.J., *Electronic Separation of Biological Cells by Volume*. *Science*, 1965. **150**(3698): p. 910-911.
197. Arakelyan, A., et al., *Nanoparticle-based flow virometry for the analysis of individual virions*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2013. **123**(9): p. 3716-3727.
198. Tang, V.A., et al., *Engineered Retroviruses as Fluorescent Biological Reference Particles for Nanoscale Flow Cytometry*. 2019: p. 614461.
199. Hercher, M., W. Mueller, and H.M. Shapiro, *Detection and discrimination of individual viruses by flow cytometry*. *J Histochem Cytochem*, 1979. **27**(1): p. 350-2.
200. Khadivjam, B., N. El Bilali, and R. Lippé, *Analysis and Sorting of Individual HSV-1 Particles by Flow Virometry*, in *Herpes Simplex Virus : Methods and Protocols*, R.J. Diefenbach and C. Fraefel, Editors. 2020, Springer New York: New York, NY. p. 289-303.
201. Lippe, R., *Flow Virometry: a Powerful Tool To Functionally Characterize Viruses*. *J Virol*, 2018. **92**(3): p. e01765-17.
202. Nolte-'t Hoen, E.N., et al., *Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles*. *Nanomedicine*, 2012. **8**(5): p. 712-20.
203. GROFF M. SCHROEDER, D.E.S., *Introduction to flow cytometry*. 2004: Applied Technology Products Inc.
204. Burnie, J., et al., *Flow Virometry Quantification of Host Proteins on the Surface of HIV-1 Pseudovirus Particles*. *Viruses*, 2020. **12**(11): p. 1296.
205. Loret, S., N. El Bilali, and R. Lippé, *Analysis of herpes simplex virus type I nuclear particles by flow cytometry*. 2012. **81A**(11): p. 950-959.
206. Martinez Martinez, J., F. Martinez-Hernandez, and M. Martinez-Garcia, *Single-virus genomics and beyond*. *Nat Rev Microbiol*, 2020.

207. Khalil, J.Y.B., et al., *Flow Cytometry Sorting to Separate Viable Giant Viruses from Amoeba Co-culture Supernatants*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017. **6**.
208. Gaudin, R. and N.S. Barteneva, *Sorting of small infectious virus particles by flow virometry reveals distinct infectivity profiles*. *Nature Communications*, 2015. **6**(1): p. 6022.
209. van der Pol, E., et al., *Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(12): p. 2596-607.
210. Chandler, W.L., *Measurement of microvesicle levels in human blood using flow cytometry*. 2016. **90**(4): p. 326-336.
211. Gates, T., et al., *Rapid, Real Time Quantification of Lentivirus Particles Using Antibody-Based Detection on the Virus Counter® 3100 Platform*. 2018.
212. Brittain, G.C., et al., *A Novel Semiconductor-Based Flow Cytometer with Enhanced Light-Scatter Sensitivity for the Analysis of Biological Nanoparticles*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 16039.
213. Hussain, R., et al., *Small form factor flow virometer for SARS-CoV-2*. *Biomedical Optics Express*, 2022. **13**(3): p. 1609-1619.
214. Niraja Soni, P.P., Raja Krishna Kumar G., Venkatesh Prasad, Santanu Dasgupta, and Bhaskar Bhadra, *Application of flow-virometry for large-scale screening of COVID 19 cases*. Preprints, 2020.
215. Tarnok, A., *SYTO dyes and histoproteins--myriad of applications*. *Cytometry A*, 2008. **73**(6): p. 477-9.
216. Ullal, A.J., D.S. Pisetsky, and C.F. Reich, 3rd, *Use of SYTO 13, a fluorescent dye binding nucleic acids, for the detection of microparticles in in vitro systems*. *Cytometry A*, 2010. **77**(3): p. 294-301.
217. Prout, A., et al., *Functional profiling of Covid 19 vaccine candidate by flow virometry*. *Vaccine*, 2022.
218. Brison, E., et al., *Novel Treatment with Neuroprotective and Antiviral Properties against a Neuroinvasive Human Respiratory Virus*. 2014. **88**(3): p. 1548-1563.
219. Coupanec, A.L., *CONSEQUENCES NEUROLOGIQUES DES CLIVAGES DE LA GLYCOPROTEINE S DU CORONAVIRUS NEUROINVASIF HUMAIN OC43*. 2018.
220. Bracci, N., et al., *Improved plaque assay for human coronaviruses 229E and OC43*. *PeerJ*, 2020. **8**: p. e10639.
221. Lambert, F., et al., *Titration of Human Coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, by an Indirect Immunoperoxidase Assay*, in *SARS- and Other Coronaviruses: Laboratory Protocols*, D. Cavanagh, Editor. 2008, Humana Press: Totowa, NJ. p. 93-102.
222. Mounir, S. and P.J. Talbot, *Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation*. *Journal of General Virology*, 1992. **73**(10): p. 2731-2736.
223. Ramakrishnan, M.A., *Determination of 50% endpoint titer using a simple formula*. *World J Virol*, 2016. **5**(2): p. 85-6.
224. Hierholzer, J.C. and R.A. Killington, *2 - Virus isolation and quantitation*, in *Virology Methods Manual*, B.W.J. Mahy and H.O. Kangro, Editors. 1996, Academic Press: London. p. 25-46.
225. Au - Baer, A. and K. Au - Kehn-Hall, *Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems*. *JoVE*, 2014(93): p. e52065.

226. Chu, H., et al., *Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study*. The Lancet Microbe, 2020. **1**(1): p. e14-e23.
227. Mashraqi, A., et al., *Prediction Model of Adverse Effects on Liver Functions of COVID-19 ICU Patients*. Journal of Healthcare Engineering, 2022. **2022**: p. 4584965.
228. Lamarre, A. and P.J. Talbot, *Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E*. Canadian journal of microbiology, 1989. **35**(10): p. 972-974.
229. E. R. McFadden, J., et al., *Thermal mapping of the airways in humans*. Journal of Applied Physiology, 1985. **58**(2): p. 564-570.
230. Tang, V.A., et al., *Single-particle characterization of oncolytic vaccinia virus by flow virometry*. Vaccine, 2016. **34**(42): p. 5082-5089.
231. Niu, Q., et al., *Quantitative Assessment of the Physical Virus Titer and Purity by Ultrasensitive Flow Virometry*. Angew Chem Int Ed Engl, 2021.
232. Molecular Probes, *SYTO® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains*. 2003.
233. Molecular Probes, *SYTO® Red Fluorescent Nucleic Acid Stains*. 2001.
234. Momen-Heravi, F., S.J. Getting, and S.A. Moschos, *Extracellular vesicles and their nucleic acids for biomarker discovery*. Pharmacology & Therapeutics, 2018. **192**: p. 170-187.
235. Bansal, S., et al., *Cutting Edge: Circulating Exosomes with COVID Spike Protein Are Induced by BNT162b2 (Pfizer–BioNTech) Vaccination prior to Development of Antibodies: A Novel Mechanism for Immune Activation by mRNA Vaccines*. The Journal of Immunology, 2021. **207**(10): p. 2405-2410.
236. El-Shennawy, L., et al., *Circulating ACE2-expressing extracellular vesicles block broad strains of SARS-CoV-2*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 405.
237. Welsh, J.A., J.C. Jones, and V.A. Tang, *Fluorescence and Light Scatter Calibration Allow Comparisons of Small Particle Data in Standard Units across Different Flow Cytometry Platforms and Detector Settings*. Cytometry Part A, 2020. **97**(6): p. 592-601.
238. Offersgaard, A., et al., *SARS-CoV-2 Production in a Scalable High Cell Density Bioreactor*. Vaccines (Basel), 2021. **9**(7).
239. Neuman, B.W., et al., *Purification and electron cryomicroscopy of coronavirus particles*. Methods Mol Biol, 2008. **454**: p. 129-36.
240. Kornilov, R., et al., *Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum*. Journal of Extracellular Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1422674.
241. Mathieu, M., et al., *Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 4389.
242. Filipe, V., A. Hawe, and W. Jiskoot, *Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates*. Pharm Res, 2010. **27**(5): p. 796-810.
243. Rost, F.W.D., *Fluorescence microscopy*. 1992, Cambridge ; New York: Cambridge University Press.
244. Zicari, S., et al., *Evaluation of the maturation of individual Dengue virions with flow virometry*. Virology, 2016. **488**: p. 20-27.
245. Zhang, X., L. Sun, and M.G. Rossmann, *Temperature dependent conformational change of dengue virus*. Current Opinion in Virology, 2015. **12**: p. 109-112.

246. Welsh, J.A., et al., *MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2020. **9**(1): p. 1713526.