

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**ÉTUDE DE LA RÉPONSE NEURONALE À L'INFECTION PAR LE
CORONAVIRUS HUMAIN OC43**

Par

Dominique J. FAVREAU

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

Philosophiae doctor (Ph.D.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Pearson, Angela
INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Flamand, Louis
Université Laval

Examinateur externe

Prat, Alexandre
Université de Montréal

Directeur de recherche

Talbot, Pierre
INRS-Institut Armand-Frappier

© droits réservés de DOMINIQUE J. FAVREAU, 2012

*Ce que je vis aujourd'hui
est-il assez porteur de sens
pour que je le revive éternellement*

Cherche à devenir le plus grand enchanteur

celui qui réussirait à s'enchanter soi-même

- Salvador Dali inspiré par Aristote - 1926

RÉSUMÉ

Les Coronavirus humains (HCoV) sont des pathogènes respiratoires reconnus. Le laboratoire du Dr Pierre Talbot a démontré que la souche HCoV-OC43 est neurotrophe et neuroinvasive chez l'humain et la souris et que le neurone est la cible principale de l'infection chez la souris, menant à une maladie neurodégénérative. Cependant les conséquences de l'infection dans le neurone sont mal connues. L'objectif de cette thèse était de déterminer les voies métaboliques importantes qui sont modulées suite à l'infection par HCoV-OC43 et de définir comment celles-ci affectent la viabilité neuronale. Les résultats de nos recherches permettent d'établir certains des mécanismes cellulaires impliqués dans la mort neuronale induite par HCoV-OC43 et ainsi de définir les bases des mécanismes de neurodégénérescence impliqués dans les neuropathologies potentiellement induites chez l'humain par HCoV-OC43. De plus, en complément à l'objectif principal, les recherches ont pour but de déterminer les différences de virulence entre la souche sauvage de HCoV-OC43 et un variant isolé d'une infection persistante de cellules neurales humaines, comportant deux mutations ponctuelles au sein de la glycoprotéine S. Nous avons procédé à une analyse de la modulation du transcriptome complet provenant d'un modèle neuronal humain infecté par HCoV-OC43. Cette étude révèle entre autres la modulation à la baisse de plusieurs gènes impliqués dans la neurotransmission, la biogenèse des protéines et la régulation du maintien du cytosquelette, de même que l'expression à la hausse de seulement quelques gènes liés à l'immunité innée et plus particulièrement l'expression des gènes liés à l'activation de la *Unfolded Protein Response* (UPR). L'étude approfondie de la UPR nous permet de mettre en évidence l'activation de celle-ci dans les neurones infectés par la souche sauvage et de façon plus importante par le variant persistant de HCoV-OC43. De plus, par nos recherches nous démontrons une atténuation importante de la traduction protéique, suivie par l'activation de la caspase-3, la fragmentation du noyau et de l'ADN ainsi qu'une diminution significative de la viabilité chez le neurone humain infecté par les deux virus. Subséquemment, ces travaux permettent d'identifier différents mécanismes associés à l'induction de la mort cellulaire programmée suite à l'infection par HCoV-OC43. Également, nous démontrons l'activation des caspases -3 et -9 tout en prouvant, à l'aide d'un inhibiteur pan-caspase, que l'activation des caspases n'est pas essentielle à la mort neuronale induite par les deux virus. Nous mettons

aussi en évidence la relocalisation des protéines pro-apoptotiques Bax, CytC et AIF à la mitochondrie, au cytosol et noyau respectivement, démontrant la perméabilisation mitochondriale suite à l'infection par les deux souches virales variantes. De plus, ces travaux définissent la protéine Cyclophiline D comme étant essentielle à la mort neuronale induite par la souche sauvage HCoV-OC43 dans le neurone humain, alors que celle induite par la souche variante ne l'est que partiellement et impliquerait d'autres voies métaboliques.

En conclusion, les résultats de ma thèse démontrent une activation de la UPR suivie par l'induction d'une mort cellulaire programmée indépendante des caspases et dépendante de la Cyclophiline D suite à l'infection par HCoV-OC43 chez le neurone humain. De plus, les résultats établissent l'importance de mutations spécifiques associées à la glycoprotéine S dans l'interaction neurone-virus qui mènent à une augmentation de la cytopathie et une mort cellulaire programmée plus importante. Considérant que la souche virale variante est plus neurovirulente chez la souris, les résultats suggèrent que ces deux mutations pourraient moduler la neuropathogénèse virale chez l'humain.

Dominique J. Favreau

Dr. Pierre Talbot

REMERCIEMENTS

Beaucoup d'années sont passées avant de mener à l'apogée de mes études et, tout au long de ce parcours, bien des gens ont participé à m'encourager, m'inspirer, m'épauler ou me relativiser. Il m'est difficile ici de souligner la participation de tous, mais ma reconnaissance s'exprime bien au-delà de ces lignes.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Talbot, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis d'amorcer et peaufiner ma formation de chercheur. Ces dernières années ont comporté bien des défis et ses conseils ont su m'aider à les relever. Je tiens à lui souligner ma reconnaissance de m'avoir laissé la liberté de choisir les orientations de mes recherches et de m'avoir fait confiance de parvenir à les réaliser.

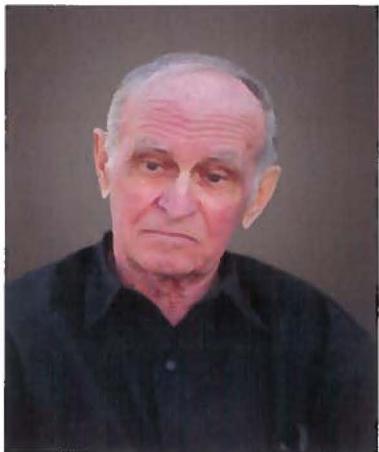
Cette reconnaissance se jumelle à celle faite à Marc Desforges, qui a su me conseiller tout au long de ces années et qui a participé à la réalisation conceptuelle et technique de plusieurs des résultats de mes recherches. Je le remercie également pour ses commentaires et ses critiques qui ont su améliorer l'ensemble de mes travaux.

Je ne saurais oublier de souligner la précieuse amitié de Jessica Desjardins et Marie-Ève Bilodeau que j'ai côtoyées et avec qui ces années passées n'auraient pas été les mêmes.

Une mention particulière s'impose à ceux qui m'ont inspiré et transmis leur passion ou leur vision, dont Dr Jocelyn Forget, Dr Henri Laborit, Dr Richard Dawkins, Dr John Forbes Nash et M Schmidt.

Finalement, j'aimerais souligner la participation inestimable de mes parents, Denis et Paulette Favreau, qui ont été les architectes de l'ensemble de mon parcours et sans qui l'ensemble de mes réalisations n'aurait jamais eu lieu. Leur philanthropie et leur bienveillance, malgré les épreuves passées, récentes et actuelles, ont toujours su m'influencer et me guider. Cette œuvre vous est dédiée.

In Memoriam



Paul-Émile Ménard

(12 juin 1924 – 30 mars 2006)

Gaspard Favreau

(10 octobre 1996 – 5 décembre 2007)



Claude Favreau

(16 septembre 1929 – 12 mai 2004)

Aline Favreau

(13 novembre 1927 – 4 janvier 2010)



Hélène Robert

(3 juillet 1931 – 2 octobre 2009)

Bien des gens m'ont quitté au cours de ces années de recherche au doctorat, mais d'eux reste des inspirations et des souvenirs bien vivants. Leurs contributions originales ont d'autant été diversifiées que structurantes. Que ce soit par leur simplicité, leur humanisme ou par anthropomorphisme, ils ont tous participé à la réalisation de ce que je suis et rends aujourd'hui.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iv
Remerciements	vi
Table des matières.....	viii
Liste des figures et tableaux	xii
Introduction.....	xii
Article 1.....	xii
Article 2.....	xiii
Liste des abréviations	xiv
Liste des réalisations.....	xviii
Publications.....	xviii
Communications.....	xviii
Séminaires	xviii
Conférences sur invitation.....	xix
Présentations orales avec comité de révision.....	xix
Présentations par affiches	xx
Remerciements / Reconnaissances	xxi
Citations.....	xxii
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.0 Les Coronavirus	2
1.1 Généralités	2
1.2 Taxonomie.....	2
1.3 Murine coronavirus (MHV).....	3
1.4 Coronavirus Humain OC43 (HCoV-OC43).....	6
1.4.1 Généralités	6
1.4.2 Neurotropisme.....	6
1.4.3 Neuroinvasion	7
1.4.4 Neurovirulence	7
1.5 Structure des Coronavirus	8
1.5.1 Structure générale du virion	8

1.6 Structure et fonction de la glycoprotéine S.....	10
1.6.1 Généralités	10
1.6.2 Structure de la glycoprotéine S.....	12
1.6.3 Fonctions de la glycoprotéine S	12
1.6.4 Évolution de la protéine S en infection persistante	15
1.7 Cycle réplicatif des Coronavirus.....	17
2.0 L'infection virale.....	21
2.1 Généralités	21
2.2 Tropisme.....	21
2.3 Infection du SNC	22
2.3.1 Système nerveux central.....	24
2.3.2 Neuroinvasion.....	25
2.3.3 Neurotropisme.....	27
2.3.4 Neurovirulence	28
2.4 Persistance et adaptation virale	31
2.5 Réponse immunitaire à l'infection virale	34
2.6 Maladies neurodégénératives à étiologie virale.....	35
3.0 La réponse cellulaire aux infections virales.....	37
3.1 Généralités	37
3.2 Réponse au stress du réticulum endoplasmique	38
3.2.1 Généralités	38
3.2.2 Voie IRE1/XBP1.....	41
3.2.3 Voie ATF6	43
3.2.4 Voie PERK/eIF2-alpha.....	44
3.2.5 Maladies neurodégénératives et la UPR.....	46
3.2.6 Infections virales et la UPR	48
3.3 Mort cellulaire programmée	49
3.3.1 Généralités	50
3.3.2 Caspases.....	54
3.3.3 Mitochondrie.....	57
Hypothèses et objectifs.....	64
Chapitre 2 Articles.....	65
Publication No.1.....	66
Contributions des auteurs	67

Résumé.....	68
Abstract.....	69
Introduction.....	70
Results.....	72
Discussion.....	90
Materials and methods.....	95
Acknowledgments.....	100
References.....	101
Publication No.2.....	106
Contributions des auteurs	107
Résumé.....	108
Abstract.....	109
Introduction.....	110
Materials and methods.....	112
Results	117
Discussion.....	131
Acknowledgments.....	136
References	137
Chapitre 3 Discussion.....	145
1.0 Présentation.....	146
2.0 HCoV-OC43 induit une réponse neuronale diversifiée à l'infection	146
2.1 Général.....	146
2.2 Neurogenèse/neurotransmission.....	147
2.3 Immunité innée.....	148
2.4 Cytosquelette	150
3.0 HCoV-OC43 induit l'activation de stress cellulaire chez le neurone, comprenant notamment la <i>Unfolded protein response</i>.....	151
3.1 Général.....	151
3.2 Les mutations de la glycoprotéine S acquises en persistance induisent une augmentation de production des protéines et particules virales.....	152
3.3 La voie IRE1/XBP1 est activée lors de l'infection par HCoV-OC43, mais ne joue pas de rôle dans la viabilité neuronale.....	154
3.4 La voie ATF6 joue un rôle mineur dans la UPR induite par HCoV-OC43	156

3.5 L'infection par HCoV-OC43 mène à une diminution de la synthèse protéique et une activation partielle de la voie PERK/eIF2-alpha.....	157
4.0 HCoV-OC43 cause une mort cellulaire programmée chez le neurone qui est dépendante de la CypD et indépendante des caspases	160
4.1 Général.....	160
4.2 HCoV-OC43 induit une PCD chez le neurone humain	161
4.3 HCoV-OC43 induit une PCD indépendante des caspases.....	161
4.4 La PCD induite par HCoV-OC43 induit la perméabilisation de la mitochondrie	162
4.5 HCoV-OC43 induit une PCD dépendante de la Cyclophiline D	164
4.6 La souche plus neurovirulente de HCoV-OC43, rOC/U_{s183-241} induit une PCD via plusieurs voies alternatives.....	165
5.0 Les mutations de la glycoprotéine S acquises en infection persistante augmentent la neurovirulence de HCoV-OC43	166
6.0 Conclusion et perspectives	167
Annexes.....	170
Annexe 1. Quantification du niveau d'inhibition d'expression de Xbp1_(U+S)	171
Annexe 2. Viabilité de neurones infectés et déficients en Xbp1_(U+S).....	172
Annexe 3. Viabilité de neurones infectés et surexprimant Xbp1_S	173
Annexe 4. Quantification de l'expression de Atf3.....	174
Annexe 5. Chapitre de livre	175
Références.....	222

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Introduction

Figure 1 : Phylogénie des <i>Nidovirales</i>	4
Figure 2 : Structure du virion des <i>Coronaviridae</i>	11
Figure 3 : Cycle répliquatif des <i>Coronaviridae</i>	20
Figure 4 : Voies de la <i>Unfolded Protein Response</i>	40
Figure 5 : Voies d'activation des caspases	58
Figure 6 : Schéma des voies métaboliques de la PCD liées à la mitochondrie	61
Tableau 1 : Liste des différents types de PCD	52

Article 1

Figure 1 : Human differentiated neuronal cell lines were susceptible to a productive HCoV-OC43 infection	73
Figure 2 : Distribution of the 275 genes which expression was modulated in the human NT2-N neuronal cell line at 24, 48 or 72 h after infection with HCoV-OC43, grouped into nine major cellular functional groups	74
Tableau 1 : Time-course of gene expression related to the unfolded protein response within human neurons infected by HCoV-OC43	75
Figure 3 : A recombinant HCoV-OC43 with two point mutations within the S protein showed increased viral replication within infected neurons but no difference in the kinetics of replication in cell culture compared to HCoV-OC43 wild-type	77
Figure 4 : The ATF6 pathway was not activated following infection of human neurons with HCoV-OC43 wild-type and HCoV-OC43 rOC/U _{S183-241} variant	78
Figure 5 : Infection of human neurons with the HCoV-OC43 rOC/U _{S183-241} variant led to a stronger protein translation attenuation, as compared to HCoV-OC43 wild-type	81

Figure 6 : Infection of human neurons with the HCoV-OC43 rOC/U _{S183-241} variant strongly induced expression of genes Chop and Gadd34, compared to HCoV-OC43 wild-type	84
Figure 7 : The IRE1/XBP1 pathway was rapidly activated following infection of human neurons with the HCoV-OC43 rOC/U _{S183-241} variant, as compared to HCoV-OC43 wild-type	86
Figure 8 : Infection of human neurons by HCoV-OC43 rOC/U _{S183-241} led to a strong activation of caspase-3 and nuclear fragmentation following strong UPR activation	88
Figure 9 : Model depicting the activation of the normal UPR and possible modulation of the different pathways by the HCoV-OC43 S protein in human neuronal cells	89

Article 2

Figure 1 : The rOC/ATCC and rOC/U _{S183-241} induce programmed cell death in human neurons	118
Figure 2 : Infection by rOC/ATCC and rOC/U _{S183-241} activates caspase-3 and -9 in human neurons	120
Figure 3 : Figure 3. Caspases are activated following infection of human neurons by rOC/ATCC and rOC/U _{S183-241} but the induced programmed cell death caused is not inhibited by Z-VAD-FMK	121
Figure 4 : Infection by rOC/ATCC and rOC/U _{S183-241} promote BAX, CytC and AIF relocalization in human neurons	123
Figure 5 : Cyclosporin A treatment and cyclophilin-D-knock-down protects human neurons from rOC/ATCC-induced programmed cell death	126
Figure 6 : Human neuronal PCD induced by rOC/ATCC is Cyclophilin D-dependent	127
Figure 7 : Cyclophilin D inhibition alters AIF nuclear translocation in infected neurons	130

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE2 : *Angiotensin converting enzyme 2*

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIF : *Apoptosis inducing-factor*

ANT : *Adenine nucleotide translocase*

APAF-1 : *Apoptotic peptidase activating factor-1*

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde- β

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ASFV : Virus de la fièvre du porc africain (*African swine fever virus*)

ASK1 : *Apoptosis signal-kinase 1*

ATF3 : *Activating transcription factor 3*

BCoV : Coronavirus bovin (*Bovine coronavirus*)

BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*

BDV : Virus de la maladie de Borna (*Borna disease virus*)

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CEACAM1 : *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPE : Effets cytopathiques (*cytopathic effects*)

CsA : Cyclosporine A

CypD : Cyclophiline D

DED : *Death effector domain*

DENV : Virus de la dengue (*Dengue virus*)

DISC : *Death-inducing signaling complex*

EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*)

eIF2-alpha : *Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*

ERAD : *Endoplasmic-reticulum-associated protein*

ERGIC : Compartiment intermédiaire RE-Golgi

ERSE : *Endoplasmic-reticulum stress-responsive cis-acting element*

FAD : Maladie d'Alzheimer familiale (*Familial Alzheimer's disease*)

FADD : *Fas-associated death domain*

FCoV : Coronavirus félin (*Feline Coronavirus*)

FIPV : Virus de la péritonite infectieuse féline (*Feline infectious peritonitis virus*)

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HCoV-229E : Coronavirus humain 229E

HCoV-OC43 : Coronavirus humain OC43

HCMV : Cytomégalovirus humain (*Human cytomegalovirus*)

HCV : Virus de l'hépatite C (*Hepatitis C virus*)

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine (*Immunodeficiency human virus*)

HPV : Virus du papillome humain (*Human papillomavirus*)

HR : *Heptad repeats*

HSV : Virus de l'herpès simplex (*Herpes simplex virus*)

IBV : Virus de la bronchite infectieuse (*Infectious bronchitis virus*)

INF : Interféron

IRE1 : *Inositol requiring enzyme-1*

JCV : Virus de John Cunningham (*John Cunningham virus*)

JEV : Virus de l'encéphalite japonaise (*Japenese encephalitis virus*)

JNK : Janus kinase

LCMV : Virus de la chorioméningite lymphocytaire (*Lymphocytic choriomeningitis virus*)

LCR : Liquide céphalo-rachidien

MBP : Protéine basique de la myéline

MHV : Coronavirus murin (*Mouse coronavirus*) (anciennement dénommé *Murine Hepatitis Virus*)

MV : Virus de la rougeole (*Measles virus*)

NCCD : *Nomenclature Committee on Cell Death*

NGF : *Nerve growth factor*

NK : *Natural killer*

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

ORF : Cadre de lecture ouvert (*Open reading frame*)

PCD : Mort cellulaire programmée (*Programmed cell death*)

PCR : Réaction de la polymérase en chaîne (*Polymerase chain reaction*)

PERK : *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*

PF : Peptide de fusion

PKR : Protéine kinase R

PLP : Protéine protéolipidique

PML : Leucoencéphalopathie multifocal progressive

PP1 : Sérine/Thréonine phosphatase 1

PrCoV : Coronavirus porcin (*Porcine coronavirus*)

RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante

RE : Réticulum endoplasmique

RT : Transcription inverse (*Reverse transcription*)

RTC : Complexe de transcription/réPLICATION (*Transcription/replication complex*)

RV : Virus de la rage (*Rabies virus*)

SAD : Maladie d'Alzheimer sporadique (*Sporadic Alzheimer's disease*)

SARS-CoV : Coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*)

SeV : Virus de Sendai (*Sendai virus*)

SINV : Virus de Sindbis (*Sindbis virus*)

Smac : *Second mitochondria-derived activator of caspase*

SNC : Système nerveux central

SRAS : Syndrome respiratoire aigu sévère

TGEV : Virus de la gastro-entérite transmissible porcine (*Transmissible gastro-enteritis virus*)

TMEV : Virus de l'encéphalite murine de Theiler (*Theiler's murine encephalitis virus*)

TNF : *Tumor necrosis factor*

TRADD : *Tumor necrosis factor receptor type I-associated death domain*

TRAF2 : *TNF receptor-associated factor 2*

TRAIL-R1, -R2 : *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1, -2*

TRS : Séquence régulatrice de la transcription (*Transcription regulating sequence*)

uORF : *inhibitory upstream open reading frame*

UPR : Réponse aux protéines mal repliées (*Unfolded protein response*)

VDAC : *Voltage-dependent anion channel*

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire (*Vesicular stomatitis virus*)

VV : Virus de la vaccine (*Vaccinia virus ou Cowpox virus*)

VZV : Virus de la varicelle-zona (*Varicella zoster virus*)

WNV : Virus du Nil Occidental (*West Nile virus*)

XIAP : *X-linked inhibitor of apoptosis protein*

LISTE DES RÉALISATIONS

Publications

Favreau, D.J., M. Meessen-Pinard, M. Desforges and P.J. Talbot (2012) *Human coronavirus-induced neuronal programmed cell death is Cyclophilin D-dependent and potentially caspase-dispensable*. Journal of Virology Vol.86 (1), p.81-93

Marc Desforges, Dominique J. Favreau*, Élodie Brison, Jessica Desjardins, Mathieu Meessen-Pinard, Hélène Jacomy and Pierre J. Talbot (2012) *Human coronaviruses : respiratory pathogens revisited as infectious neuroinvasive, neurotropic and neurovirulent agents*. In : Neuroviral Infections: RNA Viruses and Retroviruses. Singh, S.K. and Ruzek, D., eds., Taylor and Francis Group, LLC/CRC Press (sous presse)

* Contribution comme co-auteur : Ce chapitre de livre présente un vue globale des travaux de recherche du laboratoire du Dr Pierre J. Talbot en lien avec les coronavirus humains. Les résultats de mes travaux sur HCoV-OC43 utilisant les modèles neuronaux NT2-N et LA-N-5 et concernant leur susceptibilité et productivité à l'infection (Figure 4), l'analyse de la réponse cellulaire touchant la *Unfolded Protein Response* (texte) ainsi que les résultats démontrant l'ensemble de la diversité de la modulation du transcriptome suite à l'infection (Figure 5 et texte) ont été présentés.

Favreau, D.J., M. Desforges, J.R. St-Jean and P.J. Talbot (2009) *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 Vol.395, p.255-267

Communications

Séminaires

Favreau, D.J., M. Desforges, et P.J. Talbot (2011) Étude de la réponse neuronale suite à l'infection par le Coronavirus humain OC43. Deuxième séminaire de doctorat, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, 6 avril 2011

Favreau, D.J., M. Desforges, et P.J. Talbot (2008) Réponse du neurone humain à l'infection par HCoV-OC43 Premier séminaire de doctorat, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, 3 décembre 2008

Favreau, D.J., M. Desforges, et P.J. Talbot (2007) Modulation de l'expression génique du neurone humain suite à l'infection par HCoV-OC43. Deuxième séminaire de maîtrise, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, 4 avril 2007

Favreau, D.J., M. Desforges, et P.J. Talbot (2006) Modulation de l'expression génique du neurone humain suite à l'infection par HCoV-OC43. Premier séminaire de maîtrise, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, 3 mai 2006

Conférences sur invitation

Favreau, D.J., M. Desforges, and P.J. Talbot (2010) *A human coronavirus OC43 mutant triggers a strong unfolded protein response in human neurons*. Neuroinflammation Grant lunch meeting, McGill University, Montréal, 10 octobre 2010

Favreau, D.J., M. Desforges and P.J. Talbot (2010) *A human coronavirus OC43 mutant triggers a strong unfolded protein response in human neurons*. Québec-Ottawa Regional Research and Training Centre of EndMS, McGill University, Montréal, 19 mars 2010

Favreau, D.J., M. Desforges, and P.J. Talbot (2007) *Modulation of gene expression in neuronal cells infected by human coronavirus OC43*. Neuroinflammation Grant lunch meeting, McGill University, Montréal, 21 février 2007

Présentations orales avec comité de révision

Favreau, D.J., M. Meessen-Pinard, M. Desforges, et P.J. Talbot (2011) Le Coronavirus humain OC43 induit une mort cellulaire programmée qui est CypD-dépendante et caspase-indépendant chez le neurone humain. Congrès Armand-Frappier 2011, Estérel, Québec, 17-19 novembre 2011

Favreau, D.J., M. Meessen-Pinard, M. Desforges, and P.J. Talbot (2011) *Coronavirus-induced human neuronal apoptosis is Cyclophilin D-dependent and caspase-dispensable*. Neuroinflammation training program symposium, Montréal, Québec, 13 mai 2011

Favreau, D.J., M. Desforges, et P.J. Talbot (2009) Un variant du coronavirus humain OC43 possédant des mutations acquises en persistance dans la protéine S active différemment la *unfolded protein response* chez le neurone humain, comparé au virus de souche sauvage. Congrès Armand-Frappier 2009, Bromont, Québec, 4-6 novembre 2009

Favreau, D.J., M. Desforges, and P.J. Talbot (2009) *A human coronavirus OC43 mutant triggers a strong Unfolded protein response in human neurons*. Neuroinflammation training program Symposium, Montréal, Québec, 22 mai 2009.

Favreau, D.J., M. Desforges, and P.J. Talbot (2008) *Human coronavirus OC43 triggers a partial induction of the unfolded protein response in human neurons*. 11th International Nidovirus Symposium, Oxford, Angleterre, 22-27 juin 2008

Desforges, M., **D.J. Favreau***, and P.J. Talbot (2008) *Transcriptome profiling of human neuronal cells after human coronavirus OC43 infection reveals a possible viral strategy to allow cell survival while ensuring limited virus production*. 11th International Nidovirus Symposium, Oxford, Angleterre, 22-27 juin 2008

* Contribution comme second auteur : Ce résumé sélectionné pour une présentation orale est entièrement basé sur mes résultats obtenus lors de ma maîtrise. Considérant que j'appliquais et ai été sélectionné pour une autre présentation orale au même congrès (voir ci-haut), un associé de recherche du laboratoire a été choisi pour présenter mes résultats.

Présentations par affiches

Favreau, D.J., M. Meessen-Pinard, M. Desforges, and P.J. Talbot (2011) *Human Coronavirus OC43-induced neuronal programmed cell death is Cyclophilin D-dependent and caspase-dispensable*. 12th International Nidovirus Symposium, Traverse City, États-Unis, 4-9 juin 2011

Favreau, D.J., M. Desforges, and P.J. Talbot (2010) *Modulation of gene expression in neuronal cells infected by human coronavirus OC43*. Neuroinflammation training program symposium, Montréal 2010, Québec, 20 mai 2009

Favreau, D.J., M. Desforges, and P.J. Talbot (2009) *A human coronavirus OC43 harboring mutations acquired during persistent infection of human neural cells differentially induces the unfolded protein response in human neurons as compared to wild type virus.* 59th Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists, Montréal, Québec, 15 - 18 juin 2009.

Favreau, D.J., M. Desforges, and P.J. Talbot (2007) *A human coronavirus modulates gene expression associated with the unfolded protein response in human neurons.* 57th Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists, Québec, Québec, 17 - 20 juin 2007.

Favreau, D.J., M. Desforges, and P.J. Talbot (2007) *Modulation of gene expression in neuronal cells infected by human coronavirus OC43.* Neuroinflammation training program symposium, Château Bromont, Bromont, Québec, 11 - 12 mai 2007.

Favreau, D.J., M. Desforges, et P.J. Talbot (2005) Modulation de l'expression génique dans la réponse antivirale de cellules neuronales humaines suite à l'infection par le coronavirus humain OC43. Congrès Armand-Frappier, Auberge du Lac-à-l'eau-claire, St-Alexis-des-Monts, Québec, 5 - 7 novembre 2005.

Remerciements / Reconnaissances

Brison, E., H. Jacomy, M. Desforges and P.J. Talbot (2011) *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.* Journal of virology, 85(23):12464-73*

* « We thank Dominique J. Favreau for his precious help for the treatment of data related to Western blot analysis and for statistical analysis. »

de Wilde, A.H., J. C. Zevenhoven-Dobbe, Y. van der Meer, V. Thiel, K. Narayanan, S. Makino, E. J. Snijder and M. J. van Hemert (2011) *Cyclosporin A inhibits the replication of diverse coronaviruses.* Journal of general virology, 92(11) :2542-48**

** « We kindly thank [...] Dr Pierre Talbot and Dr (sic) Dominique Favreau (University of Quebec, Canada) for sharing and discussing their unpublished data on CsA and coronaviruses.

Citations

Baugh, J. and P. Gallay (2012) *Cyclophilin involvement in the replication of hepatitis C virus and other viruses*. Biological chemistry, published online 14 may 2012

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.0 Les Coronavirus

1.1 Généralités

Les Coronavirus sont des virus pouvant infecter un vaste éventail d'hôtes et sont particulièrement connus pour leur capacité à induire des maladies respiratoires et entériques (Myint, 1994). Les premiers Coronavirus humains ont été identifiés au cours des années 1960 (Almeida et Tyrrell, 1967; Hamre et Procknow, 1966; McIntosh *et al.*, 1967) et leur première classification taxonomique a été élaborée en 1967 (Almeida et Tyrrell, 1967). Jusqu'au début de ce millénaire, ils étaient surtout étudiés en raison de leur capacité à infecter différents cheptels animaux, notamment les cheptels aviaires (virus de la bronchite infectieuse) (IBV), porcins (virus de la gastro-entérite transmissible porcine) (TGEV) ou murins (coronavirus murin) (MHV). La pandémie du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) en 2003, causée par un Coronavirus nouvellement identifié, le Coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) (Drosten *et al.*, 2003; Fouchier *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003) a créé un nouvel intérêt grandissant pour cette famille de virus, précédemment connus pour causer de simples infections respiratoires chez l'homme, tel que le rhume, par les Coronavirus humains OC43 (HCoV-OC43) et 229E (HCoV-229E) (Myint, 1994). Depuis, de nouveaux Coronavirus pouvant infecter l'homme ont été identifiés, dont les espèces HCoV-HKU1 et HCoV-NL63 pouvant également affecter les voies respiratoires (van der Hoek *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2005).

1.2 Taxonomie

L'appellation Corona, empruntée du latin, dérive de leur apparence en forme de couronne lorsque visualisé au microscope électronique. Cette forme caractéristique est conférée par la présence de trimères de la protéine S à la surface du virion (Davies et Macnaughton, 1979). Les Coronavirus font partie de l'ordre des *Nidovirales*, qui comprend les familles des *Arteriviridae*, des *Roniviridae* et des *Coronaviridae* (ICTV, 2012) (Figure 1, p.4). La sous-famille des *Coronavirinae* se divise en 3 genres: *Alpha-*, *Beta-* et *Gammacoronavirus* (Figure 1, p.4). Le genre *Alphacoronavirus* comprend entre autres l'espèce HCoV-229E, connue pour infecter le tractus respiratoire (Hamre et Procknow, 1966), et l'espèce HCoV-NL63, identifiée suite à l'émergence du SARS-CoV (van der Hoek

et al., 2004), causant des infections des voies respiratoires inférieures chez l'humain (Lassnig *et al.*, 2005). Le genre *Betacoronavirus* comprend les espèces HCoV-HKU1, infectant l'homme (Woo *et al.*, 2005), l'espèce MHV, pathogène naturel de la souris et représentant le coronavirus le plus étudié, en autre connu pour sa neurovirulence chez la souris (Watanabe *et al.*, 1983), SARS-CoV et HCoV-OC43, l'homologue humain de MHV (St-Jean *et al.*, 2004). Le genre *Gammacoronavirus* comprend entre autre l'espèce IBV connu pour infecter le poulet (Figure 1, p.4).

1.3 Murine coronavirus (MHV)

L'espèce MHV regroupe en elle-même différentes souches qui diffèrent selon leur tropisme et leur virulence. Le premier groupe comporte les souches entérotropes MHV-D, -Y, -RU, -S/CDC, -LIVIM et -DVIM. Le second groupe comporte les souches polytropes MHV-A59, -1, -2, 3 et -4 (la dernière étant aussi nommée -JHM) qui peuvent infecter le foie et/ou le système nerveux central (SNC). Les souches de ce second groupe sont les plus étudiées de l'espèce MHV puisqu'utilisées en modèle animal murin, elles servent de modèle pour différentes maladies humaines, telles que l'hépatite, l'encéphalite et les maladies démyélinisantes (e.g. sclérose en plaques). La première souche de MHV (MHV-JHM) fut isolée en 1949 d'une souris montrant des signes cliniques de paralysie, d'encéphalomyélite et de démyélinisation (Bailey *et al.*, 1949; Cheever *et al.*, 1949). Cette souche est reconnue pour sa capacité à infecter les astrocytes, les microglies, les neurones et les oligodendrocytes (Marten *et al.*, 2000). De plus, elle possède une forte neurovirulence en souris et induit une mortalité élevée, avec quelques sujets survivants démontrant des signes de démyélinisation (Bailey *et al.*, 1949; Cheever *et al.*, 1949). L'infection par le JHM active les deux branches du système immunitaire adaptatif, cellules T et cellules B, qui participent à l'élimination du virus (Sussman *et al.*, 1989) et la réPLICATION virale est nécessaire pour la dissémination virale au sein de la moelle épinière et pour la démyélinisation (Marten *et al.*, 2000). Il est à noter que plusieurs variants atténués de JHM (causant un pourcentage de mortalité moins élevé chez les souris infectées), ont été isolés afin de pouvoir étudier plus facilement la démyélinisation résultante de l'infection. Il s'agit entre autres des souches JHM-DL, neurotrophe et faiblement démyélinisante, JHM-DM, causant une encéphalite et de la démyélinisation, et JHM-D, sans tropisme neuronal et démyélinisation (Stohlman *et al.*, 1982).

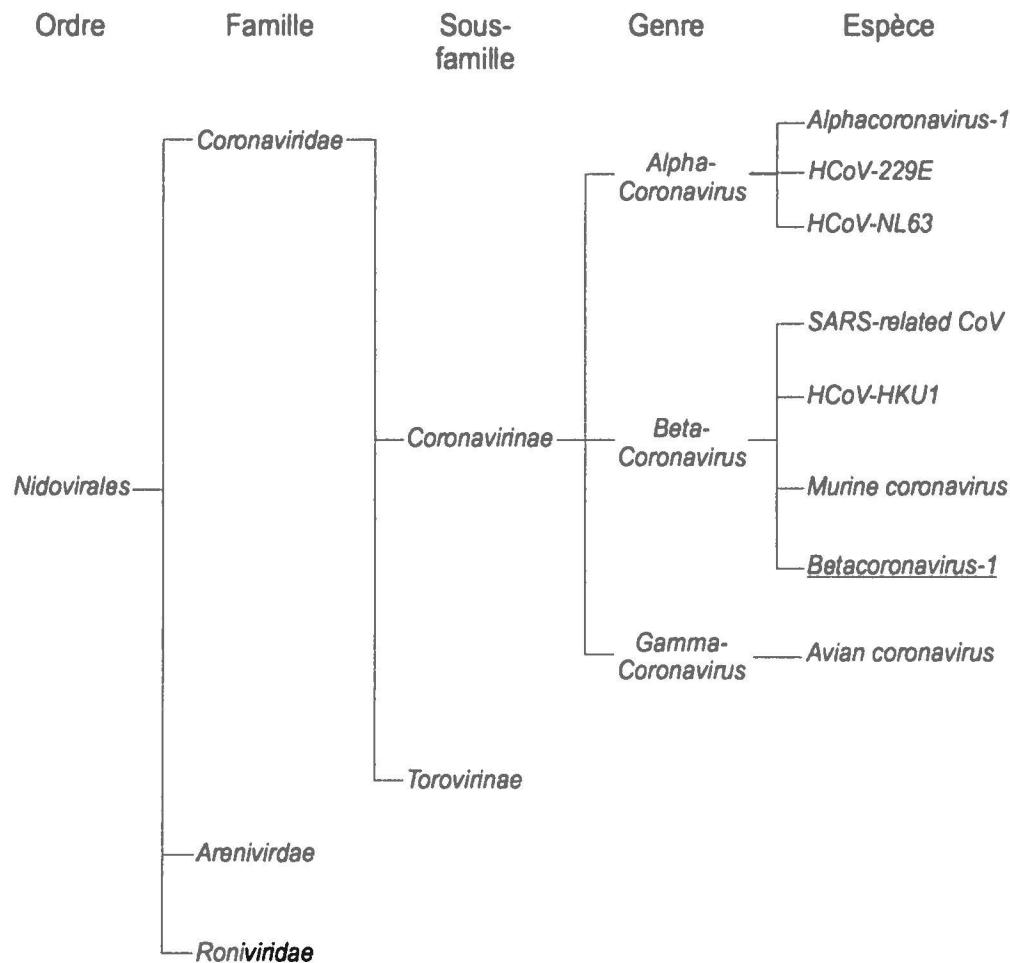


Figure 1. Phylogénie des *Nidovirales*.

Basée sur la taxonomie du 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. La souche HCoV-OC43 est membre du genre *Betacoronavirus-1* (Basé sur la nomenclature de l'ICTV, 2012).

Une autre souche de MHV, MHV-A59, est également utilisée comme modèle de maladie démyélinisante. MHV-A59 possède un tropisme neuronal et glial au niveau du SNC et est beaucoup moins neurovirulent que les différentes souches de JHM sus-mentionnées (Gombold *et al.*, 1995; Lavi *et al.*, 1984b; Phillips *et al.*, 2002). Conséquemment, le nombre de sujet murins survivants est plus élevé ce qui en fait un modèle intéressant pour étudier la démyélinisation (Das Sarma *et al.*, 2000; Lavi *et al.*, 1984b; MacNamara *et al.*, 2005). Une des particularités de la démyélinisation induite par MHV-A59 est qu'elle se produit plusieurs semaines après l'infection, alors que du virus infectieux ne peut plus être détecté (Pewe *et al.*, 1999). Le mécanisme complet de la démyélinisation induite par MHV-A59 n'est pas totalement élucidé et il subsiste toujours deux écoles de pensée quant aux causes de la démyélinisation observée. L'une repose sur les conséquences cellulaires directes de l'infection virale au SNC (Lampert *et al.*, 1973; Weiner, 1973) alors que l'autre attribue la démyélinisation aux conséquences de la réponse immunitaire subséquente à l'infection (Watanabe *et al.*, 1983; Wu et Perlman, 1999). Il est à noter que ces deux concepts ne sont pas mutuellement exclusifs et qu'une double contribution de ces deux mécanismes proposés puisse expliquer la démyélinisation induite par MHV. La capacité de MHV à infecter les neurones et à induire leur mort participerait à une neurodégénérescence menant à une perte de la gaine de myéline, caractéristique de la démyélinisation. Ce phénomène se produit puisqu'une fois le neurone dégénéré, la gaine de myéline ne bénéficie plus du support axonal pour maintenir sa propre structure. (Dales, 1995; Fazakerley et Buchmeier, 1993). Ce mécanisme est défini comme le modèle « Inside-Out » (Tsunoda et Fujinami, 2002). Cependant, l'infiltration lymphocytaire au SNC, subséquente à l'infection, est également connue pour jouer un rôle dans la démyélinisation. En effet, la persistance d'ARN et d'antigènes vitaux favorise la rétention des lymphocytes T et des macrophages au sein du SNC, ainsi qu'une libération de différentes chimiokines, notamment CXCL10 et CCL5 (Glass *et al.*, 2002). Cette inflammation soutenue mènerait à la destruction de la myéline (Ramakrishna *et al.*, 2006; Ramakrishna *et al.*, 2004) en ciblant les oligodendrocytes infectées. Ce mécanisme est défini comme le modèle « Outside-In ». Bien que différents laboratoires soutiennent préférablement un modèle par rapport à l'autre, il appert clair qu'une contribution du système immunitaire, conjointement aux effets cytopathiques de MHV, participent dans le phénomène de démyélinisation.

1.4 Coronavirus Humain OC43 (HCoV-OC43)

1.4.1 Généralités

Le Coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43) est le représentant du genre *Betacoronavirus* étudié et présenté dans cette thèse. Isolé en 1967 (McIntosh *et al.*, 1967), il fut pendant très longtemps principalement connu pour sa capacité à induire des infections des voies respiratoires inférieures et supérieures chez l'homme (Myint, 1995) et, avec HCoV-229E, ils sont conjointement responsables de près de 30% des rhumes annuels (Myint, 1994). À l'instar des autres Coronavirus humains (HCoV-229E, -NL63 et -HKU1) connus aujourd'hui, c'est un virus endémique, dont les pics d'infection ont lieu au cours de l'hiver et du printemps (Larson *et al.*, 1980; Myint, 1995). De plus, il est maintenant potentiellement associé à différentes pathologies plus sévères chez l'homme, telles que l'exacerbation d'asthme chez les nouveaux-nés (Gagneur *et al.*, 2002; Sizun *et al.*, 1993; Sizun *et al.*, 1995), des pneumonies chez les immunosupprimés et les enfants (Gerna *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2005), des myocardites (Riski et Hovi, 1980), des méningites (Riski et Hovi, 1980) et des diarrhées sévères (Gerna *et al.*, 1985; Resta *et al.*, 1985). Nonobstant ses rôles connus lors d'infection respiratoire, HCoV-OC43 est reconnu comme un agent étiologique potentiel de différentes maladies neurodégénératives du SNC. En effet, HCoV-OC43 possède un pourcentage d'identité de 71% avec son homologue murin MHV (St-Jean *et al.*, 2004), connu pour induire une encéphalite et une maladie démyélinisante chez la souris (Lavi *et al.*, 1984b). Les similarités de structure et de séquence du génome de HCoV-OC43 avec ses homologues neurotropes murins (MHV) et porcins (PrCoV) supportent l'hypothèse de l'implication probable de HCoV-OC43 dans des maladies neurodégénératives chez l'homme (Talbot *et al.*, 2001; Talbot et Jouvenne, 1992).

1.4.2 Neurotropisme

HCoV-OC43 est reconnu comme un virus neurotrophe, puisqu'il possède la capacité d'infecter différentes cellules du SNC. Il peut infecter des lignées cellulaires établies représentatives des microglies, des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones humains *in vitro* ainsi que des cultures primaires humaines provenant du SNC (Arbour *et al.*, 1999a; Bonavia *et al.*, 1997). Il possède également la capacité d'infecter des neurones (sa cellule-principale) et des cellules gliales murines *ex vivo* (Jacomy *et al.*, 2006). De plus, le

neurone est la cible d'infection principale de HCoV-OC43 en co-culture neurones/astrocytes humains et en culture primaire de cellules neurales (cellules provenant du SNC) murines *ex vivo* (Jacomy *et al.*, 2006).

1.4.3 Neuroinvasion

HCoV-OC43 possède également des propriétés neuroinvasives, vu sa propension à migrer vers le SNC et à y établir une infection. Les principales démonstrations de sa neuroinvasion chez l'humain proviennent de la détection de son ARN par RT-PCR et hybridation *in situ* dans des coupes de cerveau post-mortem (Arbour *et al.*, 2000). L'utilisation d'un modèle murin (Boucher *et al.*, 2007; Jacomy et Talbot, 2003) a permis de mieux définir son mécanisme de neuroinvasion. Il a été démontré que HCoV-OC43 peut infecter les voies respiratoires (Myint, 1995) tout en pouvant migrer vers le SNC via le nerf olfactif (Butler *et al.*, 2006) jusqu'au bulbe olfactif, où l'infection du SNC débute. La présence d'anticorps réactifs dans le LCR contre des épitopes de HCoV-OC43 indique également la capacité du virus à se retrouver au SNC (Fazzini *et al.*, 1992). Il est intéressant de noter que la capacité du virus respiratoire humain HCoV-229E à migrer au SNC en infectant des cellules myéloïdes humaines qui peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), suggère la possibilité d'un mécanisme homologue employé par HCoV-OC43 (Desforges *et al.*, 2007).

1.4.4 Neurovirulence

L'intérêt principal des études sur HCoV-OC43 porte sur la possibilité qu'il soit lié à l'induction de neuropathologies chez l'humain. Il est par contre clair que celui-ci possède des propriétés neurovirulentes, à tout le moins chez la souris (Jacomy *et al.*, 2006; Jacomy et Talbot, 2003). Dans le modèle murin, il est établi que l'infection intra-cérébrale de HCoV-OC43 induit une encéphalite vacuolisante (Jacomy et Talbot, 2003). De plus, l'infection de neurones murins induit l'activation de la caspase-3 ainsi que la fragmentation nucléaire, alors que l'infection au SNC murin induit également de la fragmentation nucléaire chez les neurones de l'hippocampe (Jacomy et Talbot, 2003). De plus, des variants de HCoV-OC43, comportant des mutations ponctuelles dans la protéine S, induisent une paralysie des membres inférieurs et mènent subséquemment à une démyélinisation (Brison *et al.*, 2011; Jacomy *et al.*, 2010). La démonstration de la neurovirulence de HCoV-OC43 chez l'homme

n'est toujours pas établie, elle est cependant présentement fortement suggérée par différentes études. La première étude soulignant le rôle possible des Coronavirus, dont HCoV-OC43, dans des maladies neurodégénératives date de 1980, où des chercheurs ont isolé des particules infectieuses de Coronavirus chez deux patients atteints de la sclérose en plaques (Burks *et al.*, 1980). Par la suite, de l'ARN coronaviral a pu être détecté dans le LCR (Cristallo *et al.*, 1997) et le cerveau (Stewart *et al.*, 1992) de patients atteints de sclérose en plaques. Il est également intéressant de noter que l'exacerbation de crise de sclérose en plaques corrèle avec les épisodes saisonniers d'infection par les Coronavirus (Sibley *et al.*, 1985). Une étude a également pu mettre en évidence un cas clinique démontrant la présence de HCoV-OC43 dans le SNC d'un patient atteint d'une encéphalomyélite disséminée aiguë (Yeh *et al.*, 2004). Plus récemment, à l'aide d'échantillons de cerveaux humains provenant d'une cohorte de donneurs post-mortem, une prévalence de la présence de HCoV-OC43 au SNC a été démontrée chez le groupe patient atteint de la sclérose en plaques (35,9%; 14/39), comparé au groupe témoin constitué de patients atteint d'autres maladies neurologiques et de gens histologiquement sains (13,7%; 7/51) (Arbour *et al.*, 2000).

Considérant, 1) l'accumulation d'études démontrant des corrélations entre l'infection par HCoV-OC43 au SNC et la présence de maladies neurodégénératives, 2) la capacité de HCoV-OC43 de migrer au SNC humain, 3) que l'homologue murin de HCoV-OC43, MHV, est capable d'induire une encéphalite ainsi qu'une maladie démyélinisante chez la souris, et 4) que HCoV-OC43 est également capable d'induire une encéphalite et une maladie démyélinisante chez la souris, il apparaît pertinent et important de considérer HCoV-OC43 comme un agent étiologique qui peut expliquer le développement de maladies neurodégénératives humaines.

1.5 Structure des Coronavirus

1.5.1 Structure générale du virion

Les Coronavirus sont des virus enveloppés dont le génome est composé d'ARN monocaténaire à polarité positive et possèdent le plus gros génome à ARN connu, allant de 26 à 32 kb (Lai, 1996) (Figure 2, p.11). Les Coronavirus possèdent également une structure relativement grosse dont le diamètre est compris entre 100 et 160nm (Gagnier *et al.*, 2002). Les protéines virales sont divisées en deux groupes, selon qu'elles possèdent ou non un rôle

dans la structure globale du virion. Le groupe betacoronavirus, à l'exception du SARS-CoV, comprend les protéines structurales qui incluent les protéines S, HE, M, N, et E. Le second groupe comprend plusieurs protéines non-structurales dont les gènes correspondant sont inclus dans le gène de la répliqueuse, correspondant aux cadre de lecture ouvert (open reading frame; ORF 1a et 1b) et d'autres dispersés à l'intérieur du génome et dont les fonctions, peu connues ou caractérisées, seraient associées à la virulence *in vivo* (Ito *et al.*, 2005). Il est à noter que l'hétérogénéité et la localisation génomique des gènes codant des protéines non-structurales de la deuxième catégorie varient énormément selon les espèces de Coronavirus (de Haan *et al.*, 2002a).

La protéine N est une protéine chaperonne de l'ARN viral qui lie et entoure le génome afin de protéger l'ARN en formant le complexe ribonucléoprotéique (Lai et Cavanagh, 1997; Zuniga *et al.*, 2007). Bien que considéré comme une protéine structurale, elle jouerait également un rôle dans la réPLICATION ou la transcription du génome, notamment en modulant la liaison des ARN viraux nouvellement formés lors du mécanisme de réPLICATION par synthèse discontinue (Almazan *et al.*, 2004; Schelle *et al.*, 2005; Zuniga *et al.*, 2010). La protéine de l'enveloppe, E, joue un rôle dans l'assemblage des particules infectieuses (Lim et Liu, 2001) ainsi que dans leur bourgeonnement (Kuo et Masters, 2003) en formant des canaux ioniques (Wilson *et al.*, 2004). L'absence de rôle de la protéine E dans la réPLICATION de MHV *in vitro* (Kuo et Masters, 2003) mise en opposition à son rôle essentiel dans la réPLICATION du TGEV (Ortego *et al.*, 2002) amène à établir avec circonspection sa fonction chez les Coronavirus, puisqu'il semble que l'importance de cette protéine varie selon le type de Coronavirus. La glycoprotéine membranaire, M, est insérée dans la membrane des particules virales et est impliquée dans l'assemblage et le bourgeonnement intracellulaire des virions (de Haan *et al.*, 1999; Lai et Cavanagh, 1997; Mounir et Talbot, 1992; Sturman *et al.*, 1980). Elle permet de faire le pont entre le génome et l'enveloppe (Kazi *et al.*, 2005; Nguyen et Hogue, 1997; Opstelten *et al.*, 1995) et par conséquent interagirait avec les protéines N (Fang *et al.*, 2005; He *et al.*, 2004; Kuo et Masters, 2003), E (Lim et Liu, 2001), S et HE (de Haan *et al.*, 1999). La protéine HE est une hémagglutinine-estérase se retrouvant à la surface de certaines espèces coronavirales et possédant une fonction de liaison à l'acide sialique ainsi qu'une fonction acétyl-estérase. Son rôle dans l'infectivité des Coronavirus demeure controversé. La protéine HE qui est exprimée chez le Coronavirus bovin (BCoV) n'est pas

nécessaire à sa réPLICATION ou à l'infection de cellule-cible (Popova et Zhang, 2002), alors que chez MHV-A59, HE n'est tout simplement pas exprimée du à l'absence d'un codon d'initiation (Yokomori *et al.*, 1991). Cependant, son expression ectopique chez MHV-A59 induit une augmentation de la neurovirulence chez la souris (Kazi *et al.*, 2005). Dans le cas du HCoV-OC43, le rôle de la protéine HE semble plus essentiel. Des travaux récents (Desjardins, 2011) tendent à démontrer qu'en absence de cette protéine, il n'est pas possible de produire de virus infectieux même si des antigènes viraux sont produits. De plus, HE pourrait se lier à un co-récepteur conjointement avec la glycoprotéine S, dont les rôles et fonctions chez les Coronavirus seront définis plus amplement.

1.6 Structure et fonction de la glycoprotéine S

1.6.1 Généralités

La glycoprotéine S est la protéine la plus étudiée et définie des Coronavirus. Elle possède une pléthore de rôles et fonctions divers au niveau de la structure du virion, du tropisme ainsi que de la pathogenèse. Elle est la protéine responsable de l'attachement de la particule virale au récepteur sur la cellule cible (Dveksler *et al.*, 1991; Yokomori et Lai, 1992) et participe également à la formation de syncytia chez certains coronavirus (Collins *et al.*, 1982). Étant donné sa présence à la surface du virion et de la cellule infectée, c'est une protéine fortement reconnue par le système immunitaire. Ainsi, on note une forte présence d'anticorps réactifs contre celle-ci (Collins *et al.*, 1982; Daniel *et al.*, 1993; Talbot *et al.*, 1984) ainsi que de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à ses différents épitopes (Bergmann *et al.*, 1996; Castro et Perlman, 1995). Elle joue également un rôle central dans la neurovirulence, le tropisme et la propagation des particules infectieuses (Dalziel *et al.*, 1986; Fleming *et al.*, 1987; Gallagher *et al.*, 1990; Matsubara *et al.*, 1991; Taguchi, 1995; Wang *et al.*, 1992).

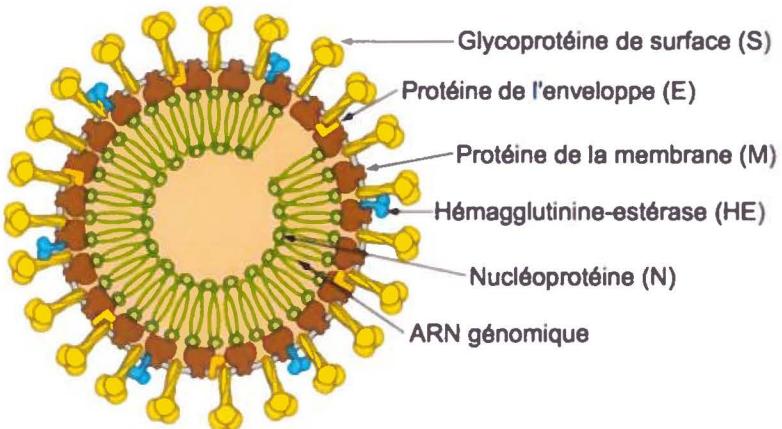


Figure 2. Structure du virion des *Coronaviridae*.

Les *Coronaviridae* sont des virus à ARN monocaténaire de polarité positive, pléiomorphes et possédant une architecture en forme de couronne qui leur est conférée par la présence des spicules (protéine S) à leur surface. La glycoprotéine de surface S est la protéine virale permettant l'attachement à un récepteur sur la cellule cible. L'hémagglutinine-estérase (protéine HE) est présente sur toutes les espèces du genre *betacoronavirus*, à l'exception de SARS-CoV, et participerait parfois au clivage du récepteur cellulaire une fois lié à la protéine S, favorisant ainsi l'entrée et/ou la sortie du virus. La nucléoprotéine N entoure et protège l'ARN viral encapsidé formant le complexe ribonucléorotéique. La protéine M lie le complexe ribonucléoprotéique à la capsidé virale en interagissant avec la protéine E, alors que celle-ci participe à la courbure et la formation de l'enveloppe.

(Adaptée de la base de données ViralZone de l'Institut Suisse de bioinformatique
<http://biowiki.org/view/Fall09/SARS>)

1.6.2 Structure de la glycoprotéine S

La glycoprotéine S est une protéine membranaire de 1 160 à 1 450 acides aminés, abondamment présente à la surface des particules virales et est hautement glycosylée (Figure 2, p.11) (Krueger *et al.*, 2001). Elle fait partie des protéines membranaires de type I, possède un domaine transmembranaire et, chez certaines souches coronavirales, elle possède également une séquence de clivage par des protéases cellulaires (de Haan et Rottier, 2005). Les virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV), SARS-CoV, HCoV-229E, TGEV et HCoV-OC43 ne possèdent pas de site de clivage dans la protéine, contrairement aux espèces BCoV, MHV-A59, MHV-JHM et MHV-3. La protéine S comporte également plusieurs résidus cystéines permettant d'établir des ponts disulfure impliqués dans son repliement (Opstelten *et al.*, 1993), qui a lieu au sein du réticulum endoplasmique (RE) (Doms *et al.*, 1993), où elle forme des homotrimères (Gallagher *et al.*, 1990; Spiga *et al.*, 2003). Dans le cas de MHV, son clivage produit deux sous-unités S1 et S2 qui sont respectivement la tête globulaire N-terminale et la région de la tige de la protéine (Daniel *et al.*, 1993).

La région S1 comprend le site de liaison présumé au récepteur cellulaire ainsi qu'une région hypervariable, probablement impliquée dans l'évasion immunitaire (Phillips et Weiss, 2001; Rowe *et al.*, 1997). La région S2 comprend quant à elle une portion de la tige, une portion intra-cytoplasmique et transmembranaire, qui inclut un domaine de peptide de fusion (PF) (Bosch *et al.*, 2003) et deux domaines nommés « heptad repeats » (HR) qui sont impliqués dans la fusion membranaire (Supekar *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). Ces deux régions seraient directement impliquées dans le processus d'entrée du virus dans la cellule (Gallagher et Buchmeier, 2001).

1.6.3 Fonctions de la glycoprotéine S

La fonction principale liée à la protéine S est l'attachement du virus à la cellule cible via son site de liaison présumé au récepteur situé dans la région S1 de la protéine (Taguchi, 1995). La protéine S permet donc au virus de lier un récepteur cellulaire spécifique qui mènera ultimement à la pénétration du virus chez la cellule cible. De plus, la région S1 serait spécifiquement impliquée dans le processus d'entrée du virus chez la cellule cible en participant au changement conformationnel de la protéine S suite à sa liaison au récepteur (Lewicki et Gallagher, 2002; Matsuyama et Taguchi, 2002; Zelus *et al.*, 2003). Ces

caractéristiques la définissent donc comme étant le déterminant majeur du tropisme cellulaire chez les différentes espèces de Coronavirus (Gallagher et Buchmeier, 2001; Hofmann et Pohlmann, 2004). Cependant, dépendamment de l'espèce coronavirale, elle possède une capacité de liaison différente, qui peut mener à la reconnaissance de récepteurs différents, selon ses caractéristiques propres d'affinité et d'avidité. Sa séquence en acides aminés au site de liaison au récepteur, ainsi que la localisation de celui-ci, explique les différences de spécificité des différents Coronavirus.

Certains récepteurs cellulaires des Coronavirus ont été identifiés, tandis que d'autres reste à être identifiés, comme pour le Coronavirus humain OC43. Plusieurs membres du genre *Alphacoronavirus* utilisent comme récepteur cellulaire l'aminopeptidase N ou le CD13, notamment les virus HCoV-229, TGEV et le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV) (Delmas *et al.*, 1992; Kolb *et al.*, 1998; Lachance *et al.*, 1998). L'espèce HCoV-NL63, membre du genre *Alphacoronavirus*, et SARS-CoV, membre du genre *Betacoronavirus*, utilisent un récepteur commun, l'*Angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) (Hofmann *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007), alors que SARS-CoV peut également utiliser L-SIGN/CD209L comme récepteur (Jeffers *et al.*, 2004). En contrepartie, le MHV, membre du genre *Betacoronavirus* reconnaît comme récepteur le *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1) (Williams *et al.*, 1991). Les espèces BCoV et HCoV-OC43 n'ont pas encore de récepteur cellulaire spécifique identifié, mais il a été reconnu que leur liaison au récepteur est dépendante de la présence d'acide sialique acétylé en position C9 (Schwegmann-Wessels et Herrler, 2006).

La liaison de la protéine S à son récepteur amorce le processus d'entrée du virus à l'intérieur de la cellule hôte. Dépendant de l'espèce coronavirale, un changement conformationnel de la protéine peut se produire, ainsi que son clivage, suite à la liaison au récepteur. Le clivage de la protéine S induit l'exposition des domaines de fusion de la sous-unité S2 (Yoo *et al.*, 1991), notamment chez certains membres du genre *Betacoronavirus*. Le rapprochement des peptides de fusion à la membrane rend alors possible l'initiation de la fusion membranaire (Bosch *et al.*, 2003; Matsuyama et Taguchi, 2002, 2009). Cependant, le clivage et la libération de la sous-unité S2 ne seraient pas essentiels à la fusion des membranes et l'entrée du virus (Bos *et al.*, 1995; Hingley *et al.*, 1998; Stauber *et al.*, 1993; Taguchi, 1993). En effet, plusieurs membres des *Alphacoronavirus* et des

Gammacoronavirus ne subissent pas le clivage de leur protéine S (Breslin *et al.*, 2003), tout comme HCoV-OC43, ne possédant pas de site de clivage (Kunkel et Herrler, 1996).

La protéine S joue également un rôle dans la pathogenèse induite par les Coronavirus. Des études de génétique inverse ont démontré qu'elle pouvait influencer la neurovirulence et la dissémination *in vivo* ou *in vitro*, probablement via les déterminants présents dans les sous-unités S1 et S2 de la protéine (Fu *et al.*, 2004; Phillips *et Weiss*, 2001; Taguchi *et al.*, 1995). La majorité des études portant sur le rôle de la protéine S dans la neuropathogenèse ont été effectuées sur différentes souches de MHV, nommément MHV-A59 et MHV-JHM, qui sont connues pour induire une neuropathologie différente. MHV-A59 est une souche hépatotrope et neurotrophe, connue pour induire des hépatites et une neurovirulence menant à la démyélinisation plusieurs semaines suite à l'infection. En contrepartie, MHV-JHM est une souche principalement neurotrophe induisant une neurovirulence importante menant rapidement à la perte des neurones et à la mort du sujet infecté. La permutation des protéines S, ou de certaines de leurs régions, entre ces deux souches a permis d'établir un rôle central de cette protéine dans la neurovirulence induite par les Coronavirus. En effet, le remplacement la protéine S de MHV-A59 par celle de MHV-JHM mène à la production d'une souche recombinante possédant une neurovirulence accrue (Phillips *et al.*, 1999) ainsi qu'une dissémination au SNC plus importante (Phillips *et al.*, 2002). De plus, cette souche recombinante n'est plus à même d'induire une hépatite, comparativement à la souche de référence MHV-A59 (Navas *et al.*, 2001). Il est cependant à noter que le remplacement de la protéine S de MHV-JHM par celle de MHV-A59 ne mène pas à une diminution de la neurovirulence de la souche résultante (Iacono *et al.*, 2006), pas plus qu'à un phénotype hépatotrope (Navas *et Weiss*, 2003). Ces données indiquent donc que la protéine S n'est pas la seule protéine coronavirale impliquée dans la neurovirulence ou le tropisme du virus.

La modification de la neuropathogenèse induite par HCoV-OC43, liée à des mutations dans sa protéine S, abonde dans le même sens que les résultats observés chez MHV. En effet, HCoV-OC43 est connu pour induire une encéphalite aiguë chez la souris et posséder un tropisme neuronal (Jacomy *et al.*, 2006; Jacomy *et Talbot*, 2003). Des mutations dans sa protéine S, obtenues suite à une infection persistante *in vitro*, confèrent à la souche résultante la capacité d'induire une neuropathogenèse modifiée ainsi que d'acquérir une neurovirulence accrue (Jacomy *et al.*, 2010). La présence de ces mutations mène à l'induction d'une maladie

démyélinisante ainsi qu'une paraparésie, alors que le virus de type sauvage n'induit qu'une encéphalite. Tout comme pour MHV-A59 exprimant la protéine S de MHV-JHM (Phillips *et al.*, 2002), les mutations présentes dans la protéine S de HCoV-OC43 induisent une dissémination virale accrue au SNC, une augmentation de la réPLICATION du virus ainsi qu'une neuroinflammation plus importante (Jacomy *et al.*, 2010).

1.6.4 Évolution de la protéine S en infection persistante

Étant des virus à ARN, les Coronavirus sont prompts à un haut taux de mutations de leur génome. Les RdRp utilisées par les Coronavirus sont reconnues pour leur faible fidélité lors de la réPLICATION du génome (Lai *et Cavanagh*, 1997). Ainsi, ce phénomène permet la génération de plusieurs mutants, sélectionnés entre autres en fonction de l'environnement dans lequel ils se trouvent (Zhang *et al.*, 2006). Les mutations ainsi produites au sein de la protéine S peuvent conséquemment moduler les rôles et fonctions principaux de celle-ci, soit le tropisme et la pathogenèse.

Par exemple, la souche MHV-A59, connue pour ses propriétés hépatotropes, acquiert des mutations ponctuelles dans la protéine S suite à une infection persistante en culture de cellules neurales *in vitro*. L'acquisition de seulement 2 mutations ponctuelles, dans la région de liaison présumée au récepteur et dans le site de clivage, diminue significativement le tropisme hépatique. Par la suite, cette même souche en infection persistante de cellules du foie mène l'apparition de 2 mutations ponctuelles compensatoires qui rétablissent le tropisme hépatique, comme la souche de référence de départ (Navas-Martin *et al.*, 2005). La culture *in vitro* de la souche MHV-JHM peut aussi mener à l'apparition de mutation dans la protéine S, altérant sa reconnaissance du récepteur CEACAM1 (Krueger *et al.*, 2001). De plus, la culture *in vitro* de la souche MHV-JHM permet la génération de souche à réPLICATION plus élevée, mais possédant une neurovirulence altérée (Fazakerley *et al.*, 1992). De telles mutations dans la protéine S, induisant une modification importante du tropisme et de la virulence, ont également été observées chez la souche FIPV. En effet, l'acquisition de mutations en persistance chez le Coronavirus félin (FCoV) induit un changement de tropisme vers les macrophages, caractéristique de la souche FIPV, et mène à une dissémination systémique rapide (Vennema *et al.*, 1998). La souche HCoV-OC43 acquiert des mutations ponctuelles dans sa protéine S suite à une infection persistante *in vitro* de cellules neurales (St-Jean,

2006; St-Jean *et al.*, 2006b). L'insertion de certaines de ces mutations ponctuelles (H183R et Y241H) au sein du clone infectieux pBAC-OC43^{FL} (St-Jean *et al.*, 2006a) a mis en évidence une modification de la neurovirulence dans un modèle murin, entraînant une maladie démyélinisante et une paralysie des membres inférieurs, contrairement à une encéphalite aiguë induite par la souche sauvage HCoV-OC43. De plus, les mutations ponctuelles acquises en persistance induisent également une dissémination et une réPLICATION plus importantes du virus dans la moelle épinière (Jacomy *et al.*, 2010). Ces mutations ponctuelles mènent également à une activation plus importante et rapide de la *Unfolded Protein Response* (UPR), et des caspases chez le neurone humain, conjointement à une augmentation de la mortalité cellulaire et de l'effet cytopathique (CPE) (Favreau *et al.*, 2009; Favreau *et al.*, 2012). En plus d'une modification de la réponse cellulaire à l'infection et de l'augmentation de la virulence, ces mutations ponctuelles engendrées pourraient, pour une raison encore inconnue, être associées à une modification dans le cycle de réPLICATION du virus alors que l'on peut observer une augmentation importante du nombre de particules virales infectieuses intracellulaires (Favreau *et al.*, 2009). L'étude de l'impact de ces mutations (H183R et Y241H) chez HCoV-OC43 lors de l'infection du neurone humain fait partie intégrante de cette thèse et sera abordée plus en profondeur subséquemment.

En plus de potentiellement modifier la liaison au récepteur, les mutations dans la protéine S acquises en persistance peuvent également participer à développer l'habileté d'utilisation d'un second récepteur. Ainsi, la substitution d'acides aminés dans la protéine S permet à la souche MHV-A59 d'infecter des cellules non-murines, précédemment non-permissive à l'infection (Holmes *et al.*, 1997; Schickli *et al.*, 1997; Yokomori *et al.*, 1992). Cette modification de tropisme est corrélée avec la perte de dépendance du récepteur CEACAM1 (Thackray *et al.*, 2004) et implique l'utilisation d'un second récepteur contenant de l'*heparan sulfate* (de Haan *et al.*, 2005). Cette capacité d'adaptation de la protéine S via l'acquisition de mutations est une des causes principales du franchissement de barrière d'espèce chez les Coronavirus, l'épidémie de SARS-CoV en 2003 en est un exemple probant (Zhang *et al.*, 2006). Les études de comparaison de séquences démontrent que le plus proche parent du SARS-CoV, avec 99,8% d'homologie, utiliserait la civette comme réservoir (Song *et al.*, 2005). L'acquisition de mutations dans la protéine S aurait permis le franchissement de barrière d'espèce et la capacité à infecter l'humain.

1.7 Cycle répliquatif des Coronavirus

Puisque ces caractéristiques influent directement sur le cycle répliquatif du virus, il est important de rappeler que les Coronavirus sont des virus enveloppés à ARN monocaténaire de polarité positive. Les Coronavirus possèdent plusieurs mécanismes similaires à ceux retrouvés chez les autres virus à ARN, autant par leur mode d'entrée que par leurs complexes de réPLICATION cytoplasmique associés aux membranes (Enjuanes, 2005).

La première étape de l'infection se produit lors de l'attachement de la protéine S du virus à son récepteur cellulaire spécifique (Figure 3, p.20). Tel que mentionné précédemment, les Coronavirus utilisent des récepteurs différents selon les espèces, ou selon le type cellulaire qu'ils infectent. Suite à l'attachement, un changement conformationnel de la protéine S entraîne un rapprochement des domaines de fusion de la protéine S avec la membrane de la cellule. Dès lors, la fusion des membranes de la particule virale et de la cellule mènent à l'internalisation de la capsid virale dans la cellule (Matsuyama *et al.*, 2005; Simmons *et al.*, 2005). Les Coronavirus possédant une protéine S clivée entreraient directement au niveau du cytoplasme afin de débuter le cycle de réPLICATION du génome (Gallagher *et al.*, 1991; Kooi *et al.*, 1991; Nash *et al.*, 1997; Payne *et al.*, 1990). Ceux possédant une protéine S non clivée seraient premièrement internalisés au sein de vésicules endocytiques où l'acidification et l'action des protéases cellulaires, dont les cathepsines D et L, induiraient le clivage de la protéine S puis la libération du contenu de la capsid virale dans le cytoplasme (Blau *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 2004). Cependant, certaines études démontrent que les Coronavirus possédant une protéine S clivée pourraient aussi emprunter la voie endocytique (Chu *et al.*, 2006; Gallagher *et al.*, 1991; Nash *et al.*, 1997).

La libération du génome dans la cellule hôte implique le début immédiat de la traduction des gènes viraux puisque le génome à ARN est de polarité positive. Les premières protéines virales produites sont les polyprotéines pp1a et pp1ab, codées par les « Open Reading Frame » ORF1a et ORF1b. Ces polypeptides sont dès lors clivés par les protéases virales PL^{PRO} et 3CL^{PRO} qui permettent la formation des protéines non-structurales nécessaires à la réPLICATION du virus. Selon les espèces coronavirales, jusqu'à 16 protéines non-structurales peuvent être produites (Britton *et al.*, 2008). La RdRp est une des protéines produites suite au clivage et participera, en association entre autres à la protéine N

(Enjuanes *et al.*, 2006), à la formation du complexe de transcripton-réPLICATION (RTC) associé à des doubles membranes dans la région péri-nucléaire (Sawicki *et al.*, 2007). Le RTC permettra de produire des copies négatives du génome qui serviront à l'amplification des copies positives en vue de leur encapsidation lors de la formation des futures particules virales. Le RTC participe également à la transcription des ARNm dédiés à la traduction des protéines virales par un processus caractéristique de l'ordre des Nidovirales, la « transcription discontinue », où des segments sous-génomiques d'ARNm de polarité négative de différentes longueurs seront produits et ensuite amplifiés par la RTC afin de produire les ARNm de polarité positive (Britton *et Cavanagh*, 2008). La RdRp reconnaît une séquence dans la région 3' du génome, formée de structures secondaires *hairpin* et *pseudoknot*, et débute la transcription de la copie négative du génome (de Haan *et al.*, 2002b; den Boon *et al.*, 1996; Siddell *et al.*, 2005; Siddell, 1995). Lorsque la RdRp rencontre une séquence régulatrice de la transcription (TRS), la transcription peut s'arrêter et le complexe de réPLICATION est alors relocalisé dans la portion 5' du génome où la transcription recommence afin de générer la séquence *leader* présente sur tous les ARNm. Si la transcription n'est pas interrompue à la rencontre du premier TRS, elle continue jusqu'à la rencontre d'un second TRS, où la transcription peut également s'interrompre. Ce mécanisme produit donc des ARNm sous-génomiques de polarités négatives de différentes longueurs qui comportent tous la séquence *leader* en 5', séquence qui correspond à la séquence 3'-poly(A) de l'ARNm de polarité positive. Les ARN sous-génomiques à polarité négative sont dès lors transcrits en ARN sous-génomique à polarité positive qui seront traduits en protéines. Puisque les TRS sont présents tout au long du génome et que l'initiation de la transcription débute toujours en 3', le ratio des gènes viraux transcrits est directement proportionnel à la distance qui les sépare du début du génome. Ce mécanisme de production d'ARNm sous-génomique est nommé « transcription discontinue » et les raisons pour laquelle l'atténuation se produit ou non n'est malheureusement pas encore bien définie (Sawicki *et al.*, 2007). Certaines études soutiennent que la protéine N jouerait un rôle dans le RTC, notamment par sa capacité de liaison à l'ARN (Almazan *et al.*, 2004; Baric *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 2000; Schelle *et al.*, 2005; Stohlman *et al.*, 1988), bien que selon la souche de Coronavirus ou d'Arterivirus étudiée elle ne semble pas essentielle (Molenkamp *et al.*, 2000; Thiel *et al.*, 2001). Il est établi du moins que dans le

modèle TGEV l'absence de la protéine N mène à une faible amplification des ARNm sous-génomiques (Almazan *et al.*, 2004).

Il convient de rappeler qu'à l'instar de plusieurs virus à ARN, les Coronavirus forment des complexes de réplication associés aux membranes. Il a été démontré que plusieurs protéines non-structurales impliquées dans la réplication possèdent des régions transmembranaires (van der Meer *et al.*, 1998; Wassenaar *et al.*, 1997) et se retrouvent majoritairement associées aux membranes (Gosert *et al.*, 2002), particulièrement dans la région périnucléaire (Bi *et al.*, 1998; Bost *et al.*, 2000; Denison *et al.*, 1999; Harcourt *et al.*, 2004; Prentice *et al.*, 2004; Schiller *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1999; van der Meer *et al.*, 1998; van Dinten *et al.*, 1996). Ces complexes de réplication seraient formés à partir de membranes provenant de divers organelles intracellulaires, telles que le RE, le Golgi ou les endosomes (Bi *et al.*, 1998; Prentice *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 1999; van der Meer *et al.*, 1998; van Dinten *et al.*, 1996). La formation des complexes de réplication associés aux membranes possède plusieurs avantages pour le cycle répliquatif viral. Ces complexes permettent une plus grande promiscuité du génome et des enzymes nécessaires à sa transcription, ils procurent un micro-environnement qui protège l'ARN viral des protéines cellulaires reconnaissant l'ARN exogène et promulgant sa dégradation, et permet l'association rapide des génomes produits aux membranes qui participeront dans la formation de la future progéniture virale.

Suite à la production des différentes protéines virales, les particules infectieuses seront assemblées puis libérées par la cellule, complétant ainsi le cycle répliquatif du virus. Les particules infectieuses des Coronavirus s'assemblent au sein du lumen du RE et du réseau trans-Golgi (ERGIC) (Klumperman *et al.*, 1994) et suite à leur formation, elles sont libérées par exocytose à l'extérieur de la cellule (de Haan *et Rottier*, 2005; Masters, 2006).

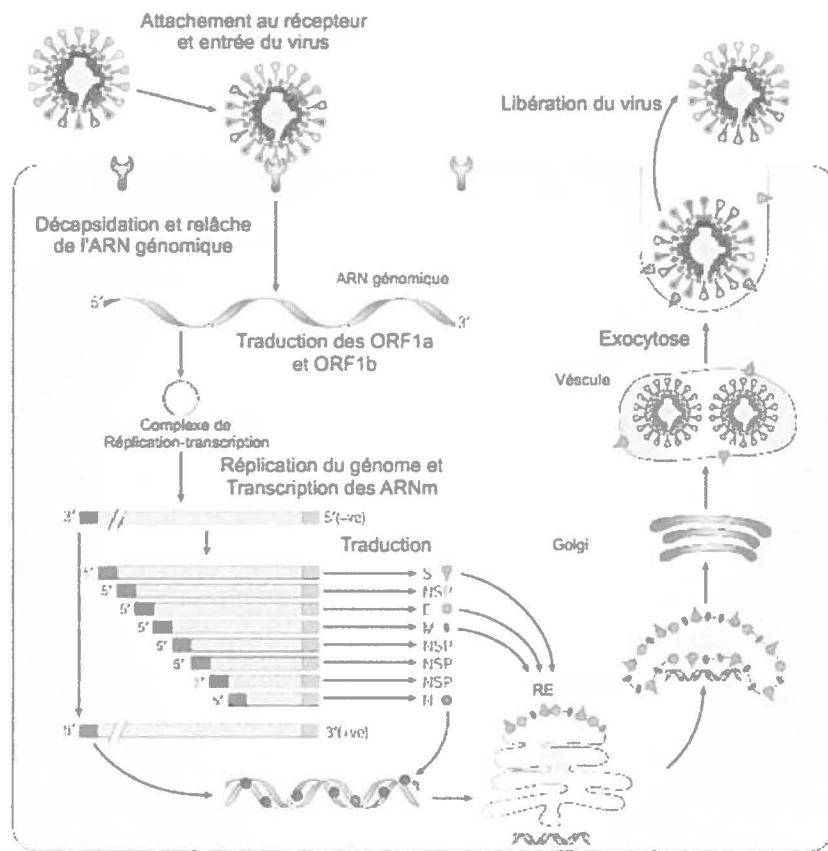


Figure 3. Cycle répliquatif des *Coronaviridae*.

Suite à l'attachement de la glycoprotéine S à son récepteur, l'enveloppe de la particule virale fusionne avec la membrane de la cellule et la capsid est alors internalisée dans la cellule. L'ARN monocaténaire de polarité positive est alors libéré de la capsid dans le cytosol où les ORF1a et 1b sont traduits en polyprotéines pp1a et pp1ab et puis clivés. Suite à leur clivage elles sont associées au complexe de transcription-réplication, en association avec la membrane périnucléaire. S'en suit alors la transcription continue et discontinue du génome viral qui génère respectivement des copies négatives du génome et des ARNm viraux de polarité négative de différentes longueurs. Ces derniers seront alors amplifiés et transcrits en ARN de polarité positive qui mène à la production de copies positives du génome et des différents ARNm qui permettront la production des différentes protéines virales. Les particules virales peuvent dès lors s'assembler au sein du RE, puis de l'appareil de Golgi, où elles acquièrent leurs enveloppes. Finalement, elles migrent depuis l'appareil de Golgi vers la membrane cytoplasmique où elles seront libérées dans le milieu extracelulaire (Adaptée de Stadler *et al.*, 2003)

2.0 L'infection virale

2.1 Généralités

Les Coronavirus ont peu été étudiés dans la population humaine jusqu'à l'avènement du SRAS causé par le SARS-CoV en 2003. Dès lors, il est apparu que ces virus sont ubiquitaires chez l'homme et les mammifères et qu'ils peuvent infecter plusieurs hôtes différents. De plus, les Coronavirus possèdent plusieurs voies d'entrées chez leur hôte et la capacité d'infecter plusieurs organes différents et d'induire des pathologies fort variées, notamment au niveau du SNC. Ici après se veut une description des divers mécanismes d'infection des Coronavirus ainsi qu'une revue des pathologies importantes qui leurs sont associées.

2.2 Tropisme

Les Coronavirus sont majoritairement des virus respiratoires, connus pour se disséminer au sein des populations via la génération d'aérosols par un hôte infecté (Gagneur *et al.*, 2002). Ainsi, le SARS-CoV et le HCoV-OC43 sont des exemples connus de Coronavirus possédant la capacité d'infecter les voies respiratoires et d'y induire respectivement le SRAS ou des maladies des voies respiratoires supérieures (par exemple le rhume) ou inférieures (tel l'exacerbation d'asthme) (Drosten *et al.*, 2003; Fouchier *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Myint, 1994). Certains Coronavirus possèdent cependant la capacité d'infecter plusieurs autres types cellulaires, tels que les hépatocytes, les monocytes et les cellules neurales. Comme mentionné précédemment, la protéine de surface S est un déterminant majeur du tropisme cellulaire des différentes espèces coronavirales. Selon sa spécificité pour un récepteur donné, elle permet d'infecter un type cellulaire particulier et donc de cibler un organe qui y est relié. C'est notamment le cas pour le Coronavirus murin MHV qui, selon la souche, possède une protéine S différente et un tropisme différent. En effet, MHV-A59 est connu pour infecter principalement les hépatocytes du foie (Navas *et al.*, 2001) alors que MHV-JHM possède la capacité d'infecter les cellules neurales (Marten *et al.*, 2001). Conséquemment, la pathologie induite varie selon le type cellulaire infecté, alors que MHV-A59 induit une hépatite aiguë ainsi qu'une maladie démyélinisante, MHV-JHM n'induit qu'une maladie démyélinisante au SNC. Il est important de noter qu'une même

protéine S peut permettre un tropisme varié chez l'hôte. Par exemple, HCoV-OC43 peut infecter les cellules des voies respiratoires (Myint, 1994) et également différentes cellules du SNC (Arbour *et al.*, 1999a; Bonavia *et al.*, 1997). Le SARS-CoV, aussi connu *a priori* pour infecter les cellules du système respiratoire, est également capable d'infecter des cellules du SNC (Cheever *et al.*, 1949; Gu *et al.*, 2005; Tseng *et al.*, 2007) et le HCoV-229E peut infecter à la fois des cellules du tractus entérique et du système respiratoire (Myint, 1994) et des cellules myéloïdes (Desforges *et al.*, 2007). Cependant, bien que la protéine S soit un déterminant majeur du tropisme cellulaire, d'autres facteurs viraux non encore identifiés peuvent également y jouer un rôle. Par exemple, la protéine HE de MHV a récemment été identifiée comme étant exclusivement le ligand du 9-O-acetyl, alors que la protéine S n'est pas impliquée (Langereis *et al.*, 2010).

Globalement, les Coronavirus possèdent un vaste tropisme qui varie selon les souches étudiées et également une diversité de tropisme pour une même souche donnée. Bien que connus pour causer des infections des voies respiratoires, ils sont particulièrement étudiés pour leur capacité à infecter le SNC de différentes espèces et y induire des neuropathologies diverses. Ces particularités sont au cœur de cette thèse et seront donc abordées plus en profondeur.

2.3 Infection du SNC

Le SNC a, par le passé, été considéré comme étant un site immunoprivilégié, où les pathogènes et le système immunitaire n'avaient pas accès. Or, il est maintenant connu que le système immunitaire joue un rôle important au SNC dans la défense contre les pathogènes, qui y ont par conséquent beaucoup plus accès que ce que l'on pouvait croire. Il n'en demeure pas moins que par sa nature particulière, le SNC jouit d'une immuno-surveillance particulière. Ceci s'explique entre autres par le fait que les dommages possibles occasionnés directement par les pathogènes ou par le système immunitaire lui-même, peuvent être hautement délétères, particulièrement dû au faible renouvellement des cellules neuronales. Aujourd'hui, plusieurs données tendent à démontrer que cette immuno-surveillance spécifique implique également la présence, persistante ou ponctuelle, de pathogènes viraux, ce que l'on appelle la flore virale (Campbell *et* Buchmeier, 2001). Plusieurs virus peuvent infecter et parfois établir des infections persistantes au SNC, dont le virus de Sendai (SeV), le virus de la

chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Tuomanen, 1996), le virus de l'Influenza (Frielle *et al.*, 1984), le virus de l'herpès simplex (HSV) (Hampar *et al.*, 1965), le virus de la varicelle-zona (VZV) (Iltis *et al.*, 1982), le virus de la rougeole (MV) (Rustigian, 1966), le virus de la rage (RV) (Wild *et al.*, 1981), le virus de John Cunningham (JCV) (Chesters *et al.*, 1983), le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Locardi *et al.*, 1992), le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Youngner *et al.*, 1978), plusieurs Picornavirus, Togavirus, Bunyavirus, etc. Les Coronavirus ne font pas exception. Certaines maladies du SNC ont rapidement été associées à une étiologie virale, telle que l'encéphalite subsclérosante aiguë, causée par le MV, alors que l'infection primaire et la maladie sont facilement corrélées dans le temps (Allen *et al.*, 1996). Bien que les postulats de Koch aient prouvé leur utilité dans de tels cas, il peut être difficile de les appliquer dans un contexte de maladie neurodégénératives, surtout lorsque cette pathologie est associée à une infection persistante. Conséquemment, il peut être plus difficile d'établir une étiologie virale pour des maladies neurologiques pour plusieurs raisons. L'infection primaire et l'apparition de symptômes peuvent être grandement espacés dans le temps (mois, années), le polymorphisme génétique et le sexe peuvent générer une susceptibilité différente, différents contextes environnementaux additifs peuvent être nécessaire ou moduler l'apparition de la maladie, etc. En conséquence, il est primordial de se détacher des postulats de Koch lors de l'étude de pathologies à étiologies multifactorielles (Giovannoni *et al.*, 2006; Giovannoni *et al.*, 2007).

Comme mentionné préalablement, les Coronavirus possèdent la capacité d'envahir le SNC (neuroinvasion), d'y établir une infection (neurotropisme) et d'y induire une maladie (neurovirulence) chez la souris. Ces particularités en font dès lors des agents étiologiques pouvant expliquer le développement de maladies neurodégénératives humaines. De plus, considérant que MHV est l'homologue murin de HCoV-OC43, il convient de spéculer sur les parallèles qui pourraient exister entre des maladies induites par ces deux virus chez la souris et l'humain respectivement. Ainsi, l'ensemble des connaissances portant sur leurs capacités à participer à des maladies neurodégénératives chez la souris et l'humain seront abordées dans ce qui suit.

2.3.1 Système nerveux central

Afin de bien saisir les mécanismes utilisés par les Coronavirus lors de l'infection du SNC, il convient de définir celui-ci. Le SNC est un organe particulier chez les mammifères en ceci qu'il possède une architecture cellulaire beaucoup plus complexe et diversifiée que tout autre organe du corps, et qui demeure encore aujourd'hui non complètement caractérisé. Il est constitué de l'encéphale, qui regroupe le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral, et de la moelle épinière. Il se compose de plusieurs types cellulaires possédant chacun leur rôle particulier. Les neurones, principales cellules connues du SNC, sont constitués de dendrites, d'un corps cellulaire et d'un axone au sein duquel parcourt l'influx nerveux. En participant à la transmission de l'influx nerveux, les neurones sont en soi l'élément central de la fonction du SNC, e.g. la mémoire, l'esprit cognitif, la spécificité comportementale. Leur capacité à transmettre efficacement l'influx nerveux repose en partie sur la présence de la gaine de myéline autour de l'axone. Cette gaine de myéline est produite par les oligodendrocytes qui participent ainsi à l'agencement architectural des neurones au sein du SNC (Baumann *et al.*, 2001). Les astrocytes sont les cellules les plus représentées au niveau du SNC. Ils participent au maintien de l'homéostasie du SNC par la libération de facteurs neurotrophiques nécessaires à la survie des neurones (Piet *et al.*, 2004). Ils participent également à la formation de la BHE, en conjonction avec les cellules épithéliales (Abbott *et al.*, 2006). Finalement, les microglies sont les homologues des macrophages au sein du SNC (Brodal, 2010). Elles participent principalement à la réponse immunitaire grâce à leur capacité à phagocytter et à libérer différentes cytokines impliquées dans l'inflammation. Elles sont responsables de plusieurs maladies neurodégénératives du SNC, notamment par leur capacité à libérer du TNF-alpha, suite à leur stimulation par l'INF- γ , à participer à la génération de dommages neuronaux (Meda *et al.*, 1995) et favoriser la destruction de la gaine de myéline (Sriram *et Rodriguez*, 1997).

L'utilisation de modèles cellulaires établis afin d'étudier les différentes composantes du SNC est essentielle et leur réplication continue *in vitro* est une caractéristique principale de ceux-ci. Or, les neurones chez un être vivant sont des cellules différenciées post-mitotiquement, i.e. que leur cycle mitotique est arrêté et qu'elles ne peuvent plus se diviser (Herrup *et Yang*, 2007). Cette caractéristique constitue ici un obstacle à leur utilisation pratique *in vitro* puisque les neurones primaires issus du SNC, humain ou murin, ne peuvent

se maintenir longtemps en culture, contrairement à la grande majorité de types cellulaires, et complexifie grandement leur étude. L'utilisation de neuroblastome *in vitro* est un modèle permet de contourner cette contrainte de culture, mais implique nécessairement que le neurone ne possède plus une caractéristique majeure de sa spécificité, son stade de différentiation post-mitotique. Ainsi, l'utilisation de neuroblastome conjuguée à un processus de différentiation neuronale permet de réconcilier ces deux aspects (Shastry *et al.*, 2001). Les neuroblastomes LA-N-5, SK-N-SH et SH-SY5 apparaissent alors comme des modèles propices à l'étude du neurones humain *in vitro*, considérant que leur différentiation permet non seulement d'obtenir des neurones au processus mitotique arrêté, mais qui exprime également plusieurs marqueurs typiquement neuronaux, tels que les différents neurotransmetteurs (e.g. dopamine, sérotonine) et leurs récepteurs associés et des protéines du cytosquelettes menant à leur structure caractéristique (e.g. Map1 β , NFM, Vimentin) (Biedler *et al.*, 1978; Hill *et Robertson*, 1997, 1998; Lee *et al.*, 1997). Un autre modèle neuronal *in vitro* peut être obtenu suite à une différentiation fastidieuse d'un tératocarcinome testiculaire qui possède des caractéristiques pluripotentes. Ce modèle donne lieu, après plusieurs semaines de culture, à un modèle neuronal complètement différencié post-mitotiquement qui exprime également la majeure partie des marqueurs, à la différence qu'il possède un cytosquelette et une architecture neuronal beaucoup plus développé (Pleasure *et Lee*, 1993). Ainsi, il existe divers modèles neuronaux *in vitro* au processus de différentiation à complexité variable. Cependant, considérant qu'il existe également plusieurs types neuronaux au sein du SNC (e.g. neurones dopaminergique, GABAergique) aucun ne peut se targuer de représenter un modèle central ou général. Conséquemment, leur utilisation individuelle implique de considérer les limites de ceux-ci lors de l'interprétation de résultats obtenus.

2.3.2 Neuroinvasion

Le SNC n'est pas un organe accessible à l'infection directement à partir de l'environnement. Ainsi, les virus pouvant infecter le SNC doivent utiliser différentes voies d'entrées afin de se rendre au SNC. La capacité de se rendre au SNC à partir de la périphérie est nommée neuroinvasion. Tel que décrit précédemment, les Coronavirus sont des virus respiratoires, et doivent par conséquent utiliser différentes stratégies afin de migrer jusqu'au SNC. La principale voie utilisée par les Coronavirus afin de migrer au sein du SNC est via le

nerf olfactif. Les Coronavirus respiratoires, tels que MHV-JHM ou HCoV-OC43, infectent premièrement les voies respiratoires pour ensuite se diriger vers le SNC en empruntant le nerf olfactif (Jacomy *et al.*, 2003; Perlman *et al.*, 1990). En effet, il a été démontré que le sectionnement du nerf olfactif permet de prévenir la migration viral au bulbe olfactif et sa neuroinvasion (Perlman *et al.*, 1990). De plus, la capacité de MHV-JHM (Marten *et al.*, 2001) et HCoV-OC43 (Bonavia *et al.*, 1997) à infecter les cellules neurales vient appuyer la théorie de neuroinvasion via l'infection et le transport viral au sein du nerf olfactif. Les différents tropismes observés lors d'infection par les Coronavirus suggèrent que ces virus peuvent utiliser d'autres voies pour la neuroinvasion. Par exemple, HCoV-229E et HCoV-OC43 possèdent la capacité d'infecter les monocytes et les macrophages périphériques (Collins, 2002) et HCoV-229E permet également d'activer ceux-ci (Desforges *et al.*, 2007). Les monocytes ainsi activés peuvent migrer au sein du SNC en traversant la BHE et ce faisant participer à la réponse immunitaire. Ainsi, HCoV-229E et HCoV-OC43 peuvent utiliser les monocytes comme vecteurs afin de mener à leur neuroinvasion. Bien que les mécanismes de neuroinvasion aient particulièrement été étudiés chez MHV et HCoV-OC43 à l'aide de modèle murin, plusieurs données permettent de spéculer que les Coronavirus humains posséderaient les mêmes capacités neuroinvasives chez l'homme. En effet, de l'ARN viral des Coronavirus humains OC43 et 229E a pu être détecté au sein de cerveau de patient post-mortem, établissant ainsi leurs capacités neuroinvasives chez l'homme (Arbour *et al.*, 2000). Plus récemment, la capacité neuroinvasive du SARS-CoV a également été identifiée chez l'humain alors que des anticorps dirigés contre celui-ci ont pu être détecté dans le LCR de patients infectés (Hung *et al.*, 2003), de même que le virus a pu être détecté par RT-PCR (Lau *et al.*, 2004). Ces résultats ont également été corroborés dans le modèle murin surexprimant le récepteur hACE2, où le virus peut être détecté dans plusieurs régions du SNC (McCray *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2007). Le mode d'entrée de ces virus au SNC chez l'humain demeure cependant inconnu. De plus, des anticorps dirigés contre des épitopes de HCoV-OC43 et de HCoV-229 ont été retrouvés dans le LCR de patients atteints de la maladie de Parkinson (Fazzini *et al.*, 1992). Considérant que les anticorps ne peuvent franchir la BHE, cela démontre que les particules virales ont été rencontrées au sein du SNC.

Globalement, les coronavirus MHV et HCoV-OC43 peuvent envahir le SNC de la souris, via le transport au sein des axones du nerf olfactif, vers le bulbe olfactif. Ils pourraient

également utiliser les cellules monocytaires comme vecteur pour l'accès au SNC. On peut également détecter la présence de HCoV-OC43 dans le SNC chez l'homme. Ainsi, HCoV-OC43 est un virus neuroinvasif chez l'homme et il est adéquat de spéculer qu'il pourrait utiliser des mécanismes de neuroinvasion similaires à ceux observés chez la souris.

2.3.3 Neurotropisme

Lorsqu'un virus atteint le SNC, il lui est nécessaire de pouvoir infecter des cellules afin de se répliquer et ce, au sein de cellules permissives afin compléter son cycle réplicatif. La capacité d'un virus à infecter des cellules du SNC se nomme le neurotropisme. À l'instar d'autres virus, il a été démontré que les Coronavirus peuvent infecter différents types de cellules neurales (ensemble des différents types de cellules présentes au système nerveux), avec une spécificité propre à chaque espèce. Bien que le récepteur spécifique utilisé par les Coronavirus n'ait pas été identifié pour chaque type cellulaire, il appert évident que la protéine S est un déterminant majeur dans la capacité du virus à infecter une cellule et par conséquent une cellule neurale spécifique. Tel que décrit précédemment, il a été démontré que MHV-A59 peut infecter les neurones et les microglies du SNC murin, alors que la souche MHV-JHM est à même de pouvoir infecter les astrocytes, les microglies, les neurones et les oligodendrocytes murins (Marten *et al.*, 2001). Les Coronavirus humains démontrent également la capacité à infecter différentes cellules neurales. La souche HCoV-229E peut infecter des lignées humaines représentatives du SNC (Arbour *et al.*, 1999b; Talbot *et al.*, 1993). L'infection des lignées neuronales SK-N-SH, neurogliomales H4, astrocytaires U-87MG et U-373MG et oligodendrocytaires MO3.13 peut mener à la production d'antigènes vitaux suite à l'infection par ce Coronavirus. Le SARS-CoV possède également la capacité à infecter les cellules du SNC, plus précisément les neurones (Netland *et al.*, 2008). De plus, la souche HCoV-OC43 est également capable d'infecter différents types cellulaires neuraux murins ou humains, *in vivo* ou *in vitro* (Arbour *et al.*, 1999a). Des astrocytes, oligodendrocytes et microglies d'origine humaine en cultures primaires peuvent être infectés *in vitro* et mener à la production de particules virales infectieuses (Bonavia *et al.*, 1997). Cependant, l'infection de cultures primaires mixtes de cellules neurales murines indiquent que les neurones sont la cible primaire de l'infection par HCoV-OC43 et qu'il n'infecte les astrocytes seulement lorsque les neurones sont tous morts (Jacomy *et al.*, 2006). Il est également établi que dans le modèle murin, HCoV-OC43 cible les neurones lors de

l'infection au SNC (Jacomy *et al.*, 2003). Tel que démontré pour HCoV-22E, HCoV-OC43 peut infecter et se répliquer au sein de lignées neurales humaines établies représentatives du SNC (Arbour *et al.*, 1999a). HCoV-OC43 est ainsi capable d'infecter la lignée neuronale SK-N-SH, les lignées astrocytaires U-87, U-373MG et GL-15, la lignée neurogliomale H4 ainsi que des lignées oligodendrocytaires. De plus, tel que démontré dans l'article #1 de cette thèse, HCoV-OC43 peut également infecter les lignées cellulaires établies humaines différenciées en neurones, N-Tera-2 et LA-N-5, et l'infection est productive alors qu'elle mène à la production de particules infectieuses (Favreau *et al.*, 2009). HCoV-OC43 est également capable d'établir des infections persistantes au sein des différentes lignées neurales mentionnées précédemment (Arbour *et al.*, 1999a). De plus, la détection d'ARN viral de HCoV-OC43 au sein de cerveaux humains post-mortem suggère que la souche pourrait y établir des infections persistantes *in vivo* chez l'homme (Arbour *et al.*, 2000).

Globalement, les Coronavirus peuvent infecter différents types cellulaires présents au niveau du SNC, autant *in vivo* chez la souris que *in vitro* chez l'humain. De plus, ils peuvent y établir des infections persistantes, où la présence de virus infectieux ou d'ARN viral peut être détecté. Considérant que les souches MHV neurovirulentes peuvent migrer au SNC, infecter des cellules neurales et y établir une infection persistante chez la souris et que HCoV-OC43 peut en faire de même, nous pouvons spéculer que HCoV-OC43 est un agent étiologique probable de maladie neurodégénératives chez l'homme. Une revue démontrant la capacité des Coronavirus à induire des maladies neurodégénératives chez la souris, et potentiellement chez l'homme, sera donc subséquemment abordée.

2.3.4 Neurovirulence

Les capacités des Coronavirus à migrer vers le SNC de la souris ou de l'homme et de pouvoir infecter les cellules du SNC laissent présumer également la possibilité qu'ils puissent y induire une neuropathologie, *per se* la neurovirulence. Il a été démontré que plusieurs Coronavirus possèdent des propriétés neurovirulentes, particulièrement chez la souris; modèle animal principalement utilisé lors de cette démonstration. Chez l'homme, il est plus complexe de démontrer les propriétés neurovirulentes des Coronavirus. Cependant, plusieurs hypothèses visant à établir si de telles propriétés neurovirulentes des Coronavirus pourraient exister chez l'homme peuvent être appuyées, soit par homologie entre des souches

Coronavirales phylogénétiquement rapprochées, (e.g. MHV et HCoV-OC43), soit par transposition des résultats obtenus en souris, (e.g. la neurovirulence de HCoV-OC43 en modèle murin), ou soit par des corrélations contextuelles pertinentes (e.g. prépondérance de Coronavirus au SNC de personnes atteintes de différentes maladies neurodégénératives).

Le membre du genre *Betacoronavirus* le plus étudié pour ses propriétés neuroinvasives est MHV, qui contient plusieurs souches, dont les principales étudiées sont MHV-JHM et MHV-A59 (Bender *et al.*, 2010). Ces souches possèdent toutes deux la capacité à induire une maladie neurodégénérative chez la souris mais diffèrent par leur différent niveau de neurovirulence. MHV-JHM, la souche la plus neurovirulente, cause une encéphalite qui est létale dans près de 100% des cas chez la souris (Navas-Martin *et al.*, 2005). Lors de l'infection au SNC, la souche MHV-JHM infecte principalement les neurones et les cellules gliales menant à la mort cellulaire de ces derniers, caractéristique d'une encéphalite mortelle (Dalziel *et al.*, 1986; Yount *et al.*, 2003). Parallèlement à l'induction d'une encéphalite, les titres viraux augmentent, tant au niveau du cerveau que de la moelle épinière, alors que le virus est à même de s'y disséminer (Weiss *et al.*, 2008). En contre-partie, la souche MHV-A59 induit une maladie démyélinisante chez la souris, subséquemment à l'induction d'une encéphalite. À l'instar de MHV-JHM, MHV-A59 infecte principalement les neurones et les cellules gliales, cependant la dissémination virale au SNC est limitée conséquemment à l'élimination du virus par le système immunitaire aux environs de 14 jours post-infection (Williamson *et al.*, 1991). L'élimination du virus, conjointement aux dommages neuronaux limités au SNC donne lieu à une mortalité modérée chez les sujets infectés, mais l'ARN viral persiste tout au long de leur vie (Lavi *et al.*, 1984a). Cette persistance de l'ARN viral induit une activation chronique des cellules T qui mène subséquemment à l'induction d'une maladie démyélinisante, principalement médiée par le système immunitaire (Lavi *et al.*, 1984a; Lavi *et al.*, 1984b). Cette perte de myéline cause une faiblesse des membres inférieurs et mène ultimement à une paralysie complète du sujet (Lavi *et al.*, 1984b). Il n'est pas encore établi si les mécanismes de démyélinisation sont directement liés à l'infection virale ou s'ils découlent exclusivement de la réponse immunitaire causée par l'infection. La théorie du mécanisme « inside-out » considère que la mort neuronale occasionnée suite à l'infection précéderait la perte de myéline, qui n'est plus en mesure de protéger un axone dégénéré (Tsunoda *et al.*, 2002; Tsunoda *et al.*, 2007). À l'opposé, le

mécanisme « outside-in » attribue la perte de myéline comme étant une conséquence de la destruction des oligodendrocytes, alors que la dégénérescence axonale y est subséquente. Un des phénomènes expliquant la perte de la myéline via l'action du système immunitaire est la génération de lymphocytes T auto-réactifs (Holz *et al.*, 2000). Lors de la mort des oligodendrocytes, des peptides libérés à partir des protéines composant la myéline, dont la *myelin basic protein* (MBP) ou la *proteolipid protein* (PLP), sont reconnus par des lymphocytes T activés auto-réactifs qui participeraient alors dans l'accentuation de la mort oligodendrocytaire (Zhou *et Hemmer*, 2004). Cette maladie démyélinisante, induite chez la souris, est homologue à la sclérose en plaques, qui est une maladie neurodégénérative chez l'homme (Lavi, 2005). Ceci en fait par conséquent un modèle pertinent afin d'étudier l'étiologie virale potentielle d'une maladie neurodégénérative chez l'homme.

Il importe par contre de noter que MHV-A59 ne possède pas la capacité d'infecter l'homme, ou à tout le moins d'y induire une maladie neurodégénérative telle que décrite précédemment. Toutefois, l'homologue humain de MHV-A59, HCoV-OC43 (St-Jean *et al.*, 2006b), est un virus pouvant infecter l'humain, qui possède lui aussi des propriétés neurovirulentes chez des modèles murins (Jacomy *et Talbot*, 2003). On peut émettre l'hypothèse que les phénomènes neurodégénératifs observés chez la souris suite à l'infection par HCoV-OC43 pourraient également avoir lieu chez l'humain (Talbot *et al.*, 1996). HCoV-OC43 infecte principalement les neurones au niveau du SNC murin, causant une encéphalite vacuolisante aiguë, alors que le virus se dissémine au cerveau et à la moelle épinière (Jacomy *et al.*, 2006; Jacomy *et Talbot*, 2003). La mort neuronale induite directement par HCoV-OC43 chez la souris contribuerait à la neuropathologie observée suite à l'infection (Anderson, 2001). Il est à noter que l'activation des cellules adjacentes des neurones (e.g. astrocytes, microglies) pourraient également contribuer à la neurodégénération suite à la libération de facteurs pro-inflammatoires ou neurotoxiques (e.g. TNF- α) (Edwards *et al.*, 2000). De plus, l'ARN viral persistant au SNC, on peut également constater une perte neuronale plusieurs mois suite à l'infection, alors que du virus infectieux ou des antigènes viraux sont indétectables (Jacomy *et Talbot*, 2003). À l'instar de MHV-A59, une contribution du système immunitaire pourrait expliquer les dommages neuronaux alors qu'une infiltration lymphocytaire, une activation des microglies et des astrocytes ainsi qu'une libération de cytokines (e.g. TNF- α) sont concomitantes à l'apparition des symptômes neurodégénératifs.

(Jacomy *et al.*, 2010; Jacomy *et Talbot*, 2003). Alors que HCoV-OC43 induit une encéphalite vacuolisante du SNC murin, il diffère conséquemment de son homologue murin MHV-A59 qui cause de plus une maladie démyélinisante. Or, des variants de HCoV-OC43 possédant des mutations dans la protéine S ont été isolés suite à une infection persistante et possèdent la capacité de cause une maladie démyélinisante chez la souris (Jacomy *et al.*, 2010; St-Jean *et al.*, 2006b). Ces variants de HCoV-OC43, menant à une neurovirulence accrue, mènent à une neuroinflammation plus importante, notamment via une augmentation de l'infiltration des lymphocytes T (Jacomy *et al.*, 2010). Il est possible que cette infiltration lymphocytaire accrue soit responsable des dommages axonaux et de ceux faits à la myéline, alors qu'il a été démontré que l'infection par HCoV-OC43 peut générer des lymphocytes auto-réactifs chez la souris (Boucher *et al.*, 2007). Par conséquent, ces variants issus d'une infection persistante, mènent globalement à une neuropathologie caractéristique de la sclérose en plaques chez l'homme. De plus, considérant que HCoV-OC43 est à même de persister au SNC chez l'homme, il est envisageable que de telles mutations, modifiant la neurovirulence, puissent apparaître chez un individu infecté. Finalement, il existe également une corrélation entre l'induction des épisodes de démyélinisation chez l'homme et des infections virales au niveau des voies respiratoire, appuyant ici aussi un possible rôle de HCoV-OC43 dans cette neuropathologie. Il appert ainsi que HCoV-OC43 est un agent étiologique potentiel de maladie neurodégénérative chez l'homme, particulièrement la sclérose en plaques (Talbot, 1997).

2.4 Persistance et adaptation virale

Tout comme l'ensemble des êtres vivants, les virus possèdent la capacité d'évoluer et de s'adapter dans le temps et l'espace. Plusieurs mécanismes agissent de façon concomitante dans ce processus et donne lieu à l'apparition de nouvelles espèces ou à l'adaptation de celles-ci dans un contexte environnemental donné. L'évolution et/ou l'adaptation sont des phénomènes continuels au sein des espèces et l'émergence de leurs résistantes peut être contrainte à l'avantage ou au désavantage qu'ils procurent. Alors, l'apparition de modifications au sein des génomes d'une espèce est constamment présente et celles-ci deviennent individuellement de plus en plus, ou de moins en moins, présentes selon que l'organisme se multiplie avantageusement comparativement à ses semblables. Ces notions

sont à la base de la théorie d'évolution des espèces (Darwin, 1859; King *et* Jukes, 1969) qui expliquent la diversité biologique actuelle. Pour les virus, ces principes sont intrinsèquement liés aux contraintes et à la dynamique de la co-évolution avec son hôte (Agrawal, 2001; Woolhouse *et al.*, 2002). Ces contraintes s'expriment par le coût qu'engendre l'adaptation pour le virus à son hôte et par le coût de la résistance qui incombe à l'hôte face au virus (Boots *et* Sasaki, 1999). La persistance virale est une forme de résultante de ces contraintes, où l'hôte et le parasite survivent longtemps l'un en présence de l'autre. Cette résultante de co-évolution hôtes/virus est même constatée empiriquement depuis longtemps, alors que les infections persistantes en culture peuvent mener à l'apparition de virus atténusés (de la Torre *et al.*, 1988; Holland *et al.*, 1976). Il est important alors de comprendre les mécanismes biochimiques qui régissent la capacité du virus à s'adapter à son hôte.

Afin de s'adapter, les Coronavirus utilisent deux mécanismes principaux, la mutation et la recombinaison. Étant des virus à ARN, les Coronavirus utilisent des RdRp qui reproduisent le génome viral en y introduisant des erreurs à un taux de 10^{-3} à 10^{-4} (Sanchez *et al.*, 1992). Ces erreurs de réPLICATION de l'ARN génomique donnent lieu à l'apparition de mutations au sein du génome qui sont alors présentes dans la nouvelle progéniture virale. L'accumulation de ces mutations peuvent permettre au virus d'acquérir un avantage compétitif, par exemple en augmentant leur taux de réPLICATION, en modifiant des épitopes reconnus par le système immunitaire, en leur permettant d'infecter plus efficacement leurs cellules hôtes ou même de nouveaux types cellulaires. Ainsi, on peut assister alors à la génération de quasi-espèces (Adami *et al.*, 1995). Chez les Coronavirus, les mutations introduites dans la protéine S, impliquée dans le tropisme et la neurovirulence, sont particulièrement responsable justement des modifications de tropisme (Schickli *et al.*, 1997) et de neurovirulence (Ontiveros *et al.*, 2003). Par exemple, tel que mentionné précédemment, des mutations introduites dans la protéine S de MHV-A59 peuvent modifier la capacité de celui-ci à infecter le foie (Navas-Martin *et al.*, 2005) alors que des mutations dans la protéine S de MHV-JHM peuvent réduire la reconnaissance de son récepteur cellulaire CEACAM1 (Krueger *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que des mutations, acquises dans la protéine S de HCoV-OC43 en infection persistante de cellules neurales humaines, peuvent modifier la neurovirulence en souris (Jacomy *et al.*, 2010). Il a aussi été établi que les quasi-espèces émergentes d'une infection persistante de cellules neurales par HCoV-OC43 possèdent un

tropisme élargi, où l'astrocyte devient aussi une cible principale du virus au même titre que le neurone (St-Jean, 2006). Le mécanisme de recombinaison peut quant à lui mener aussi à des modifications de tropismes et/ou de neurovirulence. Lorsque deux espèces phylogénétiquement rapprochées infectent simultanément une cellule, les particules virales produites peuvent intégrer certains pans du génome de l'autre espèce virale présente. Le mécanisme de recombinaison serait à l'origine de l'apparition rapide de nouvelles espèces, notamment SARS-CoV (Rest *et al.*, 2003; Stanhope *et al.*, 2004; Stavrinides *et al.*, 2004). Ces mécanismes de mutation et de recombinaison menant aux phénomènes de changement de tropisme et/ou de neurovirulence seraient également à l'origine du franchissement de barrière d'espèce de différentes souches coronavirales, dont HCoV-OC43 (Vijgen *et al.*, 2005) et SARS-CoV (Kan *et al.*, 2005).

L'adaptation virale via les mécanismes de mutations et de recombinaison permettrait également au Coronavirus de persister chez leur hôte. Bien qu'aucun mécanisme de persistance spécifique n'ait été déterminé chez les Coronavirus, contrairement par exemple au virus de l'herpès simplex, leur capacité à muter rapidement pourrait permettre en partie d'échapper au système immunitaire de l'hôte et participer à l'établissement d'infection persistante. Il est à noter cependant que certaines infections coronavirales (e.g. HCoV-OC43) peuvent devenir persistante en maintenant un faible niveau de production d'ARN intracellulaire et où peu ou pas de virus ou d'antigènes viraux ne sont produits (Jacomy *et al.*, 2003).

Donc, considérant que les Coronavirus humains peuvent migrer au cerveau et y infecter différents types de cellules neurales, l'adaptation virale via les mutations ou les recombinaisons sont des mécanismes importants puisqu'ils peuvent influencer la persistance du virus au SNC et la neuropathologie subséquente à l'infection.

2.5 Réponse immunitaire à l'infection virale

Lors d'une infection virale, le système immunitaire est sollicité afin de l'éliminer. Bien que la réponse immunitaire globale chez l'homme soit bien caractérisée, chaque virus active différentes branches du système immunitaire inné et adaptatif et infecte différents types cellulaires dans certains organes spécifiques. La réponse immunitaire associée à l'infection par les Coronavirus est particulièrement caractérisée pour l'infection par MHV chez la souris. Ainsi, ces principaux aspects seront spécifiquement abordés.

La première réponse immunitaire présente lors d'une infection virale est la réponse innée induite par la cellule infectée. La cellule produit différentes molécules pro-inflammatoires, dont les principales sont l'interféron (IFN) – α et – β . Leurs effets autocrines et paracrines permettent à la cellule et celles avoisinantes d'induire un état antiviral, notamment en réduisant leur traduction protéique, entre autres via la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2-alpha (Garcia *et al.*, 2006). Subséquemment, les IFNs augmentent l'expression du CMH de classe I des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques, microglies au SNC) et des cellules NK qui débutent alors la réponse immunitaire adaptative à l'infection virale (Marcenaro *et al.*, 2011; Sun *et Lanier*, 2011). Les cellules dendritiques, les macrophages et les microglies sont responsables de la libération de cytokines chimio-attractantes ou chimiokines (e.g. comme par exemple CCL2 et CCL5) et de la présentation antigénique aux lymphocytes infiltrants. Les cellules NK infiltrantes sont également activées et peuvent dès lors cibler les cellules infectées et induire leur mort cellulaire afin de limiter la réPLICATION et la dissémination du virus. Les lymphocytes primordiaux lors d'une infection virale sont les lymphocytes cytotoxiques CD8+ (TCD8+) qui reconnaissent les cellules infectées et induisent leur lyse afin limiter la prolifération du virus. Les lymphocytes CD4+ (TCD4+), impliqués dans l'activation des cellules B et de la réponse humorale, sont également importants quant à leur capacité à sécréter eux aussi de l'IFN- γ (Yang *et al.*, 1999). Lors de l'infection par MHV il a été démontré que la libération d'IFN- γ est principalement responsable de la limitation de la réPLICATION virale, notamment en induisant un état antiviral chez les cellules (Houtman *et Fleming*, 1996). En plus de la présence d'IFN- γ , l'activation des TCD4+ va permettre l'activation des cellules B qui, suite à leur différenciation plasmocytaire, seront responsables

de la synthèses d'anticorps. La libération d'anticorps dans le milieu extracellulaire peut permettre la neutralisation des particules virales qui sont dès lors incapables d'infecter de nouvelles cellules. Cependant, l'infection de souris déficientes en lymphocytes B ne montrent pas de différence dans la dissémination ou l'élimination du virus (Ramakrishna *et al.*, 2002). Bien que les anticorps peuvent jouer un rôle dans l'élimination de d'autres virus, c'est la réponse à médiation cellulaire, impliquant primordialement la sécrétion d'IFN- γ par les TCD8+, qui permet l'élimination des particules virales de MHV. L'importance des anticorps circulants serait plutôt afin d'accélérer une deuxième réponse immunitaire lors d'une réinfection (Marten *et al.*, 2001) et empêcher une réactivation du virus lors d'une infection persistante (Lin *et al.*, 1999).

2.6 Maladies neurodégénératives à étiologie virale

Plusieurs maladies neurodégénératives chez l'homme ou la souris peuvent être viro-induites. Les Coronavirus en fournissent un exemple probant. Tout comme certains modèles d'infections virales du SNC murin peuvent permettre d'inférer des processus neurodégénératifs chez l'homme, l'étude d'autres virus possédant des propriétés neurovirulentes peut nous permettre de mieux saisir la diversité et la complexité des processus neurodégénératifs viro-induits. Ici sont présentés trois exemples différents de virus induisant différentes maladies neurodégénératives selon des mécanismes divers.

Un des virus particulièrement utilisé afin d'étudier une maladie démyélinisante viro-induite est le virus de l'encéphalite murine de Theiler (TMEV). Virus de la famille des Picornaviridae (Pevear *et al.*, 1987), la souche possédant une faible neurovirulence est connue pour infecter les neurones de la substance grise du SNC en infection aiguë, puis établit subséquemment une infection persistante à l'intérieur des astrocytes (Blakemore *et al.*, 1988), des oligodendrocytes (Rodriguez *et al.*, 1983) et principalement des macrophages (Lipton *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 1997). L'infiltration continue des macrophages au SNC, leur infection par le TMEV et la libération de facteurs neurotoxiques, tel que le TNF- α , représenteraient différents éléments menant à la destruction des oligodendrocytes et conséquemment à la démyélinisation observée (Lipton *et al.*, 1995). L'apparition d'une auto-immunité dirigée contre des épitopes de la myéline est en partie responsable de la

demyélinisation observée. Toutefois ce processus serait subséquent aux dommages créés au niveau des oligodendrocytes (Katz-Levy *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 1997).

Le virus de la rougeole, de la famille des Paramyxoviridae (Rima *et Duprex*, 2006), infecte les voies respiratoires puis les cellules mono- et lymphocytaires (Esolen *et al.*, 1993; Osunkoya *et al.*, 1990). Le virus peut migrer au SNC suite au passage de la BHE de ces cellules infectées ou par transport antérograde via le nerf olfactif (Allen *et al.*, 1996; Rudd *et al.*, 2006). Le virus est alors à même d'infecter de façon persistante les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes (Allen *et al.*, 1996; Schneider-Schaulies *et al.*, 1992). L'immunosuppression, induite par le virus, diminue la capacité à contrôler l'infection et peut mener à l'induction d'une pan-encéphalite aiguë subsclérosante.

Le JCV, de la famille des Polyomaviridae (Padgett *et al.*, 1971), est un virus ubiquitaire chez l'homme, où près de 80% de la population est infectée (Knowles *et Sasnauskas*, 2003; Padgett *et Walker*, 1973). Il peut être détecté chez des sujets sains alors que chez certains individus, il peut induire une leucoencéphalopathie multifocale progressive (PML), particulièrement chez les personnes immunosupprimés (Shishido-Hara, 2010). Chez les sujets présentant une PML, l'infection au sein des cellules neurales, et particulièrement les oligodendrocytes, mène à la destruction continue de la gaine de myéline et au décès rapide (Berger, 2007; Berger *et al.*, 1998). Le fait que le virus soit hautement présent dans l'environnement (Bofill-Mas *et Girones*, 2001), que la majorité de la population soit infectée, mais que peu de gens développent la PML, est un exemple flagrant d'une maladie neurodégénérative à étiologie multifactorielle. Les raisons pour lesquelles certains individus développent la PML sont diverses. L'immunosuppression, telle que chez les sidéens, mènerait à une perte du contrôle de la réPLICATION du JCV menant alors à l'induction de la PML (Gray *et al.*, 2003). La maladie est également observée chez des patients atteints d'autres maladies et prenant des médicaments immuno-modulateurs, tel que lors de traitement chimiothérapeutique (Kharfan-Dabaja *et al.*, 2007). Lors d'étude clinique sur des patients souffrant de sclérose en plaques ou de la maladie de Crohn et traités au Natalizumab, un anticorps monoclonal inhibant l'infiltration lymphocytaire au SNC, plusieurs cas de PML causée par le JCV ont été déclarés (Kleinschmidt-DeMasters *et Tyler*, 2005; Langer-Gould *et al.*, 2005; Van Assche *et al.*, 2005). Alors que certaines maladies démyélinisantes semblent être causées par une dimension immunitaire, et quelques fois auto-immunitaire, la PML est

plutôt induite lorsque certaines branches du système immunitaire sont absentes et serait donc une maladie uniquement viro-induite.

Ces exemples de maladies neurodégénératives viro-induites représentent en soi une démonstration de la diversité et de la complexité de l'interaction entre des virus, le SNC humain et le système immunitaire. Bien que l'aspect systémique de ces maladies soit important, elles sont subséquentes aux conséquences de la cible de l'infection par un virus, la cellule. Ainsi, il appert pertinent et primordial de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués ou modulés lors d'une infection virale, particulièrement lorsque ces mécanismes sont à la base de l'ensemble de la réponse antivirale systémique, et parfois pathologique, chez le sujet infecté.

3.0 La réponse cellulaire aux infections virales

3.1 Généralités

La réponse cellulaire aux infections virales est aussi diverse qu'il existe différents types cellulaires et différents virus. Cependant, plusieurs mêmes mécanismes de réponse à l'infection virale peuvent être observés dans une pléthore de types de cellule, dont la réponse immunitaire innée, la mort cellulaire programmée et la *Unfolded Protein Response*. Par exemple, lors d'une infection les cellules peuvent identifier la présence d'un virus par le biais de la détection des protéines virales ou d'ARN bicaténaire, qui est une étape intermédiaire dans la réPLICATION de plusieurs virus (Jacobs *et al.*, 1996). Les *Toll-like receptor* (TLR) sont les protéines cellulaires, hautement conservées dans l'évolution, qui sont responsables de cette détection (Finberg *et al.*, 2004). Ceux-ci induisent subséquemment l'activation de la réponse immunitaire innée où la cellule produit plusieurs molécules pro-inflammatoires (e.g. TNF- α , INF- β , IL-6) qui vont participer à activer les débuts de la réponse immunitaire systémique, mais surtout un état antiviral de la cellule infectée (Akira *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2003). Bien que la majorité des types cellulaires puissent activer ces voies de réponses antivirales, plusieurs virus ont évolué afin d'inhiber partiellement ou complètement certaines voies de l'immunité innée (Goodbourn *et al.*, 2000).

En plus d'activer la réponse immunitaire innée, l'infection virale peut induire un stress cellulaire dans une organelle particulière (e.g. RE, mitochondrie) ou dans la totalité de

la cellule ce qui mène parfois à la mort cellulaire. La description de ces stress est un élément central de cette thèse et sera abordée subséquemment.

3.2 Réponse au stress du réticulum endoplasmique

La production de protéines est essentielle au maintien des fonctions cellulaires et ultimement à la survie de la cellule. De plus, les protéines comptent pour près de 75% du poids sec d'une cellule, ce qui en fait le constituant majeur de la cellule après l'eau (Lodish *et al.*, 2005). Les divers mécanismes menant à leur formation finale sont par conséquent hautement régulés et impliquent la participation de plusieurs organelles de la cellule. Ainsi, un dysfonctionnement de ce métabolisme est particulièrement délétère pour la cellule et conséquemment plusieurs maladies neurodégénératives ont pour origine une altération d'un mécanisme cellulaire lié à la production de protéine, dont notamment la maladie d'Alzheimer (Imaizumi *et al.*, 2001) et la maladie de Parkinson (Imai *et al.*, 2000). Différents virus peuvent également altérer ou détourner les fonctions de productions de protéines cellulaires à leur escient (Liberman *et al.*, 1999; Tardif *et al.*, 2004). Considérant les Coronavirus humains comme étant des agents étiologiques probables de maladies neurodégénératives, il apparaît important dès lors d'étudier les mécanismes de réponse cellulaire au stress de production des protéines, particulièrement la *Unfolded Protein Response*, qui sont activés chez la cellule suite à l'infection par HCoV-OC43 dans un modèle neuronal.

3.2.1 Généralités

Plusieurs stress cellulaires peuvent interférer avec les processus de synthèse ou de conformation protéique chez la cellule, dont un débordement des flux de Ca²⁺, une altération des statuts d'oxydo-réduction des protéines de la cellule, l'accumulation et/ou l'aggrégation de protéines au sein du RE et l'infection virale (Kaufman, 1999). Une des voies principales activées lors de ces stress est la *Unfolded Protein Response* (UPR), qui a pour objectif le rétablissement de l'homéostasie du réticulum endoplasmique (RE), organelle centrale à la production des protéines. Bien que la UPR soit premièrement activée afin d'éliminer le stress au RE, si celui-ci ne peut être résorbé, la UPR participe alors à l'induction de la mort cellulaire (Ron *et al.*, 2007). Il importe donc de définir la UPR comme comportant une dualité dans son rôle, soit la survie de la cellule et l'induction des mécanismes initiaux d'une mort cellulaire (Todd *et al.*, 2008). Depuis près d'une décennie, la

UPR est de plus en plus étudiée dans un contexte d'infection virale, alors que celle-ci est un stress majeur pour une cellule, notamment par l'affluence de protéines virales au RE. De plus, la UPR est également activée chez la cellule dans différents contextes de maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer où l'accumulation de β -amyloïde au sein du RE de la cellule est un facteur majeur du débalancement de l'homéostasie du RE (Katayama *et al.*, 2004). L'ensemble des mécanismes de la UPR ainsi que les inducteurs de stress qui y sont reliés (infections virales et maladies neurodégénératives) seront donc subséquemment abordés plus amplement.

Cependant, en prélude à l'élaboration des mécanismes moléculaires impliqués dans les différents stress cellulaires liés à la production des protéines, il convient de rappeler les différentes étapes menant à leur synthèse. Suite à son exportation du noyau vers le cytoplasme, un ARNm spécifique d'une protéine est reconnu, via sa coiffe méthylée, par le complexe de pré-initiation ribosomal 40S. Celui-ci qui entame alors la traduction démarrant au codon de départ AUG, suite à l'arrivée du premier ARNt-méthionine. Le facteur d'initiation eIF2-alpha, faisant partie du complexe 40S, est un élément régulateur important de l'initiation de la traduction, alors que sa phosphorylation par différentes kinases cellulaires (e.g. PERK, PKR, HRI) amène une inhibition de la synthèse protéique chez la cellule (De Benedetti *et Baglioni*, 1983). Suite à la formation du complexe de pré-initiation 40S, à la reconnaissance du codon de départ et à l'arrivée du premier ARNt-méthionine, le complexe d'initiation est formé suite à l'arrivée du complexe ribosomal 60S. Dès lors, l'élongation de la protéine s'en suit jusqu'à la reconnaissance d'un codon de terminaison (UAG, UAA, UGA). Suite à l'élongation, ou simultanément à celle-ci, la protéine est transloquée au sein du réticulum endoplasmique (RE) où différentes protéines chaperonnes (e.g. GRP78, GRP94, PDI) participeront au repliement de la protéine dans sa forme native et fonctionnelle. La protéine repliée migre alors au sein d'une vésicule vers l'appareil de Golgi où elle acquiert différentes modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation, la formation de ponts disulfure ou la lipidation (Dobson, 2004) avant d'être libérée dans le cytoplasme ou dans une vésicule afin de migrer vers une organelle particulière ou d'être sécrétée.

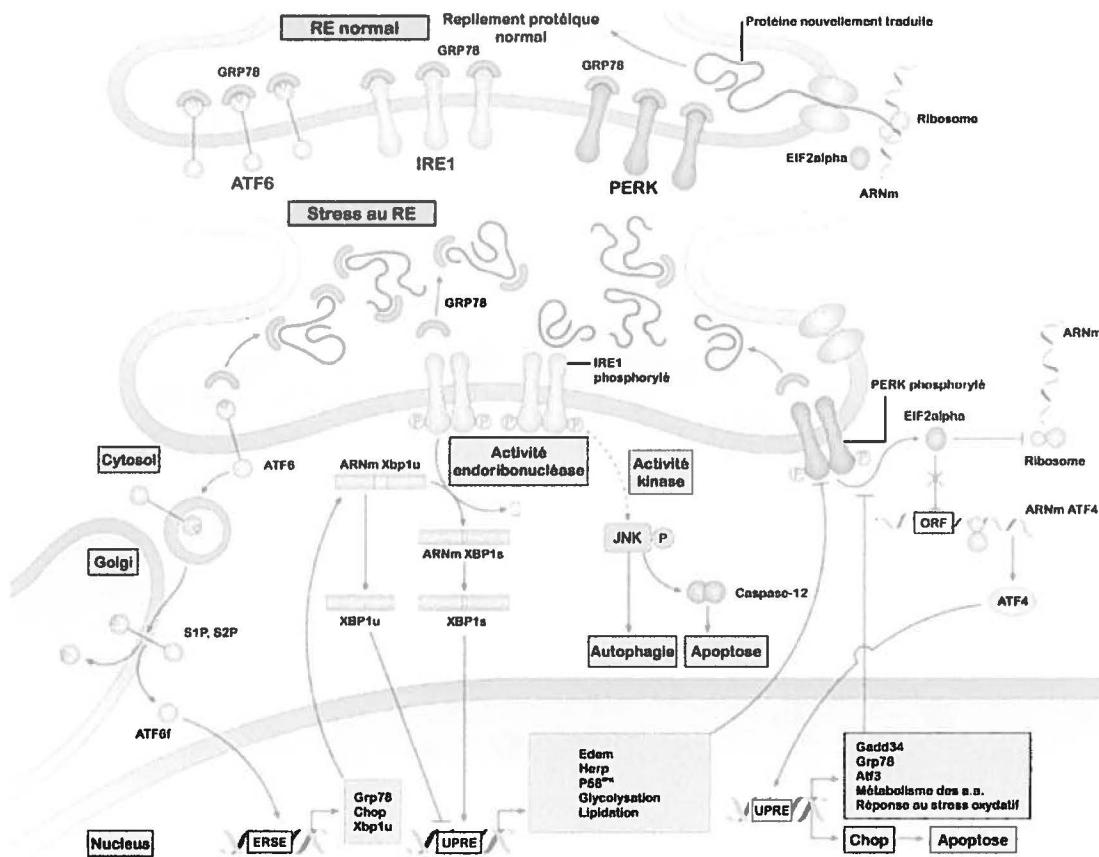


Figure 4. Voies de la *Unfolded protein response*.

Schéma représentant les différentes voies métaboliques de la *Unfolded Protein Response* activées lors d'un stress induit au réticulum endoplasmique. L'apparition de protéines mal repliées au RE délocalise GRP78 de son site d'inhibition des senseurs IRE1, PERK et ATF6 afin de participer au repliement protéique. La protéine IRE1 active participe alors à l'épissage non-conventionnel de l'ARNm Xbp1_U générant l'ARNm épissé Xbp1_S. La protéine XBP1_S est alors transloquée au noyau afin de promouvoir l'expression de gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles au sein du RE, dont Edem, Herp et P58-ipk. La protéine PERK active induit la phosphorylation du facteur de traduction eIF2-alpha, inhibant ainsi la synthèse protéique de la cellule. Cependant, la traduction de l'ARNm d'ATF4 s'en trouve favorisée et induit l'expression de gènes liés au stress oxydatif et l'apoptose, dont Chop, Gadd34 et Atf3. Finalement, la protéine ATF6 est délocalisée vers le Golgi où des sérines protéases induisent son clivage, générant un facteur de transcription ATF6f qui favorise l'expression de protéines impliquées dans la capacité conformationnelles du RE, dont Grp78 et Xbp1_U. (Adapté de Todd *et al.*, 2008)

Lors de l'accumulation de protéines mal-repliées au sein du RE l'ensemble des chaperonnes impliquées dans leurs repliement, particulièrement les chaperonnes GRP78 et GRP94, sont accaparées par les protéines présentes au sein du RE (Bertolotti *et al.*, 2000). GRP78 est la protéine chaperonne sentinelle de la UPR. Alors qu'elle est normalement associée à des sites d'inhibition sur les protéines activatrices de la UPR insérées dans la membrane du RE, sa délocalisation de ces sites vers les protéines mal-repliées permet l'activation des 3 voies principales de la UPR, la voie IRE1/XBP1, la voie PERK/eIF2-alpha et la voie ATF6 (Bertolotti *et al.*, 2000; Kimata *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2002b) (Figure 4, p.40).

3.2.2 Voie IRE1/XBP1

La première voie activée lors de l'induction de la UPR est la voie IRE1/XBP1, qui a pour objectif principal de favoriser l'expression et la synthèse de chaperonnes afin d'augmenter la capacité de repliement protéique adéquat du RE. La rapidité d'activation de cette voie provient du fait que les protéines impliquées sont produites suite à une modification post-transcriptionnelle d'un ARNm déjà présent au sein du cytoplasme, l'ARNm Xbp1_U. Celui-ci est constitutivement exprimé chez la cellule et donne lieu à la production de la protéine XBP1_U qui est un répresseur de l'activité de sa forme clivée, XBP1_S (Yoshida *et al.*, 2006). Lors d'un stress au RE, la protéine transmembranaire *inositol-requiring protein-1* (IRE1) est responsable de l'activation de cette première voie (Tirasophon *et al.*, 2000). Suite à la délocalisation de GRP78 de son site d'inhibition sur IRE1 (Bertolotti *et al.*, 2000) il s'ensuit une oligomérisation et une *trans-autophosphorylation* d'IRE1 qui active sa capacité endoribonucléase (Shamu *et al.*, 1996). IRE1 est alors à même d'effectuer un épissage alternatif non-conventionnel de l'ARNm Xbp1_U en l'ARNm Xbp1_S (Calfon *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2001). Cet épissage non-conventionnel se produit au niveau du cytoplasme en association avec la membrane du RE et ne nécessite pas la participation du *spliceosome* (Ruegsegger *et al.*, 2001) et permet l'épissage de 26 nucléotides de l'ARNm Xbp1_U. Ceci induit alors un changement du cadre de lecture ainsi que l'élimination d'un codon de terminaison produisant ainsi l'ARNm Xbp1_S qui donne lieu à la traduction d'une protéine plus longue comportant une séquence de localisation nucléaire (Yoshida *et al.*, 2006) et une région d'association à l'ADN en C-terminale ciblant les éléments ERSE, ERSEII et UPRE dans les régions promoteurs de gènes (Yamamoto *et al.*,

2004). La forme non-épissée XBP1U est traduite en une protéine plus courte exclusivement cytoplasmique, contenant un domaine de dégradation (Yoshida *et al.*, 2006) et qui est rapidement dégradée par le protéasome (Lee *et al.*, 2003a). De plus, il a été démontré que XBP1_U peut interagir avec XBP1_S et ainsi promouvoir sa dégradation (Yoshida *et al.*, 2006). Conséquemment, la protéine XBP1_U est impliquée dans la boucle de rétroaction négative de la UPR, alors que XBP1_S agit comme un activateur transcriptionnel de gènes liés au rétablissement de l'homéostasie du RE. De plus, XBP1_S est un facteur de transcription, en aval du *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), qui est impliqué dans le développement et la formation des neurites chez les neurones (Hayashi *et al.*, 2007). Parmi les gènes liés à la UPR dont l'expression est promue par XBP1_S, il y a les gènes reliés au complexe de dégradation des protéines du ER (ERAD), tel que Edem (Hosokawa *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003b), Hrd1 (Yamamoto *et al.*, 2008) et Herp (Hori *et al.*, 2004; van Laar *et al.*, 2002) qui participe à diriger les protéines mal-repliées vers le protéasome afin de réduire le nombre de protéine du RE (Ron *et al.*, 2007). La protéine HERP régule également la signalisation du Ca²⁺ entre le RE et la mitochondrie chez le neurone et possède par conséquent des fonctions neuroprotectrices (Chan *et al.*, 2004). XBP1_S induit également l'expression de la protéine chaperonne GRP94 afin d'augmenter la capacité de repliement des protéines au sein du RE (Argon *et al.*, 1999). On compte finalement la protéine P58-IPK, un inhibiteur de PERK impliquée la seconde voie de la UPR (décrise ci-après) (Lee *et al.*, 2003b; van Huizen *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2002), qui participe dans l'inhibition de phosphorylation de eIF2-alpha et par conséquent dans le rétablissement de la capacité de traduction de la cellule. La modulation d'expression de P58-IPK, impliquée dans la voie PERK/eIF2a, par la voie IRE1/XBP1 démontre que les voies de la UPR sont interconnectées entre elles.

En plus de sa contribution à l'induction de la UPR, de récentes études démontrent que IRE1 serait impliquée dans l'activation de la cascade des *Jun-N-terminal-kinases* (JNK), via la protéine adaptatrice *TNF-receptor-associated factor 2* (TRAF2) (Urano *et al.*, 2000) et l'*apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) (Nishitoh *et al.*, 2002). Ceux-ci sont entre autres impliqués dans l'induction de la mort cellulaire en favorisant l'activation de ATF3 (Zhang *et al.*, 2001) et de Bim (Lei *et al.*, 2003; Putcha *et al.*, 2003) et l'inhibition de Bcl-2 (Yamamoto *et al.*, 1999). Lors de la mort cellulaire, les protéines Bax et Bak seraient d'ailleurs impliquées dans l'activation de IRE1, favorisant l'échange entre la mort cellulaire et

la UPR (Hetz *et al.*, 2006). De plus, l'activation de IRE1 pourrait également activer la caspase-12 chez la souris (Nakagawa *et al.*, 2000; Yoneda *et al.*, 2001), et la caspase-4 chez l'humain (Hitomi *et al.*, 2004).

Globalement, la voie IRE1/XBP1 est la voie de la UPR la plus rapidement activée suite à l'induction de stress au RE et participe à réduire ledit stress en favorisant la dégradation des protéines mal-repliées et en augmentant la capacité de repliement des protéines du RE à l'aide de chaperonnes. De par ces faits, elle participe à promouvoir la viabilité de la cellule (Lin *et al.*, 2009). Or, elle peut également moduler l'activation de différentes voies métaboliques menant à la mort cellulaire et constituerait un pont avec la mitochondrie lors de l'apoptose (Lai *et al.*, 2007).

3.2.3 Voie ATF6

La seconde voie de la UPR activée suite à un stress du RE est la voie ATF6 (Haze *et al.*, 1999). Elle est principalement impliquée dans l'induction d'expression de Xbp1_U et des différentes chaperonnes du RE nécessaires aux repliements des protéines. Lors de la délocalisation de GRP78 de son site d'inhibition sur la protéine transmembranaire ATF6 (Shen *et al.*, 2002a), celle-ci migre vers l'appareil de Golgi où elle subit un clivage protéolytique à l'aide des protéases S1P et S2P (Ye *et al.*, 2000). Dès lors, le fragment ATF6 produit (ATF6f) agit comme facteur transcriptionnel (Haze *et al.*, 1999) qui se lie aux éléments *cis-acting ER stress-response* (ERSE) (Yoshida *et al.*, 1998) en amont des gènes Xbp1_U, Grp78, Grp94, Herp et Chop (Kokame *et al.*, 2001; Roy *et Lee*, 1999; Yoshida *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2000). L'augmentation d'expression de ces gènes a pour but d'augmenter la capacité de repliement du RE tout en favorisant l'inhibition de l'activation de la UPR. Alors que l'accumulation de GRP78 au RE contribue à inhiber l'activation des 3 voies, soit IRE1/XBP1, PERK/eIF2-alpha et ATF6 (Bertolotti *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002a), cette protéine peut inhiber l'activation des caspases 7 et 12 chez la souris et participerait donc à l'inhibition de la PCD dépendante des caspases provenant du RE (Rao *et al.*, 2002).

La capacité de ATF6f et de XBP1_S à moduler l'expression de mêmes chaperonnes, telles que GRP94 et GRP78, s'explique par la similarité de leur séquence de liaison à l'ADN

(Wang *et al.*, 2000) et indique la présence d'une redondance entre les voies IRE1/XBP1 et ATF6 (Shen *et al.*, 2005).

ATF6f peut également promouvoir l'expression du gène Chop (Okada *et al.*, 2002) impliqué dans l'induction de la PCD (Rutkowski *et al.*, 2006; Zinszner *et al.*, 1998), notamment en favorisant la synthèse protéique (Marciniak *et al.*, 2004).

3.2.4 Voie PERK/eIF2-alpha

La troisième voie de la UPR activée suite à un stress au niveau du RE est la voie PERK/eIF2-alpha. Le rôle principal de celle-ci est de réduire la traduction protéique chez la cellule et ainsi diminuer l'arrivée de protéines au RE. La protéine PERK est une protéine transmembranaire (Harding *et al.*, 1999), phylogénétiquement rapprochée de la protéine IRE1 (Bertolotti *et al.*, 2000), et qui possède également une région d'activité kinase dans la portion cytoplasmique et une région d'activation dans la portion lumineuse du RE (Shi *et al.*, 1998). Lors de la délocalisation de GRP78 de son site d'inhibition sur la protéine PERK (Bertolotti *et al.*, 2000), celle-ci subit une homodimérisation ainsi qu'une *trans-autophosphorylation* qui mène à son activation. PERK est une protéine kinase, un homologue de PKR, qui phosphoryle le facteur de traduction eIF2-alpha sur la séroïne-51. La phosphorylation du facteur eIF2-alpha inhibe l'échange de GDP/GTP avec le facteur eIF2B, l'initiation de la traduction d'une protéine dans le complexe ribosomal ne peut donc avoir lieu (Sudhakar *et al.*, 2000). Il s'ensuit alors une diminution de la traduction protéique globale chez la cellule. Compte tenu de l'importance de la synthèse *de novo* des protéines, la phosphorylation de eIF2-alpha par PERK est hautement régulée et la déphosphorylation de PERK intervient rapidement lorsque l'homéostasie du RE est rétablie (Bertolotti *et al.*, 2000; Harding *et al.*, 1999; Jousse *et al.*, 2007). Si l'arrêt de synthèse des protéines est transitoire, elle bénéficie à rétablir l'homéostasie du RE, en diminuant l'arrivée de protéine au RE. Toutefois, si l'arrêt de synthèse protéique est maintenu de façon prolongée dans la cellule, l'absence de renouvellement des protéines cellulaires devient délétère pour la cellule et favorise dès lors la mort de celle-ci. Ici s'exprime une partie de la dualité de la UPR mentionnée auparavant. Alors que dans un premier temps son activation participe à rétablir l'homéostasie du RE en faveur du maintien de la viabilité de la cellule, son activation prolongée mène à un stress cellulaire global, par la diminution de production de l'ensemble des protéines de la cellule,

qui peut ultimement mener à la mort cellulaire (Lin *et al.*, 2009). Cependant, parallèlement à l'inhibition de synthèse protéique, il a été démontré que la phosphorylation du facteur eIF2-alpha sur la sérine-51 favorise la traduction de certains ARNm spécifiques possédant des *inhibitory upstream open reading frames* (uORF), dont l'ARNm Atf4 (Vattem *et Wek*, 2004), ce qui permet leur traduction en protéine (Lu *et al.*, 2004). ATF4 régule l'expression des gènes chop et gadd34 (Fawcett *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2002). Chop est impliqué dans l'induction de mort cellulaire en diminuant l'expression de Bcl-2 (McCullough *et al.*, 2001; Oyadomari *et al.*, 2002; Zinszner *et al.*, 1998) et en favorisant la translocation de Bax à la mitochondrie (Gotoh *et al.*, 2004) suite à une UPR prolongée ou à la privation de *Nerve Growth Factor* (NGF) chez le neurone (Tajiri *et al.*, 2006). La protéine GADD34 est impliquée dans la déphosphorylation du facteur eIF2-alpha (Connor *et al.*, 2001; Novoa *et al.*, 2001) et participe donc dans la boucle de rétroaction négative de la voie PERK/eIF2-alpha en favorisant le rétablissement de la traduction protéique via l'activation de la sérine/thréonine phosphatase (PP1) (Ma *et Hendershot*, 2003; Novoa *et al.*, 2001; Novoa *et al.*, 2003). La protéine P58-IPK, présentée précédemment et dont l'expression est sous le contrôle du facteur de transcription XBP1_s, est un inhibiteur de la phosphorylation de PERK et contribue donc elle aussi à la boucle de rétroaction négative de la voie PERK/eIF2-alpha.

En résumé, la voie PERK/eIF2-alpha participe à réduire l'affluence des protéines *de novo* au RE en inhibant la traduction protéique tout en favorisant l'induction de la mort cellulaire suite à son activation prolongée due à un stress soutenu.

Globalement, la UPR est un ensemble de voies de signalisation qui a pour objectif le rétablissement de l'homéostasie du RE lors de stress légers ou non-soutenus, alors qu'elle participe à l'induction de la mort cellulaire lorsque les stress du RE sont trop importants ou soutenus dans le temps. Cette dualité de finalité est présente dans chacune des voies de la UPR où elles peuvent mener tant à la synthèse de chaperonnes nécessaire au repliement protéique (e.g. Grp78) qu'à l'expression de facteurs impliqués dans la mort cellulaire (e.g. Chop). Compte tenu de son rôle central dans la production des protéines et la survie de la cellule, il n'est pas étonnant de constater qu'elle peut être impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires menant à différentes pathologies, notamment des maladies neurodégénératives, ou qu'elle soit activée et/ou modulée lors d'infection virale. Considérant l'implication des Coronavirus dans l'induction de maladies neurodégénératives et dans

l'induction de la UPR (Bechill *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2006; Favreau *et al.*, 2009; Versteeg *et al.*, 2007), il convient de comprendre les mécanismes cellulaires liés au RE menant à la neurodégénérescence.

3.2.5 Maladies neurodégénératives et la UPR

Plusieurs maladies neurodégénératives sont causées par une anomalie de la production protéique ou par une altération des statuts d'oxydo-réduction de la cellule qui affectent le fonctionnement du RE (Soto, 2003). Ceci mène souvent à une accumulation de protéines mal-repliées qui affecte entre autre la survie neuronale. Ainsi, compte tenu de son rôle dans le rétablissement de l'homéostasie du RE, il appert que la UPR est souvent impliquée dans différents processus neurodégénératifs, dont notamment la maladie d'Alzheimer (Katayama *et al.*, 2004), la maladie de Parkinson (Ryu *et al.*, 2002) ou la sclérose en plaques (Mhaille *et al.*, 2008).

La maladie d'Alzheimer familiale (FAD) est une maladie neurodégénérative héréditaire qui se caractérise par une diminution des fonctions cognitives parallèlement à une perte neuronale dans différentes régions du cerveau (Selkoe, 2001). Cette dégénérescence neuronale est conséquente à l'accumulation d'aggrégats du peptide d'amyloïde- β (A β) (Selkoe, 2001) suite à une mutation de la protéine précurseur de A β (APP) ou les présénilines PS1 et PS2, impliquées dans le transport de l'APP (Wilquet *et De Strooper*, 2004). L'accumulation de A β au sein du RE y induit une altération de l'homéostasie du Ca $^{2+}$ (Demuro *et al.*, 2005) ainsi que l'apparition d'un stress oxydatif menant à l'induction de la UPR (Katayama *et al.*, 2004; LaFerla, 2002; Verkhratsky, 2005). Les PS1 et PS2 sont des protéines transmembranaires du RE qui participent à la régulation du Ca $^{2+}$ du RE et du transport de l'APP. Leurs mutations, présentes dans la FAD, ou leurs épissages alternatifs, présents dans l'Alzheimer sporadique (SAD), altèrent la maturation de l'APP, favorisent leur aggrégation et sensibilisent la cellule au stress du RE (Katayama *et al.*, 1999; Wilquet *et De Strooper*, 2004), notamment en liant et en inhibant IRE1, bloquant alors l'activation cette branche de la UPR (Sato *et al.*, 2001) et donc particulièrement la synthèse de chaperonnes, dont GRP78, impliquées dans le repliement des protéines (Katayama *et al.*, 1999).

La maladie de Parkinson (PD) est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'accumulation de corps d'inclusion et de Lewy menant à la perte progressive de neurone

dopaminergique dans la région *substantia nigra pars compacta* du cerveau (Lindholm *et al.*, 2006). Cette perte neuronale est causée entre autre par une mutation dans la protéine α -Synucléine qui inhibe le protéasome et favorise alors l'accumulation de protéines et la formation d'aggrégats, prélude à l'induction de la UPR (Greenamyre *et Hastings*, 2004). Les mutations dans la protéine Parkin, une protéine ubiquitine ligase impliquée dans l'ubiquitination et la dégradation protéique par le protéasome, mènent également à l'inhibition du protéasome (Shimura *et al.*, 2000), à l'accumulation d'aggrégats neurotoxiques (Imai *et Takahashi*, 2004) et l'induction de la UPR (Friedlander *et al.*, 2000).

Dans le cas de la FAD et de la PD puisque le stress est continu et soutenu, la UPR activée mène alors vers l'induction de la mort cellulaire. Dans les modèles cellulaires de PD, où la maladie est induite chimiquement par le 6-OHDA, l'expression de CHOP ainsi que la phosphorylation soutenue de PERK et de IRE1 est observée (Holtz *et O'Malley*, 2003; Ryu *et al.*, 2002). De plus, chez les modèles de souris déficients en caspase-12 on observe une diminution de la mortalité neuronale causée par A β , alors que cette caspase est connue pour interagir et être activée par IRE1 (Nakagawa *et al.*, 2000; Yoneda *et al.*, 2001).

La sclérose en plaques, telle que décrite précédemment, est une maladie inflammatoire démyélinisante caractérisée par la perte de la myéline, la dégénérescence axonale et la mort des oligodendrocytes (Reynolds *et al.*, 2011). Bien que plusieurs études tendent à démontrer que l'inflammation et l'auto-immunité sont responsables de l'induction de cette pathologie (Trapp *et Nave*, 2008), la littérature émergente démontre le rôle de la UPR dans cette neuropathologie (Mhaille *et al.*, 2008; Zhang *et Kaufman*, 2008). En effet, au sein des plaques de démyélinisation, comprenant entre autres des oligodendrocytes et des microglies, on observe l'expression de CHOP, Grp78 et XBP1 (Mhaille *et al.*, 2008) ainsi qu'une phosphorylation de PKR, PERK et eIF2-alpha (Chakrabarty *et al.*, 2004; Chakrabarty *et al.*, 2005).

De plus, la présence et l'activation de PERK au sein d'oligodendrocytes matures dans un modèle animal de l'EAE est essentielle à leur survie et donc à la remyélinisation, lorsque de l'INF- γ est administré avant le début des symptômes de l'EAE (Lin *et al.*, 2007). Paradoxalement, l'administration d'INF- γ pendant l'apparition des symptômes de EAE induit plutôt une mortalité accrue des oligodendrocytes ainsi qu'une remyélinisation déficiente,

dépendante également de l'activation de la UPR. Alors que l'activation de PERK en prélude aux symptômes de l'EAE est essentielle à la survie des oligodendrocytes, l'activation de PERK parallèlement à la rémyélinisation des oligodendrocytes est délétère pour ceux-ci (Lin *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006). Il appert ainsi que l'induction de la UPR au sein d'oligodendrocytes matures, possédant un RE normalement sollicité, pourrait servir à préparer celui-ci au stress de production protéique qu'en entraînera subséquemment la rémyélinisation. Par contre, l'induction de la UPR chez des oligodendrocytes déjà en processus de rémyélinisation, et au RE largement sollicité, apparaîtrait alors comme un stress délétère pour la cellule.

La UPR apparaît ainsi, depuis près d'une décennie, comme une voie métabolique omniprésente dans plusieurs pathologies neurodégénératives. Son rôle dans la réponse au stress induit dans des cellules du SNC, soit par l'accumulation de protéines neurotoxiques, soit par la nécessité d'une capacité accrue de synthèse protéique lors de la rémyélinisation, la rend aujourd'hui incontournable dans l'étude des mécanismes neurodégénératifs.

3.2.6 Infections virales et la UPR

L'infection virale chez la cellule peut avoir plusieurs répercussions sur l'homéostasie du RE, notamment par l'affluence de protéines virales (He, 2006). L'induction de la UPR peut dès lors permettre à la cellule de rétablir ses fonctions de repliement protéique au RE, mais par le fait même, elle peut également favoriser ou inhiber la production des protéines virales. Ainsi, plusieurs virus sont connus pour activer la UPR suite à l'infection, dont le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) (Su *et al.*, 2002), le virus de la maladie de Borna (BDV) (Williams *et Lipkin*, 2006), le virus du Nil Occidental (WNV) (Medigeshi *et al.*, 2007) ou le virus de la dengue (DENV) (Umareddy *et al.*, 2007). Certains virus, dont le virus de l'hépatite C (HCV) et le HSV, peuvent également moduler l'activation de la UPR afin de bénéficier de celle-ci tout en inhibant ses effets délétères (Isler *et al.*, 2005; Liberman *et al.*, 1999; Mulvey *et al.*, 2007; Tardif *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005).

Les Coronavirus peuvent également induire la UPR suite à l'infection, mais l'activation des différentes branches varie selon l'espèce et le type cellulaire infecté (Chan *et al.*, 2006; Favreau *et al.*, 2009; Versteeg *et al.*, 2007). Ainsi, lors d'infection de cellule Vero, SARS-CoV induit l'expression de Grp78, Grp94 et Chop via la voie PERK/eIF2-alpha alors

qu'aucune activation des voies ATF6 ou IRE1/XBP1 n'est observée (Chan *et al.*, 2006). MHV-A59 par contre, lors d'infection de cellules DBT, induit l'activation des voies ATF6 et IRE1/XBP1 où l'on peut observer l'expression de Edem et P58-ipk, alors que la voie PERK/eIF2-alpha est activée, menant à la phosphorylation de eIF2-alpha et la traduction de ATF4 (Bechill *et al.*, 2008). Finalement, l'infection de neurone par HCoV-OC43 active principalement la voie IRE/XBP1 ainsi que partiellement la voie PERK/eIF2-alpha sans toutefois mener à la phosphorylation du facteur de traduction eIF2-alpha (Favreau *et al.*, 2009). La glycoprotéine S a été identifiée comme la protéine virale principalement responsable de l'induction de la UPR, autant par le SARS-CoV ou MHV-A59, où l'expression seule de la protéine est suffisante pour induire un stress au RE (Chan *et al.*, 2006; Versteeg *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que des mutations dans la glycoprotéine S de HCoV-OC43, acquises en persistance, peuvent moduler la UPR et induire plus fortement la voie IRE1/XBP1 (Favreau *et al.*, 2009).

Bien que la UPR induite par différents Coronavirus ait été étudiée, des travaux déterminant comment ils peuvent en moduler l'activation, ou si la UPR est impliquée dans la mort cellulaire observée suite à l'infection, restent à faire. Cependant, afin de déterminer le rôle ou les conséquences de la UPR lors de la mort cellulaire suite à l'infection, il convient *a priori* d'étudier les mécanismes menant à la perte de viabilité des cellules, notamment les voies métaboliques menant à la mort cellulaire programmée.

3.3 Mort cellulaire programmée

Bien que, sans le nommer tel quel, c'est le zoologiste Carl Vogt en 1842 qui fût le premier à décrire le principe de l'apoptose, un des mécanismes de mort cellulaire programmée (PCD), alors que les travaux de l'anatomisme Walther Flemming vinrent décrire de façon plus précise ce concept (Paweletz, 2001). C'est en 1972 que le premier mécanisme de PCD fut officiellement nommé, l'apoptose (Kerr *et al.*, 1972). Dès lors commencèrent l'engouement pour les recherches portant sur la caractérisation des mécanismes de PCD, plus spécifiquement les mécanismes apoptotiques. Bien que l'apoptose soit la forme de PCD la plus répandue dans la culture générale scientifique, la recherche des années '90 démontre qu'il existe plusieurs types de PCD (Kroemer *et al.*, 2005), et surtout que l'absence de caractéristiques de l'apoptose, lors de la mort d'une cellule, n'indique pas nécessairement la

présence d'une mort cellulaire passive, voire nécrotique. Il importe alors de saisir que la PCD peut revêtir des caractéristiques diversifiées, qui ne se limite pas à celles de l'apoptose.

3.3.1 Généralités

La PCD se définit comme un ensemble de mécanismes biochimiques intra-cellulaires, dépendant de l'énergie, dont l'action et la concertation mènent à la mort de la cellule (Galluzzi *et al.*, 2012). Elle se distingue de la nécrose, qui est une mort cellulaire, parfois passive, où la cellule participe peu ou pas à l'induction de sa propre mort, où l'énergie (ATP) n'est pas essentielle (Nicotera *et al.*, 1998) et qui est encore aujourd'hui plutôt définie en regard de l'absence de marqueurs biochimiques spécifiques (Kroemer *et al.*, 2009). La PCD joue un rôle au sein de l'organisme lors du développement embryonnaire et post-embryonnaire, du renouvellement (*turn-over*) cellulaire, de l'élimination de cellules transformées et dans différentes pathologies (Hengartner, 2000; Kroemer *et al.*, 2007; Thompson, 1995). Elle peut être induite par différent stimulus autant intra-cellulaire (voie intrinsèque) qu'extra-cellulaire (voie extrinsèque) (Zimmermann *et al.*, 2001) et plusieurs organelles peuvent participer à l'induction de la PCD, dont principalement la mitochondrie, mais également le noyau et le RE.

Considérant la diversité des stimuli et des voies métaboliques impliquées dans la PCD, la classification des différents types de mort cellulaire est en constante évolution et a donné lieu à l'apparition de plusieurs néologismes (e.g. nécroptose, apoptosis-like) dont l'utilisation dans la littérature n'est pas uniforme, consistante ou consensuelle. Ainsi, en 2005, le *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) a publié les premières lignes directrices tentant de définir une classification cohérente et définie des différentes formes de PCD (Kroemer *et al.*, 2005). Suite aux consultations et aux délibérations du comité, le NCCD a publié en 2012 une liste exhaustive des types de PCD, ainsi que leurs marqueurs phénotypiques et biochimiques correspondant, afin que les termes utilisés dans la littérature puissent être conséquents et se prêter à la comparaison entre les différentes études publiées (Tableau 1) (Galluzzi *et al.*, 2012). Il est important de noter que ces recommandations sont appelées encore à évoluer et que les différents types de PCD dénommés ne sont pas mutuellement exclusifs les uns des autres. En effet, il est maintenant établi que la cellule peut utiliser différents mécanismes de mort cellulaire en parallèle, en complémentarité, en

redondance ou en compensation, ce qui accentue la difficulté d'une classification ou d'une dénomination absolue d'une mort cellulaire (Golstein *et al.*, 2005).

Ainsi, il est important de bien définir les différents mécanismes de mort cellulaire observés lors de la caractérisation d'une PCD et de démontrer clairement la participation, ou non, d'une voie métabolique dans celle-ci. Ce n'est qu'une fois l'ensemble des caractéristiques biochimiques d'une mort cellulaire définie, qu'il convient de dénommer sous une, ou des appellations, la PCD observée (Galluzzi *et al.*, 2012).

Nonobstant la complexité de dénomination des différentes PCD, les voies métaboliques impliquées demeurent néanmoins globalement bien caractérisées à ce jour et il convient de les définir en prélude à l'étude d'une mort cellulaire. Ces voies métaboliques regroupent les différentes cascades de caspases (e.g. caspase-8, -3), les molécules anti- et pro-apoptotiques (e.g. Bcl2, Bax, CytC, AIF) en aval et en amont de la mitochondrie, les protéines liées à la dégradation de l'ADN (e.g. PARP, iCAD) ainsi que les protéines pro-apoptotiques liées au RE (e.g. caspase-4, CHOP, Bax).

Tableau 1. Liste des différents types de PCD. Les différents types de PCD sont catégorisés selon différents marqueurs biochimiques et moléculaires conformément aux lignes directrices du *National Committee on Cell Death* (Adapté de Galluzzi *et al.*, 2012)

Type de PCD	Marqueurs biochimiques principaux	Dépendance aux caspases
Anoikis	Baisse d'expression de EGFR Inhibition de la signalisation de ERK1 Absence de rôle de $\beta 1$ -intégrine Surexpression de BIM Activation de caspase-3 (-6,-7)	++
Mort cellulaire autophagique	Lipidation de MAP1LC3 Dégradation de SQSTM1	--
Apoptose intrinsèque dépendante des caspases ou Apoptose intrinsèque indépendante des caspases	MOMP Dissipation $\Delta \psi_m$ irréversible Libération des protéines de IMS Inhibition de la chaîne respiratoire	++ ou --
Cornification	Activation des transglutaminases Activation de la caspase-14	+
Entosis	Activation de RHO Activation de ROCK1	--
Apoptose extrinsèque via les récepteurs de mort cellulaire	Signalisation via les récepteurs de mort Activation de la caspase-8(-10) Clivage de BID MOMP	++
	Activation de la caspase-3(-6, -7)	

	Dépendance à la signalisation via un récepteur	
Apoptose extrinsèque dépendante de récepteur	Activation de PP2A Activation de DAPK1 Activation de la caspase-9 Activation de la caspase-3 (-6,-7)	++
Catastrophe mitotique	Activation de la caspase-2 Activation de TP53 ou TP73 Arrêt de la mitose	--
	Signalisation via les récepteurs de mort cellulaire	
Nécroptose	Inhibition des caspases Activation de RIP1/RIP3	--
	Inhibition des caspases	
Nétose	Activation de la NADH oxydase Libération de NET	--
	Accumulation de PAR médiée par PARP1	
Parthanatos	Dissipation $\Delta\psi_m$ irréversible Diminution d'ATP et de NADH Liaison de PAR à AIF Localisation nucléaire de AIF	--
	Activation de la caspase-1	
Pyroptosis	Activation de la caspase-7 Sécrétion de IL-1 β et IL-18	++

Abréviations: $\Delta\psi_m$: Potentiel transmembranaire mitochondrial; DAPK1 : death-associated protein kinase 1; EGFR : epidermal growth factor receptor; ERK1 : extracellular-regulated kinase 1; MAP1LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3; MOMP : Perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie; NET : neutrophil extracellular trap; PAR : poly(ADP-ribose); PARP1 : poly(ADP-ribose) polymerase 1; PP2A : protein phosphatase 2A; ROCK1 : RHO-associated coiled-coil containing protein kinase 1; SQSTM1 : sequestosome 1

3.3.2 Caspases

Les caspases sont des cystéines protéases possédant une spécificité pour l'aspartate et jouent un rôle important dans l'exécution de la PCD (Alnemri *et al.*, 1996; Kumar *et Lavin*, 1996; Thornberry, 1997) et également dans la réponse immunitaire (Martinon *et Tschopp*, 2004). Elles sont regroupées selon qu'elles sont impliquées dans l'initiation de la cascade des caspases (caspases initiatrices), l'exécution de la mort cellulaire (caspases exécutrices), ou dans la réponse immunitaire. Elles sont présentes dans la cellule sous forme de pro-enzyme (zymogènes) et deviennent actives suite à leur autoclavage ou par le clivage induit par une autre caspase (Yang *et al.*, 1998). Les cascades de caspases peuvent être activées via deux voies principales, la voie liée aux récepteurs de mort cellulaire (voie extrinsèque) et la voie liée à la mitochondrie (voie intrinsèque) (Figure 5, p.58).

La cascade de caspases activée par les récepteurs de mort cellulaire est principalement médiée par les récepteurs cellulaires *TNF receptor-1* (TNF-R1), *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor* 1 et 2 (TRAIL-R1 -R2), ou FAS (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Locksley *et al.*, 2001; Muzio *et al.*, 1996; Scaffidi *et al.*, 1998) (Figure 5, p.58). Suite à la liaison à leur ligand respectif, soit le TNF-alpha ou le FasL, les récepteurs recrutent et forment respectivement des *TNFR-associated death domain* (TRADD) ou des *FAS-associated death domain* (FADD) qui favorisent l'émergence des *Death effector domain* (DED) (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995). Les DED des différents récepteurs interagissent avec les DED présents sur la caspase-8 et la caspase-10 et mènent à leur oligomérisation et successivement à la formation du *death-inducing signal complex* (DISC) (Kischkel *et al.*, 2001; Muzio *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001). Ce complexe permet l'autoclavage de la caspase-8 ou de la caspase-10, donc leur activation, et dès lors elles activent différentes caspases en aval de la cascade (Wang *et al.*, 2001). La caspase-8 peut alors induire la PCD avec ou sans la participation de la mitochondrie (Scaffidi *et al.*, 1998). Dans certains types cellulaires, la caspase-8 active directement la caspase-3, qui est la caspase effectrice principale, alors que la caspase-10 posséderait la même fonction dans l'apoptose des cellules lymphoïdes (Wang *et al.*, 2001). Dans d'autres types cellulaires, en plus d'activer la caspase-3, la caspase-8 induit suffisamment le clivage du facteur pro-apoptotique Bid, générant la forme active tBid qui participe à la perméabilisation de la mitochondrie qui libère alors différents facteurs pro-apoptotiques (e.g. CytC et AIF) (Li *et*

al., 1998; Luo *et al.*, 1998). Considérant le rôle des caspases-8 et -10 dans l'induction de la PCD, la diminution de leur expression peut mener à différentes pathologies. En effet, l'expression de la caspase-10 est souvent régulée à la baisse dans différentes cellules tumorales, alors que le gène de la caspase-8 est fréquemment éliminé ou silencieux chez les neuroblastomes (Kischkel *et al.*, 2001; Teitz *et al.*, 2000). Globalement, les caspases-8 et -10 sont principalement impliquées dans l'induction de la mort cellulaire suite à la stimulation par des facteurs extra-cellulaires, notamment chez les cellules B et T au sein du système immunitaire (Schattner *et al.*, 1995; Wang *et Lenardo*, 1997; Zheng *et al.*, 1998).

La cascade de caspases menant à la mort cellulaire médiée par la mitochondrie est activée avec la participation de facteurs provenant de la mitochondrie (Zimmermann *et al.*, 2001) (Figure 5, p.58). Lors d'un stress intra-cellulaire (e.g. dommage à l'ADN, débalancement de Ca^{2+}) les facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, dont Bax, Bad, tBid, forment des pores dans la mitochondrie induisant alors la perméabilisation de la mitochondrie et la libération de différents facteurs pro-apoptotiques (Dewson *et Kluck*, 2009). Un de ceux-ci est le cytochrome C (CytC) qui est libéré dans le cytosol où il s'associe avec l'*apoptotic protease activation-factor* (Apaf1) et la caspase-9 et forme l'apoptosome (Li *et al.*, 1997). L'apoptosome favorise l'autoclavage, donc l'activation, des caspases-9 présentes qui activent dès lors la caspase-3 (Zou *et al.*, 1999). La caspase-3 active peut également activer la caspase-9 ce qui constitue une boucle de rétroaction positive d'activation de cette cascade (Zhivotovsky, 2003).

Le RE est également impliqué dans l'activation de la cascade des caspases. Il a été démontré que la caspase-12, chez la souris, est une caspase initiatrice localisée au RE et activée lors de stress spécifiquement induit au sein de cette organelle (Nakagawa *et al.*, 2000) (Figure 5, p.58). Cependant, son mécanisme initial d'activation au RE demeure controversé (Szegezdi *et al.*, 2003). Le premier modèle propose que la caspase-12 interagirait avec la molécule adaptatrice TRAF2, en association avec IRE1, et lors de l'activation de IRE1 la caspase-12 serait libérée, s'homodimeriserait puis s'autocliverait, menant à son activation (Yoneda *et al.*, 2001). Un autre modèle propose que la caspase-12 serait clivée par la m-calpaine, alors que cette dernière serait activée par la libération de Ca^{2+} provenant du RE (Nakagawa *et Yuan*, 2000). Un dernier modèle propose que la caspase-12 serait activée par la caspase-7, sans toutefois définir comment la caspase-7 est activée par un stress du RE (Rao *et*

al., 2001). Il est probable que la caspase-12 puisse être activée par ces différents mécanismes selon le type cellulaire ou le stimulus induit. Il a par contre été démontré que la caspase-12 peut cliver et activer la caspase-9, indépendamment de la présence de CytC et de l'apoptosome, ce qui indique qu'elle serait impliquée dans une PCD induite par le RE qui serait indépendante de la mitochondrie ou des récepteurs de mort cellulaire (Morishima *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2002). Certaines études démontrent par contre que l'activation de la caspase-12 peut être dépendante de l'apoptosome (Shiraishi *et al.*, 2006). Il apparaît alors que les voies d'activation de la caspase-12 sont diverses, seulement partiellement caractérisées et potentiellement spécifique du type cellulaire et du stimuli. Chez l'humain la caspase-12 contient plusieurs mutations qui la rendent non-fonctionnelle. Cependant la caspase-4 humaine possèderait des fonctions homologues à la caspase-12 murine, avec un pourcentage d'identité de séquence de 51% (Fischer *et al.*, 2002; Hitomi *et al.*, 2004). Il a de plus été démontré que la caspase-4 est responsable de l'induction de la PCD suite au stress du RE chez le neurone humain (Kim *et al.*, 2006), renforçant l'hypothèse que la caspase-4 serait l'homologue fonctionnel de la caspase-12 chez l'humain. Finalement, la caspase-2 a récemment été identifiée comme étant responsable du clivage du facteur pro-apoptotique Bid, générant sa forme active tBid, spécifiquement suite à un stress au RE (Upton *et al.*, 2008). Advenant que ces premières données soient confirmées, elles constituerait un lien direct entre les stress au RE et les PCD dépendante de la mitochondrie.

Que ce soit suite à l'activation des caspases-8 ou -10 par les récepteurs de mort cellulaire, ou à l'activation des caspases-4 ou -2 humaines ou -12 murines suite à un stress au RE, l'activation des caspases effectrices, caspases-3, -6 et -7, est le point culminant des différentes cascades de caspases. Elles participent en effet au clivage des molécules directement impliquées dans l'induction de la mort cellulaire. Leurs substrats comportent les caspases-3, -6 et -9 ainsi que les facteurs PARP, impliqués dans la réparation de l'ADN, et iCAD qui une fois clivé libère CAD qui participe alors au clivage de l'ADN (Sakahira *et al.*, 1998). L'inactivation de PARP inhibe les mécanismes de réparation de l'ADN, conjointement au clivage de iCAD en sa forme active CAD, qui mène à la fragmentation de l'ADN (Krishnakumar *et Kraus*, 2010; Liu *et al.*, 1998; Mukae *et al.*, 1998).

Globalement, les caspases participent à l'initiation des voies métaboliques menant à la PCD aussi bien qu'à l'exécution de celle-ci. Elles participent conjointement avec les autres

voies de PCD qui originent autant de la mitochondrie, du RE ou du milieu extra-cellulaire. Cependant, plusieurs PCD sont indépendantes des caspases (e.g. Parthanatos, Nécroptose, Apoptose intrinsèque indépendante des caspases), i.e. qu'elles peuvent avoir lieu sans la participation nécessaire des caspases (Chipuk *et Green*, 2005; Kroemer *et Martin*, 2005). Ainsi, il importe de définir les autres mécanismes liés menant à la PCD dont la mitochondrie est organelle majeure.

3.3.3 Mitochondrie

La mitochondrie est une organelle centrale dans plusieurs types de PCD, dont l'apoptose intrinsèque, dépendante et indépendante des caspases, l'apoptose extrinsèque et la parthanatos (Kroemer *et al.*, 2007). En plus d'être responsable de la respiration cellulaire et de la production d'énergie, elle est une organelle carrefour de plusieurs voies de PCD, dont les cascades des caspases et les stress au RE (Figure 5, p.58 et Figure 6, p.61). Ceci provient du fait qu'elle intègre plusieurs signaux de stress ou de survie provenant de la cellule, notamment les variations de concentrations d'ions (e.g. Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+), de métabolites (e.g. ATP, ADP, NAD(P)), de messagers secondaires lipidiques (e.g. céramide) et les membres de la famille Bcl2 (e.g. Bax, Bcl2, Bak, Bcl-X_L) (Kroemer *et al.*, 2007). Sa participation dans les processus de mort cellulaire est initiée par la perméabilisation de sa membrane externe (MOMP) via la formation de pores membranaires par différents effecteurs (e.g. CypD, Bax), ce qui mène à la libération de différentes molécules effectrices dans la PCD (e.g. CytC, AIF) et la perte de production d'énergie via la dissipation du potentiel membranaire (Kroemer *et al.*, 2007). La formation de pores au sein de la membrane externe de la mitochondrie est un événement majeur dans les différentes voies apoptotiques et la parthanatos (Galluzzi *et al.*, 2012). La perméabilisation de la mitochondrie est régulée par deux mécanismes, la formation de pores par les protéines pro-apoptotique de la famille Bcl2 (Bax, Bak) (MOMP) et la formation d'un pore transitoire de perméabilisation membranaire (mPTP) par différentes protéines de la mitochondrie, dont le *voltage-dependent anion channel* (VDAC), l'*adenine nucleotide translocase* (ANT) et la Cyclophiline D (CypD) (Green *et Kroemer*, 2004).

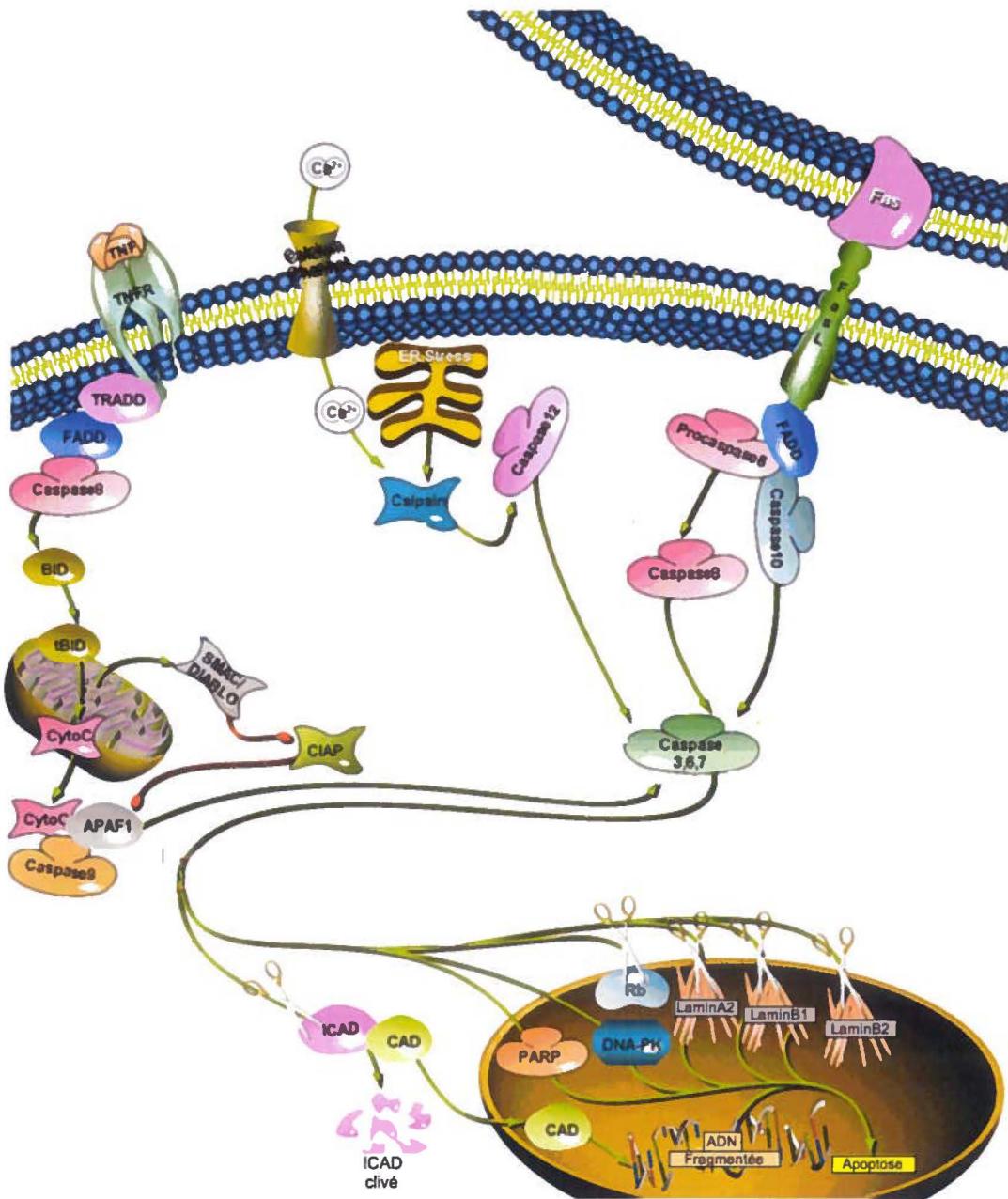


Figure 5. Schéma représentant les voies d'activation des caspases.

Figure 5. Schéma représentant les voies d'activation des caspases. (Légende)

L'activation de la voie extrinsèque se produit lors de la liaison des ligands TNF- α , Fas/FasL à leur récepteur spécifique qui, en association avec TRADD ou FADD, induit le clivage et l'activation de la caspase-10 et caspase-8. Cette-dernière participe alors au clivage et l'activation du facteur pro-apoptotique Bid en tBid, qui participe à la perméabilisation mitochondriale. La caspase-12 est activée par les calpaines suite à un débordement du Ca²⁺ ou un stress du RE. La perméabilisation de la mitochondrie engendre une libération du CytC qui en association avec Apaf-1 et la caspase-9 forme l'apoptosome menant à l'activation de la caspase-9. La libération de Smac/Diablo permet d'inhibier CIAP qui normalement participe à l'inhibition de Apaf-1. Toutes ces voies convergent pour cliver et activer les caspases effectrices 3, 6 et 7. Celles-ci sont responsables de l'activation de CAD (via la dégradation de iCAD) impliquée dans la fragmentation de l'ADN, de PARP et DNA-PK qui participent à l'induction de la mort cellulaire, ainsi que de Rb et les Lamin A2, B1 et B2 qui sont responsables de la dégradation de la lamine nucléaire. (Adaptée de <http://www.sabiosciences.com/iapp/caspase.html>)

Les membres de la famille des Bcl2 régulent la formation du MOMP et comprennent les protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-X_L et les protéines pro-apoptotiques Bax, Bak, Bid et Bad (Letai *et al.*, 2002). Les protéines Bak, Bax et tBid sont responsables de la perméabilité mitochondriale suite à la formation d'homo-oligomères ou d'hétéro-oligomères (Bax/tBid, Bax/Bax, Bax/Bak ou Bak/tBid) qui mènent à l'apparition des pores membranaires (Kuwana *et al.*, 2002). La présence seule de Bax ou Bak est nécessaire à l'apparition de pores mitochondriaux, alors qu'il a été démontré que leur rôle est redondant dans plusieurs modèles d'apoptose (Wei *et al.*, 2001). En condition physiologique normale, la formation de ces pores par ces trois protéines est inhibée par les protéines Bcl2 et Bcl-X_L qui forment des complexes avec Bax et Bak et empêchent leur oligomérisation ainsi que leur insertion dans la membrane mitochondriale (Letai *et al.*, 2002; Nechushtan *et al.*, 2001). Le mécanisme précis de la formation du mPTP est encore aujourd'hui controversé, mais il est accepté qu'il résulte de la formation d'un complexe multiprotéique au site de contact des membranes externes et internes de la mitochondrie (Kroemer *et al.*, 2007). Le complexe du mPTP serait formé par l'interaction du VDAC, de ANT et de la CypD (Zoratti *et Szabo*, 1994, 1995). Le mPTP serait formé suite à différents stress cellulaires dont principalement l'augmentation des flux de Ca²⁺ ainsi que l'interaction avec la protéine pro-apoptotique Bax (Brenner *et Grimm*, 2006). Bien que les rôles des protéines du complexe mPTP sont sujets à débat, il est établi que son induction peut être inhibée par l'inhibition de la CypD, par la Cyclosporine A (CsA) (Halestrap *et al.*, 1997), ou par la surexpression de Bcl2 et Bcl-X_L (Belzacq *et al.*, 2003; Marzo *et al.*, 1998a; Marzo *et al.*, 1998b). De plus, il a été démontré que la CypD est essentielle dans le complexe mPTP alors que les souris ou les cellules déficientes pour cette protéine (*Ppif*^{-/-}) sont résistantes à la PCD induite par le H₂O₂ (Basso *et al.*, 2005) ou les stress de Ca²⁺ (Baines *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2005). De plus, la surexpression de CypD favoriserait la mort cellulaire induite par le NO, le Ca²⁺ et les stress oxydatifs (Li *et al.*, 2004).

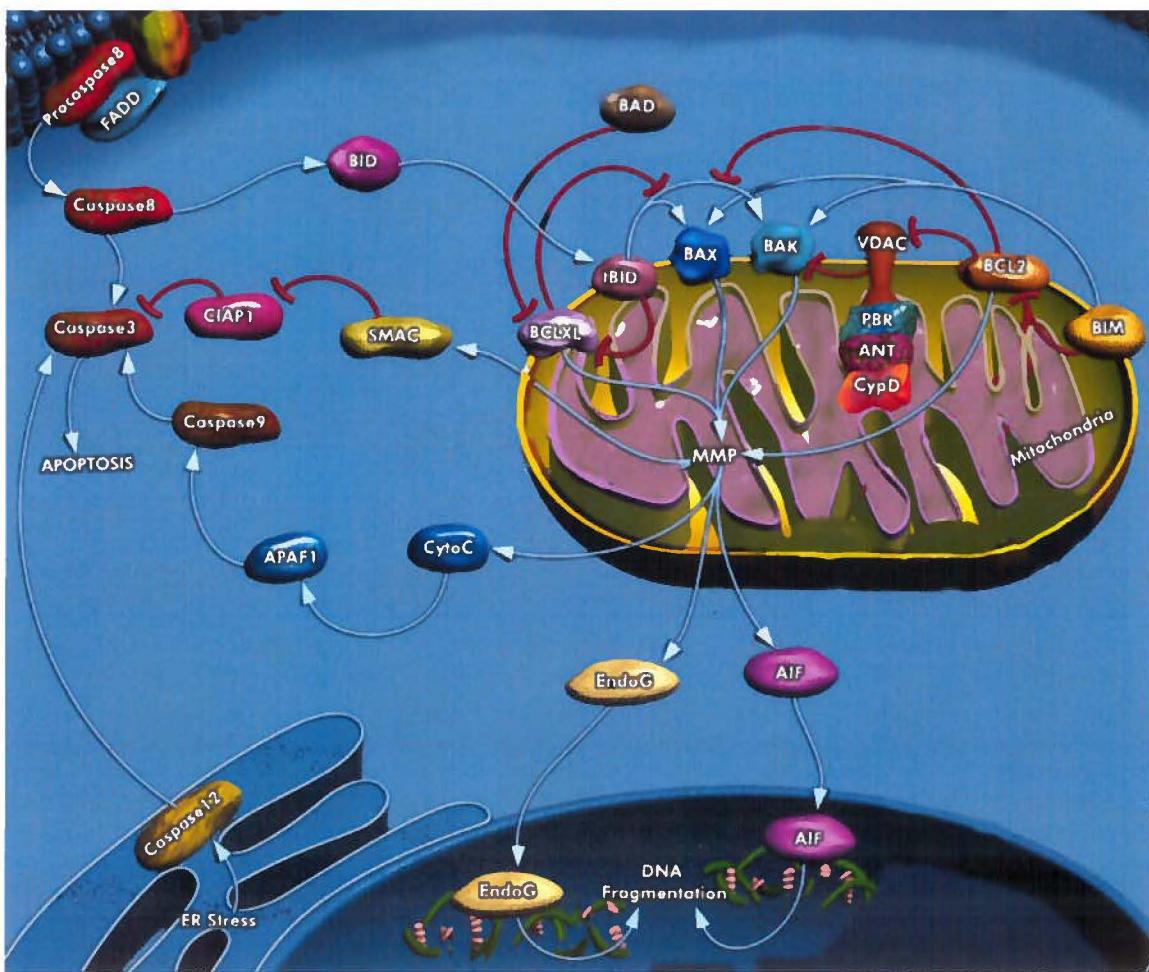


Figure 6. Voies métaboliques de la PCD liées à la mitochondrie.

Suite à un stress cellulaire important (e.g. via l'activation des caspases-8, -12 ou -3), la perméabilisation de la mitochondrie est un événement central de la PCD, alors que la mitochondrie induit la libération de CytC, impliqué dans l'activation de la caspase-9 (en conjonction avec Apaf-1), de EndoG et AIF, impliqués dans la fragmentation de l'ADN, ainsi que Smac2 qui favorise l'activation des caspases activatrices en inhibant cIAP1. La perméabilisation de la mitochondrie est causée par la formation de pores membranaires par les protéines Bax, Bad en association avec les protéines mitochondrielles VDAC, ANT et CypD. Les protéines Bcl2 et Bclx, qui inhibent Bax et Bad en condition physiologique normale, se retrouvent inhibées par les protéines tBid, Bak et Bim. (La voie des caspases représentées pour permettre une compréhension globale et intégrative de la PCD est décrite à la figure précédente)

(Tirée de http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Mitochondrial_Apoptosis)

Cependant, certaines études indiquent que la CypD ne serait pas universellement essentielle dans la formation du mPTP et l'induction de la PCD. En effet, les cellules *Ppif*^{-/-} (provenant des souris déficiente en CypD) ne sont pas protégées de la mort cellulaire induite par la surexpression de Bax (Baines *et al.*, 2005) ou les traitements à la cycloheximide, l'étoposide ou la staurosporine (Nakagawa *et al.*, 2005). Par contre, considérant, que la formation du mPTP et du MOMP sont complémentaires et/ou compensatoires et que plusieurs PCD peuvent être inhibées par l'inhibition de la CypD par la CsA (Zamzami *et al.*, 2005), il est prématuré d'exclure la participation de la CypD dans la formation du mPTP (Kroemer *et al.*, 2007).

Suite à la perméabilisation de la mitochondrie, par la formation du MOMP ou du mPTP, plusieurs molécules pro-apoptotiques sont libérées dans le cytosol et participent à l'induction de la mort cellulaire. Le CytC est la molécule la plus connue et tel que décrit précédemment participe à l'activation de la cascade des caspases effectrices (Li *et al.*, 1997). Suite à sa libération, en combinaison avec Apaf-1 et la caspase-9, il forme l'apoptosome qui induit l'auto-clivage et l'auto-activation de la caspase-9 qui mène à l'activation de la caspase-3 (Zou *et al.*, 1999). De plus, le CytC participerait à favoriser la libération de Ca²⁺ du RE en inhibant le canal ionique régulé par IP₃R ce qui mène à l'amplification des signaux de stress menant à la perméabilisation de la mitochondrie (Boehning *et al.*, 2003; Boehning *et al.*, 2004). En plus d'un activateur de la cascade des caspases libéré lors de la MOMP ou de la mPTP, les protéines *second mitochondria-derived activator* (Smac) et Omi/HtrA2 libérées favorisent l'inhibition des différents IAPs, et donc indirectement l'activation des caspases. Smac lie les inhibiteurs de caspases *X-linked IAP* (XIAP), cIAP1 et cIAP2 et inhibe leur capacité d'inhibition des caspases -3 et -9 (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2002). Omi/HtrA2 est une protéase qui induit le clivage de cIAP1 (Jin *et al.*, 2003) et qui inhibe XIAP, favorisant l'activation de la caspase-9 (van Loo *et al.*, 2002). L'*apoptosis inducing-factor* (AIF) est une protéine mitochondriale favorisant l'induction de mort cellulaire la plus récemment identifiée (Susin *et al.*, 1999) et est la protéine caractéristique de la PCD parthanatos (Galluzzi *et al.*, 2012). Suite à sa libération de la mitochondrie, elle est dirigée au noyau où elle participe à la fragmentation de l'ADN ainsi qu'à la condensation de la chromatine (Daugas *et al.*, 2000; Susin *et al.*, 1999). Il a été démontré que l'inhibition partielle de l'expression de AIF permet de protéger de la mort différents modèles neuronaux

suite à l'exposition au MMP⁺ (Liou *et al.*, 2005) ou à des différents agonistes des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Wang *et al.*, 2004). Cependant, les mécanismes de fragmentation d'ADN et de condensation de chromatine par AIF demeurent peu caractérisés. Il a par contre été démontré que AIF peut se lier à l'ADN (Vahsen *et al.*, 2006) et recruterait la CyclophilinA qui elle induirait les dommages à l'ADN (Cande *et al.*, 2004).

Globalement, la mitochondrie est une organelle centrale dans différentes PCD puisqu'elle intègre différentes voies de signalisation qui comportent les cascades de caspases, les stress oxydatifs et de Ca²⁺ originant du RE, ainsi que les différents membres de la famille des Bcl2. De plus, elle participe à la libération de plusieurs effecteurs de PCD, dépendants (e.g. CytC, Smac) ou indépendants (e.g. AIF) des caspases, ce qui fait de sa perméabilisation (MOMP ou mPTP) un point de non-retour qui mène à la mort de la cellule (Green *et* Kroemer, 1998; Green *et* Kroemer, 2004)

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les Coronavirus humains sont des pathogènes respiratoires dont les propriétés neurotropes et neuroinvasives ont été clairement établies, autant chez des modèles murins que chez l'humain. Il est clair aujourd'hui qu'ils peuvent être responsables de neuropathologies chez la souris, en induisant autant une encéphalite aiguë qu'une maladie démyélinisante. De plus, tel que décrit précédemment, les Coronavirus humains, et particulièrement la souche OC43, pourraient causer des maladies neurodégénératives chez l'humain. Cependant, aucune recherche n'avait été faite à ce jour afin de déterminer la réponse cellulaire de la cible principale de l'infection par HCoV-OC43 : le neurone.

Considérant que 1) le neurone est la cible principale de l'infection par HCoV-OC43, et que 2) HCoV-OC43 peut induire des neuropathologies en souris, ces travaux découlent de l'hypothèse que l'étude de la réponse neuronale à l'infection pourrait permettre d'expliquer les mécanismes intra-cellulaires menant subséquemment au processus neurodégénératif.

Ainsi, ces travaux avaient pour premier objectif de définir la modulation globale du transcriptome neuronal suite à l'infection par HCoV-OC43 et de classifier en groupes fonctionnels les différents gènes régulés afin d'élaborer les hypothèses subséquentes du projet.

Considérant que parmi la modulation des gènes étudiés, certains étaient liés à la *Unfolded Protein Response* et que plusieurs publications scientifiques associaient de plus en plus celle-ci à certaines maladies neurodégénératives, l'hypothèse a été émise que cette voie métabolique pourrait être activée chez le neurone infecté. Ainsi, il a été établi de définir l'activation de cette voie chez le neurone infecté par HCoV-OC43.

De plus, puisque la viabilité neuronale était affectée suite à l'infection, il apparaissait important de définir quelles voies métaboliques liées à l'induction de la mort cellulaire étaient responsables de cette diminution de viabilité.

Finalement, puisque la glycoprotéine S est un déterminant viral majeur de la neuropathogenèse induite par les Coronavirus et que le laboratoire du Dr Pierre Talbot a pu mettre en évidence des mutations ponctuelles, acquises en infection persistante de cellules neurales humaines, pouvant moduler la neuropathologie en souris, l'impact de ces deux mutations sur la réponse et la viabilité neuronale a également été étudié à l'aide d'un mutant viral recombinant en parallèle à la souche virale sauvage.

CHAPITRE 2

ARTICLES

Publication No.1

Virology, Décembre 2009, p.255-267, Vol. 395

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.

Un variant du Coronavirus humain OC43 comportant des mutations dans la protéine S associées à la persistance induit différemment la *Unfolded Protein Response* chez le neurone humain comparé au virus de souche sauvage

Dominique J. FAVREAU ¹, Marc DESFORGES ¹, Julien R. ST-JEAN ¹ and Pierre J. TALBOT ^{1*}

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Quebec, Canada

*Auteur pour correspondance

Adresse: INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec

531 boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7

Téléphone: 450-687-5010 poste 4300

Télécopieur: 450-686-5501

Courriel: pierre.talbot@iaf.inrs.ca

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Dominique J. Favreau : Élaboration des hypothèses, conception de la méthodologie, réalisation des expériences, écriture du manuscript et des réponses aux réviseurs.

Marc Desforges : Appui et collaboration à la conception de la méthodologie et à la réalisation des expériences, révision du manuscript et des réponses aux réviseurs.

Julien R. St-Jean : Étudiant au doctorat ayant identifié les mutations acquises en persistance et ayant construit le clone recombinant de HCoV-OC43.

Pierre J. Talbot : Directeur de recherche et supervision de l'ensemble des travaux de recherche. Révision du muscript et des réponses aux réviseurs.

RÉSUMÉ

Nous avons précédemment démontré que le Coronavirus respiratoire humain OC43 (HCoV-OC43) est neurotrophe et neuroinvasif chez l'humain et la souris et que le neurone est la cible principale de l'infection chez la souris, menant à une maladie neurodégénérative. Nous démontrons maintenant qu'un variant de HCoV-OC43, comportant deux mutations ponctuelles au sein de la glycoprotéine S acquises en persistance (H183R et Y241H), induit fortement la *Unfolded Protein Response* (UPR) et une atténuation de la traduction chez les neurones humains infectés. La voie IRE1/XBP1 est principalement activée, suivi par l'activation de la caspase-3 et la fragmentation nucléaire, alors que l'activation des voies ATF6 et eIF2-alpha n'est pas significative. Nos résultats démontrent l'importance de mutations spécifiques associées à la glycoprotéine S dans l'interaction neurone-virus qui mènent à une augmentation de la production de protéines virales et de particules infectieuses, une activation prononcée de la UPR, ainsi qu'une cytopathie et mort cellulaire plus importante. Considérant que ce virus mutant est plus neurovirulent en souris, nos résultats suggèrent que ces deux mutations ponctuelles pourraient moduler la neuropathogenèse virale.

ABSTRACT

We have reported that human respiratory coronavirus OC43 (HCoV-OC43) is neurotropic and neuroinvasive in humans and mice, and that neurons are the primary target of infection in mice, leading to neurodegenerative disabilities. We now report that an HCoV-OC43 mutant harboring two persistence-associated S glycoprotein point mutations (H183R and Y241H), induced a stronger unfolded protein response (UPR) and translation attenuation in infected human neurons. There was a major contribution of the IRE1/XBP1 pathway, followed by caspase-3 activation and nuclear fragmentation, with no significant role of the ATF6 and eIF2-alpha/ATF4 pathways. Our results show the importance of discrete molecular viral S determinants in virus–neuronal cell interactions that lead to increased production of viral proteins and infectious particles, enhanced UPR activation, and increased cytotoxicity and cell death. As this mutant virus is more neurovirulent in mice, our results also suggest that two mutations in the S glycoprotein could eventually modulate viral neuropathogenesis.

INTRODUCTION

Human coronaviruses (HCoV) are enveloped positive-stranded RNA viruses and known respiratory pathogens (Talbot *et al.*, 2008) with neurotropic and neuroinvasive properties (Arbour *et al.*, 2000 and Bonavia *et al.*, 1997). Indeed, we reported that the OC43 strain (HCoV-OC43) could infect and persist in human neural cell lines (Arbour *et al.*, 1999), and infect primary human and murine central nervous system (CNS) cultures (Bonavia *et al.*, 1997 and Jacomy *et al.*, 2006). Moreover, neurons were the main target of infection in the murine CNS (Jacomy *et al.*, 2006), as well as in human co-cultures of neurons and astrocytes (M. Desforges and P.J. Talbot, unpublished data). Furthermore, HCoV-OC43 induced a chronic encephalitis in susceptible mice (Jacomy *et al.*, 2006), HCoV RNA was detected in human brains (Arbour *et al.*, 2000) and HCoV-OC43 was associated with acute disseminated encephalomyelitis (Yeh *et al.*, 2004). Considering that murine hepatitis virus, MHV, the murine counterpart of HCoV-OC43, causes neurological disease in mice (Buchmeier *et al.*, 1987), we hypothesized that HCoV-OC43 might be associated with some human neurological diseases.

In several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) (Imaizumi *et al.*, 2001) and Parkinson's disease (PD) (Imai *et al.*, 2000), neuronal death has been linked to endoplasmic reticulum (ER) stress. Defects in neuronal ER function can lead to accumulation of misfolded proteins and activate the unfolded protein response (UPR), usually leading to the recovery of ER homeostasis (Ron and Walter, 2007). On the other hand, impaired UPR activation was recently associated with human neurological diseases (Antony *et al.*, 2007, Lindholm *et al.*, 2006 and Paschen, 2003).

So far, three pathways have been identified to play a role in the UPR, namely ATF6, PERK/eIF2-alpha and IRE1/XBP1 (Ron and Walter, 2007). These pathways are activated when the UPR regulatory protein, GRP78, is delocalized from its inhibitory sites on the ER-stress-sensor proteins, ATF6, PERK and IRE1 (Ron and Walter, 2007).

ATF6 is a major transcriptional factor that leads to upregulation of chaperones involved in the recovery of ER protein folding capacity (Ron and Walter, 2007). PERK is activated following homodimerization and plays a major role in the phosphorylation of the translation initiation factor eIF2-alpha (Shi *et al.*, 1998). IRE1 is an endoribonuclease and

kinase which undergoes oligomerization and autophosphorylation, leading to its activation following UPR induction (Tirasophon *et al.*, 1998, Tirasophon *et al.*, 2000 and Yoshida *et al.*, 2001). IRE1 is responsible for the unconventional splicing of Xbp1(u) mRNA by excising an 26-nucleotide intron, yielding the Xbp1(s) mRNA form (Yoshida *et al.*, 2001). Xbp1(s) is translated into a transcription factor, XBP1, which translocates to the nucleus (Yoshida *et al.*, 2001). XBP1 induces the expression of genes related to proteasomal degradation of proteins (Yamamoto *et al.*, 2004). XBP1 may also promote the expression of the genes Grp94, an ER chaperone (Yamamoto *et al.*, 2004), and Chop (Lee *et al.*, 2003). XBP1 is also known to solely induce the expression of P58-ipk, an inhibitor of PERK kinase activity (Lee *et al.*, 2003), preventing its ability to phosphorylate eIF2-alpha.

The UPR has been shown to be induced by a number of viruses, such as human cytomegalovirus (Isler *et al.*, 2005), herpes simplex virus (Cheng *et al.*, 2005), hepatitis C virus (Tardif *et al.*, 2002), Japanese encephalitis virus (Yu *et al.*, 2006), Borna disease virus (Williams and Lipkin, 2006), Dengue virus (Umareddy *et al.*, 2007), SARS-CoV (Chan *et al.*, 2006) and MHV (Bechill *et al.*, 2008). Various viruses have evolved different strategies to modulate its activation and/or benefit from it. Interestingly, the S proteins of the coronaviruses MHV (Versteeg *et al.*, 2007) and SARS-CoV (Chan *et al.*, 2006) were shown to induce UPR within cells. Even though the involvement of the coronavirus S protein in neurovirulence (Phillips *et al.*, 1999) and the UPR in neurological diseases (Lindholm *et al.*, 2006) have been suggested, no studies have, to our knowledge, been performed to identify specific amino acid residues within the S protein which would differ between coronavirus variants and correlate with an increased neurovirulence and UPR activation.

Consequently, UPR activation within human neurons following infection by HCoV-OC43 was examined in the human neuronal models, the NT2-N (Pleasure and Lee, 1993) and the LA-N-5 (Hill and Robertson, 1998), in order to study pathways that might ultimately be involved in coronavirus-induced neurological diseases. Two HCoV-OC43 point mutations that reproducibly appeared upon persistent infection of human neural cell lines (H183R and Y241H) were introduced into an infectious cDNA clone (St-Jean *et al.*, 2006) and generated an HCoV-OC43 variant which induced an increased UPR within infected human neurons, an interesting fact as this variant showed enhanced neurovirulence in mice (H. Jacomy and P. J. Talbot, submitted for publication).

RESULTS

Human differentiated neuronal cell lines were susceptible to a productive HCoV-OC43 infection. As we have previously shown that neurons are the main target of HCoV-OC43 infection in the mouse CNS (Jacomy and Talbot, 2003) and in NT2-N/human primary astrocytes co-cultures (M. Desforges and P. J. Talbot, unpublished data), we sought to study the early cellular events occurring in human neurons after HCoV-OC43 infection. First, we evaluated the susceptibility of the two well-characterized differentiated human neuronal cell lines NT2-N (Pleasure and Lee, 1993) and LA-N-5 (Hill and Robertson, 1998) to HCoV-OC43 (ATCC strain) infection. Immunofluorescence analysis confirmed the neuronal nature of the cells, as revealed by the detection of specific neuronal markers, NFM for LA-N-5 and β -tubIII for NT2-N (Fig. 1A, panels a and b), and their susceptibility to HCoV-OC43 infection was demonstrated by the detection of viral antigens (Fig. 1A, panels c and d). Furthermore, the infection was shown to be productive, as demonstrated by the increase in infectious HCoV-OC43 progeny virions in cell culture medium over a period of 72 h post-infection (Fig. 1B).

Infection of human neurons by HCoV-OC43 modulated the expression of 275 genes. In order to study the early cellular events occurring in human neurons following HCoV-OC43 infection, we investigated the transcriptomic profile of neurons at 24, 48 and 72 h post-infection, as compared to mock-infected cells. Total RNA of NT2-N cells was extracted and linearly amplified mRNAs were hybridized on microarray chips representing 22,000 human transcripts. Considering that Cy3-CTP and Cy5-CTP do not incorporate at the same rate during the amplification stage, we performed duplicate microarray experiments in dye-swap to prevent label-bias in analysis (Tseng *et al.*, 2001). Results of internal chip controls showed a correlation of more than 95% compared to their expected modulation, confirming the reliability of our modulation results (data not shown). We identified a total of 275 genes, the expression of which was significantly modulated at 24, 48 and/or 72 h post-infection, in at least two independent infections, with a maximum p-value of 0.05. The transcriptomic profile showed a diversity in the modulation of expression of genes that we grouped into nine major cellular functional groups (Fig. 2)

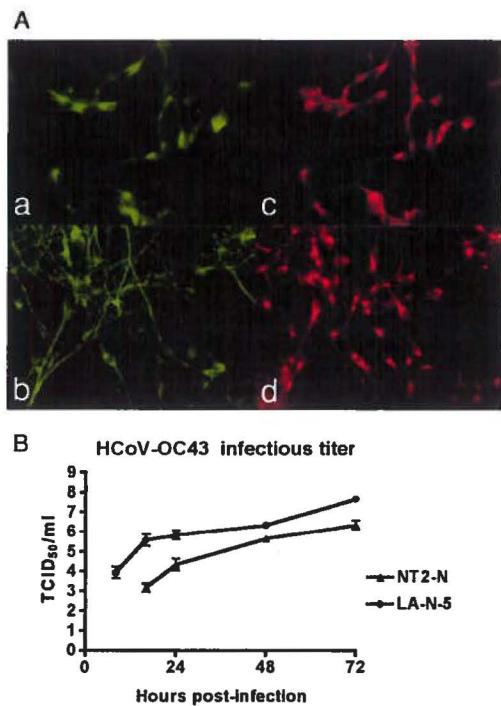


Figure 1. Human differentiated neuronal cell lines were susceptible to a productive HCoV-OC43 infection. (A) Immunofluorescence on cell lines differentiated into human neurons, LA-N-5 (panels a and c) and NT2-N (panels b and d), using specific neuronal markers NFM (panel a) and β -tub isoform III (panel b), or detection of HCoV-OC43 (panels c and d). (B) Production of infectious HCoV-OC43 particles in supernatants of infected LA-N-5 and NT2-N cell lines differentiated into human neurons.

Infection of both NT2-N and LA-N-5 human neurons by HCoV-OC43 led to the modulation of expression of a subset of genes related to the unfolded protein response. Analysis of the transcriptomic profile revealed a modulation of expression of several genes in the Biosynthesis and Degradation functional group (Fig. 2) that are related to the unfolded protein response (UPR), which can be activated by different types of stress, including viral infection. The UPR occurring in human neurons is also associated with various neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (Imaiizumi *et al.*, 2001) and Parkinson's disease (Imai *et al.*, 2000). Moreover, some studies also indicated that ER stress induced in neurons might underlie the neuropathological mechanisms leading to neuronal injury (Paschen, 2001). Therefore, we sought to analyze the activation of the three UPR pathways, namely ATF6, PERK/eIF2-alpha and IRE1/XBP1.

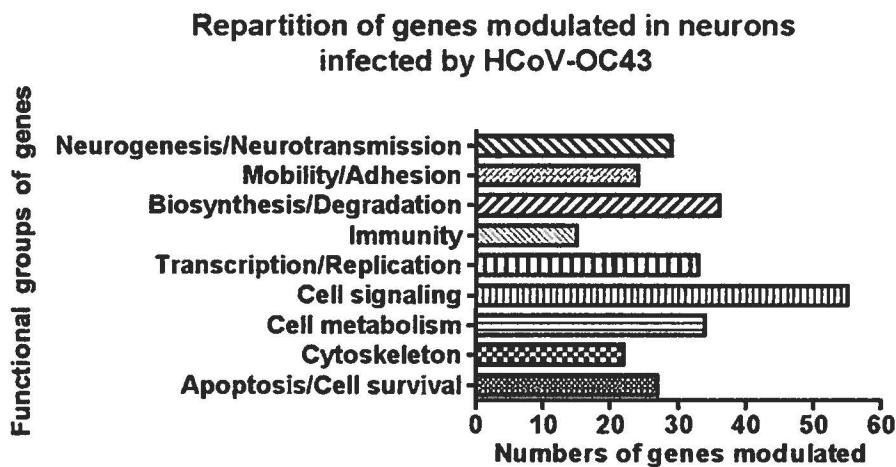


Figure 2. Distribution of the 275 genes which expression was modulated in the human NT2-N neuronal cell line at 24, 48 or 72 h after infection with HCoV-OC43, grouped into nine major cellular functional groups. Neurogenesis/neurotransmission: 29 genes; mobility/adhesion: 24 genes; biosynthesis/degradation: 36 genes; immunity: 15 genes; transcription/replication: 33 genes; cell signaling: 55 genes; cell metabolism: 34 genes; cytoskeleton: 22 genes; apoptosis/cell survival: 27 genes.

First, the modulation of expression of genes related to the UPR revealed by our microarray experiments, was confirmed by quantitative PCR in both NT2-N and LA-N-5 cells. Total RNA was reverse-transcribed before performing real-time quantitative PCR, using primers specific to each gene of interest (Supplementary data 1). Our results showed a high correlation between the NT2-N and LA-N-5 neuronal models in the modulation of expression of UPR-related genes following HCoV-OC43 infection (Table 1). The degree of induction (fold-induction) in the expression of the *Atf4*, *Erdj3*, *Erdj4*, *Gadd34*, *Grp78* and *Grp94* genes clearly indicated a significant similarity between the response of both NT2-N and LA-N-5 cells, establishing a relevant consistency between the two models (Table 1). Moreover, even though there were some differences in the degree of induction of gene expression in the two cell lines for the *Chop*, *Edem*, *Herp*, *P58-ipk* and *Xbp1* genes, an upregulation was always observed over the time-course of HCoV-OC43 infection (Table 1). Indeed, the trend in the modulation of expression of these genes followed the same pattern in both NT2-N and LA-N-5 cells, which again revealed a consistency in the state of activation of the underlying pathways.

Gene name	Common gene name	Gene ID	24 h post-infection			48 h post-Infection			72 h post-infection		
			Microarray	qPCR NT2-N	qPCR LA-N-5	Microarray NT2-N	qPCR NT2-N	qPCR LA-N-5	Microarray	qPCR NT2-N	qPCR LA-N-5
			NT2-N			NT2-N		NT2-N	NT2-N		
ATF4	ATF4	NM_001675	- ^b	1.12	1.11	3.38	3.47	1.63	2.49	2.58	3.25
DDIT3	CHOP	NM_004083	- ^b	1.30	1.54	3.69	4.59	6.38	2.22	5.10	12.24
EDEM1	EDEM1	NM_014674.1	- ^b	1.20	1.13	- ^b	5.54	4.56	- ^b	5.00	15.38
DNAJB11	Erdj3	NM_016306	- ^b	1.14	1.13	3.49	3.20	1.91	3.02	2.64	4.22
DNAJB9	Erdj4	NM_012328	2.07	1.34	1.16	5.02	5.45	2.73	3.25	4.83	4.42
PPM1R15A	CADD34	NM_014330.3	- ^b	1.06	1.13	- ^b	3.02	3.14	- ^b	3.20	7.00
HSP90AS	GRP78	NM_005347.2	- ^b	0.75	0.95	- ^b	1.58	1.23	- ^b	1.18	1.72
HSP90B1	GRP94	NM_003299.1	- ^b	1.11	1.03	6.56	3.59	2.18	4.50	3.05	3.77
HERPDU1	HERPDU1	NM_014685	2.08	1.55	1.87	8.88	5.83	9.06	4.23	5.13	35.10
DNAJC3	P58-IPK	NM_006260	- ^b	1.54	1.16	3.56	8.09	15.85	- ^b	8.51	17.51
XBP1	XBP1(s)	NM_001079539.1	- ^b	2.17	2.46	- ^b	13.99	15.56	- ^b	5.24	26.35

Table 1. Time-course of gene expression related to the unfolded protein response within human neurons infected by HCoV-OC43. a Numbers represent the degree of induction (fold-induction) of each gene in HCoV-OC43 infected NT2-N or LA-N-5 cells, at the indicated times post-infection, as revealed by either microarray or real-time quantitative PCR (qPCR). b Gene is not significantly modulated according to microarray results.

A recombinant HCoV-OC43 used to study the impact of the S glycoprotein on UPR activation showed increased viral replication within infected neurons but no difference in the kinetics of replication in cell culture, as compared to HCoV-OC43 wild-type. Previous studies have reported that the S protein of coronaviruses can alone induce the UPR within cells (Chan *et al.*, 2006 and Versteeg *et al.*, 2007). Consequently, we sought to determine whether a HCoV-OC43 variant harboring mutations within the S protein related to enhanced neurovirulence in mice (H. Jacomy and P. J. Talbot, submitted for publication), could differentially induce the UPR in human neurons, compared to the so-called HCoV-OC43 wild-type, which we obtained several years ago from the ATCC. Two point mutations (H183R and Y241H) identified in the S protein of a HCoV-OC43 variant obtained from persistently infected human neural cell lines were introduced into the HCoV-OC43 genome using our full-length cDNA clone pBAC-OC43FL (St-Jean *et al.*, 2006), yielding a recombinant virus which we designated HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}. Before analyzing the effects of these mutations on UPR activation, we sought to determine whether both viruses showed similar kinetics of replication and dissemination in cell culture. The production of extra- and intra-cellular infectious viral particles was evaluated at 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 and 72 h post-infection. No differences in extra-cellular infectious titers were observed between HCoV-OC43 wild-type and HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} (Fig. 3A, left panel). However, a significant increase in the production of intra-cellular infectious viral particles was noted for

HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} as compared to HCoV-OC43 wild-type (Fig. 3A, right panel). Moreover, cells infected by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} produced more viral S proteins, as shown by flow cytometry at 24 h post-infection (Fig. 3C) and by immunofluorescence revealed by microscopic observation (Fig. 3B). We then assessed the percentage of infected cells at 4, 16 and 24 h post-infection by flow cytometry and found that there were no differences between the two viruses in their spread in the neuronal cultures, as the percentage of infected cells was not significantly different (Fig. 3D). Globally, our data indicate that the two viruses have the same capacity to release infectious particles in the cell medium and that their kinetics of dissemination within neuronal cultures were comparable. However, we did observe a significant increase in the amount of viral proteins and infectious viral particles within cells infected by the variant HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}.

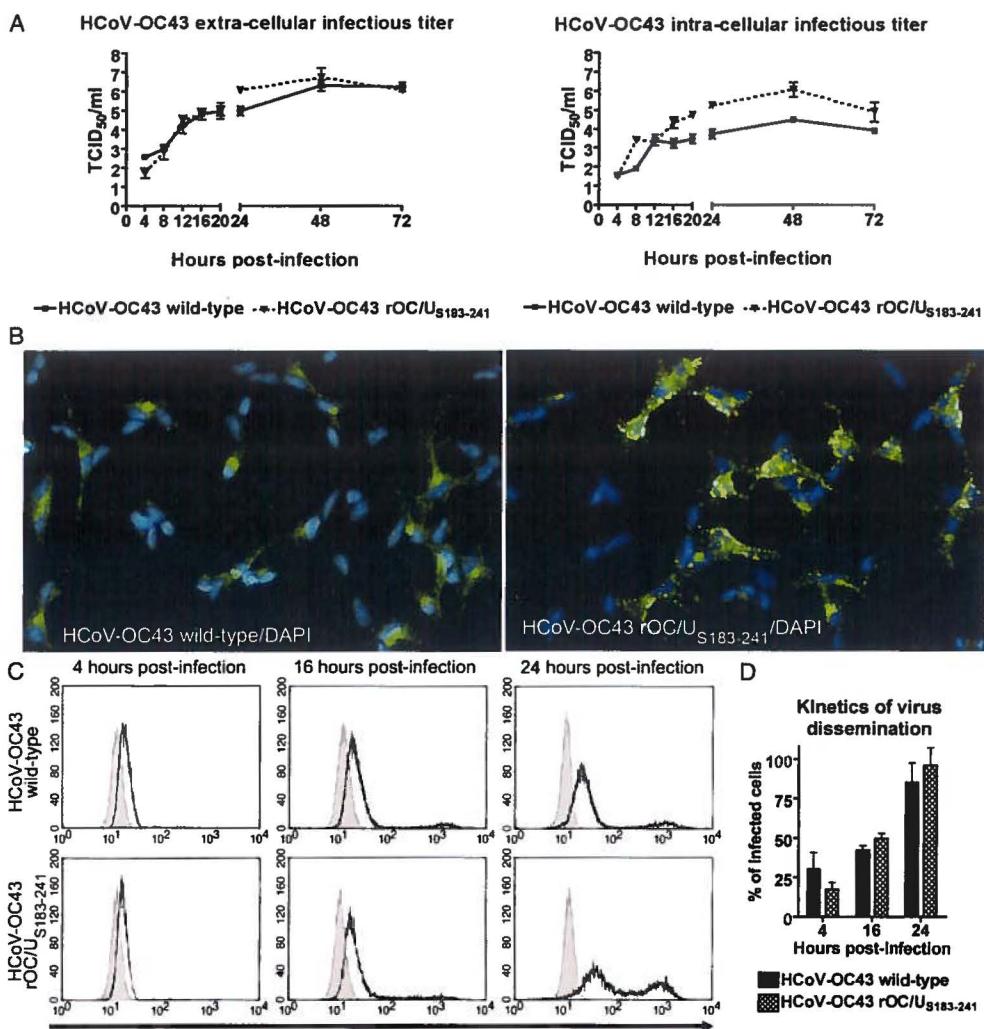


Figure 3. A recombinant HCoV-OC43 with two point mutations within the S protein showed increased viral replication within infected neurons but no difference in the kinetics of replication in cell culture compared to HCoV-OC43 wild-type. LA-N-5 cells were infected with HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant for 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 or 72 h. (A) Production of viral infectious particles. Supernatants and cells were separately harvested and titers of extra-and intra-cellular viral infectious particles were assayed. (B) Detection of viral antigens within neurons infected by HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}. Merged images of immunofluorescence of LA-N-5 differentiated into human neurons infected with HCoV-OC43 wild-type (left panel) or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} (right panel) showing HCoV-OC43 antigens (green) and DAPI (blue). (C) Kinetics of infection of neurons. Neurons were infected and, at the indicated times post-infection, fixed, permeabilized, labeled with antibody directed against HCoV-OC43 or HCoV-229E (isotype control) and labeled with secondary antibody AlexaFluor 488 anti-mouse. Grey area represent cells labeled with isotype control antibody and white area represent cells labeled with HCoV-OC43 antibody. (D) Percentage of infected neurons. Percentage of cells labeled with HCoV-OC43 antibody were quantified considering the background established with cells labeled with HCoV-229E isotype control antibody.

The ATF6 pathway in human neurons is functional and was activated by thapsigargin but not by infection with HCoV-OC43 wild-type and the HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant. In order to decipher which branches of the UPR were activated after infection, the ATF6 pathway was first examined as it is involved in the expression of ER chaperones, leading to an increase of protein folding capacity of the cell. During the course of UPR, ATF6 is cleaved within the Golgi, leading to the appearance of ATF6 transcriptional factors, which are translocated to the nucleus where they mainly bind cis-acting ER stress-response element (ERSE) (Okada *et al.*, 2002). As the Grp78 gene is a major target of ATF6 and a central effector of the UPR, its expression was assessed by quantitative real-time PCR to determine the degree of activation of the ATF6 pathway. Infection of neurons with HCoV-OC43 wild-type did not result in any significant modulation of the expression of Grp78 (Fig. 4A). On the other hand, infection with HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} did result in a 3-fold transient increase of Grp78 expression (Fig. 4A). The level of expression of the corresponding GRP78 protein

was examined by Western blotting but no significant difference in the expression of the GRP78 protein between mock-infected cells and infected cells by either HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} was detected (Fig. 4B). Thapsigargin-treated cells were used a positive control and did demonstrate the capacity of the neuronal cells to express GRP78 following activation of the UPR (Fig. 4B). As Grp78 is the major gene modulated by the ATF6 pathway of the UPR, our data indicate that the ATF6 pathway is functional in the LA-N-5 cells but that it did not play a significant role in the UPR induced by infection with either virus.

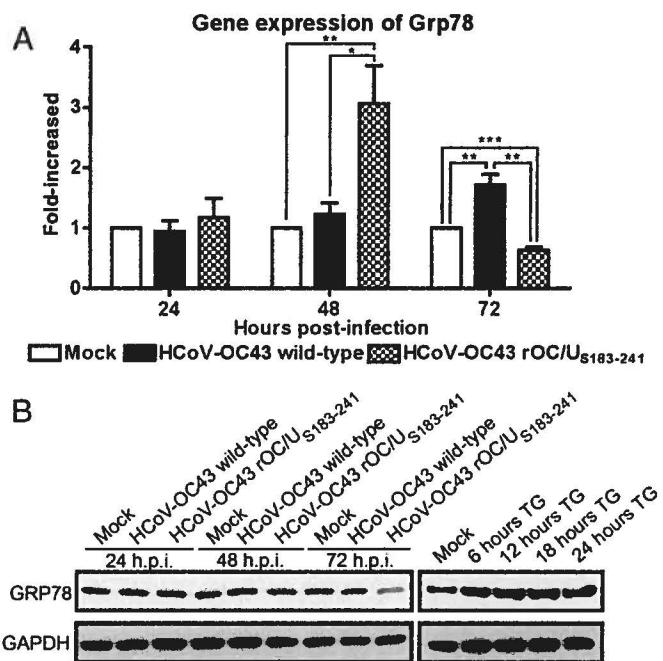


Figure 4. The ATF6 pathway was not activated following infection of human neurons with HCoV-OC43 wild-type and HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant. LA-N-5 cells were infected with HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant for 24, 48 or 72 h, or incubated in presence of 2 μ M of thapsigargin for 6, 12, 18 or 24 h. (A) Grp78 gene expression analysis. Total RNA extracted was reverse-transcribed and mRNA expression was evaluated by quantitative PCR compared to mock-infected cells. Gapdh expression was used for normalization. Statistical significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. (B) GRP78 protein expression analysis. Whole cell lysates were subjected to Western blot analysis using antibody directed against GRP78. GAPDH served as a loading control. Thapsigargin-treated samples served as a positive control.

Infection of human neurons with the HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant led to a stronger protein synthesis attenuation compared to infection with HCoV-OC43 wild-type. Another UPR pathway potentially activated following ER stress is PERK/eIF2-alpha. The ER sensor PERK induces the phosphorylation of the eIF2-alpha translation initiation factor in order to reduce total protein synthesis. As other coronaviruses are known to induce eIF2-alpha phosphorylation and attenuation of protein synthesis (Bechill *et al.*, 2008), we investigated whether HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} could do the same. Western blot analysis showed that eIF2-alpha was only transiently phosphorylated at 24 h post-infection by both viruses and that the phosphorylation state of eIF2-alpha then returned to its basal level within 48 h post-infection, as compared to mock-infected cells (Fig. 5A). The use of thapsigargin-treated cells indicated that eIF2-alpha could indeed be phosphorylated in neurons during the activation of the UPR (Fig. 5A).

The total neuronal translational activity was determined by [³⁵S]cysteine/methionine incorporation into proteins to determine whether the transient phosphorylation of eIF2-alpha could lead to an attenuation of mRNA translation. Strikingly, no significant decrease in protein translation was observed following infection by both viruses at 24 h post-infection, as compared to mock-infected cells, as revealed by autoradiographic gel and quantified after TCA precipitation (Fig. 5B and 5C). The three intense bands present only in infected-cells, which likely correspond to the viral S, N and M proteins, showed a stronger expression in cells infected by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} at 24 h post-infection, which correlates with our observations of intra-cellular infectious viral titers (Fig. 3A), immunofluorescence (Fig. 3B) and flow cytometry (Figs. 3C and D). Thapsigargin-treated cells served as a positive control of protein synthesis inhibition, demonstrating that repression of mRNA translation could indeed occur in neurons. Staining of the gel with Coomassie blue was used as a loading control (data not shown). Altogether, these results suggest that translational repression observed after 24 h post-infection was not a consequence of an activated PERK/eIF2-alpha pathway. Moreover, translation attenuation started only at 72 h post-infection for HCoV-OC43 wild-type, in comparison to 48 h post-infection for HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}. These results demonstrate that only two point mutations in the S protein of HCoV-OC43 can result in a different kinetics of total protein synthesis attenuation following infection.

In order to confirm that the observed protein synthesis attenuation was not a consequence of cell death, cell viability was assessed. Data at 48 and 72 h post-infection showed that this attenuation preceded the loss of cell viability (Figs. 5C and D), suggesting that the reduction of protein synthesis preceded cell death and therefore was not only its consequence.

Infection of human neurons with the HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant led to a stronger activation of the expression of genes Chop and Gadd34, compared to infection with HCoV-OC43 wild-type. Considering the transient phosphorylation of eIF2-alpha (Fig. 5A), the activation of related UPR factors was examined. Atf4 mRNA is known to be preferentially translated into a transcription factor when eIF2-alpha is phosphorylated (Harding *et al.*, 2000). Considering that the ATF4 protein regulates the expression of the Gadd34 and Chop genes, respectively involved in the dephosphorylation of eIF2-alpha (Novoa *et al.*, 2001) and in the induction of apoptosis (Matsumoto *et al.*, 1996 and Zinszner *et al.*, 1998), the potential modulation of expression of these genes was analyzed by quantitative PCR. Our results revealed clear differences in the kinetics of induction of the Chop gene expression after infection with HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} (Fig. 6A). Chop was strongly induced at 48 h post-infection by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} and its expression decreased at 72 h post-infection. On the other hand, infection with HCoV-OC43 wild-type led to a constantly increasing level of the Chop gene up to 72 h post-infection, but to a lower level than for HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}.

Even though Gadd34 expression is also considered to be regulated by ATF4, its expression followed a different kinetics. Both HCoV-OC43 wild-type and HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} induced the upregulation of Gadd34, which expression gradually increased up to 72 h post-infection (Fig. 6A), with a more pronounced induction after infection by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}. Even though there was no significant level of phosphorylated eIF2-alpha at 48 and 72 h post-infection (Fig. 5A), the level of expression of the ATF4 protein was evaluated to determine whether the expression of the Chop and Gadd34 genes could be linked to this protein.

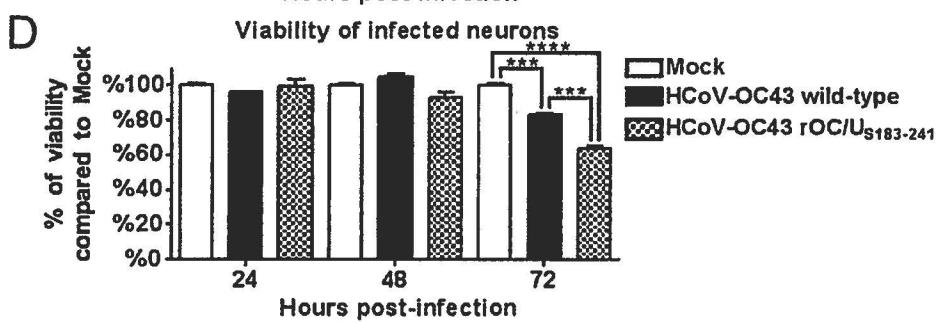
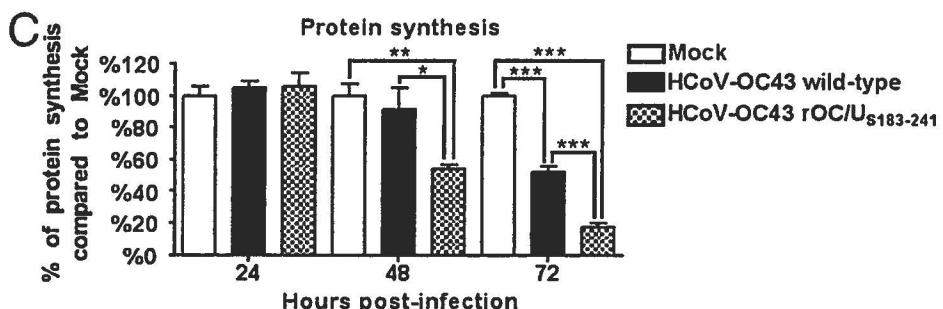
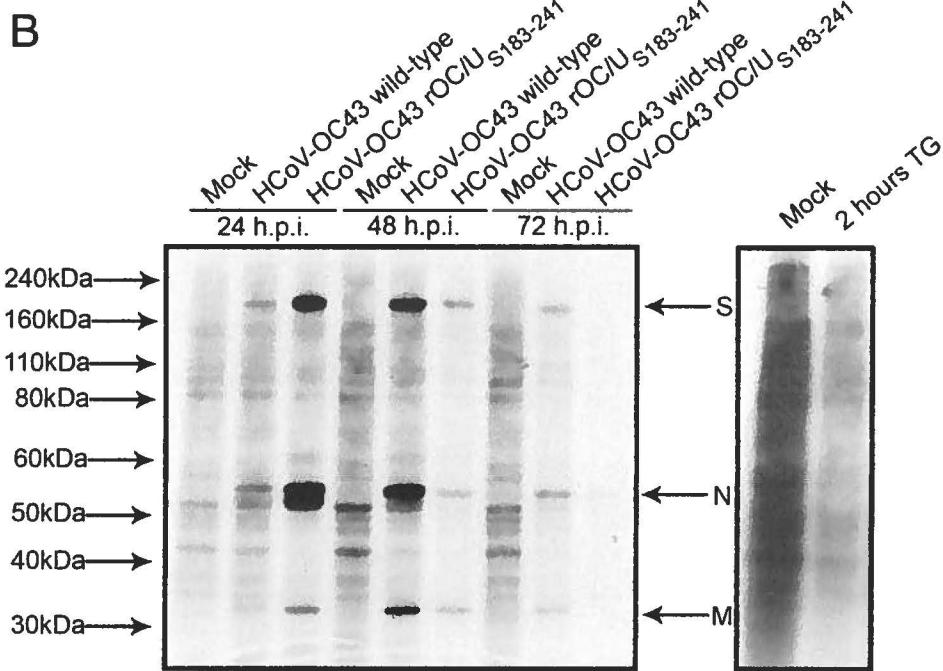
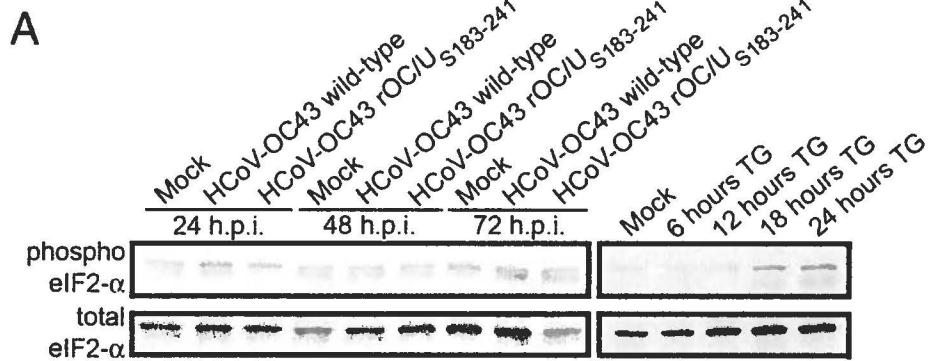


Figure 5. Infection of human neurons with the HCoV-OC43 rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ variant led to a stronger protein translation attenuation, as compared to HCoV-OC43 wild-type. The LA-N-5 cells were infected with HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ for 24, 48 or 72 h, or incubated in the presence of 2 µM of thapsigargin for 2 h. (A) eIF2-alpha phosphorylation-state analysis. Whole cell lysates were subjected to Western blot analysis using antibody directed against Ser52-phosphorylated eIF2-alpha. Total eIF2-alpha served as a loading control. Thapsigargin-treated samples served as a positive control. (B and C) Protein synthesis analysis. Cell cultures were starved for cysteine and methionine for 30 min, then incubated with ³⁵S-radiolabeled cysteine/methionine for 15 min and harvested. Whole cell lysates were assayed for cpm (C) counts and resolved on a 4–12% polyacrylamide gel (B). Thapsigargin-treated cells served as a translational shutoff control. (D) Cell viability assay. Cell cultures were incubated with the MTS/PMS solution and absorbance was read at 492 nm. Cell viability is expressed as a relative percentage compared to mock-infected cells. Statistical significance: *p < 0.05; **p < 0.001; ***p < 0.0001; ****p < 0.00001.

We were not able to detect any expression of the ATF4 protein following infection by both viruses (Fig. 6B). The level of expression of the CHOP and GADD34 proteins was then assessed to verify whether the observed increase in expression of the corresponding gene led to an increase in the amount of the corresponding protein. Strikingly, no increase in the CHOP protein was observed even though we observed a 50-fold increase in gene expression at 48 h post-infection by HCoV-OC43 rOC/US₁₈₃₋₂₄₁, compared to mock-infected cells. On the other hand, a slight increase in the amount of GADD34 protein could be detected at 72 h after infection by HCoV-OC43 rOC/US₁₈₃₋₂₄₁. Thapsigargin-treated cells were used as a positive control to demonstrate that neurons could indeed be induced to up-regulate expression of these proteins. Our results indicate again that two mutations within the S protein of HCoV-OC43 led to a different kinetics of induction of the UPR.

The IRE1/XBP1 pathway was differentially activated following infection of human neurons by the HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant, as compared to infection with HCoV-OC43 wild-type. The IRE1/XBP1 pathway was then studied to complete the portrait of the UPR induced in human neurons after infection with HCoV-OC43. Following its activation by ER stress, IRE1 induces an unconventional splicing of Xbp1(u) mRNA, producing the Xbp1(s) form lacking 26 nucleotides (Yoshida *et al.*, 2001), which leads to translation of the transcriptional factor XBP1, that binds to ERSE, ERSE-II and UPR element (UPRE) (Yamamoto *et al.*, 2004) within the promoter of a series of specific genes. Consequently, XBP1 is involved in the expression of ERAD-related genes, such as Edem and Herp (Kim *et al.*, 2008 and Olivari *et al.*, 2006), chaperones such as Grp94 (Lee *et al.*, 2003), and P58-ipk (Lee *et al.*, 2003 and van Huizen *et al.*, 2003), an inhibitor of eIF2-alpha phosphorylation.

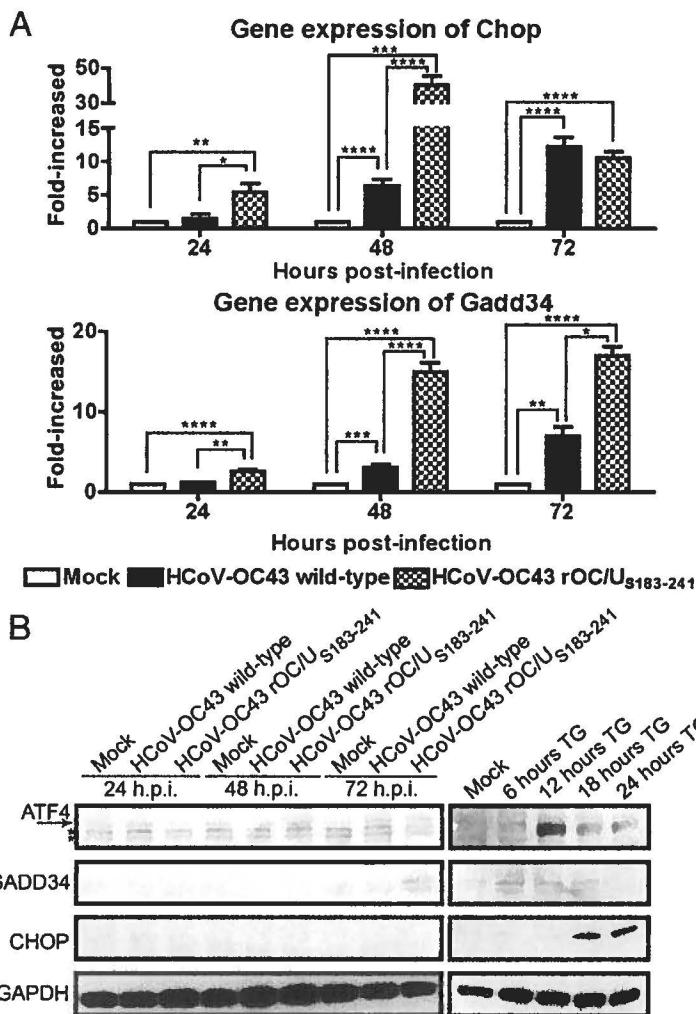


Figure 6. Infection of human neurons with the HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant strongly induced expression of genes Chop and Gadd34, compared to HCoV-OC43 wild-type. The LA-N-5 cells were infected with HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} for 24, 48 or 72 h, or incubated in presence of 2 μ M of thapsigargin for 6, 12, 18 or 24 h. (A) Chop and Gadd34 gene expression analysis. Total RNA was extracted and reverse-transcribed and mRNA expression was evaluated by quantitative PCR compared to mock-infected. Gapdh expression was used for normalization. Statistical significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. (B) ATF4, CHOP and GADD34 protein expression analysis. Whole cell lysates were subjected to Western blot analysis using antibody directed against ATF4, CHOP or GADD34. GAPDH served as a loading control. Thapsigargin-treated samples served as a positive control. *Non-specific bands on ATF4 Western blot.

As our microarray results revealed a modulation of these four genes that are under the control of XBP1, the potential modulation of their expression was confirmed by quantitative PCR following infection by HCoV-OC43 wild-type and HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} (Fig. 7A). Our results also showed clear differences in the kinetics of induction of these genes by the two viruses. Expression of the Edem, Herp, Grp94 and P58-ipk genes was induced within 24 h post-infection by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}, and decreased at 72 h post-infection. On the other hand, HCoV-OC43 wild-type infection led to a continuous but lower increase over the course of infection, at least up to 72 h post-infection. This led us to assess the increase of Xbp1(s) mRNA by quantitative PCR, with primers spanning the 26-nucleotide intron (Hirota *et al.*, 2006), and measure the increase of the Xbp1(s) mRNA concurrently to the decrease of the Xbp1(u) form by RT-PCR, with primers flanking the 26-nucleotide intron (Hirota *et al.*, 2006) (Figs. 7A and B). Our results clearly showed a strong increase in the Xbp1(s) form at 24 and 48 h after infection by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}, followed by a subsequent decrease. On the other hand, infection by HCoV-OC43 wild-type resulted in a constant but slower increase in the amount of Xbp1(s) form over the course of the infection, at least up to 72 h post-infection. The kinetics of Xbp1(u) cleavage correlated with the upregulation of expression of the four XBP1-controlled genes that we analyzed after infection by both viruses (Fig. 7A), and indicated an unambiguous activation of the IRE1/XBP1 pathway. Moreover, Western blot analysis confirmed that the expression of the Grp94 gene, which can be under the control of XBP1, led to a significant increase in the amount of its corresponding protein within neurons following infection by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} (Fig. 7B). Thapsigargin-treated cells were used as a positive control to confirm that the LA-N-5 neurons could indeed be induced to express this protein. Altogether, our data demonstrate again that only two mutations within the S protein of HCoV-OC43 can lead to a different kinetics and amplitude of UPR activation.

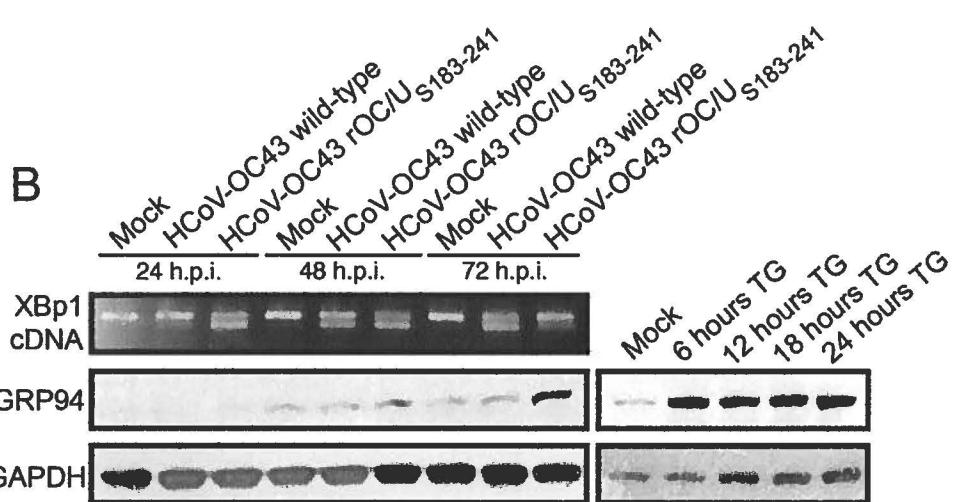
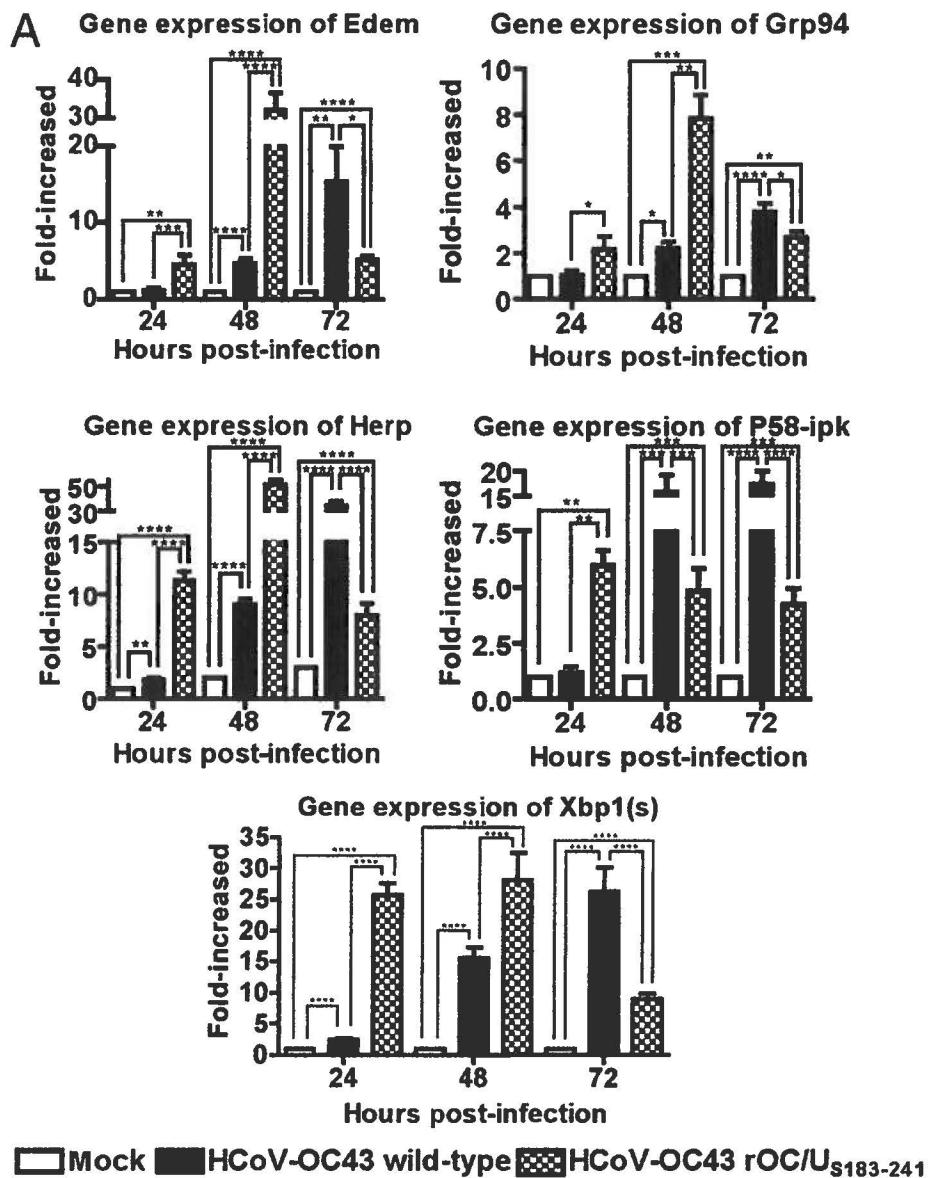


Figure 7. The IRE1/XBP1 pathway was rapidly activated following infection of human neurons with the HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant, as compared to HCoV-OC43 wild-type. The LA-N-5 cells were infected with HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} for 24, 48 or 72 h, or incubated in presence of 2 μM of thapsigargin for 6, 12, 18 or 24 h. (A) Xbp1(s), Xbp1(u)(s), Grp94, Edem, Herp and P58-ipk gene expression analysis. Total RNA was extracted and reverse-transcribed and mRNA expression was evaluated by quantitative PCR compared to mock-infected. Gapdh expression was used for normalization. Statistical significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. (B) GRP94 protein expression analysis. Whole cell lysates were subjected to Western blot analysis using antibody directed against GRP94. GAPDH served as a loading control. Thapsigargin-treated samples served as a positive control.

Infections of human neurons by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} led to a strong activation of caspase-3 and nuclear fragmentation following a stronger UPR activation. Following the deciphering of the UPR induced by HCoV-OC43 wild-type and HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}, we investigated whether the latter could lead to increased neuronal death by apoptosis following a stronger UPR activation. Caspase-3 and nuclear fragmentation are hallmarks of apoptosis and were shown to be induced following virus-induced UPR (Medigeshi *et al.*, 2007). We assayed the activation of caspase-3 by immunofluorescence at 48 h post-infection, a time where we observed the most significant differences in UPR activation and protein synthesis rate between the two viruses (Fig. 8). At 48 h post-infection, neurons infected by HCoV-OC43 wild-type did not exhibit significant differences in caspase-3 activation and nuclear fragmentation compared to mock-infected cells. In contrast, most of the neurons infected by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} showed intense activation of caspase-3, as well as nuclear fragmentation. Indeed, quantification of apoptotic cells support our conclusion that neurons infected by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} exhibited more nuclear fragmentation than mock-infected or HCoV-OC43-infected cells (Fig. 8B). Cells treated for 24 h with staurosporine, a common apoptosis inducer, served as a positive control. Moreover, cells experiencing intense activation of caspase-3 following HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} infection were also positive for viral antigens and nuclear fragmentation. Altogether, our results showed that HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} induced caspase-3 activation and nuclear fragmentation, two common apoptosis markers, as early as 48 h p.i., whereas HCoV-OC43 wild-type did not show any significant activation of either compared to mock-infected cells.

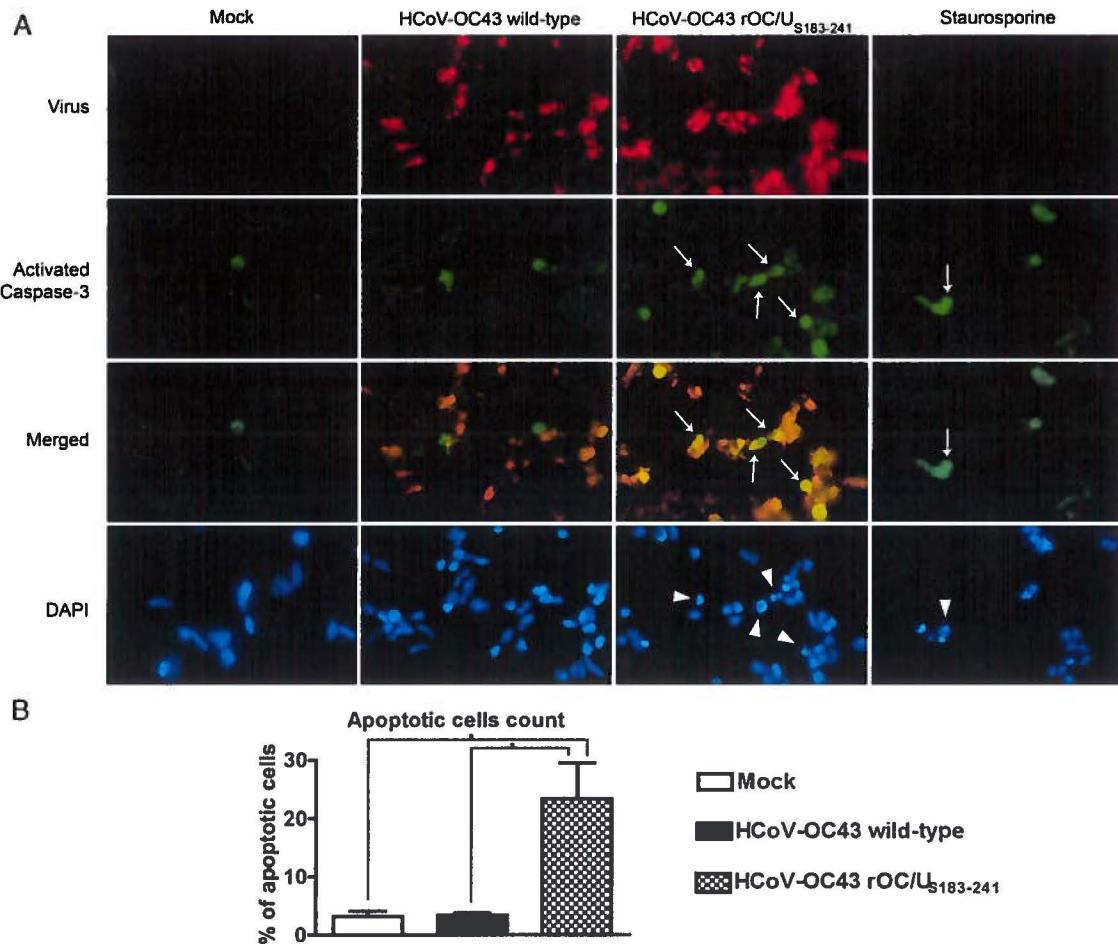


Figure 8. Infection of human neurons by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} led to a strong activation of caspase-3 and nuclear fragmentation following strong UPR activation. Detection of activation of caspase-3 and nuclear fragmentation within neurons infected by HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241}. (A) Immunofluorescence of LA-N-5 differentiated into human neurons infected with HCoV-OC43 wild-type or HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} showing HCoV-OC43 S protein (red), caspase-3 activation (green), their colocalization in merged image (yellow) and nuclear fragmentation by DAPI (blue). Arrows indicate example of infected cells with activated caspase-3. Arrowheads show example of cells with intense fragmented nucleus. Staurosporine-treated samples served as a positive control. (B) Quantification of cells showing nuclear fragmentation. Data are presented as a percentage of cells with nuclear fragmentation compared to total cells in the field. Each quantification represents the mean of 5 fields containing at least 100 cells. Statistical significance: *p < 0.001.

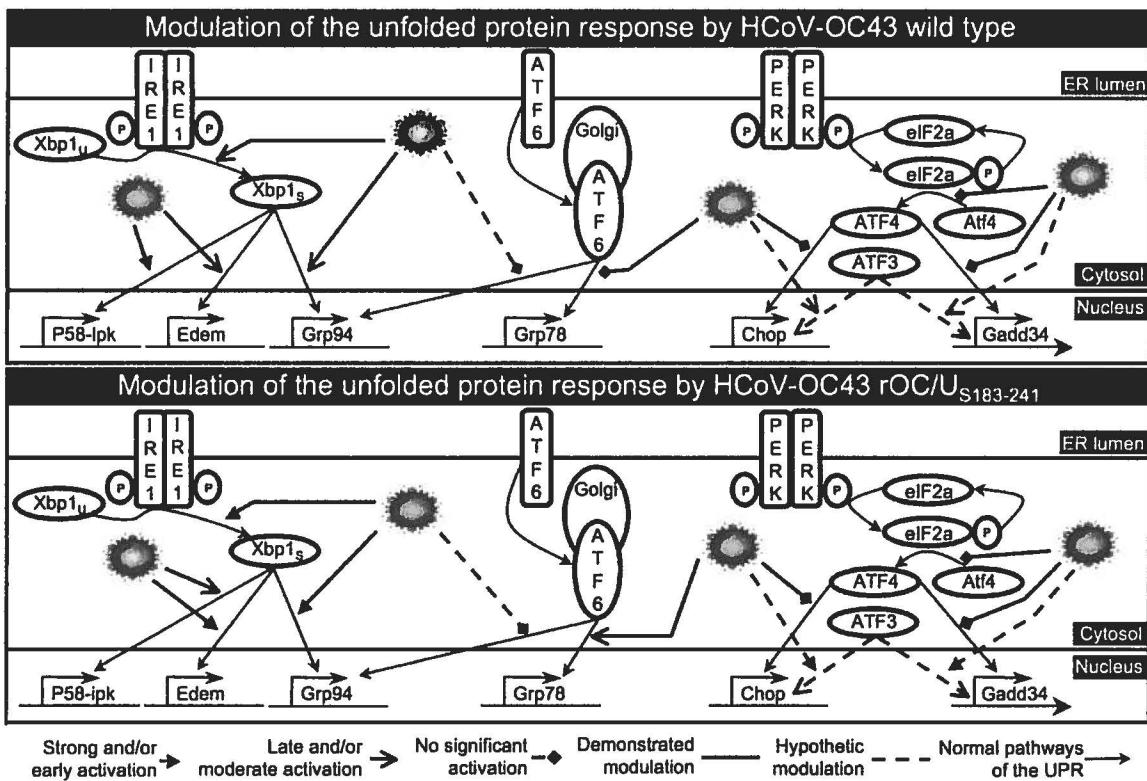


Figure 9. Model depicting the activation of the normal UPR and possible modulation of the different pathways by the HCoV-OC43 S protein in human neuronal cells. The IRE1/XBP1 pathway is strongly and rapidly activated by the HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} mutant while its activation is less intense and slower by HCoV-OC43 ATCC. Target genes of XBP1, e.g. Grp94, P58-ipk and Edem, are expressed following the appearance of the Xbp1s spliced form. The ATF6 pathway is thought to play a minor role, if any, in the UPR activated by both viruses. Indeed, its well known major target gene, Grp78, is merely expressed and no expression upregulation of the GRP78 protein is observed in both infection. The PERK/eIF2 α pathway is only transiently activated by both viruses in the first 24 h post-infection although HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} induced a strong translational protein shutoff starting at 48 h post-infection. However, no ATF4 protein was found during the course of infections by both viruses, even though Chop and Gadd34 gene were expressed. This could be explained by the expression of ATF3, also known to regulate their expression. Acronyms. IRE1: inositol-requiring enzyme 1; PERK: PKR-like ER kinase; ATF6: activating transcription factor 6; Xbp1_U: X-box binding protein mRNA unspliced form; Xbp1_S: X-box binding protein mRNA spliced form; ATF4: activating transcription factor 4; ATF3: activating transcription factor 3; eIF2 α : α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2.

DISCUSSION

The complete transcriptomic profile of human neurons infected by HCoV-OC43 revealed the modulation of expression of 275 genes among which many are known to be related to the activation of the UPR. Making use of a mutant virus harboring persistence-associated mutations in the S glycoprotein, we sought to evaluate the role of the HCoV-OC43 S protein on the UPR and neuronal viability. Altogether, our results demonstrate that only two point mutations in the S protein influence the activation of the UPR by HCoV-OC43 and shed light on the importance of discrete molecular determinants in the genome of HCoV-OC43 in the activation of the UPR in human neurons and induction of neuronal death.

Our results establish the relevance of two human neuronal models, NT2 and LA-N-5, to study early events occurring in human neurons following infection by HCoV-OC43. These cells are of particular interest since primary human neurons are difficult to obtain in sufficient quantity and quality for in vitro studies. Moreover, as coronaviruses, such as HCoV-OC43 and SARS-CoV, have been associated with neurological diseases in mice (Jacomy and Talbot, 2003 and Netland *et al.*, 2008) and potentially in humans (Arbour *et al.*, 2000 and Gu *et al.*, 2005), these two neuronal models are useful to study the neuronal response to infection in the context of potential human neuropathologies.

Overall, our microarray results provide an overview of gene diversity associated with different molecular pathways that could be modulated in human neurons infected by a human coronavirus. Among the global transcriptomic modulation, several genes are associated with the translation machinery, neurotransmission, immunity and cytoskeleton factors. One important group of genes that attracted our attention was related to the biosynthesis and degradation functional group (Fig. 2) and more precisely associated with the process of the unfolded protein response (UPR), which has already been shown to be induced by other coronaviruses, such as MHV (Bechill *et al.*, 2008) and SARS-CoV (Chan *et al.*, 2006 and Sung *et al.*, 2009). Considering the numerous studies suggesting an association of neurological diseases with the activation of ER stress (Lindholm *et al.*, 2006 and Paschen, 2003), it is of importance to study the induction of the UPR in a human neuronal model by a virus which has been associated with neurological diseases (Arbour *et al.*, 2000 and Jacomy and Talbot, 2003).

The use of the HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant is of high interest because the S protein of coronaviruses have been shown to induce the UPR (Chan *et al.*, 2006 and Versteeg *et al.*, 2007) and especially since this variant has been shown to be more neurovirulent in mice (H. Jacomy and P. J. Talbot, submitted for publication). As clearly shown in Fig. 3, the comparison of infectious viral particles production between HCoV-OC43 wild-type and HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} showed that both viruses bear the same capacity to produce extracellular infectious particles and that they disseminated in neuronal culture at the same rate. However, HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} showed a more rapid and intense production of viral proteins and intracellular infectious viral particles. This suggests that discrete molecular viral S determinants could play a role in virus–cell interactions, leading to an increased capacity to produce viral proteins and infectious viral particles. More importantly, the resulting increase in viral proteins present in the ER suggest that the cells might experience a more intense UPR activation in order to cope with an increased ER stress caused by the burden of viral proteins. Therefore, mutations in the S protein of HCoV-OC43, which lead to an increased neurovirulence in mice, induce a different kinetics of UPR activation. Considering that an uncontrolled UPR appears to be associated with neurological diseases (Lindholm *et al.*, 2006 and Paschen, 2003), we studied its level of activation following infection by HCoV-OC43 wild-type and HCV-OC43 rOC/U_{S183-241} in human neurons, which are the main target of infection and determined whether these mutations could lead to increased neuronal death (Fig. 9).

We characterized the splicing of XBP1 as a standard analysis to identify the activation of the IRE1/XBP1 pathway (Fig. 7B) and found that HCoV-OC43 promoted the splicing of XBP1 and the expression of genes partially or solely under the control of this transcriptional factor (Fig. 7A). Indeed, we showed that HCoV-OC43 infection induced the upregulation of expression of a negative regulator of PERK and PKR activity, P58-ipk, and of a central gene in the ERAD complex, Edem, both solely under the control of XBP1 following activation of the UPR (Lee *et al.*, 2003 and Yamamoto *et al.*, 2004). Altogether, these results indicate an unambiguous activation of the IRE1/XBP1 pathway following HCoV-OC43 infection. Indeed, the increase of Xbp1 splicing (Figs. 7A and B) directly correlated with the increased expression of these genes, thus reinforcing our hypothesis of activation of the IRE1/XBP1 pathway. Moreover, HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} induced a more rapid and stronger splicing

of Xbp1 mRNA, indicating an increased activation of the IRE1/XBP1 pathway by this virus variant compared to wild-type virus.

On the other hand, we only found a transient level of phosphorylated eIF2-alpha at 24 h post-infection (Fig. 5A), suggesting that the main effector of the PERK/eIF2-alpha pathway, ATF4, might not be efficiently translated following HCoV-OC43 infection, thus suggesting an ATF4-independent induction of the UPR. Moreover, we hypothesize that the increased expression of the cellular inhibitor of PERK P58-ipk, starting at 48 h post-infection, may help explain the absence of phosphorylation of eIF2-alpha at 48 and 72 h post-infection (Fig. 7A). However, even if we were not able to detect any ATF4 protein (Fig. 6B), we observed a significant upregulation of expression of the Gadd34 and Chop genes (Fig. 6A), which are largely considered to be under the control of ATF4. However, although ATF4 plays a major role in the expression of these genes, other factors are known to regulate their expression. ATF3 is a transcriptional factor that has been shown to regulate Gadd34 and Chop gene expression (Haneda *et al.*, 2004 and Jiang *et al.*, 2004). Given that our microarray results showed an upregulation of the expression of ATF3 (data not shown), we hypothesize that Gadd34 and Chop might be induced by this transcriptional factor instead of ATF4. Furthermore, the expression of the Chop gene was also shown to be under the control of XBP1 (Lee *et al.*, 2003), which correlates with our results (Fig. 6 and Fig. 7). Considering our results showing upregulation of the Edem and P58-ipk genes, solely under XBP1 control (Lee *et al.*, 2003), this adds to the possible involvement of XBP1 in the expression of Chop. The absence of expression of the CHOP protein is striking considering the strong upregulation of Chop mRNA by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} (Fig. 6A). However, this may suggest a post-transcriptional regulation of the Chop gene in coronavirus infection, as it has already been shown for INF-beta by MHV (Roth-Cross *et al.*, 2007). Altogether, our results indicate that the PERK/eIF2-alpha pathway does not play a significant role in the infection of neuronal cells by HCoV-OC43.

Although the level of phosphorylated eIF2-alpha was only transient, we did observe a translational shutoff after infection, particularly important for HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} within 48 h of infection (Fig. 5B). It is of interest to consider that such attenuation of translation can occur concurrently with increased protein degradation by the ERAD complex. The strong upregulation of Edem (Olivari *et al.*, 2006) and Herp (Kim *et al.*, 2008) gene

expression (Fig. 6A), especially after HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} infection might in part explain this phenomenon, as these proteins are associated with protein degradation during the UPR (Figs. 5B and C). Moreover, translational shutoff is a common hallmark preceding cell death, which was also already very strong at 48 h post-infection by the HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} variant, as shown by a viability assay (Fig. 5D) and evaluation of apoptosis induction by caspase-3 activation and nuclear fragmentation (Figs. 8A and B). Thus, considering the strong upregulation of gene expression of Edem and Herp known for their role in protein degradation, the significant activation of caspase-3 and the induction of nuclear fragmentation, we hypothesize that the strong decrease in protein synthesis detected following HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} infection might be the result of an increased protein degradation by the ERAD complex concurrently with initial activation steps of apoptosis.

While deciphering the UPR following a viral infection, one should bear in mind that redundancy between activated and non-activated pathways and compensating mechanisms for transcriptional gene control, may also lie elsewhere than within the three well-known UPR pathways. Indeed, such complex cross-talk between the UPR pathways using knock-out of XBP1 and ATF6 was reported (Lee *et al.*, 2003). This would account for the expression of Grp94, which is under the control of both XBP1 and ATF6, following infection by HCoV-OC43 rOC/U_{S183-241} at both mRNA and protein levels (Figs. 7A and B). Our results indicate that the expression of the Grp78 gene is slightly upregulated, but not to a significant level, as revealed by the absence of the corresponding protein in Western blot analysis (Figs. 4A and B). Interestingly, the knock-out of ATF6 or XBP1 alone was shown to induce a very weak loss of Grp78 expression, showing redundancy between these pathways (Lee *et al.*, 2003). In contrast, other groups showed that XBP1 knock-out only slightly impaired Grp78 expression and that ATF6 is the major inductor of Grp78 (Yamamoto *et al.*, 2004). However, further studies need to be performed in order to decipher the cross-talk between ATF6 and XBP1 pathways. Nevertheless, our results do suggest that the low level of expression of Grp78 mRNA could account for the XBP1 activity, as it weakly induces the ERSE promoter (Yamamoto *et al.*, 2004), and that a full activation of the ATF6 pathway would have led to a strong GRP78 protein expression, as revealed by thapsigargin treatment (Fig. 4A). Therefore, we hypothesize that the ATF6 pathway plays a minor role, if any, in the UPR activated by

HCoV-OC43, leading to the absence of upregulation of GRP78 protein and that consequently GRP94 protein expression is likely to account for XBP1 activity.

Our results showed that the HCoV-OC43 rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ variant harboring point mutations within its S protein can lead to an increased production of viral proteins and intracellular infectious viral particles and we speculate that these events could give rise to an increased ER stress leading to a stronger activation of the UPR (Fig. 9). Indeed, others have already shown that the S protein of MHV (Versteeg *et al.*, 2007) and SARS-CoV (Chan *et al.*, 2006) or the 8ab protein of SARS-CoV (Sung *et al.*, 2009) can alone induce the UPR and that only the presence or accumulation of the protein is thought to be responsible for the ER stress (Versteeg *et al.*, 2007). Our study clearly reveals that mutations within the S protein of HCoV-OC43 can differentially induce the UPR and lead to a stronger neuronal death by apoptosis, as shown by intense caspase-3 activation and nuclear fragmentation (Figs. 8A and B). Interestingly, IRE1 was linked to the JNK pathway that is involved in apoptosis following the UPR (Urano *et al.*, 2000) and JNK activation can be modulated by other virus, such as HCMV, to cope with cell death (Xuan *et al.*, 2009). One might speculate that the JNK pathway could play a role in the strong neuronal apoptosis induced by HCoV-OC43 rOC/US₁₈₃₋₂₄₁, as we observed a strong and unambiguous activation of the IRE1/XBP1 pathway. Studies are currently underway to decipher the possible implication of the JNK pathway in our model.

In summary (Fig. 9), the present study demonstrates that only two point mutations within the S protein of HCoV-OC43, which are acquired upon persistence in human neural cells and lead to increased neurovirulence in mice (H. Jacomy and P. J. Talbot, submitted for publication), also lead to: (1) an increase in production of viral proteins and intracellular infectious viral particles; (2) a stronger and faster induction of the UPR (Fig. 9); (3) an increased attenuation of translation with only transient phosphorylation level of eIF2-alpha; and (4) an increased neuronal cell death by apoptosis. Moreover, it suggests that mutations of RNA viruses acquired during persistence in the central nervous system could modulate neuropathogenesis in the context of virus-mediated neurodegenerative diseases. Such studies are on-going in our animal model of human coronavirus neuropathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, viruses, infection and thapsigargin treatment. The cell lines N-Tera2 (a gift from Dr. Glenn Rall, University of Pennsylvania School of Medicine) and LA-N-5 (a gift from Dr. Stephan Ladisch, George Washington University School of Medicine) were cultured in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and RPMI supplemented with 15% (v/v) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and 100 µM non-essential amino acids (Gibco-Invitrogen), respectively. The N-Tera2 cells were differentiated into human neurons (NT2-N), as previously described (Pleasure and Lee, 1993). Briefly, 2 × 10⁶ cells were seeded in a 75 cm² flask in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) FBS. The next day, and every 3 days for 4 weeks, medium was replaced by the same medium also containing 10 µM all-trans retinoic-acid (Sigma). Cells were then trypsinized and plated into Petri dishes (1 × 10⁷ cells) or 24-well (2 × 10⁵) plates coated with poly-d-lysine (Sigma, P-1149) and matrigel (BD Biosciences) and cultured for 2 weeks with DMEM medium supplemented with 5% (v/v) FBS, 1 µM AraC, 10 µM FudR and 10 µM UriD (Sigma), with medium replaced every 3 days. The LA-N-5 cells were differentiated into human neurons as previously described (Hill and Robertson, 1998). Briefly, cells were seeded in Cell+Petri dishes (5 × 10⁵ cells), 6-well (4 × 10⁴ cells), 24-well (5 × 10³ cells) or 96-well (1.8 × 10³ cells) plates (Sarstedt), in RPMI medium supplemented with 10% (v/v) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and 100 µM non-essential amino acids. The next day, and every 2 days for 6 days, medium was replaced with the same medium also containing 10 µM all-trans retinoic-acid.

HCoV-OC43 was obtained several years ago from the American Type Culture Collection (ATCC VR-759) and propagated on the HRT-18 cell line as previously described (Mounir and Talbot, 1992). A recombinant HCoV-OC43 variant containing two point mutations within the S protein (H183R and Y241H), named HCoV-OC43 rOC/US183-241, was generated using the full-length cDNA clone pBAC-OC43FL, as previously described (St-Jean *et al.*, 2006). The genome of HCoV-OC43 rOC/US183-241 was completely sequenced to confirm that the only differences with the HCoV-OC43 ATCC VR-759 strain were the two inserted mutations in the S glycoprotein. Cells were infected at a MOI of 0.2 or mock-infected, then incubated at 37 °C for 2 h, washed with PBS and incubated at 37 °C with

fresh medium. Cells and supernatants were harvested at the indicated times post-infection. Cells were treated with 2 µM thapsigargin, or 2 µM staurosporine or mock-treated and harvested at the indicated times.

Immunofluorescence. Cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 20 min at room temperature, permeabilized with methanol at – 20 °C for 5 min, incubated with primary mouse monoclonal antibody (mAb) directed against β-tub isoform III (1/1000, Chemicon) and rabbit antiserum specific to BCoV, serologically related to HCoV-OC43 (undiluted) (gift from the late Dr. Serge Dea, INRS-Institut Armand-Frappier), or incubated with rabbit polyclonal antibody NFM (1/100, Chemicon) or with rabbit polyclonal antibody to activated Caspase-3 (1/50, R and D Systems) and culture supernatant of mouse hybridoma containing mAb 1-10C.3 directed against the S protein of HCoV-OC43 (undiluted), or incubated only with mAb 1-10C.3 (1/100) for 1 h at room temperature and washed 3 times with PBS. Cells incubated with β-tub isoform III antibody and antiserum specific to BCoV were then incubated for 1 h at room temperature with two secondary antibodies (Molecular Probes-Invitrogen): anti-rabbit AlexaFluor568 (1/1000) and anti-mouse AlexaFluor488 (1/1500). Cells incubated with NFM antibody or activated Caspase-3 antibody and mAb 1-10C.3 were then incubated with the anti-mouse AlexaFluor568 (1/1000) and anti-rabbit AlexaFluor488 (1/1500) for 1 h at room temperature. Cells incubated with only mAb 1-10C.3 were then incubated with the anti-mouse AlexaFluor568 (1/1000) for 1 h at room temperature. All cells were then incubated with DAPI for 5 min and then washed three times with PBS prior to imaging. ANOVA tests followed by post-hoc Tukey's analysis were performed to determine the statistical significance of the differences in number of cells showing fragmented nuclei between samples, using SPSS software version 16.

RNA isolation, quantitative real-time PCR and microarray experiments. Total RNA was extracted at 24, 48 and 72 h post-infection using the Agilent RNA extraction kit according to the manufacturer's instructions, quantified using a ND1000 spectrophotometer (Nanodrop) and RNA integrity assessed by microfluidic electrophoresis using the Agilent RNA 6000 Nano kit with the Agilent 2100 Bioanalyzer. Microarray experiments were performed using the Low RNA Input linear amplification kit (Agilent) (Zhu *et al.*, 2006), according to the manufacturer's protocol, where CTP-Cy3 (Perkin-Elmer) and CTP-Cy5 (Perkin-Elmer) were incorporated into cRNA. Equimolar solution of cRNA from infected and

mock-infected cells were hybridized for 17 h at 65 °C on the Agilent 60-mer Oligo Microarray Human 1A v2, 22K chip, which represents 22,000 human transcripts. Microarray fluorescence was revealed using a ProScanArray HT scanner (Perkin-Elmer) at a 5 µm resolution and colorimetric intensity quantified using the ProScanArray Express software (Perkin-Elmer). Statistics were performed with the open-source software Microarray Data Analysis System (MIDAS) from the TM4 microarray software suite (Saeed *et al.*, 2003), using combined threshold for a significant gene modulation of $p < 0.05$ and a minimum of 2-fold modulation of expression in two independent viral infections. Transcriptomics time-point analysis was made from two independent infections, where each of the time-point was performed in dye-swap quadruplicate. cDNAs for quantitative real-time PCR were obtained from total RNA extracts reverse-transcribed using the SuperscriptII first-strand kit with oligo-dT primers (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Real-time quantitative PCR was performed using the DyNAamo SYBR green qPCR kit (NEB) with the Rotor-gene 3000 (Corbett Life Science) with 1 cycle of 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Modulation of gene expression from quantitative real-time PCR was analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) and normalized to Gapdh expression. ANOVA tests followed by post-hoc Tahame's analysis were performed to determine the statistical significance of the differences in gene expression between samples, using SPSS software version 16.0. Primers used are presented in supplementary data.

Protein extraction and immunoblotting. Total protein was extracted using RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, 1% (v/v) NP-40, 0.25% (w/v) sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) supplemented with the Protease cocktail inhibitor (Sigma) and the Halt-Phosphatase inhibitor (Pierce). Harvested cells were vortexed for 1 min into RIPA buffer, incubated on ice for 20 min, centrifuged for 5 min at 4 °C at 17,000×g and supernatants were stored at ~ 80 °C until further analyzed. Protein concentration was determined using the BCA Protein assay kit (Novagen), according to the manufacturer's protocol. Equal amounts of protein were subjected to SDS-PAGE using a 10% or 4–12% gradient gel Novex NuPage (Invitrogen), transferred to PVDF membrane (Millipore) with the Bio-Rad Semi-dry transblot apparatus. Membranes were blocked overnight at 4 °C with TBS buffer containing 1% (v/v) Tween (TBS-T) and 5% (w/v) non-fat milk, then incubated with

rabbit anti-ATF4 antibody (1/200, SantaCruz), mouse anti-CHOP antibody (1/200, SantaCruz), rabbit anti-total eIF2-alpha antibody (1/1000, Cell Signaling), rabbit anti-phosphorylated Ser52-eIF2-alpha antibody (1/1000, BioSource), rabbit anti-GADD34 antibody (1/250, SantaCruz), mouse anti-GAPDH antibody (1/5000, Chemicon), mouse anti-GRP78 antibody (1/1000, BD Biosciences) or rabbit anti-GRP94 antibody (1/1000, Stressgen) for 1 h at room temperature. After TBS-T washes, the membranes were incubated with secondary antibody anti-mouse or anti-rabbit, coupled to horseradish peroxidase (GE Life Sciences) and detection made by chemiluminescence using the ECL kit (GE Life Sciences) using Kodak-XOmat L-S film (Kodak).

Radiolabeling. Cell cultures were starved in cysteine-and methionine-free medium for 30 min, incubated with 70 μ Ci of 35 S-radiolabeled cysteine/methionine using the EXPRE 35 S 35 S protein labeling mix (Perkin-Elmer) for 15 min, washed twice with ice-cold PBS buffer and harvested. Proteins were extracted with RIPA buffer, as described above. Equal volumes of whole cell extracts were precipitated in triplicate using the trichloroacetic acid technique and assayed for cpm counts using a Beckman LS1701 scintillation counter, or subjected to SDS-PAGE using 4–12% gradient gel Novex NuPage (Invitrogen), fixed with 30% (v/v) glacial acetic acid and 10% (v/v) methanol solution for 30 min, incubated in Kodak Enlightning Rapid Autoradiography Enhancer (Perkin-Elmer) for 30 min and exposed at \sim 80 °C using Kodak-XOmat L-S film. ANOVA tests followed by post-hoc Tahame's analysis were performed to determine the statistical significance of the differences in cpm counts between samples, using SPSS software version 16.0.

Cell viability assay. Viability was assayed by the reduction of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethylthoxy-phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) in the presence of phenazine methosulfate (PMS), as previously described (Cory *et al.*, 1991). Briefly, infected, mock-infected, thapsigargin-treated and mock-treated cells, cultured in 96-well plates, were incubated in the presence of 0.6 mM MTS (Promega) and 14 μ M PMS (Sigma-Aldrich) at 24, 48 or 72 h post-infection and absorbance was read at 492 nm every 20 min for 3 h. Viability was determined by slope regression analysis for each sample and is expressed as a relative percentage compared to mock-infected cells slope. Student's t test was performed to determine the statistical significance of the differences in slope between samples, using SPSS software version 16.0.

Flow cytometry. Cells were harvested at 4, 16 and 24 h post-infection and 4×10^6 cells were fixed and permeabilized with methanol at -20°C for 5 min. After 2 washes with PBS, cells were incubated with 100 μl (5 μg) of culture supernatant of mouse hybridoma containing mAb 1-10C.3 directed against the S protein of HCoV-OC43, or with 100 μl (5 μg) culture supernatant of mouse hybridoma containing mAb 5-11 H.6 directed against the S protein of HCoV-229E as an isotype control, or with 100 μl of PBS for 1 h at room temperature. Cells were then washed three times with PBS and incubated with secondary antibody anti-mouse AlexaFluor488 (1/500) for 1 h at room temperature. Cells were then washed three times and analyzed using a FACS calibur cytofluorometer. Data analysis was performed using Cell Quest Pro (BD Bioscience). ANOVA tests followed by post-hoc Tukey's analysis were performed to determine the statistical significance of the differences in the percentage of infected cells between samples, using SPSS software version 16.0.

Microarray data. Whole transcriptomics data issued from microarray experiments are deposited and available in the public database GEO at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant No. MT-9203 from the Canadian Institutes of Health Research (Institute of Infection and Immunity). Pierre J. Talbot is the holder of the Tier-1 Canada Research Chair in Neuroimmunovirology. Dominique J. Favreau is the holder of a studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec. Julien R. St-Jean acknowledges a studentship from the Fonds québécois de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT).

REFERENCES

1. **J.M. Antony, K.K. Ellestad, R. Hammond, K. Imaizumi, F. Mallet, K.G. Warren, C. Power** The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *J. Immunol.*, **179** (2007), pp. 1210–1224
2. **N. Arbour, G. Côté, C. Lachance, M. Tardieu, N.R. Cashman, P.J. Talbot** Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43 *J. Virol.*, **73** (1999), pp. 3338–3350
3. **N. Arbour, R. Day, J. Newcombe, P.J. Talbot** Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses *J. Virol.*, **74** (2000), pp. 8913–8921
4. **J. Bechill, Z. Chen, J.W. Brewer, S.C. Baker** Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression *J. Virol.*, **82** (2008), pp. 4492–4501
5. **A. Bonavia, N. Arbour, V.W. Yong, P.J. Talbot** Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43 *J. Virol.*, **71** (1997), pp. 800–806
6. **M.J. Buchmeier, R.G. Dalziel, M.J. Koolen, P.W. Lampert** Molecular determinants of CNS virulence of MHV-4 *Adv. Exp. Med. Biol.*, **218** (1987), pp. 287–295
7. **C.P. Chan, K.L. Siu, K.T. Chin, K.Y. Yuen, B. Zheng, D.Y. Jin** Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein *J. Virol.*, **80** (2006), pp. 9279–9287
8. **G. Cheng, Z. Feng, B. He** Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2alpha dephosphorylation by the gamma(1)34.5 protein *J. Virol.*, **79** (2005), pp. 1379–1388
9. **A.H. Cory, T.C. Owen, J.A. Barltrop, J.G. Cory** Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture *Cancer Commun.*, **3** (1991), pp. 207–212
10. **J. Gu, E. Gong, B. Zhang, J. Zheng, Z. Gao, Y. Zhong, W. Zou, J. Zhan, S. Wang, Z. Xie, H. Zhuang, B. Wu, H. Zhong, H. Shao, W. Fang, D. Gao, F. Pei, X. Li, Z. He, D. Xu, X. Shi, V.M. Anderson, A.S. Leong** Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS *J. Exp. Med.*, **202** (2005), pp. 415–424
11. **M. Haneda, H. Xiao, T. Hasegawa, Y. Kimura, I. Nakashima, K. Isobe** Regulation of mouse GADD34 gene transcription after DNA damaging agent methylmethane sulfonate *Gene*, **336** (2004), pp. 139–146

12. **H.P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, D. Ron** Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells *Mol. Cell.*, **6** (2000), pp. 1099–1108
13. **D.P. Hill, K.A. Robertson** Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, **2** (1998), pp. 183–190
14. **M. Hirota, M. Kitagaki, H. Itagaki, S. Aiba** Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress *J. Toxicol. Sci.*, **31** (2006), pp. 149–156
15. **Y. Imai, M. Soda, R. Takahashi** Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin–protein ligase activity *J. Biol. Chem.*, **275** (2000), pp. 35661–35664
16. **K. Imaizumi, K. Miyoshi, T. Katayama, T. Yoneda, M. Taniguchi, T. Kudo, M. Tohyama** The unfolded protein response and Alzheimer's disease *Biochim. Biophys. Acta*, **1536** (2001), pp. 85–96
17. **J.A. Isler, T.G. Maguire, J.C. Alwine** Production of infectious human cytomegalovirus virions is inhibited by drugs that disrupt calcium homeostasis in the endoplasmic réticulum *J. Virol.*, **79** (2005), pp. 15388–15397
18. **H. Jacomy, P.J. Talbot** Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43 *Virology*, **315** (2003), pp. 20–33
19. **H. Jacomy, G. Fragoso, G. Almazan, W.E. Mushynski, P.J. Talbot** Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice *Virology*, **349** (2006), pp. 335–346
20. **H.Y. Jiang, S.A. Wek, B.C. McGrath, D. Lu, T. Hai, H.P. Harding, X. Wang, D. Ron, D.R. Cavener, R.C. Wek** Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response *Mol. Cell Biol.*, **24** (2004), pp. 1365–1377
21. **T.Y. Kim, E. Kim, S.K. Yoon, J.B. Yoon** Herp enhances ER-associated protein degradation by recruiting ubiquilins *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369** (2008), pp. 741–746
22. **A.H. Lee, N.N. Iwakoshi, L.H. Glimcher** XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response *Mol. Cell Biol.*, **23** (2003), pp. 7448–7459
23. **D. Lindholm, H. Wootz, L. Korhonen** ER stress and neurodegenerative diseases *Cell Death Differ.*, **13** (2006), pp. 385–392
24. **K.J. Livak, T.D. Schmittgen** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method *Methods*, **25** (2001), pp. 402–408

25. **M. Matsumoto, M. Minami, K. Takeda, Y. Sakao, S. Akira** Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells *FEBS Lett.*, **395** (1996), pp. 143–147
26. **G.R. Medigeshi, A.M. Lancaster, A.J. Hirsch, T. Briese, W.I. Lipkin, V. Defilippis, K. Fruh, P.W. Mason, J. Nikolich-Zugich, J.A. Nelson** West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis *J. Virol.*, **81** (2007), pp. 10849–10860
27. **S. Mounir, P.J. Talbot** Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation *J. Gen. Virol.*, **73** (1992), pp. 2731–2736
28. **J. Netland, D.K. Meyerholz, S. Moore, M. Cassell, S. Perlman** Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2 *J. Virol.*, **82** (2008), pp. 7264–7275
29. **I. Novoa, H. Zeng, H.P. Harding, D. Ron** Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha *J. Cell Biol.*, **153** (2001), pp. 1011–1022
30. **T. Okada, H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi, K. Mori** Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response *Biochem. J.*, **366** (2002), pp. 585–594
31. **S. Olivari, T. Cali, K.E. Salo, P. Paganetti, L.W. Ruddock, M. Molinari** EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349** (2006), pp. 1278–1284
32. **W. Paschen** Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium levels: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states *Cell. Calcium*, **29** (2001), pp. 1–11
33. **W. Paschen** Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain *Cell. Calcium*, **34** (2003), pp. 365–383
34. **J.J. Phillips, M.M. Chua, E. Lavi, S.R. Weiss** Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence *J. Virol.*, **73** (1999), pp. 7752–7760
35. **S.J. Pleasure, V.M. Lee** NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell *J. Neurosci. Res.*, **35** (1993), pp. 585–602
36. **D. Ron, P. Walter** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response *Nat. Rev., Mol. Cell. Biol.*, **8** (2007), pp. 519–529

37. **J.K. Roth-Cross, L. Martinez-Sobrido, E.P. Scott, A. Garcia-Sastre, S.R. Weiss** Inhibition of the alpha/beta interferon response by mouse hepatitis virus at multiple levels *J. Virol.*, **81** (2007), pp. 7189–7199
38. **A.I. Saeed, V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Storn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush, J. Quackenbush** TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis *BioTechniques*, **34** (2003), pp. 374–378
39. **Y. Shi, K.M. Vattem, R. Sood, J. An, J. Liang, L. Stramm, R.C. Wek** Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control *Mol. Cell. Biol.*, **18** (1998), pp. 7499–7509
40. **J.R. St-Jean, M. Desforges, F. Almazan, H. Jacomy, L. Enjuanes, P.J. Talbot** Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone *J. Virol.*, **80** (2006), pp. 3670–3674
41. **S.C. Sung, C.Y. Chao, K.S. Jeng, J.Y. Yang, M.M. Lai** The 8ab protein of SARS-CoV is a luminal ER membrane-associated protein and induces the activation of ATF6 *Virology*, **387** (2009), pp. 402–413
42. **P.J. Talbot, H. Jacomy, M. Desforges** Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus S. Perlman, T. Gallagher, E.J. Snijder (Eds.), *Nidoviruses*, ASM Press, Washington, D.C. (2008), pp. 313–324
43. **K.D. Tardif, K. Mori, A. Siddiqui** Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway *J. Virol.*, **76** (2002), pp. 7453–7459
44. **W. Tirasophon, A.A. Welihinda, R.J. Kaufman** A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells *Genes Dev.*, **12** (1998), pp. 1812–1824
45. **W. Tirasophon, K. Lee, B. Callaghan, A. Welihinda, R.J. Kaufman** The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response *Genes Dev.*, **14** (2000), pp. 2725–2736
46. **G.C. Tseng, M.K. Oh, L. Rohlin, J.C. Liao, W.H. Wong** Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects *Nucleic Acids Res.*, **29** (2001), pp. 2549–2557
47. **I. Umareddy, O. Pluquet, Q.Y. Wang, S.G. Vasudevan, E. Chevet, F. Gu** Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response *Virol. J.*, **4** (2007), p. 91

48. **F. Urano, X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H.P. Harding, D. Ron** Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 Science, **287** (2000), pp. 664–666
49. **R. van Huizen, J.L. Martindale, M. Gorospe, N.J. Holbrook** P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling J. Biol. Chem., **278** (2003), pp. 15558–15564
50. **G.A. Versteeg, P.S. van de Nes, P.J. Bredenbeek, W.J. Spaan** The coronavirus spike protein induces endoplasmic reticulum stress and upregulation of intracellular chemokine mRNA concentrations J. Virol., **81** (2007), pp. 10981–10990
51. **B.L. Williams, W.I. Lipkin** Endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration in rats neonatally infected with Borna disease virus J. Virol., **80** (2006), pp. 8613–8626
52. **B. Xuan, Z. Qian, E. Torigoi, D. Yu** Human cytomegalovirus protein pUL38 induces ATF4 expression, inhibits persistent JNK phosphorylation, and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced cell death J. Virol., **83** (2009), pp. 3463–3474
53. **K. Yamamoto, H. Yoshida, K. Kokame, R.J. Kaufman, K. Mori** Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II J. Biochem., **136** (2004), pp. 343–350
54. **E.A. Yeh, A. Collins, M.E. Cohen, P.K. Duffner, H. Faden** Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis Pediatrics, **113** (2004), pp. e73–e76
55. **H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, K. Mori** XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor Cell, **107** (2001), pp. 881–891
56. **C.Y. Yu, Y.W. Hsu, C.L. Liao, Y.L. Lin** Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress J. Virol., **80** (2006), pp. 11868–11880
57. **B. Zhu, F. Xu, Y. Baba** An evaluation of linear RNA amplification in cDNA microarray gene expression analysis Mol. Genet. Metab., **87** (2006), pp. 71–79
58. **H. Zinszner, M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R.T. Lightfoot, H. Remotti, J.L. Stevens, D. Ron** CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic réticulum Genes Dev., **12** (1998), pp. 982–995

Publication No.2

Journal of Virology, Janvier 2012, p.81-93, 86(1)

Human Coronavirus - Induced Neuronal Programmed Cell Death is Cyclophilin D - Dependent and Potentially Caspase - Dispensable

**Un Coronavirus humain induit une mort cellulaire programmée chez le neurone
humain qui est dépendante de la CyclophilinD et indépendante des caspases**

Dominique J. FAVREAU ¹, Mathieu MEESSEN-PINARD ¹, Marc DESFORGES ¹ and Pierre
J. TALBOT ^{1*}

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Quebec, Canada

*Auteur pour correspondance

Adresse: INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec

531 boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7

Téléphone: 450-687-5010 poste 4300

Télécopieur: 450-686-5501

Courriel: pierre.talbot@iaf.inrs.ca

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Dominique J. Favreau: Élaboration des hypothèses, conception de la méthodologie, réalisation des expériences, écriture du manuscript et des réponses aux réviseurs.

Mathieu Meessen-Pinard: Étudiant au doctorat ayant participé à la création des clones déficients pour la Cyclophilin D lors des expériences en réponse aux réviseurs.

Marc Desforges: Appui et collaboration à la conception de la méthodologie et à la réalisation des expériences, révision du manuscript et des réponses aux réviseurs.

Pierre J. Talbot: Directeur de recherche et supervision de l'ensemble des travaux de recherche. Révision du muscript et des réponses aux réviseurs.

RÉSUMÉ

Les Coronavirus humains (HCoV) sont des pathogènes respiratoires reconnus. Certaines souches de HCoV, dont HCoV-OC43, peuvent envahir le système nerveux central et infectent les neurones, avec des conséquences mal connues. Précédemment, nous avons démontré que l'infection de neurones humains par HCoV-OC43 mène à l'activation de la *Unfolded protein response* et de la caspase-3 et induit la mort cellulaire, alors que la glycoprotéine virale de surface (S) est impliquée dans le processus. Dans cette étude, nous identifions différents mécanismes associés à l'induction de la mort cellulaire programmée suite à l'infection par le virus de référence HCoV-OC43 (rOC/ATCC) et un variant viral à la neurovirulence et cytotoxicité plus élevées, possédant deux mutations ponctuelles dans la glycoprotéine S (rOC/U_{S183-241}). Bien que les caspases -3 et -9 soient activées suite à l'infection, des inhibiteurs de caspases n'ont pas permis de réduire ou retarder la mort cellulaire programmée induite par HCoV-OC43, suggérant que ces protéases ne sont pas essentielles dans le processus. En contre-partie, les protéines pro-apoptotiques Bax, cytochrome C (CytC) et l'*apoptosis-inducing factor* (AIF) sont respectivement relocalisés à la mitochondrie, au cytosol et noyau, suite à l'infection par les deux souches variées. De plus, les cellules neuronales LA-N-5, traitées à la cyclosporine A (CsA), un inhibiteur du pore transitoire de la perméabilisation mitochondriale (mPTP), ou dont l'expression de la Cyclophiline D (CypD) a été réduite, ont été totalement protégées de la mort cellulaire programmée induite par rOC/ATCC, soulignant l'implication de CypD dans ce processus. Cependant, la CsA ou la diminution d'expression de la CypD ont seulement eu un effet modéré sur la mort cellulaire programmée induite chez le neurone infecté par rOC/U_{S183-241}. En conclusion, nos résultats indiquent un rôle central des protéines mitochondrielles AIF et CypD dans la mort cellulaire programmée induite par HCoV-OC43 chez le neurone humain, alors que les caspases semblent non-essentielles.

ABSTRACT

Human coronaviruses (HCoV) are recognized respiratory pathogens. Some HCoV strains, including HCoV-OC43, can invade the central nervous system where they infect neurons, with unclear consequences. We have previously reported that HCoV-OC43 infection of human neurons activates the unfolded protein response and caspase-3, induces cell death, and that the viral spike (S) glycoprotein is involved in the process. We now report underlying mechanisms associated with the induction of programmed cell death (PCD) after infection by reference HCoV-OC43 virus (rOC/ATCC) and a more neurovirulent and cytotoxic HCoV-OC43 variant harboring two point mutations in the S glycoprotein (rOC/US₁₈₃₋₂₄₁). Even though caspase-3 and caspase-9 were both activated after infection, the use of caspase inhibitors neither reduced nor delayed virus-induced PCD, suggesting that these proteases are not essential in the process. On the other hand, the pro-apoptotic proteins BAX, cytochrome C (CytC) and apoptosis-inducing factor (AIF) were relocalized towards mitochondria, cytosol and nucleus, respectively, after infection by both virus variants. Moreover, LA-N-5 neuronal cells treated with cyclosporin A (CsA), an inhibitor of the mitochondrial permeabilization transition pore (mPTP) or knocked-down for cyclophilin D (CypD), were completely protected from rOC/ATCC-induced neuronal PCD, underlining the involvement of CypD in the process. On the other hand, CsA and CypD knock-down had moderate effects on rOC/US₁₈₃₋₂₄₁-induced PCD. In conclusion, our results are consistent with mitochondrial AIF and cyclophilin D being central in HCoV-OC43-induced PCD, while caspases appear not to be essential.

INTRODUCTION

Human coronaviruses (HCoV) are enveloped positive-stranded single-stranded RNA viruses. They are recognized respiratory pathogens (70), with neurotropic and neuroinvasive properties (4, 11, 43, 66). We reported previously that the OC43 strain of HCoV (HCoV-OC43) could infect primary cultures of human and murine central nervous system (CNS) cells (11, 41), as well as infect and persist in human neural cell lines (5) and human brains (4). We also demonstrated that neurons are the main target of infection in murine CNS (41), as well as in co-cultures of human NT2 neuronal cells and primary astrocytes (M. Desforges and P. J. Talbot, unpublished data). Furthermore, HCoV-OC43 induced a chronic encephalitis in susceptible mice (41) and was associated with acute disseminated encephalomyelitis in a human case (77). Considering that murine hepatitis virus (MHV), the murine counterpart of HCoV-OC43, induces a neurological disease in mice (14), we hypothesized that HCoV-OC43 might be associated with some human neurological diseases of unknown etiology. Recently, we reported that HCoV-OC43 induces the unfolded protein response (UPR) in infected human neurons, while inducing significant neuronal death (27). Moreover, we showed that caspase-3 was activated upon HCoV-OC43 infection of human neurons (27). However, the molecular cell death pathways involved remain to be defined.

One of the major cell death-associated complex is the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), which has been linked to several neurodegenerative diseases, such as experimental autoimmune encephalomyelitis (30) and amyotrophic lateral sclerosis (53). Following cellular stress, such as accumulation of reactive oxygen species (ROS) and high Ca^{2+} levels, mPTP opens and allows the release of pro-apoptotic factors such as cytochrome C (CytC) and apoptosis-inducing factor (AIF) (48). CytC is known to participate in the formation of the apoptosome, leading to the cascade of caspase activation associated with apoptotic programmed cell death (PCD) (8), while AIF translocates to the nucleus and promotes high molecular DNA fragmentation and chromatin condensation (67), which is considered a hallmark of caspase-independent apoptosis-like PCD (20, 44, 67, 78). Indeed, evidence is accumulating regarding the role of AIF in neuronal death in both chronic and acute neurodegeneration (3, 46, 74). Characterization of mPTP is being intensely pursued and one of its major component is cyclophilin D (CypD), which is a member of the cyclophilin

family possessing peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity (29, 68). CypD is localized at the inner mitochondrial membrane and is known to be responsible for modulation of mPTP in various types of cell death (6, 62). However, it is not clear which cellular protein(s) specifically interact(s) with CypD to promote mPTP formation. Numerous putative partners have been identified, such as adenine nucleotide transporter (38), voltage-dependent anion channel (21) and BAX (79), and this is the subject of an intense debate (7, 22, 32, 36, 45). There are some discrepancies in the literature regarding the type of cell death regulated by CypD and mPTP. Over-expression of CypD has been associated with enhanced necrosis but not apoptosis in mouse embryonic fibroblast (57) or the neuronal cell line B50 (50). Conversely, CypD^{-/-} cells were protected from death induced by focal cerebral ischemia (62), thapsigargin and oxidative stress, but not staurosporine or TNF- ζ (6, 57). This indicates that CypD can regulate various types of cell death in a specific cell type and stimulus manner. In fact, it is clear that CypD knock-out or inhibition by cyclosporine A (CsA) (37) prevents cell death from numerous injuries or apoptotic insults, such as axonal degeneration (9), motoneurons axotomy (73), oxidative stress in cultured cerebellar granule neurons (71), amyloid- β -induced neuronal apoptosis in cultured neurons (25), experimental autoimmune encephalomyelitis-induced axonal injury (30) and excitotoxic neuronal death (61).

Considering that the role of mPTP, AIF and CypD in neurodegenerative diseases is recognized and currently being characterized, particularly in neurons (46, 54, 62, 74), we sought to determine whether these factors were involved in human neuronal cell death induced by HCoV-OC43, which is associated with the viral S glycoprotein (27). Consequently, we characterized the type of cell death induced by HCoV-OC43 in human neurons, using the LA-N-5 model (40, 59), and evaluated the contribution of caspases, CypD and of different cellular proteins associated with different forms of PCD related to the mPTP. We also investigated the importance of the N-terminal portion of S (putative receptor-binding domain) in PCD induction by comparing wild-type HCoV-OC43 (rOC/ATCC) to a previously reported variant (rOC/US183-241), which harbors two point mutations within the spike S glycoprotein (H183R and Y241H) (27, 42), is more neurovirulent (42) and induces a modified virus-induced neuropathology involving hind-limb paralysis and demyelination in susceptible mice (13).

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, viruses, caspase inhibitors and cyclosporin A treatment. The LA-N-5 cell line (kind gift of Dr. Stephan Ladisch, George Washington University School of Medicine, U.S.A.) was cultured in RPMI supplemented with 15% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and 100 µM non-essential amino acids (Gibco-Invitrogen). Cells were differentiated into human neurons, as previously described (40). Briefly, cells were seeded in Cell+ Petri dishes (5×10^5 cells), 6-well (4×10^4 cells), 24-well (5×10^3 cells) or 96-well (1.8×10^3 cells) plates (Sarstedt) in RPMI medium supplemented with 10% (v/v) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and 100 µM non-essential amino acids. The next day, and every 2 days for 6 days, medium was replaced with the same medium containing 10 µM all-trans retinoic-acid (Sigma-Aldrich).

The recombinant wild-type reference HCoV-OC43 virus, designated rOC/ATCC, and the recombinant HCoV-OC43 variant virus containing two point mutations within the spike S glycoprotein (H183R and Y241H), designated rOC/U_{S183-241}, were generated by reverse genetics using the previously described full-length cDNA clone pBAC-OC43^{FL} (64). Sequencing was performed in order to confirm that the two single point mutations in the S gene were the only differences between the two recombinants. The S gene of rOC/ATCC was identical to that of the HCoV-OC43 ATCC VR-759 strain obtained several years ago from the American Type Culture Collection (ATCC). The S gene of rOC/U_{S183-241} only differed from rOC/ATCC by the two mutations inserted into the gene encoding the S glycoprotein. The rOC/ATCC designation refers to the recombinant virus identical to HCoV-OC43 ATCC VR-759 strain ; rOC/U_{S183-241} refers to the recombinant virus containing the aforementioned two point mutations within the S glycoprotein. Both viruses were propagated on the HRT-18 cell line, as previously described (55). LA-N-5 cells were infected at a MOI of 0.2 or mock-infected, then incubated at 37 °C for 2 h, washed with PBS and incubated at 37°C with fresh RPMI medium supplemented with 2.5% (v/v) FBS for different periods of time. Cells and supernatants were harvested at the indicated times post-infection. For the study with inhibitors, cells were treated with 2.5 µM cyclosporin A (Calbiochem), or 50 µM Z-VAD-FMK (MBL), or 10 µM Z-LEHD-FMK (MBL), or dimethyl sulfoxide (DMSO), and harvested at the indicated time points.

Generation of cell populations knocked-down for CypD. LA-N-5 cells knocked-down for CypD expression were obtained using the MISSION pLKO.1 shRNA expression vector (SIGMA-Aldrich) packaged within lentiviral pseudoparticles. Lentiviral pseudoparticles were obtained by cotransfected MISSION pLKO.1 shRNA vector encoding five different sequences for CypD silencing (TRCN0000049263, TRCN0000049264, TRCN0000049265, TRCN0000049266, TRCN0000049267) or the empty vector, pLP1, pLP2 and pLP-VSVG vectors in HEK293T cells and were retrieved in the supernatants 72 hours later. LA-N-5 cells were then transduced by lentiviral pseudoparticles and cell populations were selected 24 h later with puromycin (2 µg/mL). Populations of LA-N-5 cells CypD knock-down were generated and maintained in regular medium supplemented with puromycin. Five different shRNA sequences were used to generate CypD knock-down cells and only two different populations, K and M corresponding to shRNA sequences TRCN0000049263 and TRCN0000049265, respectively, survived the selection process and were used for further experiments. A population of LA-N-5 cells transduced with the empty vector and selected by puromycin were used as reference cells in CypD-knock-down studies and were named LA-N-5 empty. The expression levels of CypD in both CypD-knock-down populations was measured by quantitative PCR using the Livak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (2001) and presented as a relative expression to LA-N-5 empty population.

Immunofluorescence. Cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 20 min at room temperature, permeabilized with methanol at -20°C for 5 min, incubated with primary rabbit polyclonal antibody against activated caspase-3 (1/50, R&D Systems), or rabbit polyclonal antibody against activated BAX (1/200, sc-493, Santa Cruz), or mouse monoclonal antibody against AIF (1/500, kind gift of Dr. Guido Kroemer, INSERM, France), or mouse monoclonal antibody against AIF (1/200, sc-13116, Santa Cruz) for 1 h at room temperature and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were then incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibodies (Molecular Probes-Invitrogen) anti-rabbit AlexaFluor488 or anti-mouse AlexaFluor488 (1/1500). Cells incubated with antibody to activated caspase-3 were then incubated with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min and then washed three times with PBS prior to imaging. MitoTracker Red CMXROS (200 nM, Molecular Probes-Invitrogen) was added for 15 min to

viable cells prior to fixation and staining with antibody directed against activated BAX or AIF.

Protein extraction and Western immunoblotting. Cytoplasmic and nuclear proteins were extracted using the NucBuster extraction protein kit (Novagen, 71183-3) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were harvested, permeabilized, centrifuged at 16,000 x g for 5 min and cytoplasmic proteins were retrieved from the supernatant. The pellet was then washed with cold PBS, solubilized, centrifuged at 16,000 x g for 5 min at 4°C and nuclear proteins were retrieved from the supernatant. Mitochondrial proteins were extracted using the ProteoExtract Cytosol/Mitochondria Fractionation kit (EMD Bioscience, QIA88) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were harvested, washed with ice-cold PBS, centrifuged at 600 x g for 5 min at 4°C, incubated 10 min at 4°C with Cytosol extraction buffer, homogenized using Dounce tissue homogenizer, centrifuged at 700 x g for 10 min at 4°C. Cytosolic proteins were retrieved from the supernatant. Mitochondrial proteins were obtained from the pellet which was then washed with cold PBS, incubated with Mitochondria extraction buffer and vortexed for 10 sec.

Protein concentrations were determined using the BCA Protein assay kit (Novagen), according to the manufacturer's protocol. Equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE using a 10 % or 4-12 % gradient gel Novex NuPage (Invitrogen), transferred to PVDF membrane (Millipore) with the Bio-Rad Semi-dry transblot apparatus. Membranes were blocked overnight at 4°C with Tris-buffered saline (TBS) buffer containing 1% (v/v) Tween-20 (TBS-T) and 5% (w/v) non-fat milk, then incubated with rabbit polyclonal antibody against activated BAX (1/200, N20 sc-493, Santa Cruz), or mouse monoclonal antibody against CytC (1/500, BD Pharmingen), or mouse monoclonal antibody against p84 (1/500, AbCam), or mouse monoclonal against VDAC (1/500, AbCam), or AIF (1/1000, sc-13116, Santa Cruz) for 1 h at room temperature. After three TBS-T washes, the membranes were incubated with secondary antibody, anti-mouse or anti-rabbit, coupled to horseradish peroxidase (GE Life Sciences) and detection was by chemiluminescence using the ECL kit (GE Life Sciences), using the ChemiGenius2 Syngene apparatus.

Cell viability assay. Cell viability was monitored through the reduction of 3-[4,5,dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxy-phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H

tetrazolium, inner salt (MTS) in the presence of phenazine methosulfate (PMS), as previously described (19). Briefly, infected, mock-infected, inhibitor-treated and DMSO-treated cells, cultured in 96-well plates, were incubated in the presence of 0.6 mM MTS (Promega) and 14 µM PMS (Sigma-Aldrich) at 24, 48 or 72 h post-infection and absorbance read at 492 nm every 20 min for 3 h. Viability was determined by slope regression analysis for each sample and is expressed as a relative percentage compared the slope obtained with mock-infected cells. A Student's t test was performed to determine statistical significance of the differences in slopes between samples, using the SPSS software, version 16.0.

Caspase activity. Caspase-3 and caspase-9 activities were assessed using Caspase-3 and Caspase-9 colorimetric assays (R&D Systems), respectively, according to the manufacturer's protocol. Briefly, 1.2×10^7 cells were harvested, lysed, centrifuged at 10,000 $\times g$ for 10 min at 4°C and the concentration of protein in the supernatant was assessed by BCA Protein assay kit (Novagen), according to the manufacturer's protocol. A 200 µg aliquote of protein from each infection condition was incubated with the colorimetric substrate LEHD-pNA for the caspase-9 assay and DEVD-pNA for the caspase-3 assay, for 2 h at 37°C. Photometric analysis was performed at 405 nm and background values obtained from wells without colorimetric substrate was subtracted. Fold-increase of caspase activity in cells infected under different conditions was quantitated relative to mock-infected reference cells. ANOVA tests followed by post-hoc Tahame's analysis were performed to determine the statistical significance of the differences in the percentage of caspase activity between samples, using the SPSS software, version 16.0.

TUNEL labeling and permeability assay and intra-cellular DNA fragmentation assay. TUNEL labeling and permeability assay were performed using the *In Situ* cell death detection kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 4×10^6 cells were harvested, incubated with 0.5 µg/mL of 7-aminoactinomycin D (7-AAD) for 5 min, washed with PBS and fixed with 1% (w/v) paraformaldehyde for 20 min at room temperature. After three washes with PBS, they were then permeabilized with methanol at -20°C for 5 min, washed three times with PBS, incubated with labeling solution and enzyme solution for 1 h at 37°C, washed twice with PBS and analyzed using a FACScalibur cytofluorometer. Data analysis was performed using the Cell Quest Pro software (BD Bioscience). ANOVA tests followed by post-hoc Tahame's analysis were performed to determine the statistical

significance of the differences in the percentage of TUNEL-labeled and 7-AAD positive cells between samples, using the SPSS software, version 16.0. Intracellular DNA fragmentation assay was performed using the Cell death detection ELISA plus (Roche) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells in 96-well plates were centrifuged at 200 x g for 10 min at 4°C, supernatant was removed and the cell pellet, containing intact cells and apoptotic bodies, was lysed for 30 min at room temperature. Lysates were centrifuged at 200 x g for 10 min, to separate intact genomic DNA from fragmented DNA, and supernatants, containing fragmented DNA, were subjected to sandwich ELISA in streptavidin-coated microplates with anti-histone antibody coupled with biotin and anti-DNA antibody coupled to horseradish peroxidase for 2 h at room temperature. The ABTS substrate was added and photometric analysis was performed at 405 nm, with reference wavelength of 490 nm. Fold-increase of intracellular fragmented DNA in cells infected under different conditions was quantitated relative to mock-infected reference cells. ANOVA tests followed by post-hoc Tahame's analysis were performed to determine the statistical significance of the differences in the percentage of fragmented DNA between samples, using the SPSS software, version 16.0.

Quantitation of infectious virus titers by an immunoperoxidase assay (IPA). The IPA was performed on HRT-18 cells, as previously described (49). Briefly, the primary antibody used was Mab 1-10C3 directed against the S protein of rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241}. The secondary antibody was horseradish peroxidise-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (KPL). Immune complexes were detected by incubation with 0.025% (w/v) 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Bio-Rad) and 0.01% (v/v) hydrogen peroxide in PBS and infectious virus titers were calculated as previously described by the Karber method (49).

RESULTS

Both rOC/ATCC and rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ induce programmed cell death in human neurons. We previously showed that rOC/ATCC and rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ can induce neuronal death (27). Herein, we sought to identify both the underlying mechanisms and the type of cell death caused by infection of human neurons with two variants of HCoV-OC43: rOC/ATCC and rOC/US₁₈₃₋₂₄₁. We first confirmed that infection by both viruses led to a loss of viability of human neurons, starting at 48 h post-infection and that the rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ mutant induced a stronger neuronal death than rOC/ATCC, as shown by the MTS/PMS assay (Fig. 1A). Moreover, using an intracellular DNA fragmentation ELISA assay, we also showed that there was an increase in DNA fragmentation within infected neurons, compared to mock-infected cells, as soon as 48 h post-infection (Fig. 1B). Indeed, we confirmed that rOC/ATCC and rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ induced fragmentation of DNA in infected neurons, as shown by an increase in the percentage of positive TUNEL-labeled cells (Fig. 1C). The increase in percentage of 7-AAD positive cells started after the increase in percentage of TUNEL-labeled cells, indicating that DNA fragmentation occurred while the cell membrane was still intact in human neurons following infection by both viruses. Altogether, the loss of cell viability and the detection of intracellular fragmented DNA with subsequent cellular permeability alterations strongly suggests that neuronal death induced by rOC/ATCC and rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ is characteristic of a programmed cell death (PCD), as it has recently been described by the Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)'s unified criteria (47). Moreover, we showed that rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ induced a faster and stronger PCD than rOC/ATCC in human neurons.

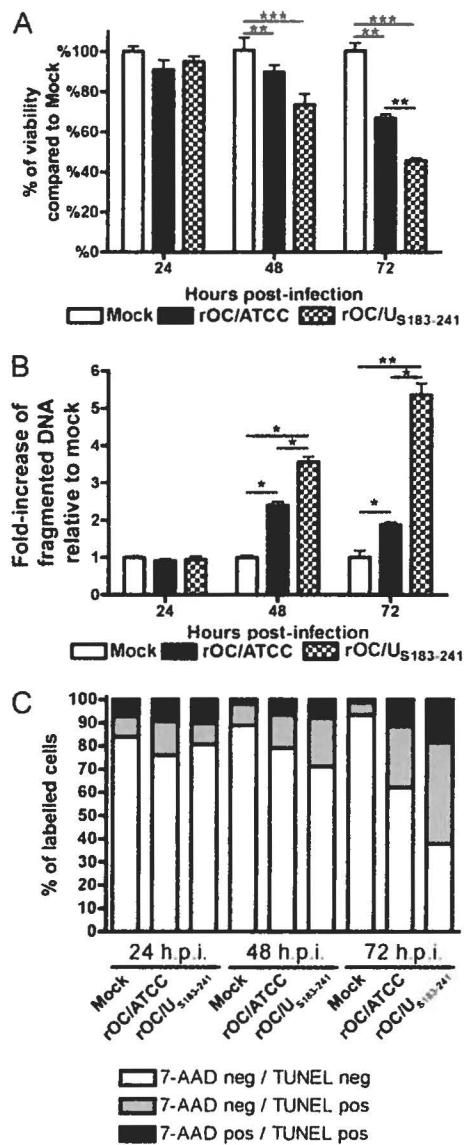


Figure 1. The rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241} induce programmed cell death in human neurons. Differentiated LA-N-5 cells were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S183-241} for 24, 48 or 72 h. A) Viability of infected human neurons. Cell viability was evaluated by the MTS/PMS assay and is expressed as relative percentage compared to mock-infected cells. B) Fragmentation of DNA in infected neurons. Fragmented DNA was quantified by sandwich ELISA against histone and DNA and is expressed as a relative fold-increase compared to mock-infected cells. C) FACS TUNEL / 7-AAD labeling of infected neurons. Cells stained with 7-AAD and TUNEL-labelled were analyzed by FACS. Graph represent percentage of quadrants. Non-significant percentage of 7-AAD-positive / TUNEL-negative cells were omitted. Statistical significance: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Caspases are activated following infection of human neurons by rOC/ATCC and rOC/US183-241 but virus-induced PCD is not inhibited by Z-VAD-FMK. We previously showed that infection of human neurons by rOC/ATCC and rOC/US183-241 can lead to activation of caspase-3 (27). In order to monitor the cascade of activation of caspases in relation to neuronal death induced by both viruses, we quantitated the activity of caspase-9, the main initiator caspase, and caspase-3, the main effector caspase. We showed that both caspase-9 and caspase-3 were activated in human neurons at 48 h post-infection by at least a 2-fold-increase compared to mock-infected cells (Fig. 2A and 2B). Moreover, rOC/US183-241 promoted a stronger activity of both caspases following infection, as compared to rOC/ATCC. The relative reduction of activity of both caspases at 72 h post-infection is likely related to an increased protein degradation that might occur at late times in the induced PCD. Considering that both initiator and effector caspases were activated following neuronal infection by both viruses, we sought to determine whether they were essential in the induction of PCD. The pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK and the caspase-9 inhibitor Z-LEHD-FMK were added to infected neurons and viability was assessed by the MTS/PMS assay. The presence of both inhibitors did not result in any change in cell viability at any time during infection (Fig. 3A and 3B). Indeed, there was no statistical difference between viability of infected cells treated with the caspase inhibitors compared to their relative vehicle (DMSO)-treated infected control cells. Moreover, the difference in cell viability between infected and mock-infected cells remained present even in the presence of the inhibitors (Fig. 3A and 3B). Immunofluorescence analysis confirmed the relative activation of caspase-3 following the infection by both viruses compared to mock-infected cells, as well as the efficiency of Z-VAD-FMK to inhibit caspase-3 activation, as no detectable level of activation of this caspase was observed (Fig. 3C). Taken together, our data indicate that initiator caspase-9 and effector caspase-3 were activated by rOC/ATCC and rOC/US183-241 and that their efficient inhibition did not impair nor delayed neuronal death, which clearly indicates that neuronal PCD induced by both viruses is not inhibited by Z-VAD-FMK and strongly suggests that caspases are not essential factors in the process.

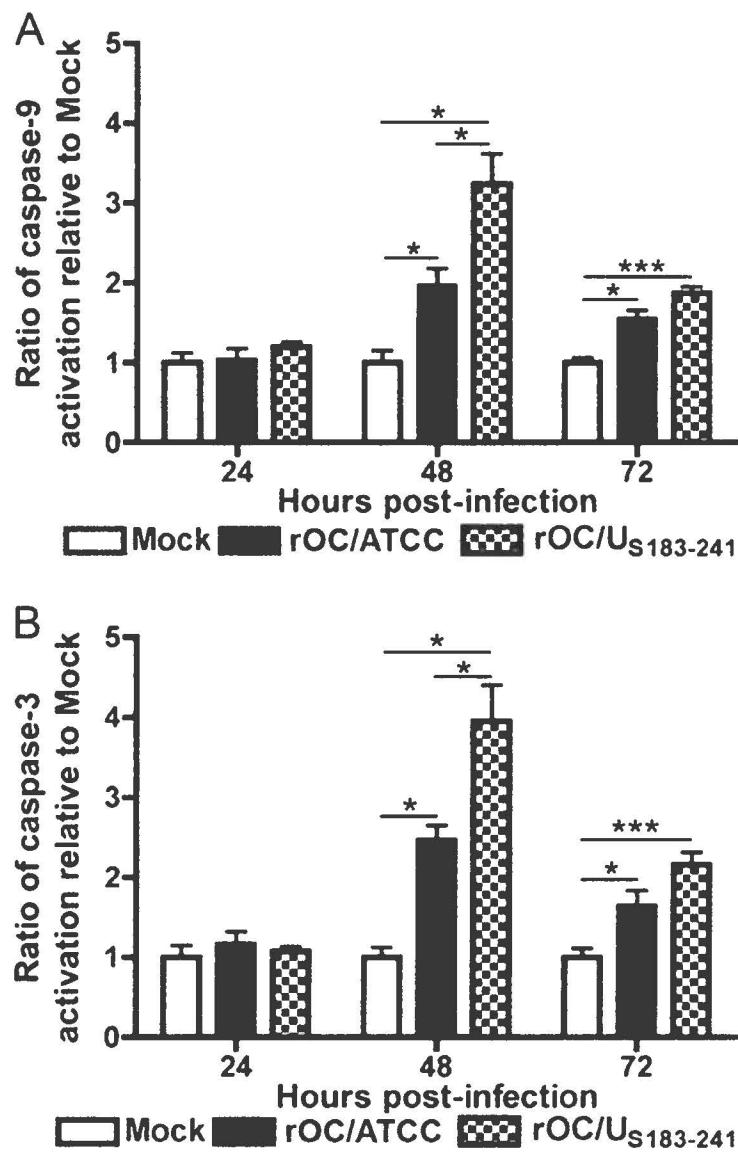


Figure 2. Infection by rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241} activates caspase-3 and -9 in human neurons. Differentiated LA-N-5 cells were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S183-241} for 24, 48 or 72 h. The relative activity of caspase-9 was measured using LEHD-pNA (A) and the relative activity of caspase-3 was measured using DEVD-pNA (B) and are expressed as a relative fold-increase compared to mock-infected cells.

Statistical significance: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

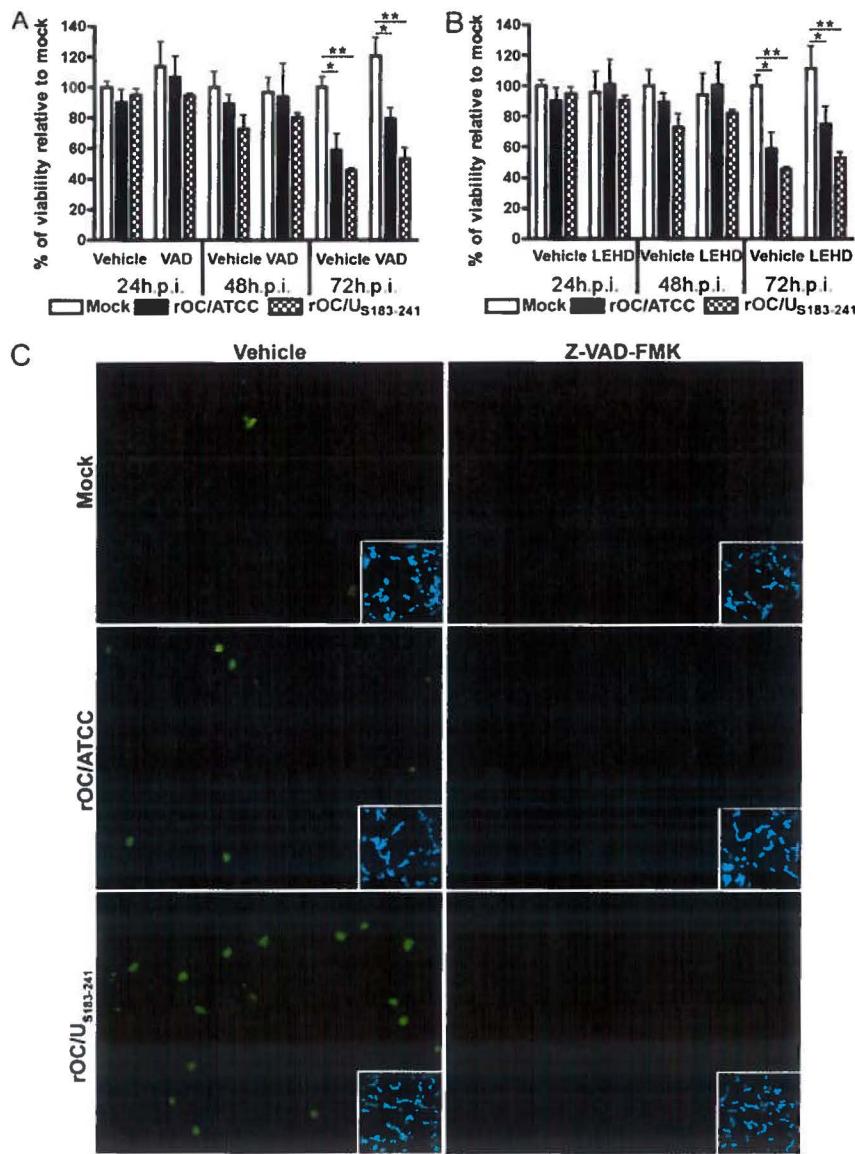


Figure 3. Caspases are activated following infection of human neurons by rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241} but the induced programmed cell death caused is not inhibited by Z-VAD-FMK. Differentiated LA-N-5 cells were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S183-241} and treated with either the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (VAD; A) or the caspase-9 inhibitor Z-LEHD-FMK (LEHD; B) for 24, 48 or 72 h. A and B) Viability of infected human neurons evaluated with the MTS/PMS assay and expressed as relative percentage compared to mock-infected cells. C) Immunofluorescence of active caspase-3. Vehicle-treated (left column) and Z-VAD-FMK-treated (right column) cells were incubated with anti-activated caspase-3 antibody (green). DAPI (blue) inserts demonstrate equivalent cell density in the microscope fields analyzed. Statistical significance: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Infection by rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241} promotes BAX, CytC and AIF relocalization in human neurons. The mitochondria is thought to play a central role in PCD by releasing pro-apoptotic factors such as CytC and AIF, after organelle permeabilization (38). Given that BAX is one of the major pro-apoptotic factors promoting permeabilization of the mitochondrial outer membrane (75), we analyzed its translocation towards the mitochondria. Making use of an antibody which is specific for the activated form of BAX, analysis by immunofluorescence confocal microscopy revealed that activated BAX was translocated to mitochondria at 48 h post-infection of neuronal cells by both viruses, as shown by the colocalization of BAX with mitotracker (Fig. 4A). These results were confirmed by Western immunoblotting analysis on mitochondrial extracts, which indicated an increased amount of BAX in this subcellular fraction (Fig. 4B). Moreover, we demonstrated that this translocation of BAX at 48 h post-infection was concurrent with the release of CytC from the mitochondria (Fig. 4B), indicating an effective permeabilization of mitochondria during the course of infection of humans neurons by both viruses. However, since caspases appear to be dispensable in rOC/ATCC- and rOC/U_{S183-241}-induced PCD, we analyzed the translocation of another pro-apoptotic protein, AIF, which is involved in a different type of neuronal death (3, 46, 74). Using immunofluorescence confocal microscopy, we demonstrated that AIF was effectively translocated from the mitochondria to the nucleus at 48 h post-infection, as shown by the colocalization of AIF with the nuclear marker DRAQ5 (arrows), with some residual mitochondrial-located AIF (arrowheads) (Fig. 4C). Moreover, this translocation was confirmed by Western immunoblotting analysis on nuclear extracts (Fig. 4D). Altogether, our results demonstrate that, in humans neurons infected by rOC/ATCC or rOC/U_{S183-241}, BAX was translocated to the mitochondria concurrently with the permeabilization of this organelle, and the release of CytC and AIF.

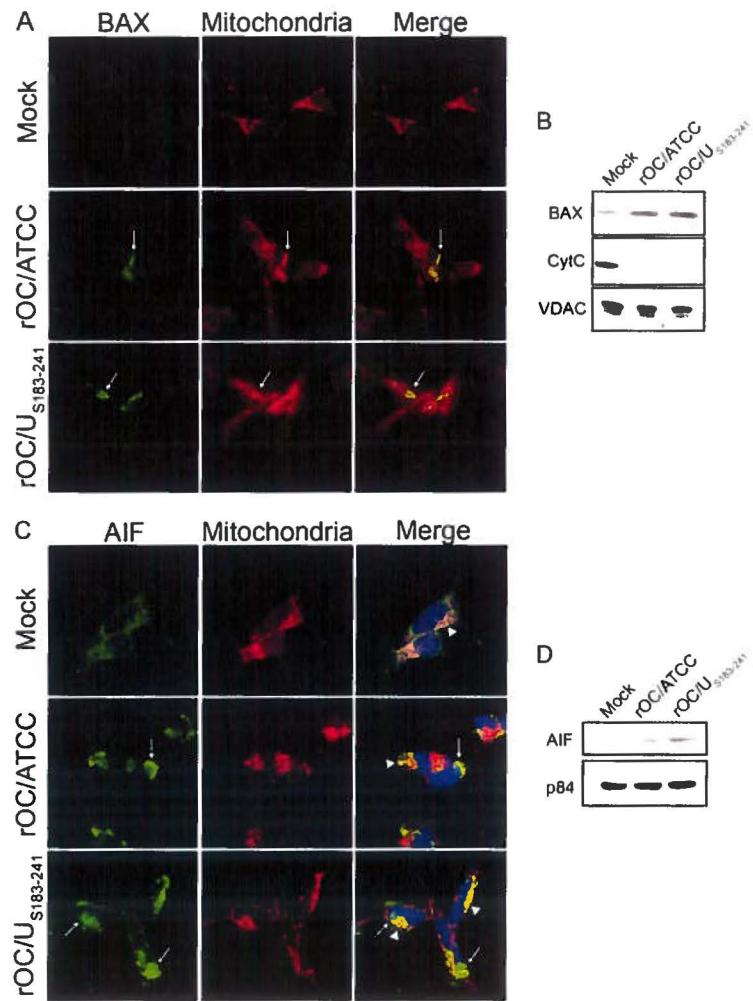


Figure 4. Infection by rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241} promote BAX, CytC and AIF relocalization in human neurons. Differentiated LA-N-5 cells were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S183-241}. A) Immunofluorescent detection of activated BAX. Cells were incubated with the Mitotracker Red CMXROS (red), fixed and incubated with an anti-activated BAX antibody (green). Colocalization is represented by merged BAX and Mitotracker Red CMXROS signals (yellow) as indicated by white arrows. B) Western immunoblotting of mitochondrial BAX and CytC. Mitochondrial protein fractions were subjected to Western immunoblotting analysis using antibodies directed against BAX or CytC. VDAC served as a loading control. C) Immunofluorescent detection of AIF. Cells were incubated with the Mitotracker Red CMXROS (red), fixed and incubated with an anti-AIF antibody (green) and DRAQ5 (blue). Nuclear colocalization is represented by merged AIF and DRAQ5 signals (turquoise) indicated by white arrows, residual mitochondrial colocalization is represented by merged AIF and Mitotracker (yellow) as indicated by white

arrowheads. D) Western immunoblotting of nuclear AIF. Nuclear protein fractions were subjected to Western immunoblotting analysis using antibodies directed against AIF. p84 served as a loading control.

Human neuronal PCD induced by HCoV-OC43 rOC/ATCC involves Cyclophilin

D. Considering that one of the putative partner of BAX in the pore forming unit at the mitochondria is CypD (48) and that CypD is being associated with numerous neurodegenerative diseases (9, 25, 30, 61, 73), we sought to determine whether chemical inhibition or knocked-down expression of CypD could prevent or modulate rOC/ATCC- or rOC/U_{S183-241}-induced PCD in infected human neurons. In a first experimental approach, cells were treated with a chemical inhibitor of CypD, cyclosporin A (CsA), to inhibit its ability to promote mPTP. In a second experimental approach, two stable LA-N-5 cell populations, knocked-down for CypD, were generated using shRNA expression vector transduced via lentiviral pseudoparticles. To determine their suitability for CypD knock-down experiments, the selected populations were assessed for their levels of expression of CypD compared to LA-N-5 population transduced with the empty vector (LA-N-5-empty) by quantitative PCR (Fig. 6F). The LA-N-5 CypD knock-down population K (pop K CypD-kd) expressed only 6.75% of CypD compared to LA-N-5-empty (Fig. 6F). Moreover, the LA-N-5 CypD knock-down population M (pop M CypD-kd) expressed 34.55% of CypD compared to LA-N-5-empty (Fig. 6F). Treatment with CsA or knock-down of CypD expression completely abolished the cytopathic effect (CPE) induced by rOC/ATCC infection, as shown by phase contrast microscopy at 48 h post-infection (Fig. 5A). CsA treatment or CypD-knock-down also reduced the retractions of dendrites and axons (Fig. 5A, arrows), as well as cell rounding and shrinking (Fig. 5A, arrowheads), while promoting the preservation of a characteristic neuronal shape (Fig. 5A). It is noteworthy that pop K CypD-kd led to greater protection from rOC/ATCC infection-induced CPE, as compared to pop M CypD-kd, which is in exact correlation with the level of expression of CypD in these two populations of LA-N-5 knocked-down for CypD. However, CsA and CypD- knock-down only moderately reduced CPE induced by rOC/U_{S183-241}, which induced a stronger PCD in human neurons (Fig. 5A). Using the MTS/PMS assay, we confirmed that inhibition of CypD by CsA and CypD knock-down efficiently reduced neuronal death induced by rOC/ATCC (Fig. 6A). Indeed, survival of cells treated with CsA and infected with rOC/ATCC was equal to mock-

infected CsA-treated cells at all times tested after infection (Fig. 6A). In contrast, CypD inhibition only slightly and transiently improved neuronal survival after infection by rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ at 48 h post-infection, correlating with phase contrast microscopy results (Fig. 6A). These differences correlated with the level of expression of CypD (Fig. 6F), which was significantly lower in the pop K CypD-kd, and demonstrate that protection from cell death was linked to the expression level of CypD. However, CypD inhibition by CsA or knock-down of CypD only moderately and transiently improved neuronal survival after infection by rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ at 48 h post-infection (Fig. 6A and 6B), correlating with phase contrast microscopy results showing partial protection against CPE (Fig. 5A). Moreover, analysis of DNA fragmentation confirmed that CypD inhibition by CsA led to a significant reduction of fragmented DNA in neurons infected with rOC/ATCC during the course of infection (Fig. 6C), as well as to a reduction of the percentage of TUNEL- and 7-AAD positive cells (Fig. 6E). Indeed, the pop K CypD-kd infected by rOC/ATCC also showed a significantly reduced DNA fragmentation at all times after infection, which was comparable to mock-infected cells, demonstrating that CypD is involved in neuronal death induced by rOC/ATCC (Fig. 6D). On the other hand, pop M CypD-kd infected by rOC/ATCC only showed a moderate reduction of DNA fragmentation at 48 and 72 h.p.i. (Fig. 6D). Here again, these differences were in correlation with the relative level of expression of CypD (Fig. 6F), which was significantly lower in the pop K CypD-kd, which demonstrates that protection from cell death was linked to the expression level of CypD. However, CsA treatment or knock-down of CypD only moderately delayed DNA fragmentation at 48 or 72 h after infection by the variant harboring two S point mutations (rOC/US₁₈₃₋₂₄₁; (Fig. 6C and 6D)). Moreover, CsA treatment also did not significantly reduce the percentage of TUNEL and 7-AAD positive cells (Fig. 6E). As the replication of other viruses was shown to be impaired in the presence of CsA (23, 39), we measured the production of intra- and extra-cellular infectious viral particles and demonstrated that the reduced PCD induced by rOC/ATCC was not due to an impaired production of infectious virus at the concentration used (data not shown). Altogether, our data clearly demonstrate that human neuronal PCD induced by the reference wild-type rOC/ATCC is CypD-dependent. However, although inhibition of CypD by CsA or genetic knock-down of CypD appeared to play a role in the rOC/US₁₈₃₋₂₄₁-induced PCD, the outcome

was only a partial inhibition of neuronal death. This suggests that rOC/U_{S183-241}-induced PCD does not rely exclusively on CypD.

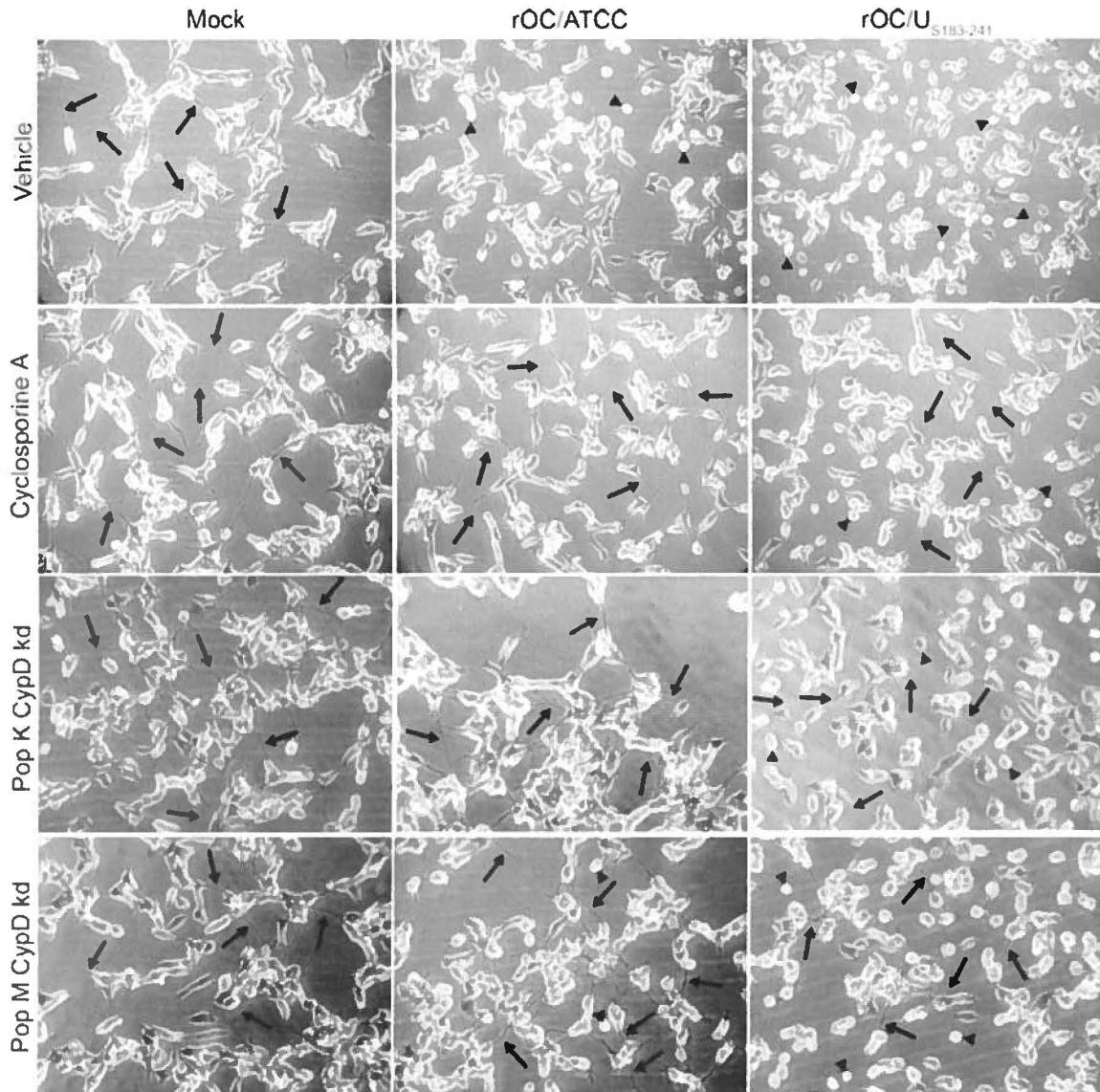


Figure 5. Cyclosporin A treatment and cyclophilin-D-knock-down protects human neurons from rOC/ATCC-induced programmed cell death. Wild-type LA-N-5 cells were treated with cyclosporin (CsA) and two LA-N-5 populations knocked-down for CypD (pop K CypD-kd and pop M CypD-kd) were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S183-241}. Images represents phase contrast microscopy pictures taken at 48 h.p.i. Control LA-N-5 empty cell population are not presented since they were comparable to non-treated CsA wild-type LA-N-5. Arrows indicates dendrites and axons. Arrowheads indicate rounding and shrinking bodies.

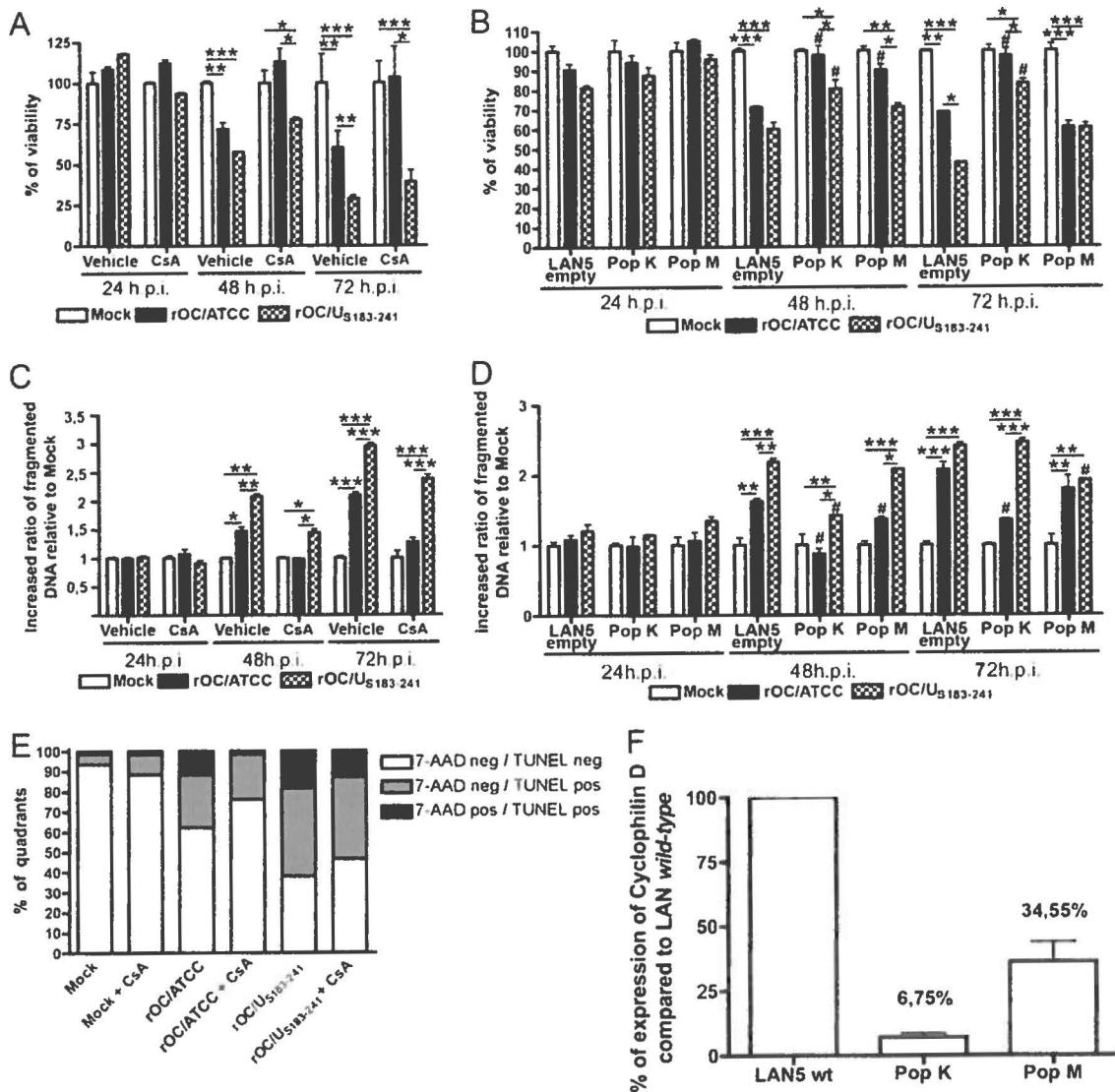


Figure 6. Human neuronal PCD induced by rOC/ATCC is Cyclophilin D-dependent. Wild-type LA-N-5, treated with cyclosporin A (CsA) or mock-treated (vehicle) for 24, 48 or 72 h, and two LA-N-5 populations knocked-down for CypD, pop K CypD-kd (pop K) and pop M CypD-kd (pop M) and LA-N-5 empty vector population (LAN5 empty) were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S183-241}. A and B) Cell viability of infected wild-type LA-N-5 treated with cyclosporin A (A) and infected LA-N-5 K and M populations knocked-down for CypD (B) was evaluated with the MTS/PMS assay and is expressed as relative percentage compared to mock-infected cells. C and D) Fragmentation of DNA in infected wild-type LA-N-5 cells trated with Cyclosporin A (C) and infected LA-N-5 K and M populations knocked-down for CypD (D) was evaluated and expressed as a relative fold-increase compared to mock-infected cells.. E) FACS TUNEL labeling / 7-AAD staining of infected wild-type LA-N-5 treated with cyclosporin A were analyzed by FACS at 72 h post-infection. Graph represents percentage of quadrants. Non-significant percentages of 7-AAD-positive / TUNEL-negative cells were omitted. F) Quantification of CypD expression in LA-N-5 knocked-down populations. Expression of CypD in the two populations of LA-N-5 neurons knocked-down for CypD was evaluated by quantitative PCR and is expressed as a relative percentage compared to LA-N-5 empty vector population.. Non-significant percentage of 7-AAD-positive / TUNEL-negative cells were omitted.

Statistical significance: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p <0.001 as compared to corresponding non-infected LA-N-5 population. # p < 0.05 as compared to LA-N-5 empty vector infected with the same virus.

Chemical inhibition of Cyclophilin D alters AIF nuclear translocation in human neurons infected by rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241}. AIF has been associated with several neurodegenerative diseases (3, 46, 74). Herein, we show that it was translocated to the nucleus following infection by both viruses (Fig. 4C (arrows) and 4D). Moreover, AIF is thought to be mainly involved in neuronal death and caspase-independent PCD (16, 46, 74). Therefore, we analyzed AIF localization after infection of neurons. Immunofluorescence confocal microscopy showed that AIF nuclear translocation was impaired following CypD inhibition by CsA (Fig. 7A). CypD inhibition also slightly favored the retention of AIF and CytC to mitochondria (Fig. 7B) following infection by rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241}. It is striking to observe that translocation of AIF followed the same kinetics in both rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241}-infected-cells, treated or not with CsA. Therefore, one might consider that the stronger PCD induced by rOC/U_{S183-241} in human neurons could use other mechanisms that do not involve CypD or AIF. Nevertheless, taken together, our data strongly suggest that AIF is translocated to the nucleus following infection by both viruses and that the impairment of this process by inhibition of CypD with CsA significantly altered virus-induced cell death.

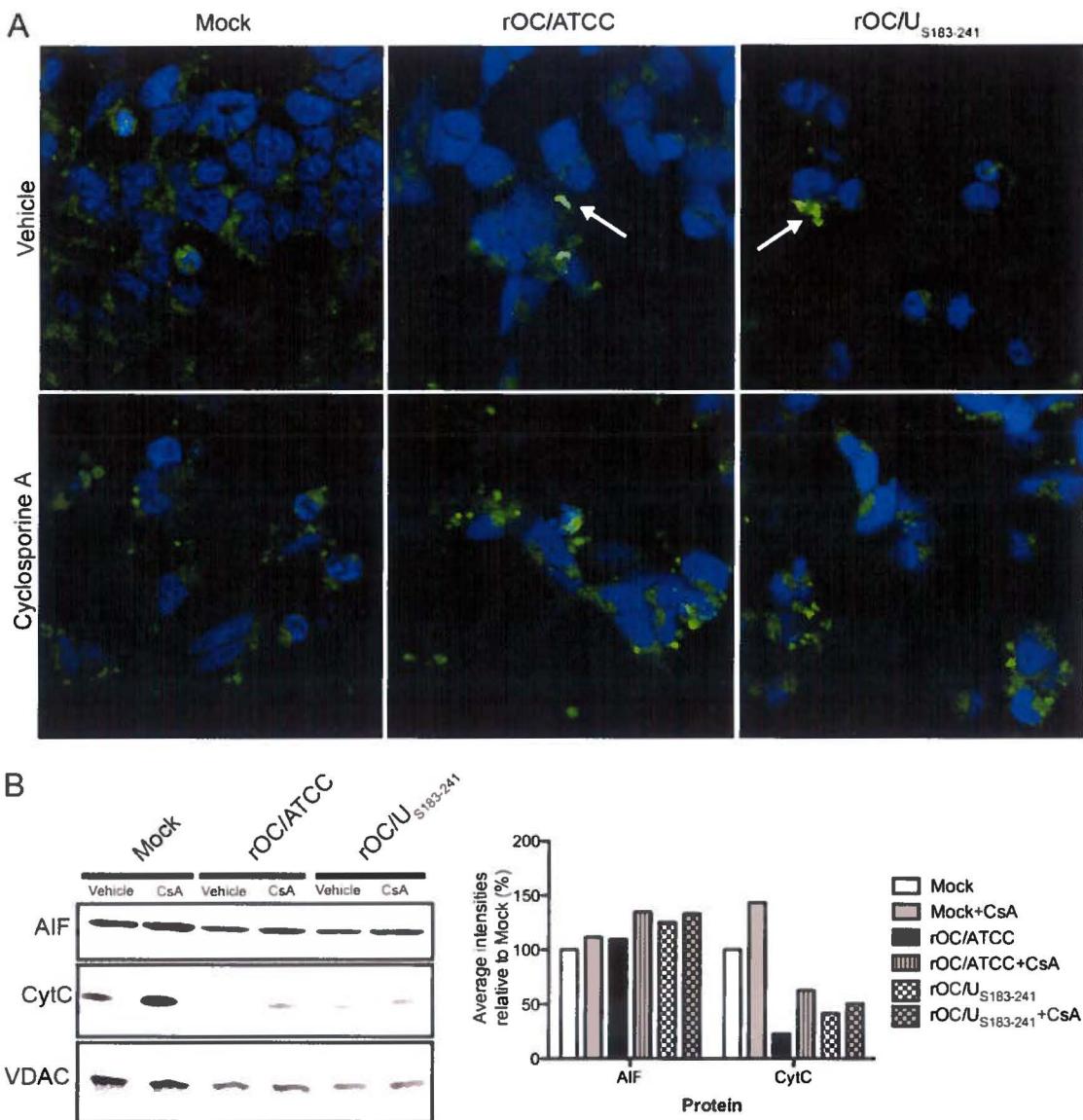


Figure 7. Cyclophilin D inhibition alters AIF nuclear translocation in infected neurons. Differentiated LA-N-5 cells were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S183-241} and treated with cyclosporin A (CsA). A) Detection of AIF by immunofluorescence. Cells were fixed and incubated with an anti-AIF antibody (green) and DRAQ5 (blue). Colocalization is represented by merged AIF and DRAQ5 signals (turquoise) as indicated by white arrowheads. B) Western immunoblotting of mitochondrial AIF and CytC. Mitochondrial proteins fractions were subjected to Western immunoblotting analysis using antibodies directed against AIF or CytC. VDAC served as a loading control. Intensity of the bands were evaluated with ChemiGenius2 Syngene software and expressed in percentage relative to loading control. Results are representative of two independent experiments.

DISCUSSION

Using reverse genetics with our cDNA infectious clone pBAC-OC43^{FL} to generate new virus recombinants (64), we previously reported the characterization of the type of neuronal death induced by two viral variants, reference wild-type virus (rOC/ATCC) or mutant virus (rOC/US₁₈₃₋₂₄₁), and identified pro-apoptotic factors involved in this process. The results reported herein define neuronal death induced by rOC/ATCC and rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ as an apoptotic-like programmed cell death that is not inhibited by Z-VAD-FMK and is CypD-dependent, with an involvement of AIF. Furthermore, our data confirm that the acquisition of persistence-associated mutations in the HCoV-OC43 S glycoprotein, which leads to an increased neurovirulence in mice (42), also causes enhanced neuronal cytopathic effects, which appear to involve other cell death factors. Analysis of binding studies and of recently obtained crystals of a viral S protein fragment containing the H183R and Y241H mutations suggests that these two mutated amino acids are involved in binding of S to 9-O-acetyl sialic acid (M. Desforges, A. Liavonchanka, A. Mansouri, C. Sharon, H. Yu, Y. Chen, X. Chen, P. J. Talbot and J. M. Rini, unpublished data). This may represent a viral determinant of the fate of infected cells.

Careful attention must be taken when classifying and attributing a characteristic type of cell death (47). The use of recent neologisms (e.g. necroptosis, aponecrosis) (58) to define non-classical mechanisms with diverse heterogeneous functional markers of apoptosis is bewildering. Based on the recently described NCCD guidelines (47), we found that human neurons infected by rOC/ATCC or rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ underwent cell death associated with modified morphological aspects and specific hallmarks of programmed cell death.

Caspases are known for their involvement in several cellular death pathways (33). We confirmed that infection of neurons by both viruses led to the release of CytC, which is known to be involved in the formation of the apoptosome (8), and the activation of initiator caspase-9 and effector caspase-3. However, viability assays in the presence of caspase inhibitors revealed that PCD induced by rOC/ATCC and rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ was not inhibited by Z-VAD-FMK, since neuronal survival after infection remained the same as controls (Fig. 3A and 3B). The NCCD guidelines (47) and others (15) bring caution in stating that the absence of cell survival protection by Z-VAD-FMK treatment is a consequence of caspase-

independent death. It cannot be excluded that undetectable residual caspase activity does remain, even in the presence of Z-VAD-FMK in cultured neurons, or that some caspases could not be inhibited (15). However, even though a slight level of activation of caspases cannot be ruled out in our model, our immunofluorescence data (Fig. 3C) showed that caspase-3 activation in the presence of Z-VAD-FMK was below detectable level. Therefore, we conclude that PCD induced in neurons by rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241} infection is not inhibited by Z-VAD-FMK, while depicting the possibility of a caspase-dispensable PCD, which cannot be associated with classical apoptotic mechanisms and is therefore more characteristic an apoptosis-like PCD (reviewed in 47). However, we cannot completely rule out the possibility that caspases play an accessory role during the course of neuronal death. On the other hand, caspase activation has also been reported in other death-unrelated cellular functions (34), such as neuronal plasticity (12) and long-term potentiation (35) or processing of viral proteins after infection by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus (26) and influenza virus (80).

Since caspases appear to be non-essential factors in rOC/ATCC- and rOC/U_{S183-241}-induced apoptosis-like PCD, we sought to identify other pro-apoptotic factors potentially involved in this virus-induced neuronal death. AIF is one such factor, which has been shown to be involved in several neurological diseases and caspase-independent neuronal death (3, 46, 74), apparently by promoting high molecular weight DNA fragmentation (67). Herein, we demonstrate that AIF translocation from mitochondria to the nucleus occurred during the course of infection by rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241}. Moreover, inhibition of CypD by CsA caused an increased mitochondrial retention of AIF, leading to impaired nuclear localization, which was accompanied by almost complete cell survival after infection by rOC/ATCC compared to mock-infected cells, and to a slightly delayed neuronal death after infection by rOC/U_{S183-241}. These results suggest that AIF is a neuronal death-related factor in rOC/ATCC infection, likely through its involvement in high molecular weight fragmentation of DNA. The sustained neuronal death induced by rOC/U_{S183-241} even in the absence of nuclear localization of AIF leads us to speculate that this viral mutant might activate other death factors. For instance, poliovirus infection is known to induce competing death programs that involve canonical cytopathic effect or classic apoptosis (1). In this case, pan-caspase inhibitors promote a switch in death programs leading to cytopathic effect (1, 2, 72).

Moreover, it is established that vesicular stomatis virus (VSV) can induce apoptosis via mitochondrial and caspase-dependent pathways (24). However, VSV could also implicate alternative death programs, such as passive necrosis, as shown by sustained cell death even in the presence of pan-caspase inhibitors (24).

Alteration of mitochondrial membrane permeability and the release of the pro-apoptotic factors CytC and AIF are also hallmarks of PCD, in which CypD and BAX represent two major inducing factors, through their possible interaction leading to the formation of pores in the mitochondrial membrane (48). The translocation of BAX towards mitochondria after infection by both viruses, shown in our study, suggests that it might be involved in inducing mitochondrial membrane permeabilization. Indeed, it was previously suggested that, when localized with the mitochondria, BAX can interact with CypD to promote mPTP formation (48). Our data showing that neurons treated with CsA or knocked-down for CypD completely recover their viability following rOC/ATCC infection clearly argues for a contribution of CypD in the apoptosis-like PCD induced by rOC/ATCC in human neurons. Furthermore, correlation between protection of neuronal viability and the level of CypD knock-down strengthens our conclusion that CypD is involved in the PCD induced by rOC/ATCC and rOC/US183-241. It is worth noting that the involvement of CypD in different types of cell death has retained much attention and remains under considerable debate, mainly regarding its role in apoptosis and necrosis. Indeed, it was reported that CypD over-expression protected the B50 neuronal cell line from apoptosis while promoting necrosis (50). On the other hand, another study showed that over-expression of the pro-apoptotic factor Apop-1 induced CypD-dependent apoptotic cell death in vascular smooth muscle cells (76). Others have argued that CypD is rather involved in necrotic cell death induced by Ca^{2+} overload or ROS in mouse embryonic fibroblasts and hepatocytes (6, 57), while CypD null-mice were nearly completely protected from mPTP-related apoptosis (54). Therefore, the apparent discrepancies between these studies investigating the role of CypD in different types of cell death might be reconciled by taking into consideration the cell type and stimulus-specific function of this important death regulating factor. Also, the absence of generalized use of recognized definitions established by the National Committee on Cell Death (NCCD) (47) to define or describe the type of cell death observed in a particular situation may amplify such apparent discrepancies. Nevertheless, considering the fact that DNA fragmentation

occurred while the cell membrane was still intact (Fig. 1) and that the CypD knocked-down cell population was protected from death, we argue that CypD functions as a pro-PCD factor in the type of apoptosis-like PCD induced by rOC/ATCC and rOC/U_{S183-241} infection of neurons. It is striking to observe that neuronal survival following infection varies depending on whether the wild-type reference virus (rOC/ATCC) or the mutant virus (rOC/U_{S183-241}) is used. As cited above (M. Desforges, A. Liavonchanka, A. Mansouri, C. Sharon, H. Yu, Y. Chen, X. Chen, P. J. Talbot and J. M. Rini, unpublished data), the H183R and Y241H mutations are within the 9-O-acetyl sialic acid (SA) binding domain of the viral S protein. Indeed, X-ray crystallographic data indicate that these two residues may be involved in an optimal interaction of the S protein with SA. Furthermore, binding studies strongly suggest that these two S mutations in rOC/ U_{S183-241} increase the affinity of S for 9-O-acetyl-SA. Interestingly, other viruses, such as reovirus (18), are able to induce apoptosis in relation to binding with higher affinity to sialic acid domain on their cellular receptor (17). The 9-O-acetyl SA can be found on different types of glycans, including the GD3 gangliosides (51). This glycolipid is found in different cell membranes, including at the cell surface and at the mitochondria (56). When acetylated, this ganglioside is beneficial to the membranes but when the acetylated group is removed, the GD3 molecule acquires pro-PCD properties (28). Indeed, deacetylation of GD3, by either the hemagglutinin esterase protein of Influenza C virus (10) or the cellular O-acetylerase (69), is known to induce the capacity of this ganglioside to participate in the opening of the mPTP, with the involvement of BAX, and promote the release of cell death proteins, such as CytC and AIF (52, 60, 63). Moreover, we reported previously that the rOC/U_{S183-241} variant produced increased amounts of viral proteins and at least ten times more infectious virus within infected human neurons and led to an increased activation of the unfolded protein response (27). Considering this increased number of infectious virions, all harboring S proteins, in the infected cells and the apparent higher affinity of rOC/U_{S183-241} S protein for 9-O-acetyl sialic acid and the presence of an active hemagglutinin esterase (HE) protein in the HCoV-OC43 envelope (M. Desforges, J. Desjardins, and P. J. Talbot, unpublished data), which is known to remove the 9-O-acetyl ester group on sialic acid (Chengsheng Zhang, personal communication), it is likely that rOC/U_{S183-241} infection may lead to an increased cleavage of 9-O-acetyl GD3 by the higher amount of HE protein molecules present in the infected cell and produce greater amount of

the pro-PCD deacetylated GD3 gangliosides, as compared to rOC/ATCC. The increase of deacetylated GD3 that promotes mPTP could participate in a stronger insult at the mitochondria, in addition to the role of CypD, to allow the release of CytC and AIF (31, 63). Therefore, we speculate that rOC/US₁₈₃₋₂₄₁, a more neurovirulent mutant (42), could promote increased GD3 deacetylation through its hemagglutinin-esterase viral protein, and induces a much stronger cellular insult, which might circumvent CypD inhibition or knock-down and promote the increased cell death observed when compared to rOC/ATCC. Our results suggest that virus persistence-associated mutations in the viral S protein led to a modification of the underlying mechanisms involved in neuronal death.

In summary, the results of the study presented herein strongly suggest that rOC/ATCC and rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ induce a neuronal death characteristic of an apoptosis-like programmed cell death, which is not inhibited by Z-VAD-FMK, accompanied by an accessory and dispensable activation of major initiator caspase-9 and effector caspase-3, and a concomitant release of CytC from mitochondria. Furthermore, we demonstrate that neuronal death induced by rOC/ATCC is CypD-dependent, consistent with a pro-apoptotic role of CypD in this human neuronal model. In addition, our data also strongly suggest a role for AIF in rOC/ATCC-induced neuronal death. Moreover, the use of a mutant virus (rOC/US₁₈₃₋₂₄₁), which harbors persistence-associated mutations in the viral S protein (65), possesses an enhanced capacity to accumulate in infected cells (27) and an apparent higher affinity for 9-O-acetyl sialic acid, points towards a central role for the viral S glycoprotein, which could indirectly influence the capacity of the viral HE protein to regulate the fate of 9-O-acetylated pro-PCD molecule such as GD3 in neuronal cell death pathways. Further studies are ongoing to characterize the early events of PCD leading to CypD activation and to further characterize the early events of PCD leading to CypD activation and to further characterize the possible involvement of the S protein of rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ with regards to 9-O-acetyl sialic acid metabolism and its potential role in related mechanisms of cell death, such as GD3 deacetylation in human neurons.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant No. MT-9203 from the Institute of Infection and Immunity (III) of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to Pierre J. Talbot, who is the holder of the Tier-1 (Senior) Canada Research Chair in Neuroimmunovirology award. Dominique J. Favreau acknowledges a doctoral studentship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FRSQ).

REFERENCES

1. **Agol, V. I., G. A. Belov, K. Bienz, D. Egger, M. S. Kolesnikova, N. T. Raikhlin, L. I. Romanova, E. A. Smirnova, and E. A. Tolskaya.** 1998. Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology* **252**:343-353.
2. **Agol, V. I., G. A. Belov, K. Bienz, D. Egger, M. S. Kolesnikova, L. I. Romanova, L. V. Sladkova, and E. A. Tolskaya.** 2000. Competing death programs in poliovirus-infected cells: commitment switch in the middle of the infectious cycle. *J. Virol.* **74**:5534-5541.
3. **Alano, C. C., P. Garnier, W. Ying, Y. Higashi, T. M. Kauppinen, and R. A. Swanson.** 2010. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *J. Neurosci.* **30**:2967-2978.
4. **Arbour, N., R. Day, J. Newcombe, and P. J. Talbot.** 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J. Virol.* **74**:8913-8921.
5. **Arbour, N., G. Côté, C. Lachance, M. Tardieu, N. R. Cashman, and P. J. Talbot.** 1999. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *J. Virol.* **73**:3338-3350.
6. **Baines, C. P., R. A. Kaiser, N. H. Purcell, N. S. Blair, H. Osinska, M. A. Hambleton, E. W. Brunskill, M. R. Sayen, R. A. Gottlieb, G. W. Dorn, J. Robbins, and J. D. Molkentin.** 2005. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**:658-662.
7. **Baines, C. P., R. A. Kaiser, T. Sheiko, W. J. Craigen, and J. D. Molkentin.** 2007. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* **9**:550-555.
8. **Baliga, B., and S. Kumar.** 2003. Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow? *Cell Death Differ.* **10**:16-18.
9. **Barrientos, S. A., N. W. Martinez, S. Yoo, J. S. Jara, S. Zamorano, C. Hetz, J. L. Twiss, J. Alvarez, and F. A. Court.** 2011. Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore. *J. Neurosci.* **31**:966-978.
10. **Birks, S.M., J.O. Danquah, L. King, R. Vlasak, D.C. Gorecki and G.J. Pilkington.** 2011. Targeting the GD3 acetylation pathway selectively induces apoptosis in glioblastoma. *Neuro-oncology* **13**:950-960.
11. **Bonavia, A., N. Arbour, V. W. Yong, and P. J. Talbot.** 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *J. Virol.* **71**:800-806.

12. **Bravarenko, N. I., M. V. Onufriev, M. Y. Stepanichev, V. N. Ierusalimsky, P. M. Balaban, and N. V. Gulyaeva.** 2006. Caspase-like activity is essential for long-term synaptic plasticity in the terrestrial snail *Helix*. *Eur. J. Neurosci.* **23**:129-140.
13. **Brison, E., H. Jacomy, M. Desforges and P.J. Talbot.** 2011. 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. *J. Virol. in press (#5576-11)*
14. **Buchmeier, M. J., R. G. Dalziel, M. J. Koolen, and P. W. Lampert.** 1987. Molecular determinants of CNS virulence of MHV-4. *Adv. Exp. Med. Biol.* **218**:287-295.
15. **Chauvier, D., S. Ankri, C. Charriaut-Marlangue, R. Casimir, and E. Jacotot.** 2007. Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ.* **14**:387-391.
16. **Cheung, E. C., L. Melanson-Drapeau, S. P. Cregan, J. L. Vanderluit, K. L. Ferguson, W. C. McIntosh, D. S. Park, S. A. Bennett, and R. S. Slack.** 2005. Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms. *J. Neurosci.* **25**:1324-1334.
17. **Clarke, P. and K.L. Tyler.** 2003. Reovirus-induced apoptosis: a mini-review. *Apoptosis* **8**:141-150.
18. **Connolly, J.D., E.S. Barton, and T.S. Dermody.** 2001. Reovirus binding to cell surface sialic acid potentiates virus-induced apoptosis. *J. Virol.* **75**:4029-4039.
19. **Cory, A. H., T. C. Owen, J. A. Barltrop, and J. G. Cory.** 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* **3**:207-212.
20. **Cregan, S. P., A. Fortin, J. G. MacLaurin, S. M. Callaghan, F. Ceconni, S. W. Yu, T. M. Dawson, V. L. Dawson, D. S. Park, G. Kroemer, and R. S. Slack.** 2002. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.* **158**:507-517.
21. **Crompton, M., E. Barksby, N. Johnson, and M. Capano.** 2002. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* **84**:143-152.
22. **Crompton, M., S. Virji, and J. M. Ward.** 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur. J. Biochem.* **258**:729-735.
23. **Damaso, C. R., and S. J. Keller.** 1994. Cyclosporin A inhibits vaccinia virus replication in vitro. *Arch. Virol.* **134**:303-319.

24. **Desforges, M., G. Despars, S. Berard, M. Gosselin, M. O. McKenzie, D. S. Lyles, P. J. Talbot, and L. Poliquin.** 2002. Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* **295**:63-73.
25. **Du, H., L. Guo, F. Fang, D. Chen, A. A. Sosunov, G. M. McKhann, Y. Yan, C. Wang, H. Zhang, J. D. Molkentin, F. J. Gunn-Moore, J. P. Vonsattel, O. Arancio, J. X. Chen, and S. D. Yan.** 2008. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **14**:1097-1105.
26. **Eleouet, J. F., E. A. Slee, F. Saurini, N. Castagne, D. Poncet, C. Garrido, E. Solary, and S. J. Martin.** 2000. The viral nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) is cleaved by caspase-6 and -7 during TGEV-induced apoptosis. *J. Virol.* **74**:3975-3983.
27. **Favreau, D. J., M. Desforges, J. R. St-Jean, and P. J. Talbot.** 2009. 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* **395**:255-267.
28. **Fernández-Checa, J.C.** 2003. Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**:471-479.
29. **Fischer, G., B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiehhaber, and F. X. Schmid.** 1989. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**:476-478.
30. **Forte, M., B. G. Gold, G. Marracci, P. Chaudhary, E. Basso, D. Johnsen, X. Yu, J. Fowlkes, M. Rahder, K. Stem, P. Bernardi, and D. Bourdette.** 2007. Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:7558-7563.
31. **García-Ruiz, C., A. Colell, R. París and J.C. Fernández -Checa.** 2000. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *FASEB J.* **14**:847-858.
32. **Giorgio, V., M. E. Soriano, E. Basso, E. Bissetto, G. Lippe, M. A. Forte, and P. Bernardi.** 2010. Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**:1113-1118.

33. **Grutter, M. G.** 2000. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:649-655.
34. **Gulyaeva, N. V.** 2003. Non-apoptotic functions of caspase-3 in nervous tissue. *Biochemistry Mosc.* **68**:1171-1180.
35. **Gulyaeva, N. V., I. E. Kudryashov, and I. V. Kudryashova.** 2003. Caspase activity is essential for long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* **73**:853-864.
36. **Halestrap, A. P., and C. Brenner.** 2003. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr. Med. Chem.* **10**:1507-1525.
37. **Halestrap, A. P., and A. M. Davidson.** 1990. Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* **268**:153-160.
38. **Halestrap, A. P., G. P. McStay, and S. J. Clarke.** 2002. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**:153-166.
39. **Henry, S. D., H. J. Metselaar, R. C. Lonsdale, A. Kok, B. L. Haagmans, H. W. Tilanus, and L. J. van der Laan.** 2006. Mycophenolic acid inhibits hepatitis C virus replication and acts in synergy with cyclosporin A and interferon-alpha. *Gastroenterology* **131**:1452-1462.
40. **Hill, D. P., and K. A. Robertson.** 1998. Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain Res. Protoc.* **2**:183-190.
41. **Jacomy, H., G. Fragoso, G. Almazan, W. E. Mushynski, and P. J. Talbot.** 2006. Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/c mice. *Virology* **349**:335-346.
42. **Jacomy, H., J. R. St-Jean, E. Brison, G. Marceau, M. Desforges, and P. J. Talbot.** 2010. Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. *J. Neurovirol.* **16**:279-293.
43. **Jacomy, H., and P. J. Talbot.** 2003. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* **315**:20-33.
44. **Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y. Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, and J. M. Penninger.** 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**:549-554.

45. **Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, S. E. Levy, J. E. Sligh, J. Cai, D. P. Jones, G. R. MacGregor, and D. C. Wallace.** 2004. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**:461-465.
46. **Krantic, S., N. Mechawar, S. Reix, and R. Quirion.** 2007. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog. Neurobiol.* **81**:179-196.
47. **Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschoopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino.** 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **16**:3-11.
48. **Kumarswamy, R., and S. Chandna.** 2009. Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? *Mitochondrion* **9**:1-8.
49. **Lambert, F., H. Jacomy, G. Marceau, and P. J. Talbot.** 2008. Titration of human coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, by an indirect immunoperoxidase assay. *Methods Mol. Biol.* **454**:93-102.
50. **Li, Y., N. Johnson, M. Capano, M. Edwards, and M. Crompton.** 2004. Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem. J.* **383**:101-109.
- 50a. **K.J. Livak, T.D. Schmittgen** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method *Methods*, **25** (2001), pp. 402–408
51. **Maccioni, H.J., J.L. Daniotti, J.A. Martina.** 1999. Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* **1437**:101-118.
52. **Malisan, F., L. Franchi, B. Tomassini, N. Ventura, I. Condò, M.R. Rippo, A. Rufini, L. Liberati, C. Nachtigall, B. Kniep and R. Testi.** 2002. Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. *J. Exp. Med.* **196**:1535-1541.
53. **Martin, L. J.** 2010. The mitochondrial permeability transition pore: a molecular target for amyotrophic lateral sclerosis therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**:186-197.
54. **Martin, L. J., N. A. Adams, Y. Pan, A. Price, and M. Wong.** 2011. The mitochondrial permeability transition pore regulates nitric oxide-mediated apoptosis of neurons induced by target deprivation. *J. Neurosci.* **31**:359-370.
55. **Mounir, S., and P. J. Talbot.** 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. *J. Gen. Virol.* **73**:2731-2736.

56. **Mukherjee, K., A.K. Chava, C. Mandal, S.N. Dey, B. Kniep, S. Chandra and C. Mandal.** 2008. O-acetylation of GD3 prevents its apoptotic effect and promotes survival of lymphoblasts in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J. Cell. Biochem.* **105**:724-734.
57. **Nakagawa, T., S. Shimizu, T. Watanabe, O. Yamaguchi, K. Otsu, H. Yamagata, H. Inohara, T. Kubo, and Y. Tsujimoto.** 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**:652-658.
58. **Nicotera, P., and G. Melino.** 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* **23**:2757-2765.
59. **Pleasure, S. J., and V. M. Lee.** 1993. NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* **35**:585-602.
60. **Rippo, M. R., F. Malisan, L. Ravagnan, B. Tomassini, I. Condo, P. Costantini, S.A. Susin, A. Rufini, M. Todaro, G. Kroemer and R. Testi.** 2000. GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *FASEB J.* **14**:2047-2054
61. **Schinder, A. F., E. C. Olson, N. C. Spitzer, and M. Montal.** 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* **16**:6125-6133.
62. **Schinzel, A. C., O. Takeuchi, Z. Huang, J. K. Fisher, Z. Zhou, J. Rubens, C. Hetz, N. N. Danial, M. A. Moskowitz, and S. J. Korsmeyer.** 2005. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:12005-12010.
63. **Scorrano, L., V. Petronilli, F. Di Lisa and P. Bernardi.** 1999. Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **274**:22581-22585.
64. **St-Jean, J. R., M. Desforges, F. Almazan, H. Jacomy, L. Enjuanes, and P. J. Talbot.** 2006. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J. Virol.* **80**:3670-3674.
65. **St-Jean, J. R., M. Desforges, and P. J. Talbot.** 2006. Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* **581**:499-502.
66. **St-Jean, J. R., H. Jacomy, M. Desforges, A. Vabret, F. Freymuth, and P. J. Talbot.** 2004. Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. *J. Virol.* **78**:8824-8834.
67. **Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R.**

- Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, and G. Kroemer.** 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**:441-446.
68. **Takahashi, N., T. Hayano, and M. Suzuki.** 1989. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**:473-475.
69. **Takematsu, H., S. Diaz, A. Stoddart, Y. Zhang and A. Varki.** 1999. Lysosomal and cytosolic sialic acid 9-O-acetylesterase activities can Be encoded by one gene via differential usage of a signal peptide-encoding exon at the N terminus. *J. Biol. Chem.* **274**:25623-25631.
70. **Talbot, P. J., H. Jacomy, and M. Desforges.** 2008. Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus, p. 313-324. *In* S. Perlman, T. Gallagher, and E. J. Snijder (ed.), *Nidoviruses*. ASM Press, Washington, DC.
71. **Teshima, Y., M. Akao, R. A. Li, T. H. Chong, W. A. Baumgartner, M. V. Johnston, and E. Marban.** 2003. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress. *Stroke* **34**:1796-1802.
72. **Tolskaya, E. A., L. I. Romanova, M. S. Kolesnikova, T. A. Ivannikova, E. A. Smirnova, N. T. Raikhlin, and V. I. Agol.** 1995. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J. Virol.* **69**:1181-1189.
73. **Vanderluit, J. L., L. T. McPhail, K. J. Fernandes, N. R. Kobayashi, and W. Tetzlaff.** 2003. *In vivo* application of mitochondrial pore inhibitors blocks the induction of apoptosis in axotomized neonatal facial motoneurons. *Cell Death Differ.* **10**:969-976.
74. **Wang, H., S. W. Yu, D. W. Koh, J. Lew, C. Coombs, W. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson, and V. L. Dawson.** 2004. Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J. Neurosci.* **24**:10963-10973.
75. **Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer.** 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**:727-730.
76. **Yasuda, O., K. Fukuo, X. Sun, M. Nishitani, T. Yotsui, M. Higuchi, T. Suzuki, H. Rakugi, O. Smithies, N. Maeda, and T. Ogihara.** 2006. Apop-1, a novel protein inducing cyclophilin D-dependent but Bax/Bak-related channel-independent apoptosis. *J. Biol. Chem.* **281**:23899-23907.
77. **Yeh, E. A., A. Collins, M. E. Cohen, P. K. Duffner, and H. Faden.** 2004. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* **113**:e73-76.

78. **Yu, S. W., H. Wang, T. M. Dawson, and V. L. Dawson.** 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* **14**:303-317.
79. **Zhang, D., C. Lu, M. Whiteman, B. Chance, and J. S. Armstrong.** 2008. The mitochondrial permeability transition regulates cytochrome c release for apoptosis during endoplasmic reticulum stress by remodeling the cristae junction. *J. Biol. Chem.* **283**:3476-3486.
80. **Zhirnov, O. P., T. E. Konakova, W. Garten, and H. Klenk.** 1999. Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. *J. Virol.* **73**:10158-10163.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

1.0 Présentation

Les premiers travaux de cette thèse avaient pour objectif de définir la modulation du transcriptome neuronal suite à l'infection par HCoV-OC43 et d'en élaborer subséquemment différentes hypothèses de travail où certaines seraient étudiées de façon plus approfondie. Conséquemment, les résultats liés aux modulations du transcriptome sont présentés en partie sous forme d'hypothèses suite à l'intégration de l'ensemble des modifications d'expression des gènes en voies métaboliques. Ainsi, ces travaux présentent également plusieurs pistes de recherche à suivre dans l'avenir tout en établissant pour la première fois un portrait global de la réponse neuronale suite à l'infection par un coronavirus humain.

L'étude de la *Unfolded protein response* et des voies de mort cellulaire furent choisies puisqu'elles représentent des stress cellulaires importants pouvant affecter le neurone en soi, mais pouvant ultimement affecter l'organe principal où se situent ces cellules, le SNC. Globalement, ces travaux démontrent que l'infection du neurone humain par un coronavirus mène à l'induction d'un stress cellulaire, particulièrement présent au sein du RE et de la mitochondrie, où la production des protéines et de l'énergie s'en trouvent affectées, menant ultimement à la mort neuronale. De plus, ils définissent les mécanismes impliqués dans celle-ci alors que le neurone est à même de subir une mort cellulaire programmée. La CypD est ainsi centrale dans la mort neuronale induite par HCoV-OC43, où, selon le modèle établi (Azzolin *et al.*, 2010), elle pourrait participer à la perméabilisation membranaire de la mitochondrie, alors que les caspases, bien qu'actives, ne sont pas essentielles au processus. Finalement, ces travaux établissent l'importance de certaines mutations acquises au niveau de la protéine S de HCoV-OC43 lors d'une infection persistante de cellules du SNC, alors que celles-ci participent à exacerber les phénomènes de stress neuronaux et accélérer l'apparition d'effets cytopathiques.

2.0 HCoV-OC43 induit une réponse neuronale diversifiée à l'infection

2.1 Général

L'analyse transcriptomique a permis de mettre en lumière l'ensemble des modulations des gènes neuronaux suite à l'infection par HCoV-OC43. Ceux-ci furent analysés et intégrés dans différents groupes de gènes fonctionnels, nommément Neurogenèse/Neurotransmission,

Mobilité/Adhésion, Biosynthèse/Dégradation, Immunité, RéPLICATION/Transcription, Signalisation cellulaire, Métabolisme cellulaire, Cytosquelette et Mort/Survie cellulaire. La catégorisation des gènes en groupes fonctionnels a permis d'élaborer différentes hypothèses quant aux voies métaboliques ou fonctions qui pourraient être affectées chez le neurone humain suite à l'infection et pose un regard quant à la diversité d'impacts que peut avoir une infection au SNC par le coronavirus humain OC43. Les principales hypothèses sont discutées ci-bas, et celles reliées au stress cellulaire de la cellule sont abordées et développées dans le cadre global des résultats de cette thèse.

2.2 Neurogenèse/neurotransmission

Il a été démontré qu'une infection virale peut altérer les fonctions "de luxe" d'une cellule, sans induire de mort cellulaire (Oldstone *et al.*, 1982). La fonction "de luxe" principale du neurone est la transmission de l'influx nerveux et différents virus sont à même de moduler ou altérer la libération de neurotransmetteurs chez le neurone. Or, l'expression de plusieurs gènes liés aux fonctions de la transmission synaptique, donc de l'influx nerveux, est régulée à la baisse chez le neurone suite à l'infection par HCoV-OC43 (Figure 2, article #1, p.74, Figure 5, annexe #5, p.199). Parmi les gènes liés à la neurotransmission, on note particulièrement une diminution de l'expression des gènes codant les protéines SNARES et les synaptogamines, impliquées dans la fusion des vésicules présynaptiques contenant les neurotransmetteurs, à la membrane de la fente synaptique. La régulation à la baisse du gène *snap25*, une v-SNARE localisée sur les vésicules présynaptiques, pourrait également affecter la capacité du neurone à relâcher ou libérer ses neurotransmetteurs, et donc altérer la transmission de l'influx nerveux. De plus, l'infection induisant une diminution de l'expression des différentes synaptogamines *syp*, *syt1*, *syt3* et *syt4* et des t-SNARES localisées à la membrane de la fente synaptique, affecterait également la fusion des vésicules présynaptiques et la transmission de l'influx nerveux (Kochubey *et al.*, 2011; Ovsepian *et al.*, 2011). Cette diminution de la capacité de neurotransmission du neurone pourrait être causée suite à la diminution de la viabilité, mais il est plausible de penser qu'une protéine spécifique de HCoV-OC43 puisse directement affecter la neurotransmission. En effet, il est connu que des protéines virales peuvent affecter la libération spécifique de différents neurotransmetteurs, dont la protéine Tat de HIV (Neri *et al.*, 2007) qui favorise la

dépolarisation du Ca^{2+} intra-cellulaire (Cheng *et al.*, 1998) causant une libération accrue d'acétylcholine ainsi qu'une excitotoxicité via l'activation des récepteurs au glutamate (Feligioni *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que HCoV-OC43 est également à même d'induire une excitotoxicité chez le neurone (Brison *et al.*, 2011). Ainsi, la diminution d'expression de gènes responsables du transport vésiculaire pourrait laisser entendre une diminution de la capacité sécrétoire des neurotransmetteurs chez le neurone. Cependant, leur baisse d'expression pourrait également être en réponse à une trop grande libération de neurotransmetteurs et avoir pour objectif de rétablir l'homéostasie de la neurotransmission. En effet, l'infection par HCoV-OC43 agissant comme stimulateur de la neurotransmission via l'excitotoxicité et favorisant une possible libération accrue de neurotransmetteurs pourrait mener à des phénomènes de tolérance où le neurone tend à diminuer sa capacité de sécrétion de neurotransmetteurs, comme c'est le cas lors de la présence de différents psychotropes où l'expression des synaptogamines varie de façon compensatoire à l'activation ou l'inhibition de la neurotransmission (Schmitt *et al.*, 2010). Conséquemment, ces données permettent de spéculer que l'infection du neurone humain par HCoV-OC43 pourrait modifier la sécrétion de neurotransmetteurs et altérer les communications synaptiques au SNC.

2.3 Immunité innée

Les neurones ne sont pas les cellules principales du SNC impliquées dans la réponse immunitaire, mais il est par contre connu que le neurone peut monter une réponse inflammatoire (Prehaud *et al.*, 2005). Par contre, suite à l'infection du neurone par HCoV-OC43, on observe peu de gènes de l'immunité innée dont l'expression fut modulée (Figure 2, article #1, p.74, Figure 5, Annexe #5, p.199). L'infection n'induit aucune modulation des principaux médiateurs de l'inflammation, tel que les interférons β/γ , le TNF- α ou des différentes chimiokines ou cytokines proinflammatoires, malgré leur capacité à exprimer des TLR-3 qui détectent la présence d'ARNdb (Prehaud *et al.*, 2005). De plus, on sait que les neurones peuvent exprimer les principaux médiateurs de l'inflammation (e.g. INF- α , - β , TNF- α) tel que démontré entre autre suite à l'infection par le RV (Prehaud *et al.*, 2005) ou HTLV-1 (Miyatake *et al.*, 2006) ou par le traitement au Poly I:C (données du laboratoires non-publiées). Ainsi, à l'instar de d'autres virus, il appert que HCoV-OC43 pourrait également moduler l'induction de la réponse immunitaire chez le neurone, malgré qu'aucun

mécanisme spécifique n'ait été démontré jusqu'à présent. L'inhibition de la détection de la présence d'ARNdb viral est un mécanisme répandu chez différents virus afin d'empêcher l'induction de la réponse immunitaire de la cellule, dont la réponse à l'INF- β (Jacobs *et al.*, 1996). Les protéines accessoires de HCoV-OC43 pourraient jouer un rôle dans cette inhibition, alors qu'elles sont principalement connues pour le rôle dans la neurovirulence chez les Coronavirus (Narayanan *et al.*, 2008a; Narayanan *et al.*, 2008b). Ainsi, celles-ci pourraient participer à l'inhibition d'induction d'INF- β notamment en inhibant la voie NF- κ B, soit via le maintien de l'inactivité de sa capacité d'activateur transcriptionnel, à l'instar de protéines produites par le virus de la fièvre du porc africain (ASFV) (Revilla *et al.*, 1998), soit en bloquant les promoteurs des *Interferon Regulating Factor* (IRF) comme la protéine E6 du virus du papillome humain-16 (HPV-16) (Ronco *et al.*, 1998). Il est également connu que la protéine accesseoire 6 du SARS-CoV peut inhiber la réponse immunitaire de la cellule, notamment en inhibant la translocation du facteur de transcription STAT1 (*signal transducer and activater of transcription factor*) au noyau (Frieman *et al.*, 2007) alors que la protéine accesseoire nspl promeut la dégradation de l'ARNm de l'INF- β (Narayanan *et al.*, 2008a). Considérant que SARS-CoV et HCoV-OC43 font tout les deux partie du genre *Betacoronavirus*, il est plausible de spéculer qu'une ou des protéines accessoires de HCoV-OC43 puisse posséder un rôle homologue. De plus, la protéine N des Coronavirus est connue pour se lier à l'ARN viral et former le complexe ribonucléique en vue de l'encapsidation (Zuniga *et al.*, 2007). Or, il convient de spéculer que la protéine N pourrait, à l'instar de plusieurs autres protéines virales, lier les différents ARNdb présents au sein de la cellule et ainsi inhiber leur reconnaissance par les TLR-3 ou PKR, tel que les protéines σ 3 du Réovirus (Lloyd *et al.*, 1992), E3L du virus de la vaccinia (VV) (Chang *et al.*, 1992), NSP3 du rotavirus porcin (Langland *et al.*, 1994) et NS1 du virus de l'Influenza (Lu *et al.*, 1995). Finalement, l'induction du gène *sels*, connu pour être un répresseur de cytokines, pourrait également participer à l'inhibition de la réponse immunitaire du neurone et expliquer l'absence d'expression de TNF- ζ et d'IL-6 (Curran *et al.*, 2005). Conséquemment, il convient de spéculer que l'absence d'expression des principaux médiateurs de l'inflammation pourrait participer à l'établissement d'une infection persistante par HCoV-OC43 au SNC. D'autres travaux devront être menés afin de déterminer les

différents mécanismes spécifiques à HCoV-OC43 inhibant l'induction d'une réponse inflammatoire.

2.4 Cytosquelette

Le cytosquelette est essentiel au maintien de la structure cellulaire, particulièrement chez le neurone où celle-ci est plus complexe alors qu'elle se divise en un corps cellulaire, un axone, une terminaison nerveuse ainsi que des dendrites. Ces structures sont nécessaires aux différentes fonctions neuronales, dont particulièrement leur capacité à établir une architecture tridimensionnelle et réseautée au sein du SNC et permettre la neurotransmission via le transport et la libération de vésicules contenant différents neurotransmetteurs (Dillon *et al.*, 2005; Luo, 2002). À l'instar des différentes organelles de la cellule, le cytosquelette peut être utilisé par différents virus afin de faciliter le cycle réplicatif de ceux-ci, mais il peut également être modifié, menant parfois à une altération des fonctions cellulaires (Zaichick *et al.*, 2011). L'infection neuronale par HCoV-OC43 induit une diminution de l'expression de plusieurs gènes liés au cytosquelette, dont les *tubulines- α* 2 et 3, l'*actine* β et γ et *mapt*. La modulation à la baisse de ces gènes pourrait affecter la structure du cytosquelette du neurone sur plusieurs aspects, à l'instar de différents virus neurotropes. Le RV induit un réarrangement du cytosquelette tout en induisant une baisse d'expression de l'actine-F (Ceccaldi *et al.*, 1997) alors que l'on observe une diminution de la capacité de transport et libération de neurotransmetteurs (Ceccaldi *et al.*, 1993; Ladogana *et al.*, 1994). Le remodelage du cytosquelette lors d'infection virale peut également favoriser la dissémination virale alors que le VV modifie et utilise l'arrangement des filaments d'actine afin de promouvoir sa migration intra-cellulaire (Cudmore *et al.*, 1995). Plus particulièrement, le réarrangement du cytosquelette peut être crucial à la migration de la particule virale au sein de l'axone. En effet, les virus de la famille des *Herpesviridae* utilisent le transport rétrograde sur les microtubules à partir de leur site d'infection jusqu'au noyau lors de leur cycle de réplication (Kristensson *et al.*, 1986; Sodeik *et al.*, 1997) alors qu'ils utilisent et modifient le cytosquelette d'actine lors de la réactivation et leur transport antérograde (Favoreel *et al.*, 2005). Or, HCoV-OC43 utilise nécessairement un transport rétrograde lors de l'infection intra-nasale, alors que l'on le retrouve subséquemment au SNC via le nerf olfactif (Jacomy *et al.*, 2003). Par conséquent, il convient de spéculer que HCoV-OC43 pourrait lui aussi

utiliser et modifier l'architecture du cytosquelette neuronale afin de favoriser sa dissémination aux autres régions du SNC, dont la moelle, en utilisant autant le transport rétrograde et qu'antérograde. De plus, la diminution d'expression des différents composants du cytosquelette lors de l'infection mènerait à une diminution du prolongement des dendrites du neurone, qui pourrait diminuer sa capacité à recevoir un influx nerveux et altérerait également le transport des vésicules présynaptiques, du corps neuronal vers la terminaison axonale. De plus, une baisse de l'expression de ces gènes pourrait modifier la plasticité neuronale et diminuer sa capacité à modifier son réseau synaptique. Ces résultats soulignent que la structure neuronale et l'architecture neurale pourrait être modifiée suite à l'infection du neurone par HCoV-OC43 et permettent de spéculer que l'infection pourrait subséquemment altérer la transmission de l'influx nerveux en diminuant l'expression des différentes composantes du cytosquelette.

3.0 HCoV-OC43 induit l'activation de stress cellulaire chez le neurone, comprenant notamment la *Unfolded protein response*

3.1 Général

L'analyse transcriptomique de neurones infectés par HCoV-OC43 a révélé la modulation de plusieurs groupes de gènes possédant des rôles et fonctions diversifiés au sein de la cellule (Figure 2, article #1, p.74, figure 5, annexe #5, p.199). Conjointement à l'étude du transcriptome, nos travaux ont démontré une perte de la viabilité neuronale suite à l'infection par HCoV-OC43 (Figure 5, article #1, p.81) établissant ainsi un pouvoir cytopathique de ce virus au sein de cellules du SNC. Dans un contexte de recherche des mécanismes neuronaux pouvant mener à la neurodégénérescence suite à une infection virale, les gènes liés aux différents stress cellulaires apparaissent dès lors comme des candidats importants à étudier. Ainsi, l'analyse de la modulation de plusieurs gènes liés au groupe fonctionnel de la biosynthèse et la dégradation a été effectuée afin de définir leur rôle dans la mort neuronale engendrée suite à l'infection par HCoV-OC43. La voie métabolique nommée *Unfolded Protein Response* a été particulièrement étudiée compte tenu de son implication dans diverses maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer et de Parkinson, où la formation et l'accumulation de protéines mal repliées au sein du réticulum endoplasmique

entraînent un stress cellulaire important, pouvant mener à la mort cellulaire (Katayama *et al.*, 2004; Ryu *et al.*, 2002). Parallèlement à notre étude, différents travaux portant sur la UPR induite par d'autres Coronavirus, nommément MHV-A59 (Bechill *et al.*, 2008) et SARS-CoV (Chan *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2009), ont démontré que ceux-ci sont à même de pouvoir activer cette voie métabolique chez différents types cellulaires. Ainsi il est apparu important d'étudier la UPR induite par un Coronavirus qui a précédemment été associé à des maladies neurologiques (Arbour *et al.*, 2000; Jacomy *et Talbot*, 2003).

De plus, alors que des travaux ont démontré que la glycoprotéine S des Coronavirus serait la protéine responsable de l'induction de la UPR chez la cellule (Chan *et al.*, 2006; Versteeg *et al.*, 2007), différents mutants de HCoV-OC43, issus d'infections persistantes de lignées du SNC, comprenant différentes mutations ponctuelles au sein de la glycoprotéine S et démontrant une neurovirulence accrue et modifiée *in vitro* (Favreau *et al.*, 2009) et *in vivo* (Jacomy *et al.*, 2010) ont été obtenues au laboratoire (St-Jean, 2006). Considérant que les travaux de cette thèse ont démontré qu'un de ces mutants, rOC/U_{S183-241}, est à même de causer une mortalité neuronale plus importante que la souche sauvage rOC/ATCC (Figure 5, article #1, p.81) ainsi que d'induire une maladie démyélinisante chez la souris (Jacomy *et al.*, 2010), il est apparu pertinent de comparer parallèlement l'induction de la UPR par ces deux souches virales aux propriétés neurovirulentes différentes, liées à des déterminants au sein de la glycoprotéine S acquis en persistance au sein de cellules neurales humaines.

3.2 Les mutations de la glycoprotéine S acquises en persistance induisent une augmentation de production des protéines et particules virales

L'infection neuronale par le mutant rOC/U_{S183-241} a révélé une production de protéines virales ainsi qu'une accumulation de particules virales infectieuses intra-cellulaires accrues, comparativement à la souche sauvage (Figure 3, article #1, p.76). Ces résultats suggèrent que le neurone subirait un stress cellulaire plus important lors de l'infection par le virus mutant que par la souche sauvage, alors que des quantités importantes de protéines virales s'accumulent au sein du RE. Conséquemment, la UPR induite par rOC/U_{S183-241} serait plus importante puisque la cellule doit composer avec une accumulation accrue de protéines au RE. Ces données indiquent alors que les mutations au sein de la glycoprotéine S, en plus de causer une modification de la pathologie en souris (Jacomy *et al.*, 2010), peuvent induire une

cinétique différente de la UPR chez le neurone. De plus, ces résultats suggèrent que des mutations au sein de la glycoprotéine S des Coronavirus pourraient moduler les interactions cellules-virus afin de favoriser la réPLICATION virale. Or, la glycoprotéine S n'est pas connue pour être impliquée directement dans la production des protéines virales ou jouer un rôle dans le cycle réPLICATIF des Coronavirus. Cependant, il est connu que la glycoprotéine S de SARS-CoV exprimée seule chez la cellule se localise au RE et induit l'activation de la UPR (Chan *et al.*, 2006), bien que le mécanisme précis ne soit pas élucidé. Considérant que la glycoprotéine S des Coronavirus possède un poids moléculaire élevé, un haut niveau de glycosylation (de Haan *et al.*, 1999) et de modifications post-traductionnelles, dont des ponts disulfure (Doms *et al.*, 1993; Opstelten *et al.*, 1993) et qu'elle forme finalement des homotrimères (Spiga *et al.*, 2003), il est plausible de spéculer que son processus conformationnel global accapare de nombreuses chaperonnes (e.g. GRP78, GRP94) et d'enzymes (e.g. protein disulfide isomerase) lors de son passage au RE. Les mutations présentent dans la glycoprotéine S du mutant rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ pourraient participer à accentuer l'utilisation de chaperonnes et d'enzymes au RE en vue de modifications post-traductionnelles. De plus, ces mutations induisent une affinité accrue à l'acide sialique 9-O-acétylé et pourraient par conséquent favoriser l'attachement et/ou l'agglomération de la glycoprotéine S avec d'autres protéines acétylées présentes au RE (M. Desforges *et al.*, données non-publiées). Ces mutations pourraient également modifier l'interaction de la glycoprotéine S avec la protéine M avec laquelle elle s'associe partiellement avant la sortie du RE (Opstelten *et al.*, 1995). Conséquemment, les mutations au sein du mutant rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ mèneraient à une induction accrue de la UPR, favorisant ainsi une augmentation de la capacité de conformation protéique au sein du RE (Ron *et Walter*, 2007), qui pourrait expliquer la production plus importante des protéines virales, et subséquemment des particules virales infectieuses intra-cellulaires. Cependant, considérant que l'activation plus importante ou prolongée de la UPR est associée à différentes maladies neurodégénératives (Lindholm *et al.*, 2006; Paschen, 2003), l'analyse des différentes voies de la UPR a été réalisée afin de confirmer son activation lors de l'infection par la souche sauvage de HCoV-OC43 et son rôle accrue lors de l'infection par le mutant rOC/US₁₈₃₋₂₄₁.

3.3 La voie IRE1/XBP1 est activée lors de l'infection par HCoV-OC43, mais ne joue pas de rôle dans la viabilité neuronale.

La voie IRE1/XBP1 est la branche de la UPR la plus rapidement activée suite à un stress du RE et son activation est liée aux événements précoce visant à rétablir l'homéostasie du RE et conséquemment protéger la cellule des effets délétères d'une UPR prolongée (Lin *et al.*, 2009). La caractérisation du niveau d'épissage de l'ARNm $Xbp1_U$ lors de l'infection par HCoV-OC43 a démontré une activation rapide de la voie IRE1/XBP1 (Figure 7, article #1, p.86), alors que les deux souches virales induisent rapidement l'apparition d'ARNm $Xbp1_S$ épissé. De plus, l'infection par rOC/ $U_{S183-241}$ induit un épissage plus rapide et plus important de XBP1, comparativement à la souche sauvage (Figure 7, article #1, p.86). Ces résultats appuient ainsi l'hypothèse que les mutations liées à la neurovirulence accrue, présentes dans la glycoprotéine S, mènent à une activation plus intense et rapide de la UPR chez le neurone infecté. En effet, l'activation rapide de la voie IRE1/XBP1 par le mutant rOC/ $U_{S183-241}$ participerait à l'expression précoce des différentes chaperonnes (e.g. GRP94) nécessaire à la conformation de la glycoprotéine S au RE. La quantification du niveau d'expression des gènes Edem1, P58-ipk et Grp94, sous le contrôle unique du facteur de transcription XBP1, a permis d'établir avec certitude l'activation de la voie IRE1/XBP1 suite à l'infection et de confirmer que le mutant rOC/ $U_{S183-241}$ induit rapidement et fortement la UPR chez le neurone (Figure 7, article #1, p.86). L'activation rapide de la voie IRE1/XBP1 est également constatée lors de stress indépendant d'une infection virale, notamment lors de la différentiation des lymphocytes B en plasmocytes (Iwakoshi *et al.*, 2003), alors que la cellule augmente sa capacité sécrétoire via l'expansion du RE (Shaffer *et al.*, 2004). Conséquemment, on peut spéculer que l'infection par HCoV-OC43 bénéficierait de cette expansion du RE et expliquerait également la production plus importante de protéines virales par le mutant rOC/ $U_{S183-241}$, alors que l'on observe une forte augmentation précoce de $Xbp1_S$. Globalement, l'infection par la souche sauvage induit chez le neurone une réponse au stress, plus importante encore par le mutant rOC/ $U_{S183-241}$, qui mène à l'augmentation de la capacité de dégradation des protéines, via Edem1, et une plus grande capacité de conformation protéique au RE, via Grp94, et une plus grande capacité sécrétoire via l'expansion globale du RE. De plus, l'expression importante et soutenue du régulateur négatif de PERK, P58-ipk, indique une communication avec une autre branche de la UPR, la voie PERK/eIF2-alpha, et

souligne la modulation globale de la UPR lors de l'infection. Ainsi, l'induction rapide de P58-ipk suite à l'infection par un Coronavirus pourrait participer à diminuer l'inhibition de la synthèse de protéine, aider à maintenir le taux de traduction de la cellule et favoriser la production de protéine virale. À défaut de posséder des protéines virales possédant spécifiquement ce rôle, telles que les protéines E2 et NS5A de HCV (Gale *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1999) ou E3L du VV (Romano *et al.*, 1998), les Coronavirus pourraient utiliser cette voie de la UPR afin d'induire lors de l'infection la présence précoce d'un inhibiteur de kinase du facteur de traduction eIF2-alpha et ainsi palier la phosphorylation éventuelle de ce même facteur par l'enzyme PKR, suite à la reconnaissance probable de l'ARNdb viral.

Il est intéressant de noter que l'activation précoce de la voie IRE1/XBP1 chez le neurone humain par HCoV-OC43 se produit de façon similaire à celle observée chez des neurones murins infectés par certains autres virus neurotropes et cytopathiques, dont le DENV et JEV (Yu *et al.*, 2006). Considérant que l'activation rapide de la voie IRE1/XBP1 peut permettre à la cellule de rétablir l'homéostasie du RE lorsque le stress cellulaire n'est pas trop important et peut éventuellement protéger la cellule de la mort, l'impact de la surexpression et de l'inhibition d'expression de Xbp1_S ont été étudié. Selon le type cellulaire, XBP1 peut être une protéine essentielle à la survie cellulaire et l'inhibition de son expression délétère (Kaser *et al.*, 2010). En effet, même en absence d'infection virale, l'expression de différents shRNA dirigés vers Xbp1_U et Xbp1_S au sein des neurones LA-N-5 humains a généré une mortalité cellulaire importante et n'a pas permis de générer des clones neuronaux dont le niveau d'expression de Xbp1 soit inférieur à 50% comparativement aux neurones contrôles (Figure annexe #1, p.171). Ainsi, l'étude de la viabilité neuronale suite à l'infection de ces clones avec l'une ou l'autre des souches virales n'a pu démontrer aucune différence avec la viabilité observée chez les neurones contrôles (Figure annexe #2, p.172). Cependant, cela permet tout de même de souligner l'importance de XBP1 dans la viabilité neuronale et laisse présumer que lors de stress importants, tel que lors de l'infection par HCoV-OC43, sa présence soit bénéfique pour maintenir la viabilité du neurone, du moins dans les premières heures de l'infection, afin de promouvoir une réPLICATION virale minimale, à l'instar du DENV ou du JEV (Yu *et al.*, 2006). Bien que XBP1 puisse participer à maintenir l'homéostasie cellulaire (Lin *et al.*, 2009), la surexpression de Xbp1 chez les neurones infectés n'a pas permis de réduire ou de retarder la mort neuronale induite par les deux virus

(Figure annexe #3, p.173). Conséquemment, ces données indiquent que la surexpression de Xbp1s ne peut à elle seule protéger les neurones contre le stress et/ou la mort induite par l'infection virale, alors que l'inhibition d'expression partielle de Xbp1 par des shRNA permet tout de même de spéculer sur le rôle essentiel ou partiel de XBP1 à la survie cellulaire lors des étapes précocees de la UPR induite dans ce contexte d'infection.

3.4 La voie ATF6 joue un rôle mineur dans la UPR induite par HCoV-OC43

La voie ATF6 promouvoit principalement l'expression des chaperonnes GRP78 et GRP94 afin d'augmenter la capacité de repliement du RE. Cependant, lors de l'infection, on note une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine de GRP94 (Figure 7, article #1, p.86), alors que l'ARNm de GRP78 est légèrement régulé à la hausse sans que la protéine correspondante ne le soit (Figure 4, article #1, p.78), soulignant alors que l'implication de la voie ATF6 dans la UPR induite ne serait que partielle. Il est important de noter qu'il existe des redondances entre les voies IRE1/XBP1 et ATF6 dans l'induction de certaines chaperonnes, dont GRP94, et que l'activation d'une seule de ces voies peut être compensatoire de l'inactivité de l'autre (Lee *et al.*, 2003b). Ainsi, la forte activation de la voie IRE1/XBP1 serait à l'origine de l'expression soutenue de GRP94, alors que l'expression transitoire et non-soutenue de Grp78 serait la résultante d'une faible activité de son promoteur ERSE par XBP1 (Yamamoto *et al.*, 2004). Conséquemment, la faible expression de l'ARNm de GRP78 et l'absence d'augmentation de l'expression de la protéine démontrent que la voie ATF6 n'est peu ou pas activée lors de l'infection par la souche sauvage ou la souche plus neurovirulente de HCoV-OC43. Plusieurs virus démontrent également la capacité de moduler ou d'activer spécifiquement chacune des voies de la UPR. L'infection par le cytomégavirus humain (HCMV) ne mène pas au clivage de ATF6, bien que la voie IRE1/XBP1 soit activée (Isler *et al.*, 2005). Le MHV-A59, en contre-partie, active la voie ATF6 seulement dans les moments précocees de l'infection, alors que la présence de sa forme clivée diminue dans le temps (Bechill *et al.*, 2008). Cependant, l'induction d'expression des chaperonnes ou des gènes du complexe ERAD est toujours effective et s'expliquerait par la redondance des gènes cibles des voies ATF6 et IRE1/XBP1 (Lee *et al.*, 2002). Bien qu'aucun mécanisme viral d'inhibition spécifique d'une voie de la UPR n'ait été déterminé, l'absence d'activation de ATF6 pourrait être bénéfique pour la réplication virale, puisqu'elle mènerait à l'inhibition

d'expression de sa cible principale, GRP78, qui possède un rôle de rétro-inhibition de la UPR. Ainsi, l'infection par HCoV-OC43 mènerait à une activation soutenue et persistante de la UPR, soulignée notamment par le maintien de l'activité de la branche IRE1 et l'absence de boucle de rétro-inhibition par la voie ATF6.

3.5 L'infection par HCoV-OC43 mène à une diminution de la synthèse protéique et une activation partielle de la voie PERK/eIF2-alpha

Ces travaux ont démontré que l'infection des neurones par les deux variants de HCoV-OC43 mène à une diminution significative de la synthèse protéique et de façon particulièrement importante par le variant plus neurovirulent (Figure 5, article #1, p.81). Or, aucune phosphorylation soutenue du facteur de traduction eIF2-alpha n'est présente 24 heures après l'infection, indiquant dès lors que l'activation de la voie PERK/eIF2-alpha ne peut être que partielle et limitée. Toutefois, la faible activation du senseur PERK, responsable de la phosphorylation de eIF2-alpha (Bertolotti *et al.*, 2000), ne serait pas due à un stress insuffisant au RE. En effet, on observe simultanément une forte activité de la voie IRE1, et considérant que PERK et IRE1 sont des protéines phylogénétiquement rapprochées et que leurs portions luminales du RE sont similaires (Bertolotti *et al.*, 2000), leurs sensibilités au stress du RE sont également semblables. La faible activité de PERK serait une conséquence de la forte augmentation d'expression de P58-ipk (Figure 7A, article #1, p.86) qui est un inhibiteur de PERK (Yan *et al.*, 2002). De plus, l'absence de phosphorylation de eIF2-alpha 24 heures après l'infection est corrélée par un niveau d'expression de P58-ipk qui est similaire selon l'infection par l'une ou l'autre des souches virale (Figure 5 et 7, article #1, p.81 et p.86). Conséquemment, il semble que la voie PERK/eIF2-alpha soit peu ou pas activée suite à l'infection par les deux variants. HCoV-OC43 utiliserait l'absence d'activation de cette voie afin de permettre à la cellule de maintenir la traduction des ARNm viraux et ainsi favoriser la réplication virale. De plus, à défaut de posséder des protéines virales qui peuvent inhiber les kinases responsables de la phosphorylation de eIF2-alpha, telles que les protéines NS5A et E2 de HCV (Gale *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1999), l'infection par HCoV-OC43 pourrait promouvoir l'expression d'un inhibiteur cellulaire de la kinase PERK. Ainsi, l'expression de P58-IPK pourrait permettre d'inhiber la phosphorylation subséquente de eIF2-alpha suite à la détection d'ARNdb viral par PKR. De plus, nos données démontrant

l'absence du facteur de transcription ATF4 (Figure 6, article #1, p.84) appuie l'absence d'activation de la voie PERK/eIF2-alpha et souligne la présence d'une UPR indépendante de ATF4 chez le neurone infecté par HCoV-OC43. Il apparaît alors surprenant de constater l'expression de différents gènes connus pour être principalement sous le contrôle de ATF4 (Figure 6, article #1, p.84). Il a cependant été démontré que l'expression des gènes Gadd34 et Chop, généralement sous le contrôle de ATF4, peut également être induite par d'autres facteurs de transcription, dont ATF3 (Haneda *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2004). Or, nos données obtenues suite à l'analyse du transcriptome (Figure 2, article #1, p.74 et Figure 5, Annexe #5, p.199), et confirmées par PCR quantitatif suite à l'infection par les souches sauvage et rOC/Us₁₈₃₋₂₄₁ (Figure annexe 3, p.173), démontrent l'augmentation significative de l'expression de ATF3 suite à l'infection. Le niveau d'expression de ATF3 corrèle également avec le niveau d'expression des gènes sous son contrôle, soient Gadd34 et Chop, selon l'infection par l'un ou l'autre des deux variants. De plus, l'augmentation d'expression de Xbp1_S expliquerait également l'augmentation d'expression de Chop en l'absence d'ATF4, alors qu'il est aussi connu pour en promouvoir l'expression (Lee *et al.*, 2003b). L'absence de détection de la protéine CHOP, malgré l'augmentation d'expression de son ARNm, peut s'expliquer par une diminution de la régulation de la stabilité de son ARNm (Bartlett *et al.*, 1992; Bruhat *et al.*, 1997), l'augmentation globale du taux de dégradation protéique de la cellule causée entre autre par l'augmentation de la présence de facteurs liés au complexe de dégradation ERAD, e.g. Edem1 et Herp, (Figure 7, article #1, p.86) et peut suggérer une régulation post-traductionnelle de la protéine lors d'une infection par un Coronavirus. En effet, l'absence d'expression protéique de Chop a également été observée lors d'une infection par l'homologue murin de HCoV-OC43, MHV-A59, alors que celui-ci est également connu pour réguler de façon post-traductionnelle certaines protéines cellulaires, dont l'IFN-β (Roth-Cross *et al.*, 2007). Conséquemment, l'ensemble de nos données indique que la voie PERK/eIF2-alpha ne joue pas un rôle significatif dans la UPR induite par HCoV-OC43 et suggère que malgré l'activation probable de PERK, celui-ci serait négativement régulé par son inhibiteur P58-ipk, fortement induit par la voie IRE1/XBP1.

Considérant qu'on observe une diminution du taux de synthèse protéique, particulièrement importante lors de l'infection par la souche rOC/Us₁₈₃₋₂₄₁, et l'absence de phosphorylation soutenue du facteur de traduction eIF2-alpha, il appert que d'autres

mécanismes cellulaires indépendants de la voie PERK/eIF2-alpha en seraient la cause. Les résultats de l'analyse transcriptomique ont démontré une régulation d'expression à la baisse de plusieurs facteurs ribosomaux impliqués dans les processus d'initiation et d'elongation lors de la synthèse protéique (Figure 5, annexe #5, p.199). Ainsi, la diminution du nombre de facteurs ribosomaux nécessaires à la traduction protéique engendrerait une baisse de la capacité traductionnelle globale de la cellule. Ce phénomène est également concomitant à l'augmentation de la dégradation des protéines par le complexe ERAD. En effet, la forte augmentation de Edem (Olivari *et al.*, 2006) et de Herp (Kim *et al.*, 2008) (Figure 7, article #, p.86), particulièrement lors de l'infection par le mutant rOC/Us₁₈₃₋₂₄₁, accentuerait la capacité de dégradation des protéines chez le neurone infecté et participerait à la diminution de renouvellement des protéines. De plus, la diminution de synthèse protéique est un phénomène commun précédent la baisse du métabolisme cellulaire et la mort qui s'ensuit et l'on observe une diminution de la viabilité neuronale suite à l'infection. En effet, la baisse du taux de traduction protéique a lieu parallèlement à l'activation des caspase-3 et -9 (Figure 5, article #1, p.81, Figure 8, article #1, p.88 et Figure 2, article #2, p.120), la fragmentation nucléaire (Figure 8, article #1, p.88) et de l'ADN (Figure 1, article #2, p.118), ainsi que de la diminution de la production d'énergie par la mitochondrie (Figure 4, article #1, p.78 et figure 1, article #2, p.118). Conséquemment, la diminution de la synthèse protéique causée chez le neurone par l'infection par les deux variants de HCoV-OC43 est indépendante de la voie PERK/eIF2-alpha, et de la phosphorylation de ce-dernier, et serait causée par une diminution des facteurs de traduction ribosomaux, une augmentation de la dégradation des protéines ainsi qu'une baisse du métabolisme énergétique mitochondrial, en prélude à l'induction de la mort cellulaire.

En conclusion, l'infection neuronale par HCoV-OC43 mène à une activation sélective de la UPR, principalement via la voie IRE1/XBP1 et orientée d'une part vers l'augmentation de la capacité de conformation protéique du RE et d'autre part vers la diminution globale des protéines nouvellement synthétisées afin de réduire l'arrivée de protéine *de novo* au RE. L'expression de l'ARNm de Chop, dont la protéine est normalement impliquée dans l'induction de la mort cellulaire, est régulée indépendamment du facteur ATF4, mais l'absence de la protéine CHOP démontre qu'elle n'est pas impliquée dans l'induction de la mort neuronale suite à l'activation persistante de voies de la UPR. Puisque la mort cellulaire

observée ne peut être causée par la participation de la protéine CHOP, il convient d'élaborer sur les autres facteurs cellulaires pouvant être impliqués, parallèlement ou subséquemment au stress induit au RE. L'implication des caspases 12 chez la souris, ou la caspase 4 chez l'homme pourraient en partie expliquer l'induction de la mort neuronale, indépendamment du facteur CHOP. En effet, il a été démontré que la caspase 4 peut être activée suite à un stress au RE causé par l'amyloïde- β dans un modèle de la maladie d'Alzheimer et que son clivage est indépendant des membres de la famille Bcl-2 (Hitomi *et al.*, 2004). Ainsi, la caspase 4 pourrait constituer un lien vers l'induction de la mort cellulaire dépendante des caspases, mais indépendante des facteurs de mort cellulaire en aval de trois branches de la UPR (IRE1, PERK, ATF6). De plus, la libération de Ca^{2+} provenant du RE pourrait également participer à l'induction de la mort cellulaire. Les protéines BAX et BAK sont connues pour former des pores membranaires à la mitochondrie, mais également au RE (Scorrano *et al.*, 2003; Zong *et al.*, 2003). La libération de Ca^{2+} via le RE pourrait ainsi favoriser l'apparition d'un débordement des stocks de Ca^{2+} chez la cellule et favoriser subséquemment la perméabilisation membranaire de la mitochondrie, menant ultimement à la mort cellulaire.

4.0 HCoV-OC43 cause une mort cellulaire programmée chez le neurone qui est dépendante de la CypD et indépendante des caspases

4.1 Général

Considérant que l'on a démontré que l'infection par HCoV-OC43 mène à un stress au RE et à l'activation de la UPR, alors que l'on note une perte de la viabilité du neurone infecté, il appert pertinent de déterminer des mécanismes menant à la mort cellulaire. Le RE peut être impliqué dans l'induction de la mort cellulaire, notamment via l'activation de la caspase-4 chez l'humain (Kim *et al.*, 2006), ou la caspase-12 chez la souris (Nakagawa *et al.*, 2000), et la translocation des protéines Bax et Bak vers la mitochondrie où ils participent à sa perméabilisation (Kuwana *et al.*, 2002). En plus de ses liens avec le RE, la mitochondrie participe au mécanisme de mort cellulaire en étant un organelle carrefour de l'activation des caspases, de la perte énergétique et de la libération de différents facteurs menant à l'exécution de la mort cellulaire programmée et consiste alors en un organelle important à étudier afin de définir les mécanismes de mort cellulaire engendrés suite à l'infection par HCoV-OC43.

L'identification du type de mort cellulaire programmée, en accord avec les lignes directrices du NCCD, apparaît alors primordiale afin de caractériser adéquatement les voies métaboliques impliquées dans celle-ci (Kroemer *et al.*, 2009).

4.2 HCoV-OC43 induit une PCD chez le neurone humain

Nos données ont démontré que la cellule subit une baisse significative de son métabolisme énergétique (Figure 1, article #2, p.118) conjointement à une rétractation des dendrites et des axones (Figure 5, article #2, p.126). De plus, on note une augmentation de la fragmentation de l'ADN (Figure 1, article #2, p.118) et du noyau (Figure 8, article #1, p.88) qui précèdent la perméabilisation de la cellule. Puisque la perte d'intégrité de l'ADN et du noyau est concomitante à une baisse de la viabilité et que ces deux phénomènes se produisent alors que la membrane cellulaire est toujours intacte, la mort neuronale engendrée par l'infection de l'une ou l'autre des deux souches de HCoV-OC43 est caractéristique d'une mort cellulaire programmée (Kroemer *et al.*, 2009). L'induction d'une mort cellulaire passive, nommée nécrose, est conséquemment absente puisque celle-ci se caractérise par une perte de la viabilité simultanément ou conséquemment à une perte de l'intégrité cellulaire.

La mort neuronale engendrée par l'infection par le variant plus neurovirulent rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ est plus importante et survient plus rapidement, comparé à l'infection par le virus de type sauvage. Ceci souligne, en accord avec les résultats obtenus sur l'activation de la UPR, que le stress cellulaire induit par le mutant rOC/US₁₈₃₋₂₄₁ est plus prononcé et démontre que les mutations acquises en persistance mènent à une cytopathie plus importante chez le neurone humain, corrélant ainsi la neurovirulence accrue observée chez la souris (Jacomy *et al.*, 2010).

Considérant que le neurone subit une mort cellulaire programmée, il convient dès lors de définir les mécanismes cellulaires impliqués.

4.3 HCoV-OC43 induit une PCD indépendante des caspases

Les caspases sont connues pour être impliquées dans les différentes voies de mort cellulaire (Grutter, 2000). Nos données démontrent que l'infection par les deux variants de HCoV-OC43 induit l'activation de la caspase initiatrice 9 et la caspase activatrice 3 (Figure 8, article #1, p.88 et figure 2, article #2, p.120) tout en favorisant la libération du facteur CytC,

impliqué dans la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9 (Figure 4, article #2, p.123). De plus, le degré d'activation des caspases ainsi que le niveau de libération du CytC sont plus importants lors de l'infection par le variant plus neurovirulent rOC/U_{S183-241} ce qui corrèle avec la cytopathie plus sévère induite. Or, l'inhibition de caspases par l'inhibiteur Z-VAD-FMK (pan-caspase) ou l'inhibiteur Z-LEHD-FMK (caspase-9) ne permet pas de diminuer ou de retarder la perte de viabilité neuronale infecté par l'un ou l'autres des deux variants viraux (Figure 3, article #2, p.121). Ainsi, il appert que la mort cellulaire programmée induite par HCoV-OC43 est indépendante des caspases. Cependant, il a été démontré que ces inhibiteurs chimiques des caspases peuvent ne pas inhiber complètement l'activité des caspases, alors qu'une activité résiduelle peut tout de même subsister (Chauvier *et al.*, 2007). Dès lors, tel que recommandé par les lignes directrices du NCCD, il convient de définir cette mort cellulaire programmée comme étant non-inhibée par le Z-VAD-FMK. Or, nos données démontrent une absence d'activité de la caspase-3 autant chez les cellules infectées ou non-infectées et traitées au Z-VAD-FMK (Figure 3, article #2, p.121). Ceci indique que si un niveau d'activité résiduelle non-détectable, donc non-significatif, de la caspase-3 subsiste, celui-ci ne peut être considéré significativement différent de celui présent chez les cellules non-infectées. Ainsi, ces résultats démontrent que la mort cellulaire programmée induite par HCoV-OC43 est indépendante des caspases qui ne peut alors être associé à un mécanisme d'apoptose classique et est par ce fait caractéristique d'une PCD « apoptosis-like » (revue dans (Kroemer *et al.*, 2009)).

Cependant, bien que les caspases ne soient pas essentielles à la mort cellulaire programmée induite par HCoV-OC43, il est possible qu'elles possèdent tout de même un rôle accessoire durant la mort neuronale. De plus, elles pourraient posséder des rôles dans différents mécanismes cellulaires non-reliés à la mort cellulaire (Gulyaeva, 2003) dont la plasticité neuronale (Bravarenko *et al.*, 2006) et la potentialisation à long terme (Gulyaeva *et al.*, 2003) ou participer dans la modification des protéines virales suivant l'infection comme chez le TGEV (Eleouet *et al.*, 2000) ou le virus de l'influenza (Zhirnov *et al.*, 1999).

4.4 La PCD induite par HCoV-OC43 induit la perméabilisation de la mitochondrie

La présence de caspases activées est souvent subséquente à la libération du CytC qui participe à la formation de l'apoptosome impliqué dans l'activation de la caspase-9. En effet,

nos données indiquent la présence de CytC au cytosol, qui reflète alors une perméabilisation de la mitochondrie et indique la participation possible de celle-ci dans le mécanisme de PCD induit par HCoV-OC43. De plus, la mitochondrie peut également libérer d'autres facteurs de mort cellulaire dont AIF, qui est impliqué dans la fragmentation de l'ADN en haut poids moléculaire (Susin *et al.*, 1999), dans la mort neuronale indépendante des caspases et différentes maladies neurologiques (Alano *et al.*, 2010; Krantic *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004). Nos résultats démontrent la libération de AIF de la mitochondrie vers le noyau où il participerait à la fragmentation de l'ADN observée lors de l'infection par les deux souches de HCoV-OC43 (Figure 4, article #2, p.123). De plus, l'inhibition de la CypD par la cyclosporine A, ainsi que l'inhibition d'expression de CypD, favorise la rétention de AIF à la mitochondrie, empêche sa localisation au noyau, protège le neurone de la mort cellulaire causée par la souche sauvage, rOC/ATCC, et retarde légèrement la mort neuronale causée par la souche plus neurovirulente, rOC/U_S183-241 (Figure 6, article #2, p.127 et figure 7, article #2, p.130). Conséquemment, ces résultats suggèrent que AIF est un facteur impliqué dans la mort neuronale, causée par la souche sauvage de HCoV-OC43, via la fragmentation de l'ADN en haut poids moléculaire. Cependant, l'absence de localisation nucléaire de AIF conjuguée au maintien de la mort neuronale causée par la souche rOC/U_S183-241 souligne que ce mutant pourrait activer d'autres facteurs de mort cellulaire. Il convient de noter que d'autres infections virales sont connues pour induire parallèlement différents mécanismes de mort cellulaire qui peuvent être complémentaires ou compensatoires. L'infection par poliovirus par exemple est connue pour induire des effets cytopathiques via la voie canonicale ou l'apoptose classique selon que les caspases sont actives ou inhibées (Agol *et al.*, 1998; Agol *et al.*, 2000; Tolskaya *et al.*, 1995). À l'instar, l'infection par VSV peut activer à la fois la nécrose de la cellule et des mécanismes apoptotiques dépendants des caspases et de la mitochondrie (Desforges *et al.*, 2002).

La libération des facteurs, tels que CytC et AIF, est caractéristique d'une mort cellulaire programmée où la mitochondrie subit une perméabilisation membranaire et au cours duquel les protéines CypD et BAX sont deux acteurs majeurs via leur interaction et la formation de pores (Kumaraswamy *et al.*, 2009). Nos données démontrant l'activation de BAX, ainsi que sa localisation à la mitochondrie, suggèrent qu'il participerait à la perméabilisation de la mitochondrie et la libération de CytC et IAF chez le neurone humain

infecté par la souche sauvage de HCoV-OC43 ou sa souche plus neurovirulente, rOC/U_{S183}-241 (Figure 4, article #2, p.123).

4.5 HCoV-OC43 induit une PCD dépendante de la Cyclophiline D

La localisation des protéines BAX et CypD à la mitochondrie et leur interaction sont connues pour promouvoir la formation de pores mitochondriaux et induire la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie requiert entre autre la participation des protéines BAX et CypD (Kumarswamy *et al.*, 2009). Nos données démontrent la présence et l'activation de BAX à la mitochondrie, conjointement à la libération des facteurs CytC et AIF indiquent une perméabilisation membranaire de la mitochondrie, suggérant ainsi l'implication possible de CypD dans ce phénomène (Figure 4, article #2, p.123). Nos résultats démontrent en effet que l'inhibition chimique de CypD par la cyclosporine A ou l'inhibition d'expression de CypD protègent le neurone de la mort induite par la souche sauvage de HCoV-OC43 (Figure 5, article #2, p.126 et figure 6, article #2, p.127) et empêchent la libération des facteurs CytC et AIF (Figure 7, article #2, p.130). De plus, le niveau d'inhibition d'expression de CypD corrèle directement avec le niveau de protection de la cellule, renforçant l'hypothèse de l'implication de ce facteur dans la mort du neurone. Conséquemment, ces données démontrent que la mort cellulaire programmée induite chez le neurone humain par la souche sauvage de HCoV-OC43 est dépendante de CypD et que celle-ci est responsable de la perméabilisation membranaire permettant la libération de facteurs de mort cellulaire.

Le rôle de CypD dans la mort ou la survie cellulaire fait l'objet d'intense débat au sein de la communauté scientifique où il participe à la fois dans l'apoptose, la nécrose ou la protection contre ces phénomènes selon le stimulus ou le type cellulaire (Baines *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2011; Nakagawa *et al.*, 2005; Yasuda *et al.*, 2006). Il importe alors de considérer la spécificité de chaque type cellulaire et de reconnaître que chacun de ceux-ci peuvent posséder des mécanismes différents de réponses au stress selon les différents stimuli. De plus, l'apparence d'inconsistance dans son ou ses rôles présumés dans l'apoptose ou la nécrose repose également en partie sur l'absence d'une définition et d'une classification consensuelle des mécanismes ou phénotypes de ces deux phénomènes tels que définis par le NCCD (Kroemer *et al.*, 2009).

Cependant, puisque la fragmentation d'ADN et la diminution du mécanisme énergétique se produit alors que la membrane cellulaire du neurone infecté est toujours intacte (Figure 1, article #2, p.118), HCoV-OC43 induit manifestement une mort cellulaire programmée. L'inhibition de CypD protégeant le neurone indique dès lors que CypD possède un rôle dans l'induction de la mort cellulaire de type « apoptosis-like » causée par l'infection de la souche sauvage de HCoV-OC43, rOC/ATCC, ou la souche plus neurovirulente rOC/U_{S183-241}.

4.6 La souche plus neurovirulente de HCoV-OC43, rOC/U_{S183-241} induit une PCD via plusieurs voies alternatives

Il apparaît clair que la souche plus neurovirulente de HCoV-OC43 induit une mort cellulaire plus importante et plus rapide chez le neurone, alors que l'inhibition d'activité ou d'expression de CypD protège faiblement le neurone. Il importe alors de comprendre comment deux mutations (H183R et Y241H) dans la protéine S peuvent, à elles seules, moduler différemment les voies de mort cellulaire programmée induites suite à l'infection. Le laboratoire a démontré que ces deux mutations se situent dans la région d'attachement à l'acide sialique (SA) 9-O-acétylé de la protéine S et qu'au moins un de ces deux acides aminés est impliqué dans l'interaction avec cet acide sialique (Desforges *et al.*, données non-publiées). De plus, les deux mutations du mutant rOC/U_{S183-241} induiraient une augmentation d'affinité pour la SA-9-O-acétylé. Tel qu'observé chez d'autres virus, comme les Réovirus (Connolly *et al.*, 2001), l'augmentation d'affinité pour la SA au récepteur est lié à l'induction de l'apoptose chez la cellule (Clarke *et Tyler*, 2003). De plus, la SA-9-O-acétyle est présent sur plusieurs types de glycans dans la cellule, dont les gangliosides GD3 (Maccioni *et al.*, 1999) qui se retrouvent à la surface des membranes, incluant la mitochondrie (Mukherjee *et al.*, 2008). La déacétylation du GD3 est connue pour procurer une fonction de mort cellulaire à ce ganglioside (Fernandez-Checa, 2003). En effet, l'hémagglutinine-estérase de l'influenza C (Birks *et al.*, 2011) ou des O-acétylestérases cellulaires (Takematsu *et al.*, 1999) induisent la capacité du GD3 à participer à la perméabilisation mitochondriale en interagissant avec BAX, favorisant ainsi la libération entre autres des facteurs CytC et AIF (Malisan *et al.*, 2002; Rippo *et al.*, 2000; Scorrano *et al.*, 1999). Conséquemment, considérant une plus grande production de protéines virales par la souche rOC/U_{S183-241}, une plus grande affinité de sa

protéine S à la SA-9-O-acétyle et l'activité hémaglutine-estérase de la protéine HE (données de collaboration non-publiées), l'infection induirait un clivage plus important du 9-O-acetyl du GD3 par la protéine HE menant à une augmentation de GD3 déacétylé favorisant la perméabilisation membranaire de la mitochondrie donc une mort cellulaire programmée plus importante que celle induite par la souche sauvage.

5.0 Les mutations de la glycoprotéine S acquises en infection persistante augmentent la neurovirulence de HCoV-OC43

L'obtention d'une souche de HCoV-OC43 comportant des mutations dans la glycoprotéine S obtenues en infection persistante de cellules neurales humaines et promulguant une neurovirulence accrue chez la souris (Jacomy *et al.*, 2010) et chez le neurone *in vitro* souligne l'importance de cette protéine dans les pathologies causées par HCoV-OC43. La glycoprotéine S des Coronavirus était déjà connue pour être impliquée dans la virulence, démontré notamment par les modifications de tropisme et de pathologie induites par les souches telles que MHV-A59 et -JHM où les glycoprotéines S ont été échangées (Navas *et Weiss*, 2003; Phillips *et al.*, 1999). Les travaux présentés dans cette thèse appuient et raffinent la compréhension de l'importance de la glycoprotéine S dans la virulence induite par des Coronavirus, et plus particulièrement la neurovirulence, en démontrant que celle-ci joue un rôle dans la modulation du stress cellulaire, la mort neuronale et, étonnamment, la réplication virale.

Il est connu que la glycoprotéine S peut à elle seule induire un stress au RE menant à l'activation de la UPR (Chan *et al.*, 2006). Les travaux présentés ici démontrent de surcroît que des mutations au sein de celle-ci peuvent augmenter le stress induit au RE et par le fait même la UPR qui s'ensuit. Bien que le mécanisme d'induction de ce phénomène ne soit pas défini, il convient de spéculer que ces mutations pourraient causer une altération du processus de glycosylation de la protéine ou de sa conformation native menant à un stress où le RE devrait y palier en augmentant sa capacité conformationnelle, notamment via une UPR plus intense.

L'augmentation de la production de protéines virales par le variant rOC/U_{S183-241} porte à croire que la glycoprotéine S serait impliquée dans la réplication virale, or aucune donnée ne démontre sa participation, même accessoire, dans l'ordre des *Nidovirales*. La présence

accrue de protéines virales serait plutôt causée par l'augmentation de la capacité conformationnelle globale du RE en réponse au stress supérieur engendré par les mutations de la glycoprotéine S et qui bénéficierait à l'ensemble des protéines virales.

Finalement, la neurovirulence accrue de la souche rOC/U_{S183-241}, induisant une mortalité neuronale plus importante, s'expliquerait entre autres par l'activation d'autres voies de mort cellulaire, comparativement à la souche sauvage. La déacétylation accrue du ganglioside GD3, favorisant la perméabilité mitochondriale, par la protéine HE et dont l'interaction entre les deux serait promue par une plus grande quantité de particules virales intra-cellulaire et une meilleure affinité de la glycoprotéine S expliquerait pourquoi la mort cellulaire programmée est toujours présente, en dépit de l'inhibition de la CypD. De plus, la présence accrue de protéines virales lors de l'infection par la souche rOC/U_{S183-241} au sein de la cellule pourrait à la fois induire un stress au RE plus important mais également interférer avec les mécanismes d'autophagie neuronale, responsables de la dégradation d'agrégats protéiques (Rubinsztein *et al.*, 2005). Tel qu'observé avec d'autres virus neurovirulents, dont le virus de Sindbis (SINV) (Liang *et al.*, 1998; Pattingre *et al.*, 2005), l'altération de la formation des autophagosomes ou leur hyper-sollicitation suite à l'infection peuvent mener à une augmentation de la mort neuronale, et conséquemment de la neurovirulence (Orvedahl *et al.*, 2008).

6.0 Conclusion et perspectives

Le coronavirus humain OC43 est un virus neurotrophe et neuroinvasif possédant des propriétés neurovirulentes chez la souris, et potentiellement chez l'homme, et dont la cellule cible principale au SNC est le neurone. En conséquence, il convient de déterminer les mécanismes cellulaires modulés suite à l'infection afin de mieux comprendre la neuropathologie qui peut s'en suivre. Cette thèse permet de mieux saisir l'ampleur et la diversité de la réponse neuronale à l'infection par un coronavirus humain et pose les premières bases de la compréhension moléculaire et cellulaire des événements précoce de sa neuropathologie potentielle viro-induite chez l'homme.

Ces travaux démontrent que l'infection du neurone par un coronavirus humain module une pléthore de voies métaboliques liées entre autres au métabolisme énergétique, à la structure cellulaire et au cytosquelette, à la biosynthèse des protéines, à la neurogenèse et à la

synthèse de neurotransmetteurs. Plus particulièrement, la modulation des gènes liés à la neurotransmission laisse entendre que l'infection par un coronavirus humain pourrait moduler ou affecter les fonctions de luxe du neurone et de par ce fait même, des fonctions du SNC. Alors que plusieurs virus neurotropes utilisent et modifient l'architecture neuronale afin de promouvoir leur réPLICATION et leur dissémination, il convient de spéculer que HCoV-OC43 pourrait en faire de même. Il appert ainsi que des études déterminant les mécanismes précis d'utilisation du cytosquelette soit nécessaires afin de mieux comprendre sa dynamique de dissémination au SNC. L'utilisation des différents modes de transport antérograde ou rétrograde sont nécessaire à la réPLICATION et la dissémination de plusieurs virus, dont le VV ou l'ASFV (Jouvenet *et al.*, 2004; Rieddorf *et al.*, 2001), il devient alors pertinent de déterminer si HCoV-OC43 pourrait également utiliser ou bénéficier de ces deux modes de transport dans sa dissémination. De plus, la modification du cytosquelette d'actine par différents membres de la famille des *Herpesviridae* (Favoreel *et al.*, 2005) indique une possible modification du transport des vésicules de neurotransmetteurs. Considérant que HCoV-OC43 est à même d'affecter la neurotransmission, notamment via l'excitotoxicité (Brison *et al.*, 2011), l'étude de la capacité synaptique de neurones *in vitro* infectés pourraient permettre de mieux définir les différents types de neurotransmetteurs spécifiques affectés. Qui plus est, l'altération de l'architecture neuronale ainsi que la modification de la capacité de neurotransmission pourraient être directement liées à l'induction de différentes neuropathologies, dont l'Alzheimer (Klingner *et al.*, 2003). L'utilisation de modèles neuronaux *in vitro* dans le futur apparaissent alors essentiels afin de mieux saisir l'ampleur de l'altération des fonctions de « luxe » du neurone. De plus, l'utilisation de modèle murin lors d'une infection pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de dissémination de HCoV-OC43 au sein d'un organisme et comment celui-ci pourrait affecter la transmission de l'influx nerveux selon le type neuronal, e.g. neurone moteur, neurone sensitif.

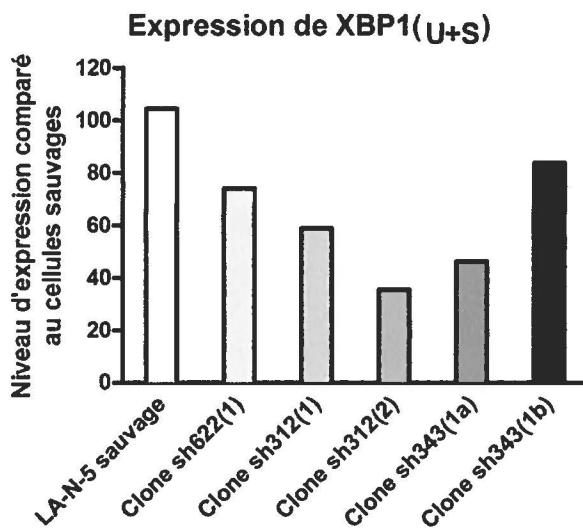
Cette thèse établit également que le neurone humain subit un stress cellulaire suite à l'infection, démontrant que celui-ci touche notamment le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, la capacité de synthèse protéique, la production d'énergie et la viabilité. De plus, elle révèle que la mort neuronale causée par un coronavirus humain est un mécanisme lié à la mort cellulaire programmée qui est indépendante des caspases et dépendante de la CypD. Alors que plusieurs maladies neurodégénératives semblent être causées par l'induction

d'un stress au RE, dont la maladie d'Alzheimer (Imaizumi *et al.*, 2001) et de Parkinson (Imai *et al.*, 2000), il appert important de déterminer si un tel stress est effectivement présent chez les neurones infectés *in vivo*. L'utilisation de modèles murins déficients spécifiquement pour certaines branches de la UPR pourrait également permettre de mieux circonscrire les effets délétères de celle-ci menant ultimement à la neurodégénération. De plus, l'induction de stress au RE étant corrélés avec l'induction de la mort neuronale, il convient d'approfondir la connaissance des voies métaboliques qui pourraient relier plus spécifiquement ces deux phénomènes. L'étude de la neuropathologie *in vitro* et *in vivo* à l'aide de modèle déficient en caspase-4 ou caspase-12 permettrait de déterminer si celle-ci est impliquée dans la neurodégénérescence au SNC, comme elle l'est dans les maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer (Nakagawa *et al.*, 2000; Yoneda *et al.*, 2001)

Finalement, cette thèse souligne pour la première fois que des mutations acquises en infection persistante modifient les propriétés neurovirulentes du coronavirus humain OC43 et que celles-ci promeuvent une mort neuronale importante via des voies métaboliques potentiellement différentes de celles engendrées par la souche sauvage. L'implication potentielle du ganglioside GD3 dans l'induction de la PCD doit être étudiée de façon plus approfondie alors qu'elle pourrait expliquer la neurodégénérescence différentielle engendrée entre la souche sauvage de HCoV-OC43 et la souche mutante. La modification de la glycoprotéine S au cours d'une infection persistante mène à une neurovirulence accrue *in vitro* et *in vivo*. L'étude des différentes hypothèses émises et concernant la participation possible de voies métaboliques compensatoires ou additives dans le processus de mort neuronale, telles que l'implication d'un stress calcique provenant du RE, la localisation de BAX et BAK au RE, la déacétylation et l'activation accrue de GD3 et l'altération du processus autophagique neuronal, pourraient permettre de mieux comprendre la neurovirulence globale du virus et comment celui-ci, lors de sa persistance au SNC de l'homme, mènerait à une neuropathologie viro-induite plusieurs années après la primo-infection.

ANNEXES

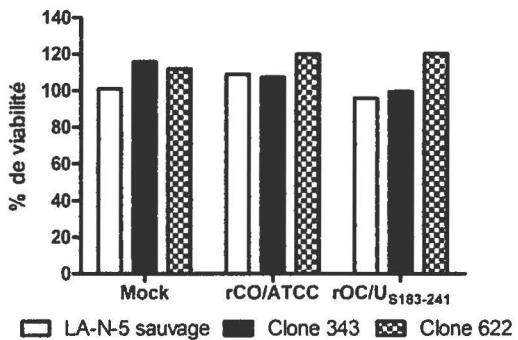
Annexe 1. Quantification du niveau d'inhibition d'expression de Xbp1_(U+S)



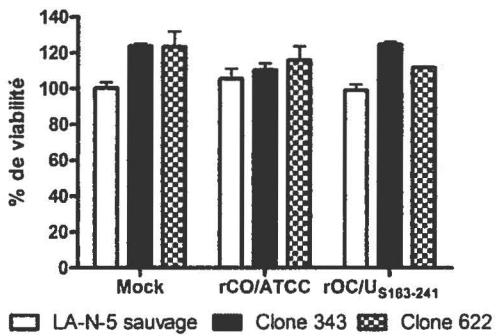
Annexe 1. Quantification du niveau d'inhibition d'expression de Xbp1_(U+S). Des cellules LA-N-5 furent transduites à l'aide de pseudoparticules lentivirales contenant le plasmide pcDNA3.1 exprimant, soit un shRNA spécifique dirigé contre l'ARNm de Xbp1_(U+S) (sh622, sh312 ou sh343), soit un shRNA non-spécifique pour aucun ARNm cellulaire (LA-N-5 sauvage). Les cellules transduites furent sélectionnées à l'aide de la puromycine et des clones cellulaires furent dérivés des populations cellulaires transduites. Le niveau d'expression de Xbp1_(U+S) de chacun des clones cellulaires fut quantifié par PCR quantitatif afin de déterminer le niveau d'inhibition d'expression des ARNm Xbp1_(U+S) comparé au LA-N-5 sauvage.

Annexe 2. Viabilité de neurones infectés et déficients en Xbp1_(U+S)

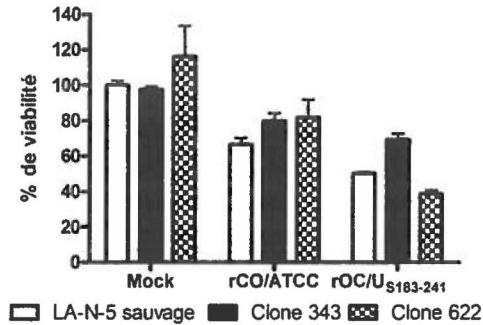
Viabilité cellulaire - XBP1 knock-out 24 h.p.i.



Viabilité cellulaire - XBP1 knock-out 48 h.p.i.

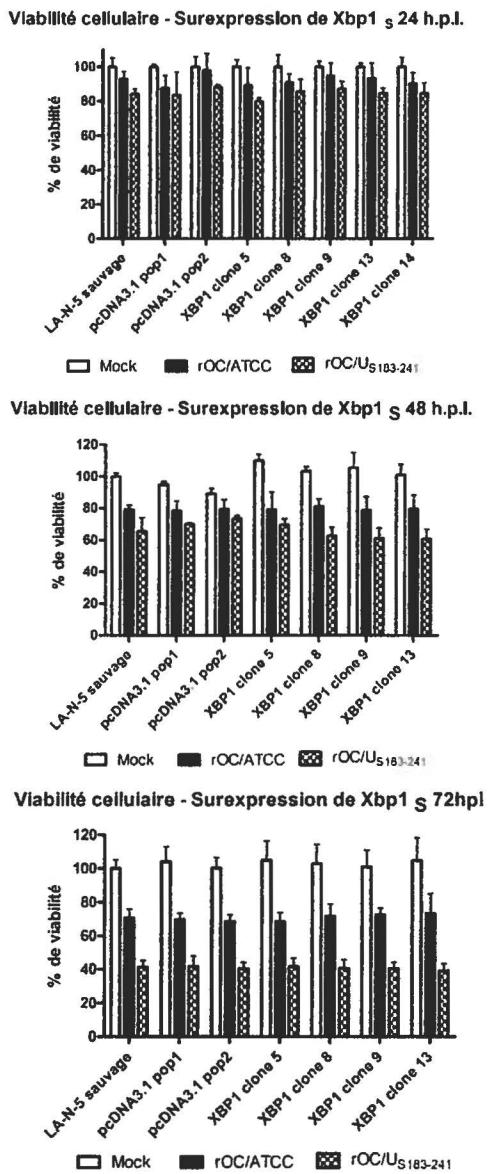


Viabilité cellulaire - XBP1 knock-out 72 h.p.i.



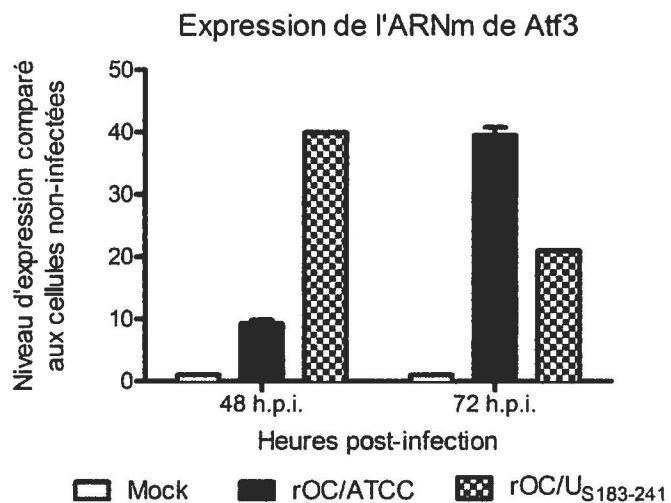
Annexe 2. Viabilité cellulaire suite à l'infection de neurones par HCoV-OC43 rOC/ATCC ou rOC/U_{S183-241} et déficients en Xbp1_(U+S). Les clones cellulaires 343 et 622 démontrant la plus forte inhibition d'expression de Xbp1_(U+S) furent infectés par HCoV-OC43 rOC/ATCC ou rOC/U_{S183-241} et la viabilité neuronale fut mesurée à 24, 48 et 72 heures post-infection et comparée aux cellules non-infectées et non-déficientes en Xbp1_(U+S).

Annexe 3. Viabilité de neurones infectés et surexprimant Xbp1_S



Annexe 3. Viabilité cellulaire suite à l'infection de neurone par HCoV-OC43 rOC/ATCC ou rOC/U_{S183-241} et surexprimant Xbp1_S. Des cellules LA-N-5 furent transfectées par le plasmide pcDNA3.1 vide ou exprimant le gène Xbp1_S. Les cellules transfectées furent sélectionnées à l'aide de la puromycine et des clones cellulaires et des populations clonales furent dérivées. Les différents clones et populations furent infectés par HCoV-OC43 rOC/ATCC ou rOC/U_{S183-241} et la viabilité neuronale fut mesurée à 24, 48 et 72 heures post-infection et comparée aux cellules non-infectées et ne surexprimant pas Xbp1_S.

Annexe 4. Quantification de l'expression de Atf3



Annexe 4. Quantification du niveau d'expression de Atf3 suite à l'infection de neurone par HCoV-OC43 rOC/ATCC ou rOC/U_{S183-241}. Des cellules LA-N-5 furent infectées par HCoV-OC43 rOC/ATCC ou rOC/U_{S183-241} et récoltées à 24, 48 ou 72 heures post-infection. Le niveau d'expression de Atf3 fut déterminé par PCR quantitatif comparativement aux neurones non-infectées.

Annexe 5. Chapitre de livre

HUMAN CORONAVIRUSES: RESPIRATORY PATHOGENS REVISITED AS INFECTIOUS NEUROINVASIVE, NEUROTROPIC AND NEUROVIRULENT AGENTS

Marc Desforges, Dominique J. Favreau*, Élodie Brison, Jessica Desjardins,
Mathieu Meessen-Pinard, Hélène Jacomy, and Pierre J. Talbot

Laboratory of Neuroimmunovirology, Institut Armand-Frappier, Institut national de la
recherche scientifique, Université du Québec
531, boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

*Contribution comme co-auteur : Ce chapitre de livre présente une vue globale des travaux de recherche du laboratoire du Dr Pierre J. Talbot en lien avec les coronavirus humains. Les résultats de mes travaux sur HCoV-OC43 utilisant les modèles neuronaux NT2-N et LA-N-5 et concernant leur susceptibilité et productivité à l'infection (Figure 4), l'analyse de la réponse cellulaire touchant la *Unfolded Protein Response* (texte) ainsi que les résultats démontrant l'ensemble de la diversité de la modulation du transcriptome suite à l'infection (Figure 5 et texte) ont été présentés.

TABLE OF CONTENTS

- 1. INTRODUCTION**
- 2. VIRUSES AND HUMAN NEUROLOGICAL DISEASES**
- 3. THE CORONAVIRUSES: AN OVERVIEW**
- 4. NON-HUMAN CORONAVIRUSES INFECTING THE CNS**
 - 4.1 Mouse hepatitis virus**
 - 4.2 Swine coronaviruses (PHEV)**
 - 4.3 Feline coronaviruses (FCoV)**
- 5. HUMAN CORONAVIRUSES INFECTING THE CNS**
- 6. HUMAN CORONAVIRUSES: EPIDEMIOLOGY OF RESPIRATORY PATHOGENS**
- 7. RESPIRATORY HUMAN CORONAVIRUSES INVADING THE CNS**
 - 7.1 Human coronaviruses other than SARS-CoV: possible association with neurological diseases in humans.**
 - 7.2 SARS-CoV: possible association with neurological diseases in humans**
- 8. POSSIBLE MECHANISMS OF HUMAN CORONAVIRUSES-INDUCED NEUROPATHOGENESIS**
- 9. CONCLUSION AND SIGNIFICANCE**

ACKNOWLEDGMENTS

Work from our laboratory was supported by Operating Grant No. MT-9203 from the Institute of Infection and Immunity (III) of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Discovery Grant No. 42619-2009 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to Pierre J. Talbot, who is the holder of the Tier-1 (Senior) Canada Research Chair in Neuroimmunovirology award. Elodie Brison acknowledges a graduate studentship from the Multiple Sclerosis Society of Canada. Jessica Desjardins acknowledges a graduate studentship from NSERC. Mathieu Meessen-Pinard acknowledges a doctoral studentship from the *Fondation Armand-Frappier*. Dominique J. Favreau acknowledges a doctoral studentship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FRSQ).

1. INTRODUCTION

The central nervous system (CNS) is a highly complex biological system that maintains life and insures its quality. However, like the rest of the organism, it is not immune to microbial infection in general and viral infection in particular. The viruses that penetrate the CNS therefore possess neuroinvasive properties and are usually also neurotropic, meaning that they infect neural cells (neurons and glial cells) and by doing so may also become neurovirulent as they can participate in the development of neurological diseases.

Neurological diseases are diverse and often remain not well understood but one constant fact is that they usually end up in loss of neuronal cell as a portion of these precious cells will eventually die by different mechanisms. These pathologies may be genetically determined or caused by environmental factors, or be provoked or perpetuated through a combination of both genes and environment. Among the several environmental factors presumed or known to be involved are the viruses, which possess potential neuropathogenic properties. Indeed, a viral origin of neurological diseases is often suspected but causes of neurological syndromes of viral origin have often been difficult to identify, since CNS viral infections are often thought to represent complications of systemic viral illnesses. Some of these neurovirulent viruses are able to infect neurons and/or glial cells, causing either an acute disease e.g. rabies-induced death (reviewed by Hankins and Rosekrans, 2004) or chronic disease e.g. measles virus-associated subacute sclerosing panencephalitis; SSPE (reviewed by Young and Rall, 2009). Several diseases once described as degenerative, such as SSPE, are actually slow viral infections with long asymptomatic incubation periods and prolonged durations of overt clinical illness. Neuropathology can be a direct result of the infection, which will alter cell functions or an indirect consequence of the infection, for example through the action of pro-inflammatory mediators (neuroinflammation) that have direct detrimental effects on neural cells or attract inflammatory leukocytes to the site of infection, or both.

Neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or multiple sclerosis (MS) have all been postulated to have an infectious origin and described to comprise an inflammatory component that could be triggered or enhanced by a viral infection. Among these different neurological diseases,

MS represents the archetype of scientific uncertainties towards a CNS affliction of unknown etiology: both genes and environment have been suspected, and several genes as well as several environmental factors may contribute to neuropathogenesis. Several viruses have been implicated in MS etiology or propagation in the last five decades, although not one has so far withstood the test of time or closer scrutiny, perhaps because several different viruses may be involved (Kakalacheva *et al.*, 2011; Gilden, 2005; Talbot *et al.*, 2001; Cook and Dowling, 1980). However, the idea that ubiquitous viruses to which a genetically determined aberrant response is made and leads to relatively rare neurologic diseases has garnered increasing support.

In the long list of viruses that are neuroinvasive, neurotropic and potentially neurovirulent, the coronaviruses, from the order *Nidovirales* (reviewed in Siddell and Snijder, 2008), are prevalent and have been occasionally associated with neurodegenerative diseases of the CNS including MS, Parkinson's and even Alzheimer's disease. In humans, these viruses are recognized respiratory pathogens involved in upper respiratory tract infection in the population in general and in lower respiratory tract infection associated with pneumonia and asthma exacerbation in more vulnerable populations such as infant, elderly and immunocompromised persons. Human coronaviruses (HCoVs) other than SARS-CoV co-circulate during seasonal outbreaks and they are distributed worldwide, whereas SARS-CoV has not been detected in humans since 2003 (Vabret *et al.*, 2009). Over the years, some coronaviruses have been associated with neurologic diseases in animals and among the five different coronaviruses able to infect humans, at least three strains are neuroinvasive and neurotropic (Xu *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2005; Arbour *et al.*, 2000).

2. VIRUSES AND HUMAN NEUROLOGICAL DISEASES

Viral infection of the human CNS does occur and often induces acute encephalitis, which can even lead to death depending on the tropism of the different viruses involved (Whitley and Gnann, 2002). Rabies virus (Hankins and Rosekrans, 2004), Herpes Simplex virus (HSV; Aurelian, 2005) as well as arthropod-borne Flaviviruses, including West Nile Virus (WNV), Japanese Encephalitis Virus (JEV) and Dengue Virus (Mackenzie *et al.*, 2004) all represent well characterized viral agents that can induce encephalitis in humans.

Long-term human neurological diseases may also be linked to viral infection. In HIV dementia, the human immunodeficiency virus (HIV) induces the degeneration of neurons in the hippocampus (reviewed in Mattson *et al.*, 2005) with such neurodegeneration resulting in motor dysfunction and possibly cognitive impairment (Nath and Berger, 2004; Berger and Arendt, 2000). Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) represents a human demyelinating disease where severe and prolonged immunosuppression leads to the reactivation of the latent polyoma JC virus (JCV; reviewed in Weissert, 2011; Roberts, 2005). Subacute panencephalitis sclerosis (SSPE), a progressive fatal neurological disease is also clearly linked to a viral cause; the persistence of measles virus within the CNS (Rima and Duprex, 2005).

However, in several long-term human neurological diseases, it is very hard to ascertain a role of any given virus, due to the difficulty of establishing the timepoint at which this (or these) virus(es) become(s) involved. In this regards, Giovannoni and collaborators (2006) have elaborated a series of new criteria, adapted from Sir Austin Bradford Hill's for causation (Hill, 1965). According to these authors, these "new" criteria should replace Koch's postulate when one wants to evaluate the relevance of any given virus in relation to multiple sclerosis etiology (Giovannoni *et al.*, 2006). It is obvious that these criteria could also more efficiently fulfill the requirements for other long-term human neurological diseases potentially related to a viral infection as well. The HSV-1 and HHV-6 viruses were proposed as potential infectious agents causing or exacerbating AD (Itzhaki *et al.*, 2004). Influenza A was described as a factor which may increase the risk of PD (Takahashi and Yamada, 1999) and viral respiratory infections in general were also described as a possible risk factor in the development of PD (Tsui *et al.*, 1999). Epidemiological studies have also revealed an association between the risk of ALS and herpesviruses and echoviruses infection (Cermelli *et al.*, 2003). Finally, psychiatric disorders were also investigated as a possible consequence of Borna Disease Virus (BDV) infection (Waltrip *et al.*, 1995).

3. THE CORONAVIRUSES: AN OVERVIEW

The Coronaviruses are comprised in the family *Coronaviridae* within the order *Nidovirales*. They are classified in three different genera, namely alpha-, beta- and

gammacoronaviruses

(http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-2008/1230.aspx) and are ubiquitous mainly respiratory and enteric pathogens, with neurotropic and neuroinvasive properties in various hosts including humans, cats, pigs, and rodents. Coronaviruses form a group of enveloped viruses that have the largest genome among RNA viruses. This 30 kb positive-single-stranded polyadenylated RNA possesses 4 or 5 genes encoding structural proteins (S, E, M, N; HE for the genus Betacoronavirus) and several genes encoding non-structural proteins (Fig. 1).

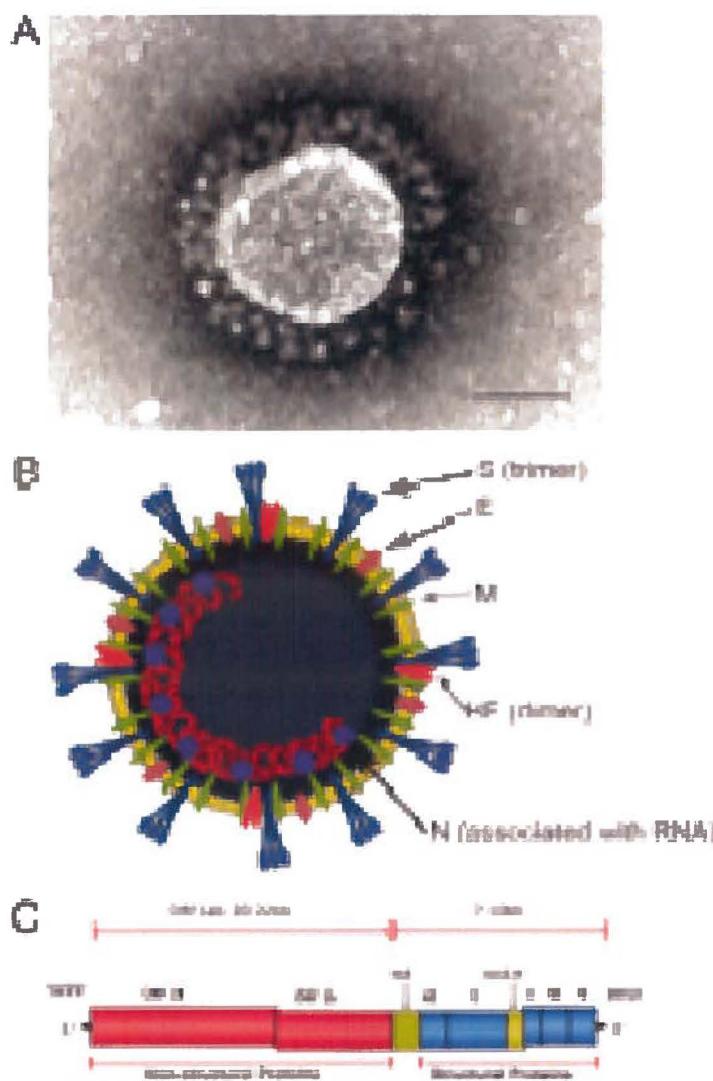


Figure 1 : Overview of the coronaviruses: Electron microscopic appearance (panel A; bar = 100 nm) and schematic diagram of the viral particle (panel B) and of the 30 kb RNA

genome (panel C). The viral particle and the genome of the betacoronavirus HCoV-OC43 are represented as an example, but the overall organization of all the coronaviruses is the same, with the exception of the HE gene, which encodes a hemagglutinin-esterase protein, only present as fifth structural protein in the viral envelope of some coronaviruses. The non-structural (ns) proteins are specific to each genus and their number varies between the different coronaviruses. ORF1 encodes two large polyproteins designated pp1a and pp1ab, which are cleaved by viral proteases to yield 15 to 16 non-structural proteins (nsp).

The spike protein (S) is a large type 1 transmembrane glycosylated protein responsible for the recognition of the cellular receptor used by the virus to infect a susceptible cell (Cavanagh, 1995). The larger portion of the S protein is exposed outside the surface of the viral envelope where it forms a homotrimer (Delmas and Laude, 1990), visible by electron microscopy and which gives the virus its “crown-like” (*corona* in latin) morphology from what its name is derived. The envelope (E) protein is a small structural protein anchored in the viral envelope which has a role in the assembly of the virion and which appears responsible for the adequate curving of the viral envelope (Liu *et al.*, 2007). The membrane (M) protein possesses three transmembrane domains and interacts with all the other structural proteins of the virus and therefore helps to shape and maintain the structure of the virion (Hogue and Machamer, 2008). The nucleocapsid (N) protein associates with the viral genome and plays an essential role in encapsidating it in a helical nucleocapsid within the viral particle (Hogue and Machamer, 2008; Macneughton and Davies, 1978). The hemagglutinin-esterase (HE) is only present in most species of the betacoronavirus genus. Like the S protein, it is a type 1 transmembrane protein which forms homodimers (Hogue and Machamer, 2008) and which interacts with different types of sialic acid associated with an apparent role in hemagglutination. It also possesses an acetyl-esterase function, which may be important early during infection or during the release of viral particles from the infected cells at the end of the replication cycle of the betacoronaviruses (Rottier, 1990). The larger part of the genome, the ORF1a and 1b encode two polyproteins (pp1a and pp1ab), which are cleaved by two viral proteases to yield 15 to 16 non structural proteins (nsp), which all play a role in the replication of the virus (Gorbalenya *et al.*, 2006; Lai and Cavanagh, 1997). The other non-structural (ns) proteins are accessory and appear to mainly play a role in pathogenesis and in the virus-host interaction (Narayanan *et al.*, 2008).

4. NON-HUMAN CORONAVIRUSES INFECTING THE CNS

4.1 Mouse hepatitis virus

The first coronavirus shown to be neurotropic was the mouse hepatitis virus (MHV), a member of the betacoronavirus genus, as early as 1949 when the JHM strain was isolated

from mice with disseminated encephalomyelitis and extensive demyelination (Cheever *et al.* 1949; Bailey *et al.* 1949).

MHV represents the best characterized coronavirus. It infects mice and rats and some strains are neurotropic and neuroinvasive, causing a large spectrum of diseases from hepatitis to encephalitis and chronic demyelination. It is the subject of several good reviews, which describe every aspects of its implication in neurological diseases and which highlight the importance of both viral and host factors in the process (reviewed in Bender and Weiss, 2010; Cowley and Weiss, 2010; Hosking and Lane, 2010). Briefly, MHV can invade the CNS using the transneuronal route through the olfactory nerve (Barnett and Perlman, 1993; Lavi *et al.*, 1988). During the acute phase of infection of the CNS, MHV induces an encephalitis and appears to infect different type of cells, which appear to vary for the different strains (Bender and Weiss, 2010). The virus spreads throughout the brain and rapidly reaches the spinal cord and an important upregulation of cytokines, chemokines and of matrixmetalloproteinases occurs as part of the antiviral innate immune response (Hosking and Lane, 2010). The MHV can also persist within the CNS and induce a chronic demyelinating disease, which is partially immune-mediated, similar to what is observed in multiple sclerosis in humans (Hosking and Lane, 2010). Furthermore, using the C57BL/6 murine model, it was shown that the moderately neurovirulent MHV-A59 strain induced a modulation in expression of different type of genes within the CNS, including several immunity-related, and that this modulation in transcriptomic profile was accompanied by the activation of auto-reactive T cells specific to myelin basic protein (Gruslin *et al.*, 2005).

4.2 Swine coronaviruses (PHEV)

The Porcine Hemagglutinating encephalitis virus (PHEV) was demonstrated to induce disease ranging from gastroenteritis to encephalomyelitis in piglets (Siddell *et al.*, 1983; Andries and Pensaert, 1980). Virus was isolated from the brains of suckling pigs suffering from encephalomyelitis several years ago (Greig *et al.*, 1962) and the disease could be reproduced experimentally in piglets following intranasal inoculation (Alexander, 1962). Moreover, using murine models, the neuroinvasiveness and neurotropism of the virus were demonstrated (Hirano *et al.*, 2004; Yagami *et al.*, 1986). PHEV induced a poor inflammatory reaction in CNS and infected cells showed no cytopathological changes (Hirano *et al.*, 2004).

4.3 Feline coronaviruses (FCoV)

Feline infectious peritonitis (FIP) is a common cause of death in cats, caused by a highly virulent variant of the feline coronavirus (FCoV), called FIPV, which either represents a naturally distinct circulating virulent form of FCoV (Brown *et al.*, 2009) or which emerges from the less virulent virus feline enteric coronavirus (FECV) after acquiring mutations (Rottier *et al.* 2005; Vennema *et al.*, 1998). The intestine was identified as the major site of persistence (Meli *et al.* 2004; Foley *et al.* 1997) but the virus also persists in macrophages of healthy cats (Kipar *et al.*, 2010). These infected macrophages disseminate systemically and trigger immunological responses, which result in microgranuloma formation, vasculitis, organ failure, and death (Vennema *et al.*, 1998; Poland *et al.*, 1996; Pedersen and Boyle, 1980). Neurological FIP may occur in about one cat out of three with FIP disease (Foley *et al.*, 1998; Kline *et al.*, 1994).

The neurological FIP appears partially immune-mediated and may result in uncontrolled inflammation in different parts of the brain that leads to diverse pathological manifestations including meningitis (Slauson and Finn, 1972) and even spinal cord involvement (Legendre and Whitenack, 1975). During neurological FIP, there is often a small amount of virus present in FIP-affected brain tissue (Foley *et al.*, 1998) but inflammatory cells are nevertheless recruited to the brain and appear to contribute to disease, in part, through uncontrolled secretion of cytokines (Foley *et al.*, 2003).

5. HUMAN CORONAVIRUSES INFECTING THE CNS

Coronaviruses are all molecularly related in structure and mode of replication (Brian and Baric 2005; Lai and Holmes 2001). Therefore, historically, the close structural and biological relatedness of HCoV to the neurotropic animal coronaviruses has led to speculation about the possible involvement of HCoV in neurological diseases. Up until today, no clear specific association was made with any known human neuropathology. However, HCoV-229E and HCoV-OC43 (Arbour *et al.* 2000; Arbour *et al.* 1999a; 1999b; Bonavia *et al.* 1997), as well as SARS-CoV (Xu *et al.* 2005; Gu *et al.* 2005), were shown to be neuroinvasive and neurotropic. The significance of the presence of human coronaviruses in

the human CNS and the related possible implications for neurological diseases is discussed in the next sections.

6. HUMAN CORONAVIRUSES: EPIDEMIOLOGY OF RESPIRATORY PATHOGENS

HCoV were first isolated in the mid-60s from patients with upper respiratory tract disease (McIntosh *et al.*, 1967; Hamre and Procknow, 1966; Tyrrell and Bynoe, 1965) and up until the fall of 2002, the only two known serological groups were represented by strains OC43 and 229E, which are respiratory pathogens responsible for 10 to 35% of common colds (Myint, 1995). Over the last decade, several new coronaviruses were identified, including the human HCoV-NL63 (van der Hoek *et al.*, 2004), HKU1 (Woo *et al.*, 2005a) and the SARS-CoV, the causative agent of the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS; Drosten *et al.*, 2003; Fouchier *et al.*, 2003).

Therefore, human coronaviruses (HCoV) are now represented by five different strains; HCoV-229E, -OC43, -NL63, -HKU1 and SARS-CoV. HCoV other than SARS-CoV are primarily associated with upper and lower respiratory tract disease worldwide (Vabret *et al.*, 2009). However, even before the SARS epidemic of 2002, the HCoV were regularly associated with severe respiratory distress in newborns (Gagneur *et al.*, 2002; Sizun *et al.*, 1993) and as important trigger of acute asthma exacerbations (El-Sahly *et al.*, 2000; Johnston *et al.*, 1995; Nicholson *et al.*, 1993). More recently, HCoVs were associated with acute lower respiratory tract infection, including pneumonia, in both infants and immunocompromised patients (Gerna *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2005b). As summarized by Vabret and collaborators, two epidemiologic pictures of HCoV infections have to be distinguished today. HCoVs other than SARS-CoV co-circulate during seasonal outbreaks and they are distributed worldwide, even though a “regional” distribution may vary according to the geographic area and season. On the other hand, the SARS-CoV, which was responsible for the first emerging infectious disease pandemic of the 21st century, 8096 probable cases of SARS were reported with a fatality of about 10% between the fall of 2002 and summer of 2003, has stopped circulating in July of 2003 with the help of drastic public health policy around the world (Vabret *et al.*, 2009). Only a few additional sporadic cases were reported between the fall of 2003 and the

spring of 2004 in China and Singapore, most of them being laboratory-related infections (Gu and Korteweg, 2007);

http://www.who.int/csr/don/archive/disease/severe_acute_respiratory_syndrome/en/index.html). Since the end of the SARS outbreak, it has been confirmed that bats are the natural reservoir of the SARS-CoV (Li *et al.*, 2005).

Among the five human coronavirus strains, at least HCoV-229E and HCoV-OC43, as well as SARS-CoV possess neuroinvasive properties as viral RNA can be detected in the human brain (Xu *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2005; Arbour *et al.*, 2000).

7. RESPIRATORY HUMAN CORONAVIRUSES INVADING THE CNS

As reviewed by Talbot and collaborators for human coronaviruses other than SARS-CoV (Talbot *et al.*, 2008) and for SARS-CoV (Nicholls *et al.*, 2008; Gu and Korteweg, 2007), coronaviruses that infect humans are primarily respiratory pathogens and they usually target first epithelial cells from the respiratory tract (Miura and Holmes, 2009).

One factor that influences a virus-induced pathogenesis is the type of cell susceptible to this virus in a tissue or a specific organ. Binding of the virus to its target cell through a receptor is a critical early step in infection. HCoV-229E uses aminopeptidase N (APN), also called CD13 (Yeager *et al.*, 1992). SARS-CoV (Li *et al.*, 2003) and HCoV-NL63 (Hofmann *et al.*, 2005) use angiotensin converting enzyme 2 (ACE2); SARS-CoV can also use L-SIGN (CD209L) (Jeffers *et al.*, 2004). However, the cellular receptor for HCoV-HKU1 and HCoV-OC43 remains to be identified. Sialic acid in the form of N-Acetyl-9-O-acetylneuraminic acid was identified as a ligand for the S protein of HCoV-OC43 (Kunkel and Herrler, 1993) and as a receptor determinant during infection (Krempl *et al.*, 1995) and it is now known that this particular sialic acid is essential for infection of susceptible human epithelial and neuronal cells (Desforges *et al.*, manuscript in preparation, 2011). The major histocompatibility complex (MHC) class I C molecule (HLA-C) was recently identified as an attachment factor that facilitates the infection of susceptible cells by HCoV-HKU1 (Chan *et al.*, 2009). All of the known receptors mentioned above have been shown to be expressed in different cell types within the respiratory tract and other tissues, including the CNS.

Human coronaviruses are recognized respiratory pathogens, however, infectious particles, antigens or RNA, were detected in other tissues than the respiratory tract, including the CNS. In order to be neuroinvasive, viruses such as HCoV-229E and -OC43 and SARS-CoV may use two different routes from the periphery. The first, called the hematogenous route, involves the presence of a given virus in the blood where it can either remain free for a period of time before it can infect the endothelial cells of the blood-brain-barrier (BBB) or infect leukocytes that will become some sort of viral reservoir. Both situations occur during HIV infection of the CNS. Indeed, HIV-infected leukocytes migrating through the BBB (called the Trojan horse; reviewed in Kim *et al.*, 2003), is one of the route, and direct infection of the endothelial cells from the BBB is also possible even though the viral

replication is low (Argyris *et al.*, 2007). A second form of any viral spread towards the CNS is through neuronal dissemination, where a given virus infects neurons in periphery and uses the machinery of transportation within those cells in order to gain access to the CNS.

Infection of human leukocytic cell lines and of monocytes/macrophages by HCoV-229E and HCoV-OC43 was reported (Desforges *et al.* 2007; Collins 2002) and infection by HCoV-229E of peritoneal macrophages (Patterson and Macnaughton, 1982) and murine dendritic cells expressing the human APN (Wentworth *et al.*, 2005) suggests that human coronaviruses may use these cells to disseminate to other tissues, where they could be associated with other type of pathologies. SARS-CoV was also shown to be able to infect human monocytes/macrophages (Nicholls *et al.* 2006; Gu *et al.*, 2005), which produced a small amount of infectious particles (Yilla *et al.*, 2005). Moreover, monocytes-derived dendritic cells are also susceptible to a low level productive infection by SARS-CoV (Spiegel *et al.*, 2006).

Both the human monocytic cell line THP-1 and human primary monocytes are activated to produce TNF-alpha and MMP-9 following infection by HCoV-229E in cell culture (Desforges *et al.*, 2007). As activated monocytes eventually become macrophages as they invade tissues, this activation suggests that HCoV-229E-infected monocytes would become activated *in vivo*, thus facilitating their passage towards other tissues, especially in immunocompromised individuals, as this was observed for murine cytomegalovirus (MCMV) (Reuter *et al.*, 2004). The fact that HCoV-229E could only infect partially immunocompromised transgenic mice (Lassnig *et al.*, 2005) suggests that HCoV-229E could take advantage of an immunosuppressed environment and disseminate to different organs within susceptible individuals. The establishment of a persistent infection in a human leukocytic cell line (Desforges *et al.*, 2007) is also consistent with the possibility that monocytes/macrophages serve as a reservoir and vector for HCoV-229E towards other tissues, including the CNS for this neuroinvasive HCoV (Arbour *et al.*, 2000). The same situation may occur for SARS-CoV, which infects monocytes-macrophages (Nicholls *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2005) as a study with a mouse model suggests that after an intranasal infection, the virus primarily replicate in the lungs before going into the brain (McCray *et al.*, 2007). Furthermore, considering the fact that SARS-CoV is able to modulate the innate immunity in dendritic cells (Spiegel *et al.*, 2006), one can also speculate that these cells could

also serve as an eventual reservoir for this virus in order to reach and maintain itself in the CNS. Our results indicate that HCoVs were also shown to infect human endothelial cells of the BBB in culture (unpublished data) and it has been speculated that SARS-CoV could do the same after viremia (Guo *et al.* 2008) as both ACE-2 and CD209L are expressed on the endothelial cells of the human BBB (Li *et al.*, 2007). Therefore, the neuroinvasive human coronaviruses could use the hematogenous route to penetrate the CNS as illustrated in Fig. 2.

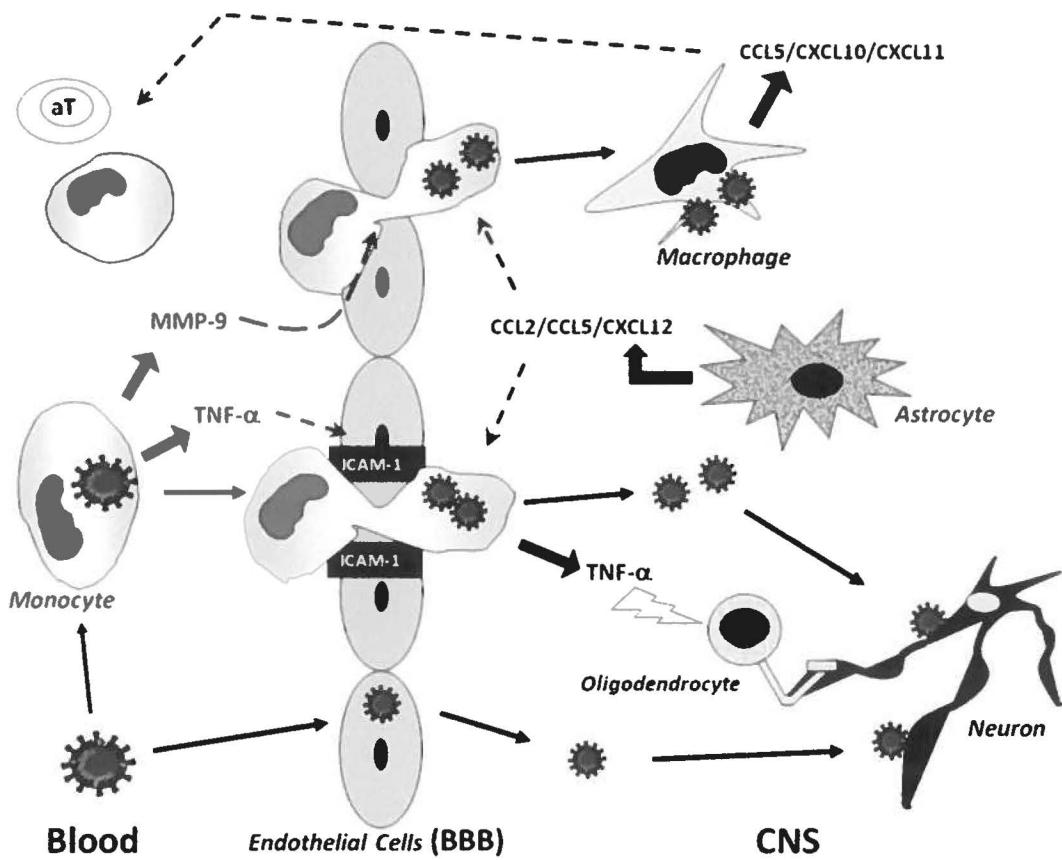


Figure 2 : The hematogenous route of neuroinvasion and possible mechanism of neurovirulence of HCoV. Human monocytes are susceptible to infection by human coronaviruses including SARS-CoV and are activated after infection. This activation involves, among other factors, the production of matrix metalloproteinase MMP-9, which increases the permeability of the blood-brain-barrier (BBB), and of TNF- α , which up-regulates the adhesion molecule ICAM-1 on endothelial cells of the BBB, facilitating the passage of infected monocytes into the central nervous system (CNS). Viruses may also directly infect endothelial cells in order to gain access to the CNS, where they can infect

neurons. Once in the CNS, the infected and activated monocytes produce pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , that can damage the myelin-synthesizing oligodendrocytes and/or neurons. Infected monocyte-derived macrophages that entered the CNS (or microglia) may produce chemokines, such as CCL5, CXCL10 or CXCL11, that will chemoattract activated T cells and/or other monocytes into the CNS. These cells may then mediate an immune-mediated pathogenesis after infection. Moreover, after sensing the infection, astrocytes may produce chemokines, such as CCL2, CCL5 and CXCL12, that will also participate in the recruitment of more infected leukocytes. Thus, coronaviruses can initiate a neuroinflammatory loop leading to neuropathology.

On the other hand, after an intranasal infection, both HCoV-OC43 (Jacomy and Talbot, 2003) and SARS-CoV (McCray *et al.*, 2007) were shown to infect the lungs in mice and to be neuroinvasive as HCoV-OC43 (Butler *et al.*, 2006; St-Jean *et al.*, 2004) and SARS-CoV (Netland *et al.*, 2008) were detected in the CNS of susceptible mice. Therefore, these two coronaviruses may use both the hematogenous and transneuronal route through the olfactory nerve towards the CNS. Furthermore, as shown here in Fig 3, once in the brain, HCoV-OC43 is able to disseminate in the cortex and medulla but the cerebellum remains uninfected. The hippocampus represents another specific structure infected by HCoV-OC43 in the brain. Once in this region of the brain, the virus appears to propagate by a transneuronal route as also illustrated and described in Fig. 3.

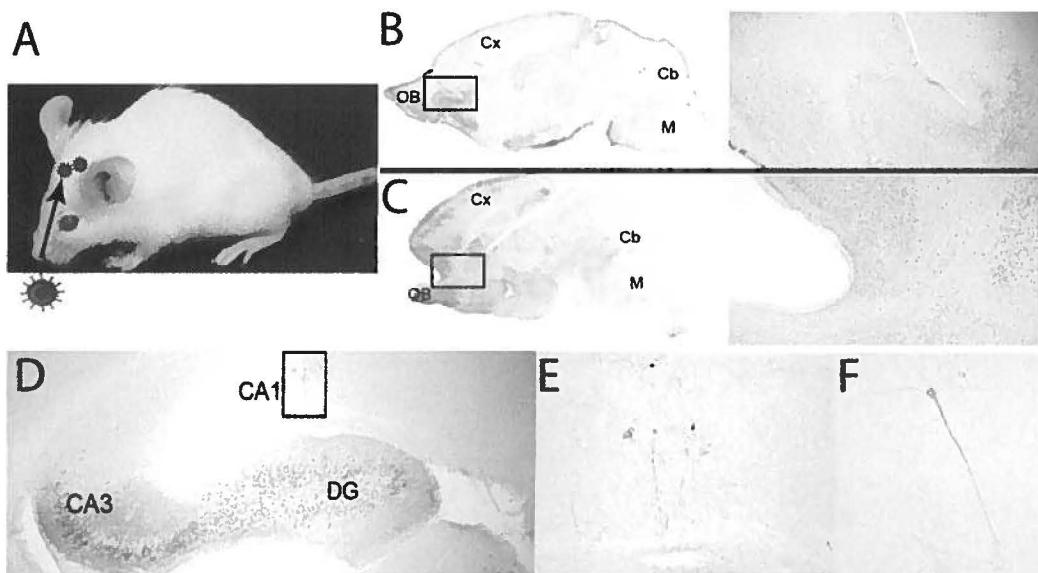


Figure 3: The transneuronal route of neuroinvasion through the olfactory nerve and spread into the CNS of HCoV. Panel A: After intranasal infection of susceptible mice, HCoV-OC43 is able to get into the brain through the olfactory nerve and replicate in the CNS. Panel B: At 3 days post-infection, viral antigens are detected in neuronal cells in the olfactory bulb (OB). The right panel presents a higher magnification of the insert on the left panel. Panel C: At 7 days post-infection, virus is still present in the OB and spread is observed into the cortical area (Cx) and the medulla (M). The cerebellum (Cb) is spared from infection. The right panel presents a higher magnification of the insert on the left panel. Panel D: The hippocampus is infected by HCoV-OC43 as shown by the presence of viral antigens in numerous neurons of the dentate gyrus (DG) and in CA3 pyramidal neurons. The low number of infected neurons in the CA1 pyramidal layer (insert magnified in panel E), suggests that the virus uses the Schaffer's collaterals from CA3 cells before spreading to CA1 cells. This illustrates the trans-neuronal spread of HCoV. Panel F: Hippocampal neuron infected by HCoV-OC43 illustrating that infection occurs in the whole dendritic tree and axonal extension.

7.1 Human coronaviruses other than SARS-CoV:possible association with neurological diseases in humans.

Traditionally, the four Koch's postulates have been applied to establish whether a particular infectious agent causes a specific disease (Koch, 1942). However, as beautifully presented by Fredericks and Relman, there are situations where Koch's postulates have to be reconsidered (Fredericks and Relman, 1996). Several viral infections, and especially the slow viral infections related to diseases that are rare manifestations of a particular infection, represent this kind of situation where Koch's postulate should be replaced. Two well-known examples of the latter situation are related to Epstein-Barr virus (EBV), where only a minority of individuals will develop Burkitt's lymphoma and to the human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1), which will cause the progressive tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (PTSP/HAM) in only 1% of infected individuals (reviewed in Giovannoni *et al.*, 2006).

The presence of HCoV-229E and HCoV-OC43 has been detected in different neurological diseases in humans. An association that was made with Parkinson's disease

(PD) stems from a report of antiviral antibodies (Fazzini *et al.*, 1992) and HCoV RNAs (Cristallo *et al.*, 1997) in the cerebrospinal fluid (CSF) of PD patients. Moreover, detection of viral RNA in human PD brains revealed that three out of three patients were positive for HCoV-229E and one of them also for HCoV-OC43 (Arbour *et al.*, 2000). Like many neurodegenerative diseases, genetic and environmental factors seem to be involved in the etiology of PD (Olanow and Tatton, 1999). Influenza A was described as a factor which may increase the risk of PD (Takahashi and Yamada, 1999) and viral respiratory infections in general were also described as a possible risk factor in the development of PD (Tsui *et al.*, 1999).

Multiple Sclerosis (MS) represents another human neurological disease where an infectious agent or agents may play a triggering role, with viruses the most likely culprit in genetically predisposed individuals (Kurtzke, 1993). There is a presumption that several neurotropic viruses could be involved in MS pathogenesis but that they may do so through similar direct and/or indirect mechanisms (reviewed in Kakalacheva *et al.*, 2011; Gilden, 2005; Talbot *et al.*, 2001; Johnson, 1985; Cook, 1980). However, research has not isolated or directly linked any specific virus with MS. Association of coronaviruses with MS was suggested by their isolation from the CNS of two patients (Burks *et al.*, 1980). Other reports include intrathecal antibody synthesis (Salmi *et al.*, 1982) and ultrastructural observation (Tanaka *et al.*, 1976). One report demonstrated a significant association of colds with MS exacerbation and a significant association of HCoV-229E infection in MS patients (Hovanec and Flanagan, 1983) and another report on the association of viral infections and MS (Sibley *et al.*, 1985) commented that seasonal HCoV infection patterns do fit the observed occurrence of MS exacerbations. Acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) is a neurological disorder characterized by inflammation of the brain and spinal cord caused by damage to the myelin and is seen most frequently after non-specific upper respiratory tract infections. Even though the etiological agent remains unknown, HCoV-OC43 was detected in the CNS of a child with ADEM (Yeh *et al.*, 2004).

As previously stated, although any direct correlation between HCoV-229E and HCoV-OC43 and neuropathology in humans remains to be investigated, the detection of RNA in human brains does confirm that they are truly neuroinvasive (Arbour *et al.*, 2000). Furthermore, the case of these human coronaviruses in the CNS may represent a new

example where the traditional Koch's postulate should be replaced by the previously cited adapted Hill's criteria (Giovannoni *et al.*, 2006).

Even though HCoV-NL63 and HKU1 have never been detected in human CNS, a recent report suggests that they may represent a co-morbid risk factor in individuals with serious mental disorders. The authors of this report are careful in the conclusions they draw as they are aware of the highly circumstantial nature of this association of HCoV with recent psychotic symptoms, which is based on high titers of IgG specific to these viruses in the serum of patients (Severance *et al.*, 2011). Nevertheless, studies to evaluate the extent that HCoV-NL63 and HKU1 can be neuroinvasive are warranted.

7.2 SARS-CoV: possible association with neurological diseases in humans.

The neuroinvasive properties of SARS-CoV were first suspected when viral RNA was detected in the CSF of a 32-year-old female patient in Hong Kong in 2004 (Lau *et al.*, 2004). The year after, SARS-CoV neuroinvasive properties were indeed demonstrated as the virus was isolated from brain tissue of a SARS patient who presented neurological symptoms and a neuropathology associated with necrosis of neuronal cells and glial cell activation. Moreover, the chemokine CXCL9/Mig (monokine induced by gamma interferon) was expressed by glial cells in association with infiltration of T cells and macrophages (Xu *et al.*, 2005). The same year, another report indicated that SARS-CoV RNA was also detected in the brain of eight different patients who died from SARS, as the presence of the genomic RNA was detected in the cytoplasm of numerous hypothalamic and cortical neurons. Furthermore, edema and scattered red degeneration were observed in the brain of six out of the eight autopsied brains (Gu *et al.*, 2005). Therefore, SARS-CoV is neuroinvasive, neurotropic and could be associated with the development of a neurological disease. Furthermore, the involvement of SARS-CoV in CNS infections was underscored by the findings that made use of transgenic mouse models expressing the human angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2), which is the cellular receptor used by the SARS-CoV to infect susceptible cells. Indeed, using these mice, it was shown that the SARS-CoV could invade the CNS after an intranasal infection primarily through the olfactory bulb (Netland *et al.*, 2008) or even after an intra-peritoneal infection (Tseng *et al.*, 2007), with concomitant neuronal loss (Netland *et al.*, 2008; Tseng *et al.*, 2007).

8. POSSIBLE MECHANISMS OF HUMAN CORONAVIRUSES - INDUCED NEUROPATHOGENESIS

Viral infection of oligodendrocytes could lead to demyelinating disease through alteration of their normal function or cytolysis as is the case for reactivated JCV, which induces the progressive lysis of oligodendrocytes during PML (Roberts 2005; Sweet *et al.*, 2002). The release of myelin components could also provide targets for autoimmune attack. Infection or activation of astrocytes and microglia could lead to release of inflammatory mediators that could damage oligodendrocytes (Hovelmeyer *et al.*, 2005; Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999; Miller *et al.*, 1997; McLarnon *et al.*, 1993).

Several years ago, HCoV-OC43 was shown to productively infect cultured mouse CNS cells and human fetal glial cells were also susceptible to HCoV-OC43 infection, although no infectious virus was detected (Pearson and Mims, 1985). Over the years, our own studies have shown that cell lines representative of the human CNS are susceptible to productive infection by HCoV-229E and HCoV-OC43, including long-term viral persistence (Arbour *et al.*, 1999a and 1999b) and that primary cultures of fetal and adult human astrocytes and adult microglia are susceptible to infection by both HCoV strains (Bonavia *et al.*, 1997) with preliminary results consistent with infection of adult oligodendrocytes and human brain endothelial cells (unpublished data).

Furthermore, making use of different mouse model, we also showed that HCoV-OC43 induces an acute vacuolating encephalitis (Jacomy and Talbot, 2003) and viral persistence in the CNS associated with motor disabilities (Jacomy *et al.*, 2006), suggesting that a respiratory pathogen, like neurotropic and neuroinvasive HCoVs could be associated with neurodegenerative disease in susceptible individuals. Like the mouse coronavirus MHV (the murine counterpart of HCoV-OC43), which is able to induce a chronic white matter pathology characterized by focal demyelinating lesions in brain and spinal cord in mice that survived acute encephalitis (Weiner, 1973; Lampert *et al.*, 1973) associated with immunopathological mechanism (Houtman and Fleming, 1996; Wang *et al.*, 1990), the human coronavirus OC43 appears to be able to establish itself in the CNS where it could eventually participate in the development of a chronic demyelinating disease resembling MS. Furthermore, we have demonstrated that MHV activates myelin basic protein-reactive T-cells

(Gruslin *et al.*, 2005) and identified HCoV-myelin T-cell cross-reactivity in MS patients (Boucher *et al.* 2007; Talbot *et al.* 1996). Moreover, variants of HCoV-OC43 harboring mutations in the Spike protein (S) acquired after a persistent infection in human neural cells are able to induce a long-term demyelination in the spinal cord of susceptible mice (Jacomy *et al.*, 2010) resembling the lesions observed in MS patients. This suggests that persistence in neural cells has allowed HCoV-OC43 to acquire mutations that may modify the capacity of the virus to spread in the CNS correlating with demyelination in the spinal cord, which ends up in a modification in the resulting neuropathology it causes in susceptible host.

We have shown that HCoV-OC43-infected astrocytes and microglia are activated to produce pro-inflammatory mediators (Edwards *et al.*, 2000). Activation of CNS glial cells, astrocytes and especially microglia, is now recognized as a hallmark of neurological disorders (reviewed in Raivich and Banati, 2004; Nelson *et al.*, 2002), including MS (Sriram and Rodriguez, 1997) and AD (Barger and Harmon, 1997). Viruses that enter the CNS, such as HCoV (Arbour *et al.*, 2000; Bonavia *et al.*, 1997) are thus prime candidate mediators of some of this neuropathologically relevant activation involving release of pro-inflammatory molecules such as cytokines, chemokines, nitric oxide (NO), and reactive oxygen intermediates (ROS; reviewed in Bilzer and Stitz, 1996), as well as local antigen presentation to infiltrating T lymphocytes (Aloisi *et al.*, 2000). Studies of the interaction of viruses with microglial cells may hold keys to understanding some neuropathogenic mechanisms. Even though HIV appears to be able to infect neurons in very young children (Canto-Nogues *et al.*, 2005), in the adult CNS, HIV does not infect neurons and it is therefore believed that the damage induced to neurons in HIV dementia is initiated by either cellular soluble mediators such as matrix metalloproteinases (MMP) released from infected infiltrating macrophages (Zhang *et al.*, 2003) or by HIV proteins released from infected glial cells (Mattson *et al.*, 2005). Our results showing that HCoV-OC43 induces neuronal apoptosis in murine primary cultures and *in vivo* (murine model), with apoptotic cells being infected or not, suggests that like it is the case for HIV, soluble mediators released by glial cells surrounding neurons may be involved in the neuronal degeneration that leads to neuropathology (Jacomy *et al.*, 2006). As stated above, HCoV-229E and HCoV-OC43 have the potential to infect different cells in the CNS. However, we have shown that the neurons are the main target cell of HCoV-OC43 in the CNS of susceptible mice (Jacomy and Talbot, 2003) and in mixed primary cultures

from the murine CNS (Jacomy *et al.*, 2006 and Fig. 4A) and in co-cultures of human neurons and astrocytes (Fig. 4B) obtained from the differentiation of the human NT2 cell line using a modified protocol which give rise to a mixture of neurons and astrocytes (Sandhu *et al.*, 2003).

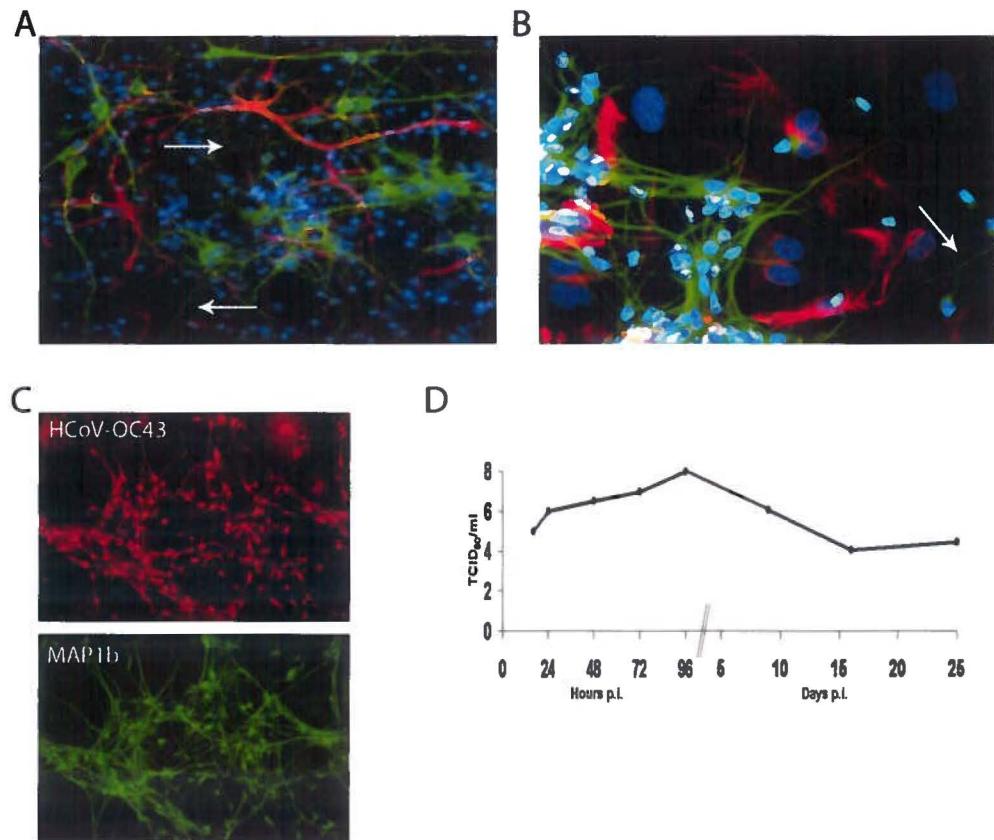


Figure 4: The main target of HCoV-OC43 infection is the neuron in mouse and human cell cultures. Panel A: Mixed primary cultures from the murine CNS and Panel B: co-cultures of human neurons and astrocytes obtained from differentiated human NT2 cell line using a protocol which gives rise to a mixture of neurons and astrocytes. In both type of cultures, HCoV-OC43 primarily targets the neuron for infection leading to axonal beeding (white arrows in Panels A and B). The viral S protein is in green in infected neurons and red represents the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in activated astrocytes. The blue signal is the nucleus detected by the DNA-specific dye DAPI. Panel C: NT2-N cells (95% pure human neuronal culture) infected by HCoV-OC43. The viral S protein is in red in infected neurons and green represents the microtubule associated protein 1b (MAP1b) expression in

differentiated neurons. Panel D: HCoV-OC43 can establish a long term infection of the NT2-N cells for up to 25 days post-infection even though cell death occurred in a portion of the NT2-N cells after acute infection.

The NT2 cell line may also be differentiated as a 95% pure neuronal culture named NT2-N, which expresses different markers of human neuronal cells (Pleasure *et al.*, 1992). Even though cell death was induced in a portion of the NT2-N cells after infection by HCoV-OC43, these cells were able to sustain a long time productive infection by HCoV-OC43 for at least 25 days (Fig. 4C). When analyzing this transcriptome modulation of the infected NT2-N cells (Fig. 5) and by confirming the results by RT-PCR, it became clear that, like other coronaviruses (Bechill *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2006) in different cell types, HCoV-OC43 induces the modulation of expression of several genes related to the unfolded protein response (UPR) in infected human NT2-N and LA-N-5 neuronal cell lines (Favreau *et al.*, 2009). The UPR is associated with the induction of ER (endoplasmic reticulum) stress and represents a process which serves in cell homeostasis but which can become deleterious to the cell when the stimulus is too strong or when it remains for a long period of time (Ron and Walter, 2007). Moreover, ER stress and impaired UPR has been associated with human neurological diseases (Lindholm *et al.*, 2006; Paschen, 2003) Using two different variants of HCoV-OC43, we were able to relate the level and duration of the UPR induction in neuronal cells with the S protein. Indeed, compared to the wild type HCoV-OC43 virus, a variant harboring two point mutations in the putative receptor binding domain of the S protein, acquired during a persistent infection of human neural cells, induced a stronger UPR, which eventually led to more activation of caspase-3 and neuronal cell-death (Favreau *et al.*, 2009). This is of particular interest as we previously showed that caspase-3 activation and apparent apoptosis was induced in the brain of infected mice and in mixed primary cultures from the murine CNS (Jacomy *et al.*, 2006).

The analysis of the transcriptomic modulation in the NT2-N neuronal cells infected by the HCoV-OC43 also indicates that the level of expression of different family of genes that can be related to diverse metabolic pathways is either up- or down-regulated after the infection (Fig. 5). For instance, the genes related to the induction of the UPR are comprised in the “Biosynthesis and Degradation” family. The modulation of expression of several genes in this family was directly correlated with an ER stress and effective UPR in HCoV-OC43-

infected neuronal cells (Favreau *et al.*, 2009). Therefore, one can argue that evaluating the complete transcriptome of infected cells will certainly help to decipher the more complete neuronal cell response after infection. In this regards, recent results from our laboratory clearly indicate that the “Apoptosis/Cell Survival” (Favreau *et al.*, manuscript under revision 2011) and the “Neurotransmission/Neurogenesis” family (Brison *et al.*, manuscript submitted for publication 2011) identified in figure 5 represent important pathways in the neuron response to HCoV-OC43 infection.

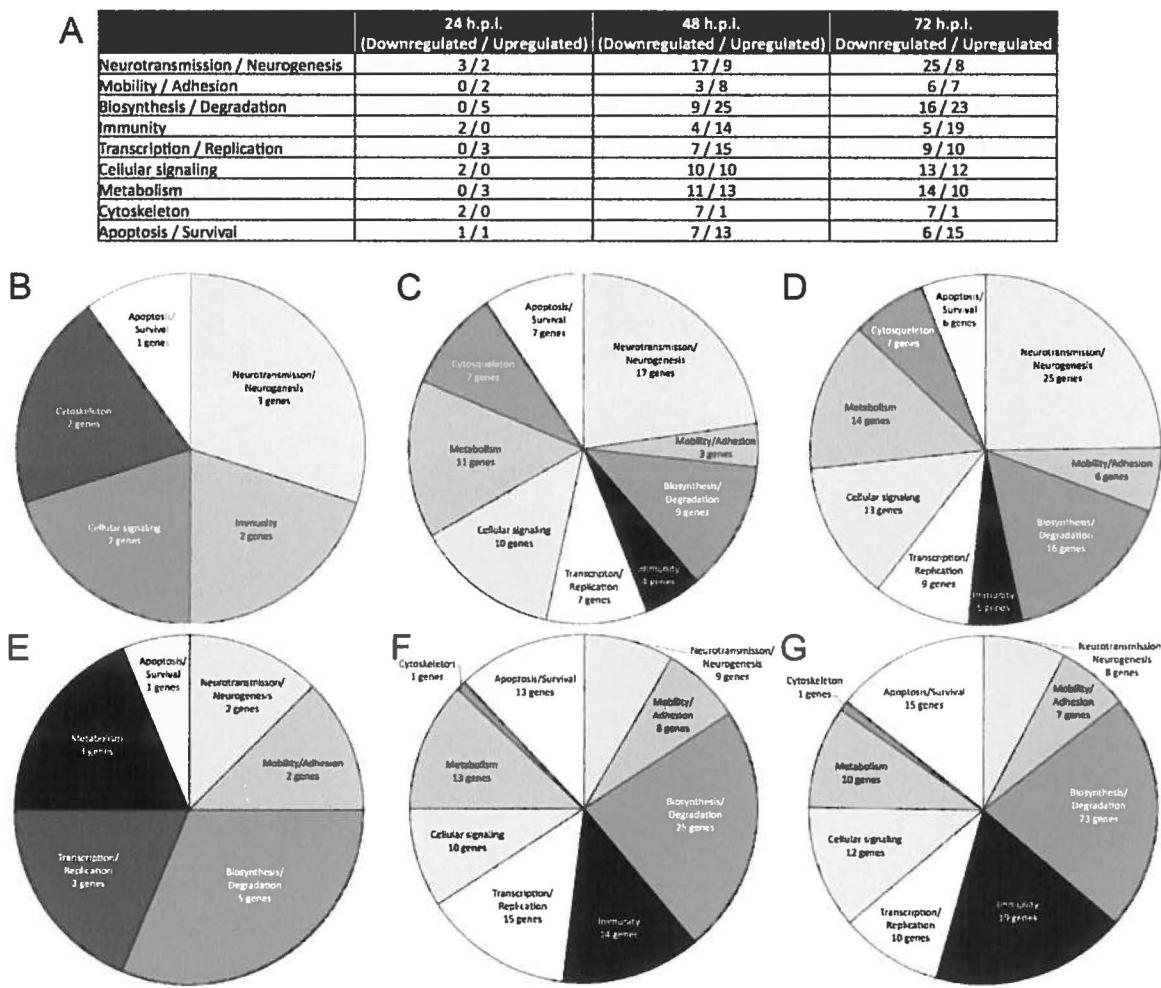


Figure 5: Virus-induced modulation of the neuronal transcriptome in the NT2-N model of human neurons. Infection of NT2-N cells by HCoV-OC43 induces a modulation of the whole neuronal transcriptome. Exhaustive analysis on a genome-wide scale revealed that the level of expression of several different genes encoding cellular proteins involved in diverse metabolic pathways was significantly modulated. The genes were classified within

nine different functional families, as shown in panel A, where the number indicates the number of genes that are either down- or up-regulated at 24, 48 and 72 hours post-infection (h.p.i.). The relative proportion of the different gene families that are down-regulated are represented in pie charts: panel B: 24 h.p.i.; panel C: 48 h.p.i. and panel D: 72 h.p.i. and the relative proportion of the different gene families that are up-regulated are represented in pie charts: panel E: 24 h.p.i; panel F: 48 h.p.i. and panel G: 72 h.p.i..

Neurotransmission between adjacent neurons is an essential process in the CNS where glutamate is the major excitatory neurotransmitter involved in several functions. In physiological conditions, glutamate is synthesized by neurons and released in the synaptic cleft. Two types of ionotropic transmembrane receptors for glutamate that mediates synaptic transmission exist in the central nervous system (CNS). The first is named the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (also known as AMPAr) and the second *N*-Methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) (reviewed in Watkins and Jane, 2006). Activation of the downstream AMPA receptor allows the entry of sodium ions in the post-synaptic neuron in order to mediate the neuronal membrane depolarization. Using another type of glutamate receptor, called the glutamate-transporter-1 (GLT-1), astrocytic cells clear the excess of extracellular glutamate in the synaptic cleft by uptake through special receptors that are high-affinity transporters of glutamate (reviewed in Kuzmiski and Bains, 2010) A disruption of glutamate homeostasis may induce neuronal degeneration and eventual cell death by an excitotoxic process (Mark *et al.*, 2001), which is an excessive stimulation by the neurotransmitter glutamate on its specific receptors (AMPAr and NMDAr) (Olney, 1969; Fig. 6). This is of particular interest considering that since then, glutamate excitotoxicity was shown to be involved in several viral infection such as West Nile virus, Sindbis virus, JEV, HIV and HSV (Blakely *et al.*, 2009; Carmen *et al.*, 2009; Golembewski *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2007; Haughey *et al.*, 2001). The loss of neuronal subpopulations in the brain during HIV dementia was also related to an indirect mechanism conjugating glial activation, cytokines released and excitotoxic transmission (Alirezaei *et al.*, 2008; Masliah *et al.*, 1996). Using a mouse model, we recently showed that during infection by HCoV-OC43, hippocampal neurons died in part by this glutamate excitotoxicity as they were partially protected from degeneration in mice that were treated with the AMPA receptor antagonist (GYKI-52466). (Brison *et al.*, manuscript submitted for publication 2011). Therefore, human

coronavirus infection of the CNS may also involve excitotoxicity, which could account for the neurological disease associated with the infection. From a scientific point of view, it is interesting to note that this process has over the years been associated with diverse human neurological diseases such as Alzheimer's, Huntington's, Parkinson's disease and ALS as well as MS (Lau and Tymianski, 2010; Haeberlein and Lipton, 2009).

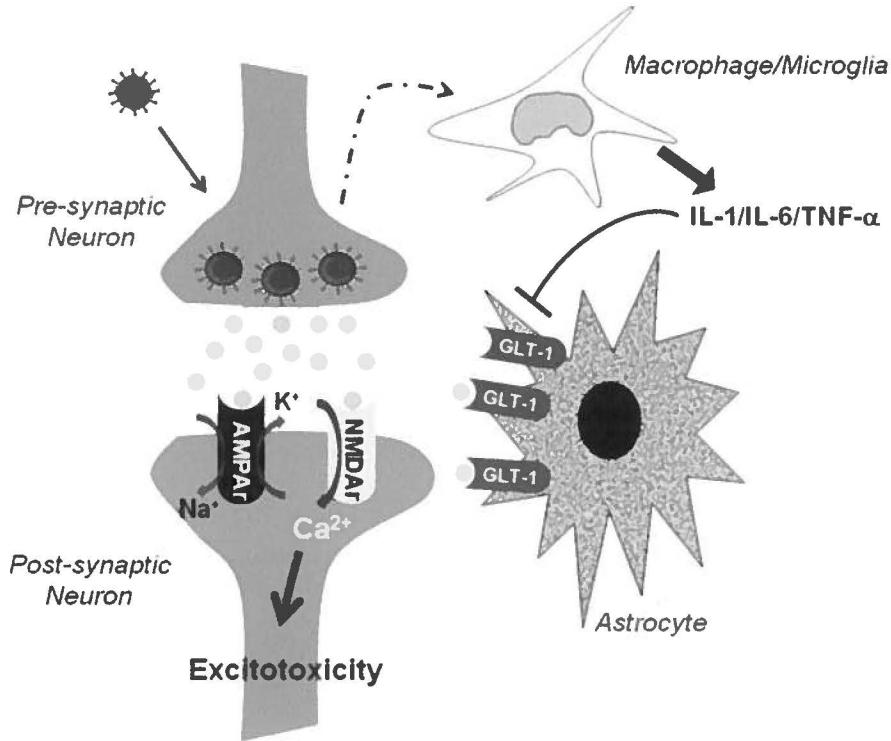


Figure 6: HCoV infection induces neuronal death by excitotoxicity Glutamate serves as the primary excitatory neurotransmitter in the mammalian CNS. In physiological conditions, glutamate is mainly synthesized by neurons and released into the synaptic cleft. Activation of AMPA receptors (AMPAr) allows entry of sodium ions into the post-synaptic neuron, which is responsible for depolarization of the neuronal membrane. This leads to activation of NMDA receptors (NMDAr) that allow an entry of calcium ions into the post-synaptic neuron. Over-stimulation of glutamate receptors (AMPAr and NMDAr) leads to neuronal injury by excitotoxicity. In pathological conditions, regulation of glutamate release and uptake may be altered by HCoV-OC43 infection, which induces an overwhelming stress in infected neurons of the spinal cord that may lead to an increased synthesis/release of glutamate into the synaptic cleft, leading to high level of calcium influx and excitotoxicity.

where neurons could be damaged and die following excessive stimulation of glutamate on its specific receptors. In this model, virus infection of neurons is detected by macrophage/microglia, which produce high level of pro-inflammatory cytokines, which will in turn down-regulate the expression of the glutamate receptor GLT-1 on astrocytes, which is responsible for the uptake of glutamate. Therefore, these astrocytes will no longer be able to recapture the excess of glutamate and neuronal cells will undergo excitotoxicity and eventual degeneration and death.

Less work has been done in relation to the potential neurovirulence of the other coronaviruses that can infect humans. However, some very interesting and relevant data have been gathered on the underlying possible mechanisms related to the SARS-CoV. Following infection of the mouse CNS, SARS-CoV was detected in a large number of neurons in the cerebrum, thalamus and brain stem although the olfactory bulb and the cerebellum appeared relatively spared. Death of mice occurred before significant infiltration of immune cells in the CNS, suggesting that the rapid infection of neurons was the cause of death in the absence of encephalitis (McCray *et al.*, 2007). Moreover, it was shown only the year after that SARS-CoV could enter the brain via the olfactory bulb and that it was able to spread very fast by a transneuronal route to connected areas of the brain. Moreover, mice infected by SARS-CoV likely died from death or dysfunction of infected neurons in particular regions of the brain, including the cardiorespiratory centers of the medulla (Netland *et al*, 2008). This fact is of high interest as SARS-CoV can be neuroinvasive in humans and that in those cases, infected neurons undergo necrosis (Xu *et al.*, 2005).

9. CONCLUSION AND SIGNIFICANCE

The presence of coronaviruses in the human CNS is now a recognized fact. Indeed, they appear to be part of a viral flora of the brain, with potential neuropathological consequences in genetically susceptible individuals with or without additional environmental insults. Even though these respiratory pathogens could induce an acute encephalitis as established using a murine model, they may also be associated with the induction or exacerbation of other type of neurological diseases for which it is very hard to ascertain a role

to any given virus due to the difficulty of establishing the time point at which this virus becomes involved.

In that regard, the “new” Hill’s criterias elaborated by Giovannoni and collaborators may represent a highly relevant tool in order to evaluate the relevance of these recognized human respiratory pathogens as a factor which will influence the development or the exacerbation of a long-term human neurological disease potentially related to a viral infection. The examples of neurological diseases once described as degenerative and which are slow viral infections with long-term asymptomatic incubation periods related to different human viruses are potent indicators that it may be relevant to associate the recognized presence of human coronaviruses in the CNS with human neurological diseases. Therefore, more in-depth studies on neuroinvasive, neurotropic and potentially neurovirulent human coronaviruses are warranted in order to better understand how they influence the neural cell functions and eventual destiny in conjunction with genetic factors of the host.

References

- Alexander, T. J. 1962. Viral encephalomyelitis of swine in Ontario--experimental and natural transmission. *American Journal of Veterinary Research* 23:756-62.
- Alirezaei, M., W. B. Kiosses, C. T. Flynn, N. R. Brady, and H. S. Fox. 2008. Disruption of neuronal autophagy by infected microglia results in neurodegeneration. *PLoS ONE* 3 (8):e2906.
- Aloisi, F., B. Serafini, and L. Adorini. 2000. Glia-T cell dialogue. *Journal of Neuroimmunology* 107 (2):111-7.
- Andries, K., and M. B. Pensaert. 1980. Virus isolated and immunofluorescence in different organs of pigs infected with hemagglutinating encephalomyelitis virus. *American Journal of Veterinary Research* 41 (2):215-8.
- Arbour, N., G. Cote, C. Lachance, M. Tardieu, N. R. Cashman, and P. J. Talbot. 1999. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *Journal of Virology* 73 (4):3338-50.
- Arbour, N., R. Day, J. Newcombe, and P. J. Talbot. 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *Journal of Virology* 74 (19):8913-21.
- Arbour, N., S. Ekande, G. Cote, C. Lachance, F. Chagnon, M. Tardieu, N. R. Cashman, and P. J. Talbot. 1999. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. *Journal of Virology* 73 (4):3326-37.
- Argyris, E. G., E. Acheampong, F. Wang, J. Huang, K. Chen, M. Mukhtar, and H. Zhang. 2007. The interferon-induced expression of APOBEC3G in human blood-brain barrier exerts a potent intrinsic immunity to block HIV-1 entry to central nervous system. *Virology* 367 (2):440-51.
- Aurelian, L. 2005. HSV-induced apoptosis in herpes encephalitis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 289:79-111.
- Bailey, O. T., A. M. Pappenheimer, F. S. Cheever, and J. B. Daniels. 1949. A Murine Virus (Jhm) Causing Disseminated Encephalomyelitis with Extensive Destruction of Myelin : II. Pathology. *The Journal of experimental medicine* 90 (3):195-212.

- Barger, S. W., and A. D. Harmon. 1997. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 388 (6645):878-81.
- Barnett, E. M., and S. Perlman. 1993. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology* 194 (1):185-91.
- Bechill, J., Z. Chen, J. W. Brewer, and S. C. Baker. 2008. Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression. *Journal of Virology* 82 (9):4492-501.
- Bender, S. J., and S. R. Weiss. 2010. Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 5 (3):336-54.
- Berger, J. R., and G. Arendt. 2000. HIV dementia: the role of the basal ganglia and dopaminergic systems. *Journal of Psychopharmacology* 14 (3):214-21.
- Bilzer, T., and L. Stitz. 1996. Immunopathogenesis of virus diseases affecting the central nervous system. *Critical Reviews in Immunology* 16 (2):145-222.
- Blakely, P. K., B. K. Kleinschmidt-DeMasters, K. L. Tyler, and D. N. Irani. 2009. Disrupted glutamate transporter expression in the spinal cord with acute flaccid paralysis caused by West Nile virus infection. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68 (10):1061-72.
- Bonavia, A., N. Arbour, V. W. Yong, and P. J. Talbot. 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *Journal of Virology* 71 (1):800-6.
- Boucher, A., M. Desforges, P. Duquette, and P. J. Talbot. 2007. Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clinical Immunology* 123 (3):258-67.
- Brian, D. A., and R. S. Baric. 2005. Coronavirus genome structure and replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 287:1-30.

- Brison, E., H. Jacomy, M. Desforges, and P. J. Talbot. 2011. 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. *Submitted for publication at J. Virol.*
- Brown, M. A., J. L. Troyer, J. Pecon-Slattery, M. E. Roelke, and S. J. O'Brien. 2009. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerging Infectious Diseases* 15 (9):1445-52.
- Burks, J. S., B. L. DeVald, L. D. Jankovsky, and J. C. Gerdes. 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science* 209 (4459):933-4.
- Butler, N., L. Pewe, K. Trandem, and S. Perlman. 2006. Murine encephalitis caused by HCoV-OC43, a human coronavirus with broad species specificity, is partly immune-mediated. *Virology* 347 (2):410-21.
- Canto-Nogues, C., S. Sanchez-Ramon, S. Alvarez, C. Lacruz, and M. A. Munoz-Fernandez. 2005. HIV-1 infection of neurons might account for progressive HIV-1-associated encephalopathy in children. *Journal of molecular neuroscience : MN* 27 (1):79-89.
- Carmen, J., J. D. Rothstein, and D. A. Kerr. 2009. Tumor necrosis factor-alpha modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. *Brain Research* 1263:143-54.
- Cavanagh, D. 1995. The Coronavirus Surface Glycoprotein. In *The Coronaviridae*, edited by S. G. Siddell. 73-113. New York: Plenum Press.
- Cermelli, C., M. Vinceti, F. Beretti, V. Pietrini, G. Nacci, P. Pietrosemoli, A. Bartoletti, D. Guidetti, P. Sola, M. Bergomi, G. Vivoli, and M. Portolani. 2003. Risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with seropositivity for herpesviruses and echovirus-7. *European Journal of Epidemiology* 18 (2):123-7.
- Chan, C. M., S. K. Lau, P. C. Woo, H. Tse, B. J. Zheng, L. Chen, J. D. Huang, and K. Y. Yuen. 2009. Identification of major histocompatibility complex class I C molecule as an attachment factor that facilitates coronavirus HKU1 spike-mediated infection. *Journal of Virology* 83 (2):1026-35.

- Chan, C. P., K. L. Siu, K. T. Chin, K. Y. Yuen, B. Zheng, and D. Y. Jin. 2006. Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of Virology* 80 (18):9279-87.
- Cheever, F. S., J. B. Daniels, and *et al.* 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *The Journal of experimental medicine* 90 (3):181-210.
- Collins, A. R. 2002. In vitro detection of apoptosis in monocytes/macrophages infected with human coronavirus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9 (6):1392-5.
- Cook, S. D., and P. C. Dowling. 1980. Multiple sclerosis and viruses: an overview. *Neurology* 30 (7 Pt 2):80-91.
- Cowley, T. J., and S. R. Weiss. 2010. Murine coronavirus neuropathogenesis: determinants of virulence. *Journal of Neurovirology* 16 (6):427-34.
- Cristallo, A., F. Gambaro, G. Biamonti, P. Ferrante, M. Battaglia, and P. M. Cereda. 1997. Human coronavirus polyadenylated RNA sequences in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *The new microbiologica* 20 (2):105-14.
- Delmas, B., and H. Laude. 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *Journal of Virology* 64 (11):5367-75.
- Desforges, M., A. Liavonchanka, A. Mansouri, C. Sharon, H. Yu, Y. Chen, X. Chen, J. M. Rini, and P.J. Talbot 2011. The sialic acid-binding region of human coronavirus OC43 S protein is located in its N-terminus and is essential for infection. *Paper presented at the XIIth International Nidovirus symposium, Traverse City, USA.*
- Desforges, M., T. C. Milette, M. Gagnon, and P. J. Talbot. 2007. Activation of human monocytes after infection by human coronavirus 229E. *Virus Research* 130 (1-2):228-40.
- Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H. R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, R. A. Fouchier, A. Berger, A. M. Burguiere, J. Cinatl, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J. C. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Sturmer, S. Vieth, H. D. Klenk, A. D. Osterhaus, H. Schmitz, and H. W. Doerr. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England journal of medicine* 348 (20):1967-76.

- Edwards, J. A., F. Denis, and P. J. Talbot. 2000. Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. *Journal of Neuroimmunology* 108 (1-2):73-81.
- El-Sahly, H. M., R. L. Atmar, W. P. Glezen, and S. B. Greenberg. 2000. Spectrum of clinical illness in hospitalized patients with "common cold" virus infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 31 (1):96-100.
- Favreau, D. J., M. Desforges, J. R. St-Jean, and P. J. Talbot. 2009. 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* 395 (2):255-67.
- Favreau, D. J., M. Desforges, and P. J. Talbot. 2011. Human coronavirus-induced neuronal cell death is cyclophilinD-dependent and caspase-dispensable. *Submitted for publication at J. Virol.*
- Fazzini, E., J. Fleming, and S. Fahn. 1992. Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 7 (2):153-8.
- Foley, J. E., J. M. Lapointe, P. Koblik, A. Poland, and N. C. Pedersen. 1998. Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 12 (6):415-23.
- Foley, J. E., A. Poland, J. Carlson, and N. C. Pedersen. 1997. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210 (9):1307-12.
- Foley, J. E., C. Rand, and C. Leutenegger. 2003. Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 5 (6):313-22.
- Fouchier, R. A., T. Kuiken, M. Schutten, G. van Amerongen, G. J. van Doornum, B. G. van den Hoogen, M. Peiris, W. Lim, K. Stohr, and A. D. Osterhaus. 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423 (6937):240.

- Fredericks, D. N., and D. A. Relman. 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clinical Microbiology Reviews* 9 (1):18-33.
- Gagneur, A., J. Sizun, S. Vallet, M. C. Legr, B. Picard, and P. J. Talbot. 2002. Coronavirus-related nosocomial viral respiratory infections in a neonatal and paediatric intensive care unit: a prospective study. *The Journal of hospital infection* 51 (1):59-64.
- Germa, G., G. Campanini, F. Rovida, E. Percivalle, A. Sarasini, A. Marchi, and F. Baldanti. 2006. 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* 78 (7):938-49.
- Gilden, D. H. 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 4 (3):195-202.
- Giovannoni, G., G. R. Cutter, J. Lunemann, R. Martin, C. Munz, S. Sriram, I. Steiner, M. R. Hammerschlag, and C. A. Gaydos. 2006. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 5 (10):887-94.
- Golembewski, E. K., S. Q. Wales, L. Aurelian, and P. J. Yarowsky. 2007. The HSV-2 protein ICP10PK prevents neuronal apoptosis and loss of function in an in vivo model of neurodegeneration associated with glutamate excitotoxicity. *Experimental Neurology* 203 (2):381-93.
- Gonzalez-Scarano, F., and G. Baltuch. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience* 22:219-40.
- Gorbalenya, A. E., L. Enjuanes, J. Ziebuhr, and E. J. Snijder. 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Research* 117 (1):17-37.
- Greig, A. S., D. Mitchell, A. H. Corner, G. L. Bannister, E. B. Meads, and R. J. Julian. 1962. A Hemagglutinating Virus Producing Encephalomyelitis in Baby Pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 26 (3):49-56.
- Gruslin, E., S. Moisan, Y. St-Pierre, M. Desforges, and P. J. Talbot. 2005. Transcriptome profile within the mouse central nervous system and activation of myelin-reactive T cells following murine coronavirus infection. *Journal of Neuroimmunology* 162 (1-2):60-70.

- Gu, J., E. Gong, B. Zhang, J. Zheng, Z. Gao, Y. Zhong, W. Zou, J. Zhan, S. Wang, Z. Xie, H. Zhuang, B. Wu, H. Zhong, H. Shao, W. Fang, D. Gao, F. Pei, X. Li, Z. He, D. Xu, X. Shi, V. M. Anderson, and A. S. Leong. 2005. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *The Journal of experimental medicine* 202 (3):415-24.
- Gu, J., and C. Korteweg. 2007. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *The American journal of pathology* 170 (4):1136-47.
- Guo, Y., C. Korteweg, M. A. McNutt, and J. Gu. 2008. Pathogenetic mechanisms of severe acute respiratory syndrome. *Virus Research* 133 (1):4-12.
- Haeberlein, S. L. B., and S. A. Lipton. 2009. Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease. In *Encyclopedia of Neurosciences*, edited by A. J. Harmar, R. A. Hills and E. M. Rosser. 77-86: Elsevier.
- Hamre, D., and J. J. Procknow. 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 121 (1):190-3.
- Hankins, D. G., and J. A. Rosekrans. 2004. Overview, prevention, and treatment of rabies. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* 79 (5):671-6.
- Haughey, N. J., A. Nath, M. P. Mattson, J. T. Slevin, and J. D. Geiger. 2001. HIV-1 Tat through phosphorylation of NMDA receptors potentiates glutamate excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 78 (3):457-67.
- Hill, A. B. 1965. The Environment and Disease: Association or Causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 58:295-300.
- Hirano, N., R. Nomura, T. Tawara, and K. Tohyama. 2004. Neurotropism of swine haemagglutinating encephalomyelitis virus (coronavirus) in mice depending upon host age and route of infection. *Journal of Comparative Pathology* 130 (1):58-65.
- Hofmann, H., K. Pyrc, L. van der Hoek, M. Geier, B. Berkhout, and S. Pohlmann. 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (22):7988-93.

- Hogue, B.G., and C.E. Machamer. 2008. Coronavirus Structural Proteins and Virus Assembly. In *Nidoviruses*, edited by S. Perlman, T. Gallagher and E. J. Snijder. 179-200. Washington: ASM Press.
- Hosking, M. P., and T. E. Lane. 2010. The pathogenesis of murine coronavirus infection of the central nervous system. *Critical Reviews in Immunology* 30 (2):119-30.
- Houtman, J. J., and J. O. Fleming. 1996. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *Journal of Neurovirology* 2 (6):361-76.
- Hovanec, D. L., and T. D. Flanagan. 1983. Detection of antibodies to human coronaviruses 229E and OC43 in the sera of multiple sclerosis patients and normal subjects. *Infection and Immunity* 41 (1):426-9.
- Hovelmeyer, N., Z. Hao, K. Kranidioti, G. Kassiotis, T. Buch, F. Frommer, L. von Hoch, D. Kramer, L. Minichiello, G. Kollias, H. Lassmann, and A. Waisman. 2005. Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 175 (9):5875-84.
- Itzhaki, R. F., M. A. Wozniak, D. M. Appelt, and B. J. Balin. 2004. Infiltration of the brain by pathogens causes Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 25 (5):619-27.
- Jacomy, H., G. Fragoso, G. Almazan, W. E. Mushynski, and P. J. Talbot. 2006. Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. *Virology* 349 (2):335-46.
- Jacomy, H., J. R. St-Jean, E. Brison, G. Marceau, M. Desforges, and P. J. Talbot. 2010. Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. *Journal of Neurovirology* 16 (4):279-93.
- Jacomy, H., and P. J. Talbot. 2003. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* 315 (1):20-33.
- Jeffers, S. A., S. M. Tusell, L. Gillim-Ross, E. M. Hemmila, J. E. Achenbach, G. J. Babcock, W. D. Thomas, Jr., L. B. Thackray, M. D. Young, R. J. Mason, D. M. Ambrosino, D. E. Wentworth, J. C. Demartini, and K. V. Holmes. 2004. CD209L (L-SIGN) is a receptor for

- severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (44):15748-53.
- Johnson, R. T. 1985. Viral Aspects of Multiple Sclerosis. In *Handbook of Clinical Neurology Demyelinating Diseases*, edited by J. C. Koetsier. 319-36. Amsterdam: Elsevier.
- Johnston, S. L., P. K. Pattemore, G. Sanderson, S. Smith, F. Lampe, L. Josephs, P. Symington, S. O'Toole, S. H. Myint, D. A. Tyrrell, and *et al.* 1995. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 310 (6989):1225-9.
- Kakalacheva, K., C. Munz, and J. D. Lunemann. 2011. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812 (2):132-40.
- Kim, W. K., S. Corey, X. Alvarez, and K. Williams. 2003. Monocyte/macrophage traffic in HIV and SIV encephalitis. *Journal of Leukocyte Biology* 74 (5):650-6.
- Kipar, A., M. L. Meli, K. E. Baptiste, L. J. Bowker, and H. Lutz. 2010. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *The Journal of general virology* 91 (Pt 7):1698-707.
- Kline, K., R. Joseph, and D. A Jr Averill. 1994. Feline infectious peritonitis with neurological involvement : clinical and pathological findings in 24 cats. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.* 30:111-18.
- Koch, R. 1942. *The aetiology of tuberculosis (translation of Die Aetiologie der Tuberkulose (1882))* New York: Dover Publications.
- Krempl, C., B. Schultze, and G. Herrler. 1995. Analysis of cellular receptors for human coronavirus OC43. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 380:371-4.
- Kunkel, F., and G. Herrler. 1993. Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* 195 (1):195-202.
- Kurtzke, J. F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clinical Microbiology Reviews* 6 (4):382-427.
- Kuzmiski, J. B., and J. S. Bains. 2010. Metabotropic glutamate receptors: gatekeepers of homeostasis. *Journal of Neuroendocrinology* 22 (7):785-92.

- Lai, M. M., and D. Cavanagh. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research* 48:1-100.
- Lai, M. M., and K. V. Holmes. 2001. Coronaviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields virology*, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley and D. E. Griffin. 1163-1185. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lampert, P. W., J. K. Sims, and A. J. Kniazeff. 1973. Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies. *Acta Neuropathologica* 24 (1):76-85.
- Lassnig, C., C. M. Sanchez, M. Egerbacher, I. Walter, S. Majer, T. Kolbe, P. Pallares, L. Enjuanes, and M. Muller. 2005. Development of a transgenic mouse model susceptible to human coronavirus 229E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (23):8275-80.
- Lau, A., and M. Tymianski. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460 (2):525-42.
- Lau, K. K., W. C. Yu, C. M. Chu, S. T. Lau, B. Sheng, and K. Y. Yuen. 2004. Possible central nervous system infection by SARS coronavirus. *Emerging Infectious Diseases* 10 (2):342-4.
- Lavi, E., P. S. Fishman, M. K. Highkin, and S. R. Weiss. 1988. Limbic encephalitis after inhalation of a murine coronavirus. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 58 (1):31-6.
- Legendre, A. M., and D. L. Whitenack. 1975. Feline infectious peritonitis with spinal cord involvement in two cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 167 (10):31-2.
- Li, J., J. Gao, Y. P. Xu, T. L. Zhou, Y. Y. Jin, and J. N. Lou. 2007. [Expression of severe acute respiratory syndrome coronavirus receptors, ACE2 and CD209L in different organ derived microvascular endothelial cells]. *Zhonghua yi xue za zhi* 87 (12):833-7.
- Li, W., M. J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S. K. Wong, M. A. Berne, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, T. C. Greenough, H. Choe, and M. Farzan. 2003. Angiotensin-

converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426 (6965):450-4.

Li, W., Z. Shi, M. Yu, W. Ren, C. Smith, J. H. Epstein, H. Wang, G. Crameri, Z. Hu, H. Zhang, J. Zhang, J. McEachern, H. Field, P. Daszak, B. T. Eaton, S. Zhang, and L. F. Wang. 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310 (5748):676-9.

Lindholm, D., H. Wootz, and L. Korhonen. 2006. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation* 13 (3):385-92.

Liu, D. X., Q. Yuan, and Y. Liao. 2007. Coronavirus envelope protein: a small membrane protein with multiple functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64 (16):2043-8.

Mackenzie, J. S., D. J. Gubler, and L. R. Petersen. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Medicine* 10 (12 Suppl):S98-109.

Macneughton, M. R., and H. A. Davies. 1978. Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. *The Journal of general virology* 39 (3):545-9.

Mark, L. P., R. W. Prost, J. L. Ulmer, M. M. Smith, D. L. Daniels, J. M. Strottmann, W. D. Brown, and L. Hacein-Bey. 2001. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR. American journal of neuroradiology* 22 (10):1813-24.

Masliah, E., N. Ge, and L. Mucke. 1996. Pathogenesis of HIV-1 associated neurodegeneration. *Critical Reviews in Neurobiology* 10 (1):57-67.

Mattson, M. P., N. J. Haughey, and A. Nath. 2005. Cell death in HIV dementia. *Cell Death and Differentiation* 12 Suppl 1:893-904.

McCray, P. B., Jr., L. Pewe, C. Wohlford-Lenane, M. Hickey, L. Manzel, L. Shi, J. Netland, H. P. Jia, C. Halabi, C. D. Sigmund, D. K. Meyerholz, P. Kirby, D. C. Look, and S. Perlman. 2007. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology* 81 (2):813-21.

- McIntosh, K., W. B. Becker, and R. M. Chanock. 1967. Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58 (6):2268-73.
- McLarnon, J. G., M. Michikawa, and S. U. Kim. 1993. Effects of tumor necrosis factor on inward potassium current and cell morphology in cultured human oligodendrocytes. *Glia* 9 (2):120-6.
- Meli, M., A. Kipar, C. Muller, K. Jenal, E. Gonczi, N. Borel, D. Gunn-Moore, S. Chalmers, F. Lin, M. Reinacher, and H. Lutz. 2004. High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6 (2):69-81.
- Miller, S. D., C. L. Vanderlugt, W. S. Begolka, W. Pao, K. L. Neville, R. L. Yauch, and B. S. Kim. 1997. Epitope spreading leads to myelin-specific autoimmune responses in SJL mice chronically infected with Theiler's virus. *Journal of Neurovirology* 3 Suppl 1:S62-5.
- Mishra, M. K., P. Koli, S. Bhowmick, and A. Basu. 2007. Neuroprotection conferred by astrocytes is insufficient to protect animals from succumbing to Japanese encephalitis. *Neurochemistry International* 50 (5):764-73.
- Miura, T. A., and K. V. Holmes. 2009. Host-pathogen interactions during coronavirus infection of primary alveolar epithelial cells. *Journal of Leukocyte Biology* 86 (5):1145-51.
- Myint, S. H. 1995. Human Coronavirus Infections. In *The Coronaviridae*, edited by S. G. Siddell. 389-401. New York: Plenum Press.
- Narayanan, K., C. Huang, and S. Makino. 2008. Coronavirus Accessory Proteins. In *Nidoviruses*, edited by S. Perlman, T. Gallagher and E. J. Snijder. Washington, DC: ASM Press.
- Nath, A., and J. Berger. 2004. HIV Dementia. *Current Treatment Options in Neurology* 6 (2):139-151.
- Nelson, P. T., L. A. Soma, and E. Lavi. 2002. Microglia in diseases of the central nervous system. *Annals of Medicine* 34 (7-8):491-500.

- Netland, J., D. K. Meyerholz, S. Moore, M. Cassell, and S. Perlman. 2008. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *Journal of Virology* 82 (15):7264-75.
- Nicholls, J. , J. S. M. Peiris, and S. Perlman. 2008. Severe Acute Respiratory Syndrome: Epidemiology, Pathogenesis, and Animal Models. In *Nidoviruses*, edited by S. Perlman, T. Gallagher and E. J. Snijder. 299-311. Washington, DC: ASM Press.
- Nicholls, J. M., J. Butany, L. L. Poon, K. H. Chan, S. L. Beh, S. Poutanen, J. S. Peiris, and M. Wong. 2006. Time course and cellular localization of SARS-CoV nucleoprotein and RNA in lungs from fatal cases of SARS. *PLoS Medicine* 3 (2):e27.
- Nicholson, K. G., J. Kent, and D. C. Ireland. 1993. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 307 (6910):982-6.
- Olanow, C. W., and W. G. Tatton. 1999. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience* 22:123-44.
- Olney, J. W. 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164 (880):719-21.
- Paschen, W. 2003. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium* 34 (4-5):365-83.
- Patterson, S., and M. R. Macnaughton. 1982. Replication of human respiratory coronavirus strain 229E in human macrophages. *The Journal of general virology* 60 (Pt 2):307-14.
- Pearson, J., and C. A. Mims. 1985. Differential susceptibility of cultured neural cells to the human coronavirus OC43. *Journal of Virology* 53 (3):1016-9.
- Pedersen, N. C., and J. F. Boyle. 1980. Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. *American Journal of Veterinary Research* 41 (6):868-76.
- Pleasure, S. J., C. Page, and V. M. Lee. 1992. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12 (5):1802-15.

- Poland, A. M., H. Vennema, J. E. Foley, and N. C. Pedersen. 1996. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (12):3180-4.
- Raivich, G., and R. Banati. 2004. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Research. Brain Research Reviews* 46 (3):261-81.
- Reuter, J. D., D. L. Gomez, J. H. Wilson, and A. N. Van Den Pol. 2004. Systemic immune deficiency necessary for cytomegalovirus invasion of the mature brain. *Journal of Virology* 78 (3):1473-87.
- Rima, B. K., and W. P. Duprex. 2005. Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Research* 111 (2):132-47.
- Roberts, M. T. 2005. AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy : current management strategies. *CNS Drugs* 19 (8):671-82.
- Ron, D., and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (7):519-29.
- Rottier, P. J. 1990. Background paper. Coronavirus M and HE: two peculiar glycoproteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 276:91-4.
- Rottier, P. J., K. Nakamura, P. Schellen, H. Volders, and B. J. Hajema. 2005. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *Journal of Virology* 79 (22):14122-30.
- Salmi, A., B. Ziola, T. Hovi, and M. Reunanan. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* 32 (3):292-5.
- Sandhu, J. K., S. Pandey, M. Ribecco-Lutkiewicz, R. Monette, H. Borowy-Borowski, P. R. Walker, and M. Sikorska. 2003. Molecular mechanisms of glutamate neurotoxicity in mixed cultures of NT2-derived neurons and astrocytes: protective effects of coenzyme Q10. *Journal of Neuroscience Research* 72 (6):691-703.

- Severance, E. G., F. B. Dickerson, R. P. Viscidi, I. Bossis, C. R. Stallings, A. E. Origoni, A. Sullens, and R. H. Yolken. 2011. Coronavirus immunoreactivity in individuals with a recent onset of psychotic symptoms. *Schizophrenia Bulletin* 37 (1):101-7.
- Sibley, W. A., C. R. Bamford, and K. Clark. 1985. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1 (8441):1313-5.
- Siddell, S. G., R. Anderson, D. Cavanagh, K. Fujiwara, H. D. Klenk, M. R. Macnaughton, M. Pensaert, S. A. Stohlman, L. Sturman, and B. A. van der Zeijst. 1983. Coronaviridae. *Intervirology* 20 (4):181-9.
- Siddell, S. G., and E. J. Snijder. 2008. An Introduction to Nidoviruses. In *Nidoviruses*, edited by S. Perlman, T. Gallagher and E. J. Snijder. 1-14. Washington: ASM Press.
- Sizun, J., D. Soupre, J. D. Giroux, D. Alix, Parscau De, M. C. Legrand, M. Demazure, and C. Chastel. 1993. Nasal colonization with coronavirus and apnea of the premature newborn. *Acta Paediatrica* 82 (3):238.
- Slauson, D. O., and J. P. Finn. 1972. Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 160 (5):729-34.
- Spiegel, M., K. Schneider, F. Weber, M. Weidmann, and F. T. Hufert. 2006. Interaction of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus with dendritic cells. *The Journal of general virology* 87 (Pt 7):1953-60.
- Sriram, S., and M. Rodriguez. 1997. Indictment of the microglia as the villain in multiple sclerosis. *Neurology* 48 (2):464-70.
- St-Jean, J. R., H. Jacomy, M. Desforges, A. Vabret, F. Freymuth, and P. J. Talbot. 2004. Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. *Journal of Virology* 78 (16):8824-34.
- Sweet, T. M., L. Del Valle, and K. Khalili. 2002. Molecular biology and immunoregulation of human neurotropic JC virus in CNS. *Journal of Cellular Physiology* 191 (3):249-56.
- Takahashi, M., and T. Yamada. 1999. Viral etiology for Parkinson's disease--a possible role of influenza A virus infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 52 (3):89-98.

- Talbot, P. J., D. Arnold, and J. P. Antel. 2001. Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 253:247-71.
- Talbot, P. J., H. Jacomy, and M. Desforges. 2008. Pathogenesis of Human Coronaviruses other than Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. In *Nidoviruses*, edited by S. Perlman, T. Gallagher and E. J. Snijder. 313-324. Washington, DC: ASM Press.
- Talbot, P. J., J. S. Paquette, C. Ciurli, J. P. Antel, and F. Ouellet. 1996. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 39 (2):233-40.
- Tanaka, R., Y. Iwasaki, and H. Koprowski. 1976. Intracisternal virus-like particles in brain of a multiple sclerosis patient. *Journal of the Neurological Sciences* 28 (1):121-6.
- Tseng, C. T., C. Huang, P. Newman, N. Wang, K. Narayanan, D. M. Watts, S. Makino, M. M. Packard, S. R. Zaki, T. S. Chan, and C. J. Peters. 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. *Journal of Virology* 81 (3):1162-73.
- Tsui, J. K., D. B. Calne, Y. Wang, M. Schulzer, and S. A. Marion. 1999. Occupational risk factors in Parkinson's disease. *Canadian journal of public health. Revue canadienne de sante publique* 90 (5):334-7.
- Tyrrell, D. A., and M. L. Bynoe. 1965. Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. *British Medical Journal* 1 (5448):1467-70.
- Vabret, A., J. Dina, E. Brison, J. Brouard, and F. Freymuth. 2009. [Human coronaviruses]. *Pathologie-Biologie* 57 (2):149-60.
- van der Hoek, L., K. Pyrc, M. F. Jebbink, W. Vermeulen-Oost, R. J. Berkhout, K. C. Wolthers, P. M. Wertheim-van Dillen, J. Kaandorp, J. Spaargaren, and B. Berkhout. 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine* 10 (4):368-73.
- Vennema, H., A. Poland, J. Foley, and N. C. Pedersen. 1998. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 243 (1):150-7.

- Waltrip, R. W., 2nd, R. W. Buchanan, A. Summerfelt, A. Breier, W. T. Carpenter, Jr., N. L. Bryant, S. A. Rubin, and K. M. Carbone. 1995. Borna disease virus and schizophrenia. *Psychiatry Research* 56 (1):33-44.
- Wang, F. I., S. A. Stohlman, and J. O. Fleming. 1990. Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated. *Journal of Neuroimmunology* 30 (1):31-41.
- Watkins, J. C., and D. E. Jane. 2006. The glutamate story. *British Journal of Pharmacology* 147 Suppl 1:S100-8.
- Weiner, L. P. 1973. Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis. *Archives of Neurology* 28 (5):298-303.
- Weissert, R. 2011. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Journal of Neuroimmunology* 231 (1-2):73-7.
- Wentworth, D. E., D. B. Tresnan, B. C. Turner, I. R. Lerman, B. Bullis, E. M. Hemmila, R. Levis, L. H. Shapiro, and K. V. Holmes. 2005. Cells of human aminopeptidase N (CD13) transgenic mice are infected by human coronavirus-229E in vitro, but not in vivo. *Virology* 335 (2):185-97.
- Whitley, R. J., and J. W. Gnann. 2002. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet* 359 (9305):507-13.
- Woo, P. C., S. K. Lau, C. M. Chu, K. H. Chan, H. W. Tsoi, Y. Huang, B. H. Wong, R. W. Poon, J. J. Cai, W. K. Luk, L. L. Poon, S. S. Wong, Y. Guan, J. S. Peiris, and K. Y. Yuen. 2005a. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of Virology* 79 (2):884-95.
- Woo, P. C., S. K. Lau, H. W. Tsoi, Y. Huang, R. W. Poon, C. M. Chu, R. A. Lee, W. K. Luk, G. K. Wong, B. H. Wong, V. C. Cheng, B. S. Tang, A. K. Wu, R. W. Yung, H. Chen, Y. Guan, K. H. Chan, and K. Y. Yuen. 2005b. Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *The Journal of infectious diseases* 192 (11):1898-907.
- Xu, J., S. Zhong, J. Liu, L. Li, Y. Li, X. Wu, Z. Li, P. Deng, J. Zhang, N. Zhong, Y. Ding, and Y. Jiang. 2005. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the

brain: potential role of the chemokine mig in pathogenesis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 41 (8):1089-96.

Yagami, K., K. Hirai, and N. Hirano. 1986. Pathogenesis of haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) in mice experimentally infected by different routes. *Journal of Comparative Pathology* 96 (6):645-57.

Yeager, C. L., R. A. Ashmun, R. K. Williams, C. B. Cardellicchio, L. H. Shapiro, A. T. Look, and K. V. Holmes. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357 (6377):420-2.

Yeh, E. A., A. Collins, M. E. Cohen, P. K. Duffner, and H. Faden. 2004. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* 113 (1 Pt 1):e73-6.

Yilla, M., B. H. Harcourt, C. J. Hickman, M. McGrew, A. Tamin, C. S. Goldsmith, W. J. Bellini, and L. J. Anderson. 2005. SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages. *Virus Research* 107 (1):93-101.

Young, V. A., and G. F. Rall. 2009. Making it to the synapse: measles virus spread in and among neurons. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 330:3-30.

Zhang, K., G. A. McQuibban, C. Silva, G. S. Butler, J. B. Johnston, J. Holden, I. Clark-Lewis, C. M. Overall, and C. Power. 2003. HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nature Neuroscience* 6 (10):1064-71.

RÉFÉRENCES

- Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E.**, 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41-53.
- Adami, C., Pooley, J., Glomb, J., Stecker, E., Fazal, F., Fleming, J.O., Baker, S.C.**, 1995. Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection: quasispecies nature of the persisting MHV RNA. *Virology* **209**, 337-346.
- Agol, V.I., Belov, G.A., Bienz, K., Egger, D., Kolesnikova, M.S., Raikhlin, N.T., Romanova, L.I., Smirnova, E.A., Tolskaya, E.A.**, 1998. Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology* **252**, 343-353.
- Agol, V.I., Belov, G.A., Bienz, K., Egger, D., Kolesnikova, M.S., Romanova, L.I., Sladkova, L.V., Tolskaya, E.A.**, 2000. Competing death programs in poliovirus-infected cells: commitment switch in the middle of the infectious cycle. *J. Virol.* **74**, 5534-5541.
- Agrawal, A.A.**, 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* **294**, 321-326.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T.**, 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**, 675-680.
- Alano, C.C., Garnier, P., Ying, W., Higashi, Y., Kauppinen, T.M., Swanson, R.A.**, 2010. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *J. Neurosci.* **30**, 2967-2978.
- Allen, I.V., McQuaid, S., McMahon, J., Kirk, J., McConnell, R.**, 1996. The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 471-480.
- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L.**, 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* **78**, 12683-12688.
- Almeida, J.D., Tyrrell, D.A.**, 1967. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J. Gen. Virol.* **1**, 175-178.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J.**, 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.
- Anderson, J.R.**, 2001. The mechanisms of direct, virus-induced destruction of neurons. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **253**, 15-33.

- Arbour, N., Cote, G., Lachance, C., Tardieu, M., Cashman, N.R., Talbot, P.J.**, 1999a. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *J. Virol.* **73**, 3338-3350.
- Arbour, N., Day, R., Newcombe, J., Talbot, P.J.**, 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J. Virol.* **74**, 8913-8921.
- Arbour, N., Ekande, S., Cote, G., Lachance, C., Chagnon, F., Tardieu, M., Cashman, N.R., Talbot, P.J.**, 1999b. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. *J. Virol.* **73**, 3326-3337.
- Argon, Y., Simen, B.B.**, 1999. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 495-505.
- Azzolin, L., von Stockum, S., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M.A., Bernardi, P.**, 2010. The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS letters* **584**, 2504-2509.
- Bailey, O.T., Pappenheimer, A.M., Cheever, F.S., Daniels, J.B.**, 1949. A Murine Virus (JHM) Causing Disseminated Encephalomyelitis with Extensive Destruction of Myelin : Ii. Pathology. *J. Exp. Med.* **90**, 195-212.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Robbins, J., Molkentin, J.D.**, 2005. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658-662.
- Baric, R.S., Nelson, G.W., Fleming, J.O., Deans, R.J., Keck, J.G., Casteel, N., Stohlman, S.A.**, 1988. Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. *J. Virol.* **62**, 4280-4287.
- Bartlett, J.D., Luethy, J.D., Carlson, S.G., Sollott, S.J., Holbrook, N.J.**, 1992. Calcium ionophore A23187 induces expression of the growth arrest and DNA damage inducible CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, gadd153. Ca²⁺ increases transcriptional activity and mRNA stability. *J. Biol. Chem.* **267**, 20465-20470.
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A., Bernardi, P.**, 2005. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* **280**, 18558-18561.

- Baumann, N., Pham-Dinh, D.**, 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* **81**, 871-927.
- Bechill, J., Chen, Z., Brewer, J.W., Baker, S.C.**, 2008. Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression. *J. Virol.* **82**, 4492-4501.
- Belzacq, A.S., Vieira, H.L., Verrier, F., Vandecasteele, G., Cohen, I., Prevost, M.C., Larquet, E., Pariselli, F., Petit, P.X., Kahn, A., Rizzuto, R., Brenner, C., Kroemer, G.**, 2003. Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Res.* **63**, 541-546.
- Bender, S.J., Weiss, S.R.**, 2010. Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **5**, 336-354.
- Berger, J.R.**, 2007. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **7**, 461-469.
- Berger, J.R., Pall, L., Lanska, D., Whiteman, M.**, 1998. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with HIV infection. *J. Neurovirol.* **4**, 59-68.
- Bergmann, C.C., Yao, Q., Lin, M., Stohlman, S.A.**, 1996. The JHM strain of mouse hepatitis virus induces a spike protein-specific Db-restricted cytotoxic T cell response. *J. Gen. Virol.* **77 (Pt 2)**, 315-325.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D.**, 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 326-332.
- Bi, W., Pinon, J.D., Hughes, S., Bonilla, P.J., Holmes, K.V., Weiss, S.R., Leibowitz, J.L.**, 1998. Localization of mouse hepatitis virus open reading frame 1A derived proteins. *J. Neurovirol.* **4**, 594-605.
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., Freedman, L.S.**, 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* **38**, 3751-3757.
- Birks, S.M., Danquah, J.O., King, L., Vlasak, R., Gorecki, D.C., Pilkington, G.J.**, 2011. Targeting the GD3 acetylation pathway selectively induces apoptosis in glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **13**, 950-960.

- Blakemore, W.F., Welsh, C.J., Tonks, P., Nash, A.A.,** 1988. Observations on demyelinating lesions induced by Theiler's virus in CBA mice. *Acta Neuropathol.* **76**, 581-589.
- Blau, D.M., Holmes, K.V.,** 2001. Human coronavirus HCoV-229E enters susceptible cells via the endocytic pathway. *Adv. Exp. Med. Biol.* **494**, 193-198.
- Boehning, D., Patterson, R.L., Sedaghat, L., Glebova, N.O., Kurosaki, T., Snyder, S.H.,** 2003. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1051-1061.
- Boehning, D., Patterson, R.L., Snyder, S.H.,** 2004. Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Cell Cycle* **3**, 252-254.
- Bofill-Mas, S., Girones, R.,** 2001. Excretion and transmission of JCV in human populations. *J. Neurovirol.* **7**, 345-349.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., Wallach, D.,** 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 7795-7798.
- Bonavia, A., Arbour, N., Yong, V.W., Talbot, P.J.,** 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *J. Virol.* **71**, 800-806.
- Boots, M., Sasaki, A.,** 1999. 'Small worlds' and the evolution of virulence: infection occurs locally and at a distance. *Proc. Biol. Sci.* **266**, 1933-1938.
- Bos, E.C., Heijnen, L., Luytjes, W., Spaan, W.J.,** 1995. Mutational analysis of the murine coronavirus spike protein: effect on cell-to-cell fusion. *Virology* **214**, 453-463.
- Bosch, B.J., van der Zee, R., de Haan, C.A., Rottier, P.J.,** 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* **77**, 8801-8811.
- Bost, A.G., Carnahan, R.H., Lu, X.T., Denison, M.R.,** 2000. Four proteins processed from the replicase gene polyprotein of mouse hepatitis virus colocalize in the cell periphery and adjacent to sites of virion assembly. *J. Virol.* **74**, 3379-3387.
- Boucher, A., Desforges, M., Duquette, P., Talbot, P.J.,** 2007. Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol.* **123**, 258-267.

- Bravarenko, N.I., Onufriev, M.V., Stepanichev, M.Y., Ierusalimsky, V.N., Balaban, P.M., Gulyaeva, N.V.**, 2006. Caspase-like activity is essential for long-term synaptic plasticity in the terrestrial snail *Helix*. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 129-140.
- Brenner, C., Grimm, S.**, 2006. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* **25**, 4744-4756.
- Breslin, J.J., Mork, I., Smith, M.K., Vogel, L.K., Hemmila, E.M., Bonavia, A., Talbot, P.J., Sjostrom, H., Noren, O., Holmes, K.V.**, 2003. Human coronavirus 229E: receptor binding domain and neutralization by soluble receptor at 37 degrees C. *J. Virol.* **77**, 4435-4438.
- Brison, E., Jacomy, H., Desforges, M., Talbot, P.J.**, 2011. 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. *J. Virol.* **85**, 12464-12473.
- Britton, P., Cavanagh, D.**, 2008. Nidovirus genome organization and expression mechanisms, in: Perlman, S., Gallagher, T., Snijder, E.J. (Eds.), *Nidoviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 29-46.
- Brodal, P.**, 2010. *The Central Nervous System : Structure and function*. Oxford University Press, New York.
- Bruhat, A., Jousse, C., Wang, X.Z., Ron, D., Ferrara, M., Fafournoux, P.**, 1997. Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* **272**, 17588-17593.
- Burks, J.S., DeVald, B.L., Jankovsky, L.D., Gerdes, J.C.**, 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science* **209**, 933-934.
- Butler, N., Pewe, L., Trandem, K., Perlman, S.**, 2006. Murine encephalitis caused by HCoV-OC43, a human coronavirus with broad species specificity, is partly immune-mediated. *Virology* **347**, 410-421.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D.**, 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96.

- Campbell, I.L., Buchmeier, M.J.**, 2001. Introduction. In *Advances in Virus Research*, Michael, J.B. et Iain, L.C., eds (Academic Press), pp., xiii-xiv.
- Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J.M., Kroemer, G.**, 2004. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* **23**, 1514-1521.
- Castro, R.F., Perlman, S.**, 1995. CD8+ T-cell epitopes within the surface glycoprotein of a neurotropic coronavirus and correlation with pathogenicity. *J. Virol.* **69**, 8127-8131.
- Ceccaldi, P.E., Fillion, M.P., Ermine, A., Tsiang, H., Fillion, G.**, 1993. Rabies virus selectively alters 5-HT1 receptor subtypes in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **245**, 129-138.
- Ceccaldi, P.E., Valtorta, F., Braud, S., Hellio, R., Tsiang, H.**, 1997. Alteration of the actin-based cytoskeleton by rabies virus. *J. Gen. Virol.* **78** (Pt 11), 2831-2835.
- Chakrabarty, A., Danley, M.M., LeVine, S.M.**, 2004. Immunohistochemical localization of phosphorylated protein kinase R and phosphorylated eukaryotic initiation factor-2 alpha in the central nervous system of SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **76**, 822-833.
- Chakrabarty, A., Fleming, K.K., Marquis, J.G., LeVine, S.M.**, 2005. Quantifying immunohistochemical staining of phospho-eIF2alpha, heme oxygenase-2 and NADPH cytochrome P450 reductase in oligodendrocytes during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Methods* **144**, 227-234.
- Chan, C.P., Siu, K.L., Chin, K.T., Yuen, K.Y., Zheng, B., Jin, D.Y.**, 2006. Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J. Virol.* **80**, 9279-9287.
- Chan, S.L., Fu, W., Zhang, P., Cheng, A., Lee, J., Kokame, K., Mattson, M.P.**, 2004. Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 28733-28743.
- Chang, H.W., Watson, J.C., Jacobs, B.L.**, 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4825-4829.
- Chauvier, D., Ankri, S., Charriaut-Marlangue, C., Casimir, R., Jacotot, E.**, 2007. Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ.* **14**, 387-391.

- Cheever, F.S., Daniels, J.B., et al.**, 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *J. Exp. Med.* **90**, 181-210.
- Cheng, J., Nath, A., Knudsen, B., Hochman, S., Geiger, J.D., Ma, M., Magnuson, D.S.**, 1998. Neuronal excitatory properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Neuroscience* **82**, 97-106.
- Chesters, P.M., Heritage, J., McCance, D.J.**, 1983. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J. Infect. Dis.* **147**, 676-684.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M.**, 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.
- Chipuk, J.E., Green, D.R.**, 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 268-275.
- Chu, V.C., McElroy, L.J., Chu, V., Bauman, B.E., Whittaker, G.R.**, 2006. The avian coronavirus infectious bronchitis virus undergoes direct low-pH-dependent fusion activation during entry into host cells. *J. Virol.* **80**, 3180-3188.
- Clarke, P., Tyler, K.L.**, 2003. Reovirus-induced apoptosis: A minireview. *Apoptosis* **8**, 141-150.
- Collins, A.R.**, 2002. In vitro detection of apoptosis in monocytes/macrophages infected with human coronavirus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 1392-1395.
- Collins, A.R., Knobler, R.L., Powell, H., Buchmeier, M.J.**, 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* **119**, 358-371.
- Connolly, J.L., Barton, E.S., Dermody, T.S.**, 2001. Reovirus binding to cell surface sialic acid potentiates virus-induced apoptosis. *J. Virol.* **75**, 4029-4039.
- Connor, J.H., Weiser, D.C., Li, S., Hallenbeck, J.M., Shenolikar, S.**, 2001. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6841-6850.
- Cristallo, A., Gambaro, F., Biamonti, G., Ferrante, P., Battaglia, M., Cereda, P.M.**, 1997. Human coronavirus polyadenylated RNA sequences in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *New Microbiol.* **20**, 105-114.

- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G., Way, M.**, 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* **378**, 636-638.
- Curran, J.E., Jowett, J.B., Elliott, K.S., Gao, Y., Gluschenko, K., Wang, J., Abel Azim, D.M., Cai, G., Mahaney, M.C., Comuzzi, A.G., Dyer, T.D., Walder, K.R., Zimmet, P., MacCluer, J.W., Collier, G.R., Kisseebah, A.H., Blangero, J.**, 2005. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat. Genet.* **37**, 1234-1241.
- Dales, S.**, 1995. Factors controlling coronavirus infections and disease of the central nervous system. A review. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**, 13-22.
- Dalziel, R.G., Lampert, P.W., Talbot, P.J., Buchmeier, M.J.**, 1986. Site-specific alteration of murine hepatitis virus type 4 peplomer glycoprotein E2 results in reduced neurovirulence. *J. Virol.* **59**, 463-471.
- Daniel, C., Anderson, R., Buchmeier, M.J., Fleming, J.O., Spaan, W.J., Wege, H., Talbot, P.J.**, 1993. Identification of an immunodominant linear neutralization domain on the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein and evidence that it forms part of complex tridimensional structure. *J. Virol.* **67**, 1185-1194.
- Darwin, C.**, 1859. *The Origins of species*. Murray J., London.
- Das Sarma, J., Fu, L., Tsai, J.C., Weiss, S.R., Lavi, E.**, 2000. Demyelination determinants map to the spike glycoprotein gene of coronavirus mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **74**, 9206-9213.
- Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., Kroemer, G.**, 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* **14**, 729-739.
- Davies, H.A., Macnaughton, M.R.**, 1979. Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Arch. Virol.* **59**, 25-33.
- De Benedetti, A., Baglioni, C.**, 1983. Phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha, binding of mRNA to 48 S complexes, and its reutilization in initiation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **258**, 14556-14562.

- de Haan, C.A., Li, Z., te Lintel, E., Bosch, B.J., Hajema, B.J., Rottier, P.J.,** 2005. Murine coronavirus with an extended host range uses heparan sulfate as an entry receptor. *J. Virol.* **79**, 14451-14456.
- de Haan, C.A., Masters, P.S., Shen, X., Weiss, S., Rottier, P.J.,** 2002a. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* **296**, 177-189.
- de Haan, C.A., Rottier, P.J.,** 2005. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **64**, 165-230.
- de Haan, C.A., Smeets, M., Vernooij, F., Vennema, H., Rottier, P.J.,** 1999. Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *J. Virol.* **73**, 7441-7452.
- de Haan, C.A., Volders, H., Koetzner, C.A., Masters, P.S., Rottier, P.J.,** 2002b. Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *J. Virol.* **76**, 12491-12502.
- de la Torre, J.C., Martinez-Salas, E., Diez, J., Villaverde, A., Gebauer, F., Rocha, E., Davila, M., Domingo, E.,** 1988. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* **62**, 2050-2058.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjostrom, H., Noren, O., Laude, H.,** 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**, 417-420.
- Demuro, A., Mina, E., Kayed, R., Milton, S.C., Parker, I., Glabe, C.G.,** 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* **280**, 17294-17300.
- den Boon, J.A., Kleijnen, M.F., Spaan, W.J., Snijder, E.J.,** 1996. Equine arteritis virus subgenomic mRNA synthesis: analysis of leader-body junctions and replicative-form RNAs. *J. Virol.* **70**, 4291-4298.
- Denison, M.R., Spaan, W.J., van der Meer, Y., Gibson, C.A., Sims, A.C., Prentice, E., Lu, X.T.,** 1999. The putative helicase of the coronavirus mouse hepatitis virus is processed from the replicase gene polyprotein and localizes in complexes that are active in viral RNA synthesis. *J. Virol.* **73**, 6862-6871.

- Desforges, M., Despars, G., Berard, S., Gosselin, M., McKenzie, M.O., Lyles, D.S., Talbot, P.J., Poliquin, L.**, 2002. Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* **295**, 63-73.
- Desforges, M., Milette, T.C., Gagnon, M., Talbot, P.J.**, 2007. Activation of human monocytes after infection by human coronavirus 229E. *Virus Res.* **130**, 228-240.
- Desjardins, J.**, 2011. Rôle des protéines accessoires du coronavirus humain OC43, Maîtrise en virologie et immunologie. INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, p. 128.
- Dewson, G., Kluck, R.M.**, 2009. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J. Cell Sci.* **122**, 2801-2808.
- Dillon, C., Goda, Y.**, 2005. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu. Rev. Neurosci.* **28**, 25-55.
- Dobson, C.M.**, 2004. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 3-16.
- Doms, R.W., Lamb, R.A., Rose, J.K., Helenius, A.**, 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**, 545-562.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W.**, 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1967-1976.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X.**, 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Dveksler, G.S., Pensiero, M.N., Cardellicchio, C.B., Williams, R.K., Jiang, G.S., Holmes, K.V., Dieffenbach, C.W.**, 1991. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* **65**, 6881-6891.

- Edwards, J.A., Denis, F., Talbot, P.J.**, 2000. Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. *J. Neuroimmunol.* **108**, 73-81.
- Eleouet, J.F., Slee, E.A., Saurini, F., Castagne, N., Poncet, D., Garrido, C., Solary, E., Martin, S.J.**, 2000. The viral nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) is cleaved by caspase-6 and -7 during TGEV-induced apoptosis. *J. Virol.* **74**, 3975-3983.
- Enjuanes, L.**, 2005. *Coronavirus replication and reverse genetics*. Springer-Verlag, New York.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuniga, S., Alvarez, E., Reguera, J., Capiscol, C.**, 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication. *Adv. Exp. Med. Biol.* **581**, 13-24.
- Esolen, L.M., Ward, B.J., Moench, T.R., Griffin, D.E.**, 1993. Infection of monocytes during measles. *J. Infect. Dis.* **168**, 47-52.
- Fang, X., Ye, L., Timani, K.A., Li, S., Zen, Y., Zhao, M., Zheng, H., Wu, Z.**, 2005. Peptide domain involved in the interaction between membrane protein and nucleocapsid protein of SARS-associated coronavirus. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 381-385.
- Favoreel, H.W., Van Minnebruggen, G., Adriaensen, D., Nauwynck, H.J.**, 2005. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8990-8995.
- Favreau, D.J., Desforges, M., St-Jean, J.R., Talbot, P.J.**, 2009. 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* **395**, 255-267.
- Favreau, D.J., Meessen-Pinard, M., Desforges, M., Talbot, P.J.**, 2012. Human coronavirus-induced neuronal programmed cell death is cyclophilin d dependent and potentially caspase dispensable. *J. Virol.* **86**, 81-93.
- Fawcett, T.W., Martindale, J.L., Guyton, K.Z., Hai, T., Holbrook, N.J.**, 1999. Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF

- composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem. J.* **339** (Pt 1), 135-141.
- Fazakerley, J.K., Buchmeier, M.J.**, 1993. Pathogenesis of virus-induced demyelination. *Adv. Virus Res.* **42**, 249-324.
- Fazakerley, J.K., Parker, S.E., Bloom, F., Buchmeier, M.J.**, 1992. The V5A13.1 envelope glycoprotein deletion mutant of mouse hepatitis virus type-4 is neuroattenuated by its reduced rate of spread in the central nervous system. *Virology* **187**, 178-188.
- Fazzini, E., Fleming, J., Fahn, S.**, 1992. Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **7**, 153-158.
- Feligioni, M., Raiteri, L., Pattarini, R., Grilli, M., Bruzzone, S., Cavazzani, P., Raiteri, M., Pittaluga, A.**, 2003. The human immunodeficiency virus-1 protein Tat and its discrete fragments evoke selective release of acetylcholine from human and rat cerebrocortical terminals through species-specific mechanisms. *J. Neurosci.* **23**, 6810-6818.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., Alnemri, E.S.**, 1996. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7464-7469.
- Fernandez-Checa, J.C.**, 2003. Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 471-479.
- Finberg, R.W., Kurt-Jones, E.A.**, 2004. Viruses and Toll-like receptors. *Microbes Infect.* **6**, 1356-1360.
- Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., Tschachler, E.**, 2002. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 722-726.
- Fleming, J.O., Trousdale, M.D., Bradbury, J., Stohlman, S.A., Weiner, L.P.**, 1987. Experimental demyelination induced by coronavirus JHM (MHV-4): molecular identification of a viral determinant of paralytic disease. *Microb. Pathog.* **3**, 9-20.
- Fouchier, R.A., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G.J., van den Hoogen, B.G., Peiris, M., Lim, W., Stohr, K., Osterhaus, A.D.**, 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* **423**, 240.

- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., Sommer, T.**, 2000. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 379-384.
- Frielle, D.W., Huang, D.D., Youngner, J.S.**, 1984. Persistent infection with influenza A virus: evolution of virus mutants. *Virology* **138**, 103-117.
- Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S.A., Palese, P., Baric, R.S.**, 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *J. Virol.* **81**, 9812-9824.
- Fu, L., Gonzales, D.M., Das Sarma, J., Lavi, E.**, 2004. A combination of mutations in the S1 part of the spike glycoprotein gene of coronavirus MHV-A59 abolishes demyelination. *J. Neurovirol.* **10**, 41-51.
- Gagneur, A., Sizun, J., Vallet, S., Legr, M.C., Picard, B., Talbot, P.J.**, 2002. Coronavirus-related nosocomial viral respiratory infections in a neonatal and paediatric intensive care unit: a prospective study. *J. Hosp. Infect.* **51**, 59-64.
- Gale, M.J., Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., Katze, M.G.**, 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* **230**, 217-227.
- Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J.**, 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* **279**, 371-374.
- Gallagher, T.M., Escarmis, C., Buchmeier, M.J.**, 1991. Alteration of the pH dependence of coronavirus-induced cell fusion: effect of mutations in the spike glycoprotein. *J. Virol.* **65**, 1916-1928.
- Gallagher, T.M., Parker, S.E., Buchmeier, M.J.**, 1990. Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. *J. Virol.* **64**, 731-741.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M.E., Piacentini, M.,**

- Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G.**, 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19**, 107-120.
- Garcia, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., Esteban, M.**, 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 1032-1060.
- Gerna, G., Campanini, G., Rovida, F., Percivalle, E., Sarasini, A., Marchi, A., Baldanti, F.**, 2006. 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. *J. Med. Virol.* **78**, 938-949.
- Gerna, G., Passarani, N., Battaglia, M., Rondanelli, E.G.**, 1985. Human enteric coronaviruses: antigenic relatedness to human coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* **151**, 796-803.
- Giovannoni, G., Cutter, G.R., Lunemann, J., Martin, R., Munz, C., Sriram, S., Steiner, I., Hammerschlag, M.R., Gaydos, C.A.**, 2006. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **5**, 887-894.
- Giovannoni, G., Ebers, G.**, 2007. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr. Opin. Neurol.* **20**, 261-268.
- Glass, W.G., Chen, B.P., Liu, M.T., Lane, T.E.**, 2002. Mouse hepatitis virus infection of the central nervous system: chemokine-mediated regulation of host defense and disease. *Viral Immunol.* **15**, 261-272.
- Golstein, P., Kroemer, G.**, 2005. Redundant cell death mechanisms as relicts and backups. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**, 1490-1496.
- Gombold, J.L., Sutherland, R.M., Lavi, E., Paterson, Y., Weiss, S.R.**, 1995. Mouse hepatitis virus A59-induced demyelination can occur in the absence of CD8+ T cells. *Microb. Pathog.* **18**, 211-221.
- Goodbourn, S., Didcock, L., Randall, R.E.**, 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **81**, 2341-2364.

- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., Baker, S.C.**, 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J. Virol.* **76**, 3697-3708.
- Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S., Mori, M.**, 2004. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* **11**, 390-402.
- Gray, F., Chretien, F., Vallat-Decouvelaere, A.V., Scaravilli, F.**, 2003. The changing pattern of HIV neuropathology in the HAART era. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 429-440.
- Green, D., Kroemer, G.**, 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* **8**, 267-271.
- Green, D.R., Kroemer, G.**, 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626-629.
- Greenamyre, J.T., Hastings, T.G.**, 2004. Biomedicine. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. *Science* **304**, 1120-1122.
- Grutter, M.G.**, 2000. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 649-655.
- Gu, J., Gong, E., Zhang, B., Zheng, J., Gao, Z., Zhong, Y., Zou, W., Zhan, J., Wang, S., Xie, Z., Zhuang, H., Wu, B., Zhong, H., Shao, H., Fang, W., Gao, D., Pei, F., Li, X., He, Z., Xu, D., Shi, X., Anderson, V.M., Leong, A.S.**, 2005. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J. Exp. Med.* **202**, 415-424.
- Gulyaeva, N.V.**, 2003. Non-apoptotic functions of caspase-3 in nervous tissue. *Biochemistry (Mosc)* **68**, 1171-1180.
- Gulyaeva, N.V., Kudryashov, I.E., Kudryashova, I.V.**, 2003. Caspase activity is essential for long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* **73**, 853-864.
- Halestrap, A.P., Connern, C.P., Griffiths, E.J., Kerr, P.M.**, 1997. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol. Cell Biochem.* **174**, 167-172.
- Hampar, B., Copeland, M.L.**, 1965. Persistent Herpes Simplex Virus Infection In Vitro with Cycles of Cell Destruction and Regrowth. *J. Bacteriol.* **90**, 205-212.

- Hamre, D., Procknow, J.J.**, 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **121**, 190-193.
- Haneda, M., Xiao, H., Hasegawa, T., Kimura, Y., Nakashima, I., Isobe, K.**, 2004. Regulation of mouse GADD34 gene transcription after DNA damaging agent methylmethane sulfonate. Gene **336**, 139-146.
- Hansen, G.H., Delmas, B., Besnardreau, L., Vogel, L.K., Laude, H., Sjostrom, H., Noren, O.**, 1998. The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. J. Virol. **72**, 527-534.
- Harcourt, B.H., Jukneliene, D., Kanjanahaluelthai, A., Bechill, J., Severson, K.M., Smith, C.M., Rota, P.A., Baker, S.C.**, 2004. Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity. J. Virol. **78**, 13600-13612.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D.**, 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature **397**, 271-274.
- Hayashi, A., Kasahara, T., Iwamoto, K., Ishiwata, M., Kametani, M., Kakiuchi, C., Furuichi, T., Kato, T.**, 2007. The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain development. J. Biol. Chem. **282**, 34525-34534.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K.**, 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. Mol. Biol. Cell **10**, 3787-3799.
- He, B.**, 2006. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. Cell Death Differ. **13**, 393-403.
- He, R., Dobie, F., Ballantine, M., Leeson, A., Li, Y., Bastien, N., Cutts, T., Andonov, A., Cao, J., Booth, T.F., Plummer, F.A., Tyler, S., Baker, L., Li, X.**, 2004. Analysis of multimerization of the SARS coronavirus nucleocapsid protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. **316**, 476-483.
- Hengartner, M.O.**, 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature **407**, 770-776.
- Herrup, K., Yang, Y.**, 2007. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? Nat. Rev. Neurosci. **8**, 368-378.

- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzel, A., Glimcher, L.H., Korsmeyer, S.J.,** 2006. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* **312**, 572-576.
- Hill, D.P., Robertson, K.A.,** 1997. Characterization of the cholinergic neuronal differentiation of the human neuroblastoma cell line LA-N-5 after treatment with retinoic acid. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **102**, 53-67.
- Hill, D.P., Robertson, K.A.,** 1998. Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **2**, 183-190.
- Hingley, S.T., Leparc-Goffart, I., Weiss, S.R.,** 1998. The spike protein of murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 is not cleaved in primary glial cells and primary hepatocytes. *J. Virol.* **72**, 1606-1609.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., Tohyama, M.,** 2004. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J. Cell Biol.* **165**, 347-356.
- Hofmann, H., Pohlmann, S.,** 2004. Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol.* **12**, 466-472.
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B., Pohlmann, S.,** 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 7988-7993.
- Holland, J.J., Villarreal, L.P., Welsh, R.M., Oldstone, M.B., Kohne, D., Lazzarini, R., Scolnick, E.,** 1976. Long-term persistent vesicular stomatitis virus and rabies virus infection of cells in vitro. *J. Gen. Virol.* **33**, 193-211.
- Holmes, K.V., Tresnan, D.B., Zelus, B.D.,** 1997. Virus-receptor interactions in the enteric tract. Virus-receptor interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* **412**, 125-133.
- Holtz, W.A., O'Malley, K.L.,** 2003. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.* **278**, 19367-19377.

- Holz, A., Bielekova, B., Martin, R., Oldstone, M.B.,** 2000. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis. *J. Immunol.* **164**, 1103-1109.
- Hori, O., Ichinoda, F., Yamaguchi, A., Tamatani, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Katayama, T., Tohyama, M., Stern, D.M., Ozawa, K., Kitao, Y., Ogawa, S.,** 2004. Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. *Genes Cells* **9**, 457-469.
- Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., Nagata, K.,** 2001. A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.* **2**, 415-422.
- Houtman, J.J., Fleming, J.O.,** 1996. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J. Neurovirol.* **2**, 361-376.
- Hung, E.C., Chim, S.S., Chan, P.K., Tong, Y.K., Ng, E.K., Chiu, R.W., Leung, C.B., Sung, J.J., Tam, J.S., Lo, Y.M.,** 2003. Detection of SARS coronavirus RNA in the cerebrospinal fluid of a patient with severe acute respiratory syndrome. *Clin. Chem.* **49**, 2108-2109.
- Iacono, K.T., Kazi, L., Weiss, S.R.,** 2006. Both spike and background genes contribute to murine coronavirus neurovirulence. *J. Virol.* **80**, 6834-6843.
- ICTV,** 2012. Virus taxonomy : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Oxford.
- Iltis, J.P., Vette, J., Castellano, G.A., Madden, D.L., Sever, J.L.,** 1982. Persistent Varicella-Zoster virus infection in a human rhabdomyosarcoma cell line and recovery of a plaque variant. *Infect. Immun.* **37**, 350-358.
- Imai, Y., Soda, M., Takahashi, R.,** 2000. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 35661-35664.
- Imai, Y., Takahashi, R.,** 2004. How do Parkin mutations result in neurodegeneration? *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 384-389.
- Imaizumi, K., Miyoshi, K., Katayama, T., Yoneda, T., Taniguchi, M., Kudo, T., Tohyama, M.,** 2001. The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1536**, 85-96.

- Isler, J.A., Skalet, A.H., Alwine, J.C.**, 2005. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J. Virol.* **79**, 6890-6899.
- Ito, N., Mossel, E.C., Narayanan, K., Popov, V.L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C.J., Makino, S.**, 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *J. Virol.* **79**, 3182-3186.
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Glimcher, L.H.**, 2003. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol. Rev.* **194**, 29-38.
- Jacobs, B.L., Langland, J.O.**, 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339-349.
- Jacomy, H., Fragoso, G., Almazan, G., Mushynski, W.E., Talbot, P.J.**, 2006. Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. *Virology* **349**, 335-346.
- Jacomy, H., St-Jean, J.R., Brison, E., Marceau, G., Desforges, M., Talbot, P.J.**, 2010. Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. *J. Neurovirol.* **16**, 279-293.
- Jacomy, H., Talbot, P.J.**, 2003. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* **315**, 20-33.
- Jeffers, S.A., Tusell, S.M., Gillim-Ross, L., Hemmila, E.M., Achenbach, J.E., Babcock, G.J., Thomas, W.D., Jr., Thackray, L.B., Young, M.D., Mason, R.J., Ambrosino, D.M., Wentworth, D.E., Demartini, J.C., Holmes, K.V.**, 2004. CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15748-15753.
- Jiang, H.Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Lu, D., Hai, T., Harding, H.P., Wang, X., Ron, D., Cavener, D.R., Wek, R.C.**, 2004. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol. Cell Biol.* **24**, 1365-1377.
- Jin, S., Kalkum, M., Overholtzer, M., Stoffel, A., Chait, B.T., Levine, A.J.**, 2003. CIAP1 and the serine protease HTRA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals. *Genes Dev.* **17**, 359-367.

- Jousse, C., Deval, C., Maurin, A.C., Parry, L., Cherasse, Y., Chaveroux, C., Lefloch, R., Lenormand, P., Bruhat, A., Fafournoux, P.**, 2007. TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 15851-15861.
- Jouvenet, N., Monaghan, P., Way, M., Wileman, T.**, 2004. Transport of African swine fever virus from assembly sites to the plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesin. *J. Virol.* **78**, 7990-8001.
- Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng, H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., Chen, K., Du, L., Gao, K., Zhao, Y.T., Zou, X.Z., Feng, Y.J., Gao, Y.F., Hai, R., Yu, D., Guan, Y., Xu, J.**, 2005. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J. Virol.* **79**, 11892-11900.
- Kaser, A., Blumberg, R.S.**, 2010. Survive an innate immune response through XBP1. *Cell Res.* **20**, 506-507.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Manabe, T., Hitomi, J., Kudo, T., Tohyama, M.**, 2004. Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J. Chem. Neuroanat.* **28**, 67-78.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St George-Hyslop, P., Takeda, M., Tohyama, M.**, 1999. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **1**, 479-485.
- Katz-Levy, Y., Neville, K.L., Padilla, J., Rahbe, S., Begolka, W.S., Girvin, A.M., Olson, J.K., Vanderlugt, C.L., Miller, S.D.**, 2000. Temporal development of autoreactive Th1 responses and endogenous presentation of self myelin epitopes by central nervous system-resident APCs in Theiler's virus-infected mice. *J. Immunol.* **165**, 5304-5314.
- Kaufman, R.J.**, 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13**, 1211-1233.

- Kazi, L., Lissenberg, A., Watson, R., de Groot, R.J., Weiss, S.R.**, 2005. Expression of hemagglutinin esterase protein from recombinant mouse hepatitis virus enhances neurovirulence. *J. Virol.* **79**, 15064-15073.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R.**, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.
- Kharfan-Dabaja, M.A., Ayala, E., Greene, J., Rojiani, A., Murtagh, F.R., Anasetti, C.**, 2007. Two cases of progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation and a review of the literature. *Bone Marrow Transplant.* **39**, 101-107.
- Kim, S.J., Zhang, Z., Hitomi, E., Lee, Y.C., Mukherjee, A.B.**, 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1826-1834.
- Kim, T.Y., Kim, E., Yoon, S.K., Yoon, J.B.**, 2008. Herp enhances ER-associated protein degradation by recruiting ubiquilins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 741-746.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., Kohno, K.**, 2007. Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *J. Cell Biol.* **179**, 75-86.
- King, J.L., Jukes, T.H.**, 1969. Non-Darwinian evolution. *Science* **164**, 788-798.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E.**, 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**, 5579-5588.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., Ashkenazi, A.**, 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* **276**, 46639-46646.
- Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Tyler, K.L.**, 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **353**, 369-374.
- Klingner, M., Apelt, J., Kumar, A., Sorger, D., Sabri, O., Steinbach, J., Scheunemann, M., Schliebs, R.**, 2003. Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter

receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta-amyloid plaque pathology. *Int. J. Dev. Neurosci.* **21**, 357-369.

Klumperman, J., Locker, J.K., Meijer, A., Horzinek, M.C., Geuze, H.J., Rottier, P.J., 1994. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J. Virol.* **68**, 6523-6534.

Knowles, W.A., Sasnauskas, K., 2003. Comparison of cell culture-grown JC virus (primary human fetal glial cells and the JCI cell line) and recombinant JCV VP1 as antigen for the detection of anti-JCV antibody by haemagglutination inhibition. *J. Virol. Methods* **109**, 47-54.

Kochubey, O., Lou, X., Schneggenburger, R., 2011. Regulation of transmitter release by Ca(2+) and synaptotagmin: insights from a large CNS synapse. *Trends Neurosci.* **34**, 237-246.

Kokame, K., Kato, H., Miyata, T., 2001. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **276**, 9199-9205.

Kolb, A.F., Hegyi, A., Maile, J., Heister, A., Hagemann, M., Siddell, S.G., 1998. Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 61-67.

Kooi, C., Cervin, M., Anderson, R., 1991. Differentiation of acid-pH-dependent and - nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus. *Virology* **180**, 108-119.

Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S., Quirion, R., 2007. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog. Neurobiol.* **81**, 179-196.

Krishnakumar, R., Kraus, W.L., 2010. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol. Cell* **39**, 8-24.

Kristensson, K., Lycke, E., Roytta, M., Svennerholm, B., Vahlne, A., 1986. Neuritic transport of herpes simplex virus in rat sensory neurons in vitro. Effects of substances interacting with microtubular function and axonal flow [nocodazole, taxol and erythro-9-3-(2-hydroxynonyl)adenine]. *J. Gen. Virol.* **67 (Pt 9)**, 2023-2028.

Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G., Nomenclature Committee on Cell, D., 2005. Classification

of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**, 1463-1467.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**, 99-163.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschoopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **16**, 3-11.

Kroemer, G., Martin, S.J., 2005. Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* **11**, 725-730.

Krueger, D.K., Kelly, S.M., Lewicki, D.N., Ruffolo, R., Gallagher, T.M., 2001. Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation of membrane fusion. *J. Virol.* **75**, 2792-2802.

Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P.E., Dowell, S.F., Ling, A.E., Humphrey, C.D., Shieh, W.J., Guarner, J., Paddock, C.D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.Y., Cox, N., Hughes, J.M., LeDuc, J.W., Bellini, W.J., Anderson, L.J., Group, S.W., 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1953-1966.

Kumar, S., Lavin, M.F., 1996. The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ.* **3**, 255-267.

Kumarswamy, R., Chandna, S., 2009. Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? *Mitochondrion* **9**, 1-8.

Kunkel, F., Herrler, G., 1996. Structural and functional analysis of the S proteins of two human coronavirus OC43 strains adapted to growth in different cells. *Arch. Virol.* **141**, 1123-1131.

Kuo, L., Masters, P.S., 2003. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J. Virol.* **77**, 4597-4608.

- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D.R., Newmeyer, D.D.**, 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**, 331-342.
- Lachance, C., Arbour, N., Cashman, N.R., Talbot, P.J.**, 1998. Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by human coronavirus 229E. *J. Virol.* **72**, 6511-6519.
- Ladogana, A., Bouzamondo, E., Pocchiari, M., Tsiang, H.**, 1994. Modification of tritiated gamma-amino-n-butyric acid transport in rabies virus-infected primary cortical cultures. *J. Gen. Virol.* **75 (Pt 3)**, 623-627.
- LaFerla, F.M.**, 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 862-872.
- Lai, E., Teodoro, T., Volchuk, A.**, 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* **22**, 193-201.
- Lai, M.M.**, 1996. Recombination in large RNA viruses:coronaviruses. *Semin. Virol.* **7**, 381-388.
- Lai, M.M., Cavanagh, D.**, 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **48**, 1-100.
- Lampert, P.W., Sims, J.K., Kniazeff, A.J.**, 1973. Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies. *Acta Neuropathol.* **24**, 76-85.
- Langer-Gould, A., Atlas, S.W., Green, A.J., Bollen, A.W., Pelletier, D.**, 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N. Engl. J. Med.* **353**, 375-381.
- Langereis, M.A., van Vliet, A.L., Boot, W., de Groot, R.J.**, 2010. Attachment of mouse hepatitis virus to O-acetylated sialic acid is mediated by hemagglutinin-esterase and not by the spike protein. *J. Virol.* **84**, 8970-8974.
- Langland, J.O., Pettiford, S., Jiang, B., Jacobs, B.L.**, 1994. Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene bind specifically to double-stranded RNA and inhibit activation of the interferon-induced protein kinase PKR. *J. Virol.* **68**, 3821-3829.
- Larson, H.E., Reed, S.E., Tyrrell, D.A.**, 1980. Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults. *J. Med. Virol.* **5**, 221-229.

- Lassnig, C., Sanchez, C.M., Egerbacher, M., Walter, I., Majer, S., Kolbe, T., Pallares, P., Enjuanes, L., Muller, M.**, 2005. Development of a transgenic mouse model susceptible to human coronavirus 229E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8275-8280.
- Lau, K.K., Yu, W.C., Chu, C.M., Lau, S.T., Sheng, B., Yuen, K.Y.**, 2004. Possible central nervous system infection by SARS coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 342-344.
- Lavi, E.**, 2005. Coronavirus-induced demyelination, in: Lavi, E., Constantinescu, C.S. (Eds.), *Experimental models of multiple sclerosis*. Springer Science, New York, pp. 711-858.
- Lavi, E., Gilden, D.H., Highkin, M.K., Weiss, S.R.**, 1984a. Persistence of mouse hepatitis virus A59 RNA in a slow virus demyelinating infection in mice as detected by in situ hybridization. *J. Virol.* **51**, 563-566.
- Lavi, E., Gilden, D.H., Wroblewska, Z., Rorke, L.B., Weiss, S.R.**, 1984b. Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus. *Neurology* **34**, 597-603.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Anderson, K.C., Glimcher, L.H.**, 2003a. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9946-9951.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H.**, 2003b. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7448-7459.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., Kaufman, R.J.**, 2002. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* **16**, 452-466.
- Lee, M.C., Kim, B.W., Kim, J.S., Lee, J.S., Kim, K.S., Lee, J.H., Nam, J.H., Rowe, S.M., Kim, S.U.**, 1997. Neuronal differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells by gangliosides. *Brain Tumor Pathol.* **14**, 5-11.
- Lei, K., Davis, R.J.**, 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2432-2437.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J.**, 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183-192.

- Lewicki, D.N., Gallagher, T.M.**, 2002. Quaternary structure of coronavirus spikes in complex with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule cellular receptors. *J Biol Chem* **277**, 19727-19734.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J.**, 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X.**, 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
- Li, W., Sui, J., Huang, I.C., Kuhn, J.H., Radoshitzky, S.R., Marasco, W.A., Choe, H., Farzan, M.**, 2007. The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2. *Virology* **367**, 367-374.
- Li, Y., Johnson, N., Capano, M., Edwards, M., Crompton, M.**, 2004. Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem. J.* **383**, 101-109.
- Liang, X.H., Kleeman, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., Levine, B.**, 1998. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol.* **72**, 8586-8596.
- Liberman, E., Fong, Y.L., Selby, M.J., Choo, Q.L., Cousens, L., Houghton, M., Yen, T.S.**, 1999. Activation of the grp78 and grp94 promoters by hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Virol.* **73**, 3718-3722.
- Lim, K.P., Liu, D.X.**, 2001. The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 17515-17523.
- Lin, J.H., Li, H., Zhang, Y., Ron, D., Walter, P.**, 2009. Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS ONE* **4**, e4170.
- Lin, M.T., Hinton, D.R., Marten, N.W., Bergmann, C.C., Stohlman, S.A.**, 1999. Antibody prevents virus reactivation within the central nervous system. *J. Immunol.* **162**, 7358-7368.

- Lin, W., Bailey, S.L., Ho, H., Harding, H.P., Ron, D., Miller, S.D., Popko, B.**, 2007. The integrated stress response prevents demyelination by protecting oligodendrocytes against immune-mediated damage. *J. Clin. Invest.* **117**, 448-456.
- Lin, W., Harding, H.P., Ron, D., Popko, B.**, 2005. Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. *J. Cell. Biol.* **169**, 603-612.
- Lin, W., Kemper, A., Dupree, J.L., Harding, H.P., Ron, D., Popko, B.**, 2006. Interferon-gamma inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress. *Brain* **129**, 1306-1318.
- Lindholm, D., Wootz, H., Korhonen, L.**, 2006. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.* **13**, 385-392.
- Liou, A.K., Zhou, Z., Pei, W., Lim, T.M., Yin, X.M., Chen, J.**, 2005. BimEL up-regulation potentiates AIF translocation and cell death in response to MPTP. *FASEB J.* **19**, 1350-1352.
- Lipton, H.L., Twaddle, G., Jelachich, M.L.**, 1995. The predominant virus antigen burden is present in macrophages in Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J. Virol.* **69**, 2525-2533.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., Wang, X.**, 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8461-8466.
- Lloyd, R.M., Shatkin, A.J.**, 1992. Translational stimulation by reovirus polypeptide sigma 3: substitution for VAI RNA and inhibition of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *J. Virol.* **66**, 6878-6884.
- Locardi, C., Puddu, P., Ferrantini, M., Parlanti, E., Sestili, P., Varano, F., Belardelli, F.**, 1992. Persistent infection of normal mice with human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **66**, 1649-1654.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J.**, 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A.**, 2005. Biologie moléculaire de la cellule, 5e édition. W.H. Freeman & Co Ltd, New York.

- Lu, P.D., Harding, H.P., Ron, D.**, 2004. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* **167**, 27-33.
- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M.G., Krug, R.M.**, 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**, 222-228.
- Luo, L.**, 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 601-635.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X.**, 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490.
- Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A., Hendershot, L.M.**, 2002. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.* **318**, 1351-1365.
- Ma, Y., Hendershot, L.M.**, 2003. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **278**, 34864-34873.
- Maccioni, H.J., Daniotti, J.L., Martina, J.A.**, 1999. Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* **1437**, 101-118.
- MacNamara, K.C., Chua, M.M., Nelson, P.T., Shen, H., Weiss, S.R.**, 2005. Increased epitope-specific CD8+ T cells prevent murine coronavirus spread to the spinal cord and subsequent demyelination. *J. Virol.* **79**, 3370-3381.
- Malisan, F., Franchi, L., Tomassini, B., Ventura, N., Condo, I., Rippo, M.R., Rufini, A., Liberati, L., Nachtigall, C., Kniep, B., Testi, R.**, 2002. Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. *J. Exp. Med.* **196**, 1535-1541.
- Marcenaro, E., Carlomagno, S., Pesce, S., Della Chiesa, M., Parolini, S., Moretta, A., Sivori, S.**, 2011. NK cells and their receptors during viral infections. *Immunotherapy* **3**, 1075-1086.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D.**, 2004. CHOP induces death by promoting protein

synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **18**, 3066-3077.

Marten, N.W., Stohlman, S.A., Bergmann, C.C., 2000. Role of viral persistence in retaining CD8(+) T cells within the central nervous system. *J. Virol.* **74**, 7903-7910.

Marten, N.W., Stohlman, S.A., Bergmann, C.C., 2001. MHV infection of the CNS: mechanisms of immune-mediated control. *Viral Immunol.* **14**, 1-18.

Martin, L.J., Adams, N.A., Pan, Y., Price, A., Wong, M., 2011. The mitochondrial permeability transition pore regulates nitric oxide-mediated apoptosis of neurons induced by target deprivation. *J. Neurosci.* **31**, 359-370.

Martinon, F., Tschopp, J., 2004. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* **117**, 561-574.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., Kroemer, G., 1998a. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**, 2027-2031.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., Kroemer, G., 1998b. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* **187**, 1261-1271.

Masters, P.S., 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **66**, 193-292.

Matsubara, Y., Watanabe, R., Taguchi, F., 1991. Neurovirulence of six different murine coronavirus JHMV variants for rats. *Virus Res.* **20**, 45-58.

Matsuyama, S., Taguchi, F., 2002. Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* **76**, 11819-11826.

Matsuyama, S., Taguchi, F., 2009. Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis. *J. Virol.* **83**, 11133-11141.

Matsuyama, S., Ujike, M., Morikawa, S., Tashiro, M., Taguchi, F., 2005. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12543-12547.

- McCray, P.B., Jr., Pewe, L., Wohlford-Lenane, C., Hickey, M., Manzel, L., Shi, L., Netland, J., Jia, H.P., Halabi, C., Sigmund, C.D., Meyerholz, D.K., Kirby, P., Look, D.C., Perlman, S.**, 2007. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **81**, 813-821.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., Holbrook, N.J.**, 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1249-1259.
- McIntosh, K., Dees, J.H., Becker, W.B., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M.**, 1967. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 933-940.
- Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L., Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., Rossi, F.**, 1995. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* **374**, 647-650.
- Medigeshi, G.R., Lancaster, A.M., Hirsch, A.J., Briese, T., Lipkin, W.I., Defilippis, V., Fruh, K., Mason, P.W., Nikolich-Zugich, J., Nelson, J.A.**, 2007. West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *J. Virol.* **81**, 10849-10860.
- Mhaille, A.N., McQuaid, S., Windebank, A., Cunnea, P., McMahon, J., Samali, A., Fitzgerald, U.**, 2008. Increased expression of endoplasmic reticulum stress-related signaling pathway molecules in multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **67**, 200-211.
- Miller, S.D., Vanderlugt, C.L., Begolka, W.S., Pao, W., Yauch, R.L., Neville, K.L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A., Kim, B.S.**, 1997. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* **3**, 1133-1136.
- Miyatake, Y., Ikeda, H., Ishizu, A., Baba, T., Ichihashi, T., Suzuki, A., Tomaru, U., Kasahara, M., Yoshiki, T.**, 2006. Role of neuronal interferon-gamma in the development of myelopathy in rats infected with human T-cell leukemia virus type 1. *Am. J. Pathol.* **169**, 189-199.
- Molenkamp, R., van Tol, H., Rozier, B.C., van der Meer, Y., Spaan, W.J., Snijder, E.J.**, 2000. The arterivirus replicase is the only viral protein required for genome replication and subgenomic mRNA transcription. *J. Gen. Virol.* **81**, 2491-2496.

- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., Yasuhiko, Y.,** 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem.* **277**, 34287-34294.
- Mounir, S., Talbot, P.J.,** 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. *J. Gen. Virol.* **73 (Pt 10)**, 2731-2736.
- Mukae, N., Enari, M., Sakahira, H., Fukuda, Y., Inazawa, J., Toh, H., Nagata, S.,** 1998. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9123-9128.
- Mukherjee, K., Chava, A.K., Mandal, C., Dey, S.N., Kniep, B., Chandra, S.,** 2008. O-acetylation of GD3 prevents its apoptotic effect and promotes survival of lymphoblasts in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J. Cell Biochem.* **105**, 724-734.
- Mulvey, M., Arias, C., Mohr, I.,** 2007. Maintenance of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in herpes simplex virus type 1-infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER stress sensor. *J. Virol.* **81**, 3377-3390.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M.,** 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-827.
- Myint, S.H.,** 1994. Human coronaviruses: a brief review. *Rev. Med. Virol.* **4**, 35-46.
- Myint, S.H.,** 1995. Human coronavirus infections, in: Siddell, S.G. (Ed.), *The Coronaviridae*. Plenum Press, New York, NY, pp. 389-401.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., Tsujimoto, Y.,** 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**, 652-658.
- Nakagawa, T., Yuan, J.,** 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* **150**, 887-894.

- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J.**, 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103.
- Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Kamitani, W., Ikegami, T., Tseng, C.T., Makino, S.**, 2008a. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nspl suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *J. Virol.* **82**, 4471-4479.
- Narayanan, K., Huang, C., Makino, S.**, 2008b. SARS coronavirus accessory proteins. *Virus Res.* **133**, 113-121.
- Nash, T.C., Buchmeier, M.J.**, 1997. Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways. *Virology* **233**, 1-8.
- Navas, S., Seo, S.H., Chua, M.M., Das Sarma, J., Lavi, E., Hingley, S.T., Weiss, S.R.**, 2001. Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in the liver and cause hepatitis. *J. Virol.* **75**, 2452-2457.
- Navas, S., Weiss, S.R.**, 2003. Murine coronavirus-induced hepatitis: JHM genetic background eliminates A59 spike-determined hepatotropism. *J. Virol.* **77**, 4972-4978.
- Navas-Martin, S., Hingley, S.T., Weiss, S.R.**, 2005. Murine coronavirus evolution in vivo: functional compensation of a detrimental amino acid substitution in the receptor binding domain of the spike glycoprotein. *J. Virol.* **79**, 7629-7640.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S.H., Youle, R.J.**, 2001. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.* **153**, 1265-1276.
- Nelson, G.W., Stohlman, S.A., Tahara, S.M.**, 2000. High affinity interaction between nucleocapsid protein and leader/intergenic sequence of mouse hepatitis virus RNA. *J. Gen. Virol.* **81**, 181-188.
- Neri, E., Musante, V., Pittaluga, A.**, 2007. Effects of the HIV-1 viral protein TAT on central neurotransmission: role of group I metabotropic glutamate receptors. *Int. Rev. Neurobiol.* **82**, 339-356.
- Netland, J., Meyerholz, D.K., Moore, S., Cassell, M., Perlman, S.**, 2008. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J. Virol.* **82**, 7264-7275.

- Nguyen, V.P., Hogue, B.G.**, 1997. Protein interactions during coronavirus assembly. *J. Virol.* **71**, 9278-9284.
- Nicotera, P., Leist, M., Ferrando-May, E.**, 1998. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.* **102-103**, 139-142.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., Ichijo, H.**, 2002. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* **16**, 1345-1355.
- Nomura, R., Kiyota, A., Suzuki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T., Fujimoto, T.**, 2004. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J. Virol.* **78**, 8701-8708.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., Ron, D.**, 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J. Cell Biol.* **153**, 1011-1022.
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P., Ron, D.**, 2003. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* **22**, 1180-1187.
- Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., Mori, K.**, 2002. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* **366**, 585-594.
- Oldstone, M.B., Sinha, Y.N., Blount, P., Tishon, A., Rodriguez, M., von Wedel, R., Lampert, P.W.**, 1982. Virus-induced alterations in homeostasis: alteration in differentiated functions of infected cells in vivo. *Science* **218**, 1125-1127.
- Olivari, S., Cali, T., Salo, K.E., Paganetti, P., Ruddock, L.W., Molinari, M.**, 2006. EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**, 1278-1284.
- Ontiveros, E., Kim, T.S., Gallagher, T.M., Perlman, S.**, 2003. Enhanced virulence mediated by the murine coronavirus, mouse hepatitis virus strain JHM, is associated with a glycine at residue 310 of the spike glycoprotein. *J. Virol.* **77**, 10260-10269.

- Opstelten, D.J., de Groote, P., Horzinek, M.C., Vennema, H., Rottier, P.J.,** 1993. Disulfide bonds in folding and transport of mouse hepatitis coronavirus glycoproteins. *J. Virol.* **67**, 7394-7401.
- Opstelten, D.J., Raamsman, M.J., Wolfs, K., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.,** 1995. Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J. Cell Biol.* **131**, 339-349.
- Ortego, J., Escors, D., Laude, H., Enjuanes, L.,** 2002. Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* **76**, 11518-11529.
- Orvedahl, A., Levine, B.,** 2008. Autophagy and viral neurovirulence. *Cell Microbiol.* **10**, 1747-1756.
- Osunkoya, B.O., Ukaejiifo, E.O., Ajayi, O., Akinyemi, A.A.,** 1990. Evidence that circulating lymphocytes act as vehicles or viraemia in measles. *West. Afr. J. Med.* **9**, 35-39.
- Ovsepian, S.V., Dolly, J.O.,** 2011. Dendritic SNAREs add a new twist to the old neuron theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 19113-19120.
- Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., Mori, M.,** 2002. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest.* **109**, 525-532.
- Padgett, B.L., Walker, D.L.,** 1973. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.* **127**, 467-470.
- Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., Dessel, B.H.,** 1971. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* **1**, 1257-1260.
- Paschen, W.,** 2003. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium* **34**, 365-383.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., Levine, B.,** 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939.
- Paweletz, N.,** 2001. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 72-75.

- Payne, H.R., Storz, J., Henk, W.G.**, 1990. Initial events in bovine coronavirus infection: analysis through immunogold probes and lysosomotropic inhibitors. *Arch. Virol.* **114**, 175-189.
- Perlman, S., Evans, G., Afifi, A.**, 1990. Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. *J. Exp. Med.* **172**, 1127-1132.
- Pevear, D.C., Calenoff, M., Rozhon, E., Lipton, H.L.**, 1987. Analysis of the complete nucleotide sequence of the picornavirus Theiler's murine encephalomyelitis virus indicates that it is closely related to cardioviruses. *J. Virol.* **61**, 1507-1516.
- Pewe, L., Heard, S.B., Bergmann, C., Dailey, M.O., Perlman, S.**, 1999. Selection of CTL escape mutants in mice infected with a neurotropic coronavirus: quantitative estimate of TCR diversity in the infected central nervous system. *J. Immunol.* **163**, 6106-6113.
- Phillips, J.J., Chua, M.M., Lavi, E., Weiss, S.R.**, 1999. Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence. *J. Virol.* **73**, 7752-7760.
- Phillips, J.J., Chua, M.M., Rall, G.F., Weiss, S.R.**, 2002. Murine coronavirus spike glycoprotein mediates degree of viral spread, inflammation, and virus-induced immunopathology in the central nervous system. *Virology* **301**, 109-120.
- Phillips, J.J., Weiss, S.R.**, 2001. MHV neuropathogenesis: the study of chimeric S genes and mutations in the hypervariable region. *Adv. Exp. Med. Biol.* **494**, 115-119.
- Piet, R., Vargova, L., Sykova, E., Poulain, D.A., Oliet, S.H.**, 2004. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2151-2155.
- Pleasure, S.J., Lee, V.M.**, 1993. NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* **35**, 585-602.
- Popova, R., Zhang, X.**, 2002. The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. *Virology* **294**, 222-236.
- Prehaud, C., Megret, F., Lafage, M., Lafon, M.**, 2005. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J. Virol.* **79**, 12893-12904.

- Prentice, E., McAuliffe, J., Lu, X., Subbarao, K., Denison, M.R.**, 2004. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *J. Virol.* **78**, 9977-9986.
- Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C., Johnson, E.M., Jr.**, 2003. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* **38**, 899-914.
- Ramakrishna, C., Atkinson, R.A., Stohlman, S.A., Bergmann, C.C.**, 2006. Vaccine-induced memory CD8+ T cells cannot prevent central nervous system virus reactivation. *J. Immunol.* **176**, 3062-3069.
- Ramakrishna, C., Stohlman, S.A., Atkinson, R.A., Hinton, D.R., Bergmann, C.C.**, 2004. Differential regulation of primary and secondary CD8+ T cells in the central nervous system. *J. Immunol.* **173**, 6265-6273.
- Ramakrishna, C., Stohlman, S.A., Atkinson, R.D., Shlomchik, M.J., Bergmann, C.C.**, 2002. Mechanisms of central nervous system viral persistence: the critical role of antibody and B cells. *J. Immunol.* **168**, 1204-1211.
- Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E.**, 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 33869-33874.
- Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E.**, 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.* **514**, 122-128.
- Rest, J.S., Mindell, D.P.**, 2003. SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronaviruses have a history of host-shifting. *Infect. Genet. Evol.* **3**, 219-225.
- Resta, S., Luby, J.P., Rosenfeld, C.R., Siegel, J.D.**, 1985. Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science* **229**, 978-981.
- Revilla, Y., Callejo, M., Rodriguez, J.M., Culebras, E., Nogal, M.L., Salas, M.L., Vinuela, E., Fresno, M.**, 1998. Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 5405-5411.

- Reynolds, R., Roncaroli, F., Nicholas, R., Radotra, B., Gveric, D., Howell, O.**, 2011. The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* **122**, 155-170.
- Rietdorf, J., Ploubidou, A., Reckmann, I., Holmstrom, A., Frischknecht, F., Zettl, M., Zimmermann, T., Way, M.**, 2001. Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat. Cell Biol.* **3**, 992-1000.
- Rima, B.K., Duprex, W.P.**, 2006. Morbilliviruses and human disease. *J. Pathol.* **208**, 199-214.
- Rippo, M.R., Malisan, F., Ravagnan, L., Tomassini, B., Condo, I., Costantini, P., Susin, S.A., Rufini, A., Todaro, M., Kroemer, G., Testi, R.**, 2000. GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *FASEB J.* **14**, 2047-2054.
- Riski, H., Hovi, T.**, 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. *J. Med. Virol.* **6**, 259-265.
- Rodriguez, M., Leibowitz, J.L., Lampert, P.W.**, 1983. Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus-induced encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* **13**, 426-433.
- Romano, P.R., Zhang, F., Tan, S.L., Garcia-Barrio, M.T., Katze, M.G., Dever, T.E., Hinnebusch, A.G.**, 1998. Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7304-7316.
- Ron, D., Walter, P.**, 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519-529.
- Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M., Howley, P.M.**, 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* **12**, 2061-2072.
- Rossi, C.P., Delcroix, M., Huitinga, I., McAllister, A., van Rooijen, N., Claassen, E., Brahic, M.**, 1997. Role of macrophages during Theiler's virus infection. *J. Virol.* **71**, 3336-3340.
- Roth-Cross, J.K., Martinez-Sobrido, L., Scott, E.P., Garcia-Sastre, A., Weiss, S.R.**, 2007. Inhibition of the alpha/beta interferon response by mouse hepatitis virus at multiple levels. *J. Virol.* **81**, 7189-7199.

- Rowe, C.L., Baker, S.C., Nathan, M.J., Fleming, J.O.**, 1997. Evolution of mouse hepatitis virus: detection and characterization of spike deletion variants during persistent infection. *J. Virol.* **71**, 2959-2969.
- Roy, B., Lee, A.S.**, 1999. The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1437-1443.
- Rubinsztein, D.C., DiFiglia, M., Heintz, N., Nixon, R.A., Qin, Z.H., Ravikumar, B., Stefanis, L., Tolokovsky, A.**, 2005. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* **1**, 11-22.
- Rudd, P.A., Cattaneo, R., von Messling, V.**, 2006. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J. Virol.* **80**, 9361-9370.
- Ruegsegger, U., Leber, J.H., Walter, P.**, 2001. Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* **107**, 103-114.
- Rustigian, R.**, 1966. Persistent infection of cells in culture by measles virus. I. Development and characteristics of HeLa sublines persistently infected with complete virus. *J. Bacteriol.* **92**, 1792-1804.
- Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., Kaufman, R.J.**, 2006. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* **4**, e374.
- Ryu, E.J., Harding, H.P., Angelastro, J.M., Vitolo, O.V., Ron, D., Greene, L.A.**, 2002. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **22**, 10690-10698.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S.**, 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99.
- Sanchez, C.M., Gebauer, F., Sune, C., Mendez, A., Dopazo, J., Enjuanes, L.**, 1992. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology* **190**, 92-105.
- Sato, N., Imaizumi, K., Manabe, T., Taniguchi, M., Hitomi, J., Katayama, T., Yoneda, T., Morihara, T., Yasuda, Y., Takagi, T., Kudo, T., Tsuda, T., Itoyama, Y.**

- Makifuchi, T., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P., Tohyama, M.**, 2001. Increased production of beta-amyloid and vulnerability to endoplasmic reticulum stress by an aberrant spliced form of presenilin 2. *J. Biol. Chem.* **276**, 2108-2114.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., Siddell, S.G.**, 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* **81**, 20-29.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E.**, 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687.
- Schattner, E.J., Elkon, K.B., Yoo, D.H., Tumang, J., Krammer, P.H., Crow, M.K., Friedman, S.M.**, 1995. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J. Exp. Med.* **182**, 1557-1565.
- Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G., Thiel, V.**, 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* **79**, 6620-6630.
- Schickli, J.H., Zelus, B.D., Wentworth, D.E., Sawicki, S.G., Holmes, K.V.**, 1997. The murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 from persistently infected murine cells exhibits an extended host range. *J. Virol.* **71**, 9499-9507.
- Schiller, J.J., Kanjanahaluethai, A., Baker, S.C.**, 1998. Processing of the coronavirus MHV-JHM polymerase polyprotein: identification of precursors and proteolytic products spanning 400 kilodaltons of ORF1a. *Virology* **242**, 288-302.
- Schmitt, U., Conner, A.C., Rapp, S., Kissling, C., Jennen-Steinmetz, C., Hunnerkopf, R., Coogan, A.N., Thome, J.**, 2010. The effects of GABA transporter inhibition on synaptophysin and synaptotagmin expression in diazepam tolerance. *World J. Biol. Psychiatry* **11**, 439-446.
- Schneider-Schaulies, S., Liebert, U.G., Segev, Y., Rager-Zisman, B., Wolfson, M., ter Meulen, V.**, 1992. Antibody-dependent transcriptional regulation of measles virus in persistently infected neural cells. *J. Virol.* **66**, 5534-5541.
- Schwiegmann-Wessels, C., Herrler, G.**, 2006. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconj. J.* **23**, 51-58.

- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J.**, 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* **300**, 135-139.
- Scorrano, L., Petronilli, V., Di Lisa, F., Bernardi, P.**, 1999. Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **274**, 22581-22585.
- Selkoe, D.J.**, 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**, 741-766.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H., Staudt, L.M.**, 2004. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**, 81-93.
- Shamu, C.E., Walter, P.**, 1996. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* **15**, 3028-3039.
- Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.P., Lin, R., Hiscott, J.**, 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148-1151.
- Shastry, P., Basu, A., Rajadhyaksha, M.S.**, 2001. Neuroblastoma cell lines--a versatile in vitro model in neurobiology. *Int. J. Neurosci.* **108**, 109-126.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R.**, 2002a. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* **3**, 99-111.
- Shen, X., Ellis, R.E., Sakaki, K., Kaufman, R.J.**, 2005. Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **1**, e37.
- Shen, Y., Meunier, L., Hendershot, L.M.**, 2002b. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J. Biol. Chem.* **277**, 15947-15956.

- Shi, S.T., Schiller, J.J., Kanjanahaluethai, A., Baker, S.C., Oh, J.W., Lai, M.M.,** 1999. Colocalization and membrane association of murine hepatitis virus gene 1 products and De novo-synthesized viral RNA in infected cells. *J. Virol.* **73**, 5957-5969.
- Shi, Y., Vattem, K.M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., Wek, R.C.,** 1998. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7499-7509.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, T.,** 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* **25**, 302-305.
- Shiraishi, H., Okamoto, H., Yoshimura, A., Yoshida, H.,** 2006. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J. Cell Sci.* **119**, 3958-3966.
- Shishido-Hara, Y.,** 2010. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demyelinating disease. *Acta Neuropathol.* **120**, 403-417.
- Sibley, W.A., Bamford, C.R., Clark, K.,** 1985. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* **1**, 1313-1315.
- Siddell, S., Ziebuhr, J., Snijder, E.J.,** 2005. Coronaviruses, toroviruses and arteriviruses, in: Mahy, B.W.J., Meulen, V.t. (Eds.), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections : Virology*. Hodder Arnold, London, pp. 823-856.
- Siddell, S.G.,** 1995. *The Coronaviridae*. Plenum, New York, NY.
- Simmons, G., Gosalia, D.N., Rennekamp, A.J., Reeves, J.D., Diamond, S.L., Bates, P.,** 2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11876-11881.
- Sizun, J., Soupre, D., Giroux, J.D., Alix, D., De, P., Legrand, M.C., Demazure, M., Chastel, C.,** 1993. Nasal colonization with coronavirus and apnea of the premature newborn. *Acta Paediatr.* **82**, 238.
- Sizun, J., Soupre, D., Legrand, M.C., Giroux, J.D., Rubio, S., Cauvin, J.M., Chastel, C., Alix, D., de Parscau, L.,** 1995. Neonatal nosocomial respiratory infection with coronavirus: a prospective study in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr.* **84**, 617-620.

- Sodeik, B., Ebersold, M.W., Helenius, A.**, 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* **136**, 1007-1021.
- Song, H.D., Tu, C.C., Zhang, G.W., Wang, S.Y., Zheng, K., Lei, L.C., Chen, Q.X., Gao, Y.W., Zhou, H.Q., Xiang, H., Zheng, H.J., Chern, S.W., Cheng, F., Pan, C.M., Xuan, H., Chen, S.J., Luo, H.M., Zhou, D.H., Liu, Y.F., He, J.F., Qin, P.Z., Li, L.H., Ren, Y.Q., Liang, W.J., Yu, Y.D., Anderson, L., Wang, M., Xu, R.H., Wu, X.W., Zheng, H.Y., Chen, J.D., Liang, G., Gao, Y., Liao, M., Fang, L., Jiang, L.Y., Li, H., Chen, F., Di, B., He, L.J., Lin, J.Y., Tong, S., Kong, X., Du, L., Hao, P., Tang, H., Bernini, A., Yu, X.J., Spiga, O., Guo, Z.M., Pan, H.Y., He, W.Z., Manuguerra, J.C., Fontanet, A., Danchin, A., Niccolai, N., Li, Y.X., Wu, C.I., Zhao, G.P.,** 2005. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2430-2435.
- Soto, C.**, 2003. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 49-60.
- Spiga, O., Bernini, A., Ciutti, A., Chiellini, S., Menciassi, N., Finetti, F., Causarono, V., Anselmi, F., Prischi, F., Niccolai, N.**, 2003. Molecular modelling of S1 and S2 subunits of SARS coronavirus spike glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 78-83.
- Sriram, S., Rodriguez, M.**, 1997. Indictment of the microglia as the villain in multiple sclerosis. *Neurology* **48**, 464-470.
- St-Jean, J.R.**, 2006. Caractérisation de l'adaptation du coronavirus dans le système nerveux central humain, Doctorat en virologie et immunologie. INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, p. 226.
- St-Jean, J.R., Desforges, M., Almazan, F., Jacomy, H., Enjuanes, L., Talbot, P.J.**, 2006a. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J. Virol.* **80**, 3670-3674.
- St-Jean, J.R., Desforges, M., Talbot, P.J.**, 2006b. Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* **581**, 499-502.
- St-Jean, J.R., Jacomy, H., Desforges, M., Vabret, A., Freymuth, F., Talbot, P.J.**, 2004. Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. *J. Virol.* **78**, 8824-8834.

- Stadler, K., Massignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H.D., Rappuoli, R.**, 2003. SARS--beginning to understand a new virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 209-218.
- Stanhope, M.J., Brown, J.R., Amrine-Madsen, H.**, 2004. Evidence from the evolutionary analysis of nucleotide sequences for a recombinant history of SARS-CoV. *Infect. Genet. Evol.* **4**, 15-19.
- Stauber, R., Pfleiderer, M., Siddell, S.**, 1993. Proteolytic cleavage of the murine coronavirus surface glycoprotein is not required for fusion activity. *J. Gen. Virol.* **74** (Pt 2), 183-191.
- Stavrinides, J., Guttman, D.S.**, 2004. Mosaic evolution of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **78**, 76-82.
- Stewart, J.N., Mounir, S., Talbot, P.J.**, 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* **191**, 502-505.
- Stohlman, S.A., Baric, R.S., Nelson, G.N., Soe, L.H., Welter, L.M., Deans, R.J.**, 1988. Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. *J. Virol.* **62**, 4288-4295.
- Stohlman, S.A., Brayton, P.R., Fleming, J.O., Weiner, L.P., Lai, M.M.**, 1982. Murine coronaviruses: isolation and characterization of two plaque morphology variants of the JHM neurotropic strain. *J. Gen. Virol.* **63**, 265-275.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J.**, 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* **33**, 449-462.
- Su, H.L., Liao, C.L., Lin, Y.L.**, 2002. Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J. Virol.* **76**, 4162-4171.
- Sudhakar, A., Ramachandran, A., Ghosh, S., Hasnain, S.E., Kaufman, R.J., Ramaiah, K.V.**, 2000. Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* **39**, 12929-12938.
- Sun, J.C., Lanier, L.L.**, 2011. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8 T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 645-657.

- Sung, S.C., Chao, C.Y., Jeng, K.S., Yang, J.Y., Lai, M.M.**, 2009. The 8ab protein of SARS-CoV is a luminal ER membrane-associated protein and induces the activation of ATF6. *Virology* **387**, 402-413.
- Supekar, V.M., Bruckmann, C., Ingallinella, P., Bianchi, E., Pessi, A., Carfi, A.**, 2004. Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17958-17963.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G.**, 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- Sussman, M.A., Shubin, R.A., Kyuwa, S., Stohlman, S.A.**, 1989. T-cell-mediated clearance of mouse hepatitis virus strain JHM from the central nervous system. *J. Virol.* **63**, 3051-3056.
- Szegezdi, E., Fitzgerald, U., Samali, A.**, 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann. NY Acad. Sci.* **1010**, 186-194.
- Taguchi, F.**, 1993. Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. *J. Virol.* **67**, 1195-1202.
- Taguchi, F.**, 1995. The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding. *J. Virol.* **69**, 7260-7263.
- Taguchi, F., Kubo, H., Takahashi, H., Suzuki, H.**, 1995. Localization of neurovirulence determinant for rats on the S1 subunit of murine coronavirus JHMV. *Virology* **208**, 67-74.
- Tajiri, S., Yano, S., Morioka, M., Kuratsu, J., Mori, M., Gotoh, T.**, 2006. CHOP is involved in neuronal apoptosis induced by neurotrophic factor deprivation. *FEBS Lett.* **580**, 3462-3468.
- Takematsu, H., Diaz, S., Stoddart, A., Zhang, Y., Varki, A.**, 1999. Lysosomal and cytosolic sialic acid 9-O-acetylesterase activities can be encoded by one gene via differential usage of a signal peptide-encoding exon at the N terminus. *J. Biol. Chem.* **274**, 25623-25631.

- Talbot, P.J.**, 1997. Virus-induced autoimmunity in multiple sclerosis : the coronavirus paradigm. *Adv. Clin. Neurosci.* **7**, 215-233.
- Talbot, P.J., Arnold, D., Antel, J.P.**, 2001. Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **253**, 247-271.
- Talbot, P.J., Ekande, S., Cashman, N.R., Mounir, S., Stewart, J.N.**, 1993. Neurotropism of human coronavirus 229E. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**, 339-346.
- Talbot, P.J., Jouvenne, P.**, 1992. Neurotropic potential of coronaviruses. *Med. Sci.* **8**, 119-125.
- Talbot, P.J., Paquette, J.S., Ciurli, C., Antel, J.P., Ouellet, F.**, 1996. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **39**, 233-240.
- Talbot, P.J., Salmi, A.A., Knobler, R.L., Buchmeier, M.J.**, 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. *Virology* **132**, 250-260.
- Tardif, K.D., Mori, K., Kaufman, R.J., Siddiqui, A.**, 2004. Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **279**, 17158-17164.
- Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., Lai, M.M.**, 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285**, 107-110.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M., Kidd, V.J.**, 2000. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat. Med.* **6**, 529-535.
- Thackray, L.B., Holmes, K.V.**, 2004. Amino acid substitutions and an insertion in the spike glycoprotein extend the host range of the murine coronavirus MHV-A59. *Virology* **324**, 510-524.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., Siddell, S.G.**, 2001. Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J. Virol.* **75**, 6676-6681.
- Thompson, C.B.**, 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.

- Thornberry, N.A.**, 1997. The caspase family of cysteine proteases. *Br. Med. Bull.* **53**, 478-490.
- Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., Kaufman, R.J.**, 2000. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev.* **14**, 2725-2736.
- Todd, D.J., Lee, A.H., Glimcher, L.H.**, 2008. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 663-674
- Tolskaya, E.A., Romanova, L.I., Kolesnikova, M.S., Ivannikova, T.A., Smirnova, E.A., Raikhlin, N.T., Agol, V.I.**, 1995. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J. Virol.* **69**, 1181-1189.
- Trapp, B.D., Nave, K.A.**, 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 247-269.
- Tseng, C.T., Huang, C., Newman, P., Wang, N., Narayanan, K., Watts, D.M., Makino, S., Packard, M.M., Zaki, S.R., Chan, T.S., Peters, C.J.**, 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. *J. Virol.* **81**, 1162-1173.
- Tsunoda, I., Fujinami, R.S.**, 2002. Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. *Springer Semin. Immunopathol.* **24**, 105-125.
- Tsunoda, I., Tanaka, T., Saijoh, Y., Fujinami, R.S.**, 2007. Targeting inflammatory demyelinating lesions to sites of Wallerian degeneration. *Am. J. Pathol.* **171**, 1563-1575.
- Tuomanen, E.**, 1996. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 289-299.
- Umareddy, I., Pluquet, O., Wang, Q.Y., Vasudevan, S.G., Chevet, E., Gu, F.**, 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virol. J.* **4**, 91.
- Upton, J.P., Austgen, K., Nishino, M., Coakley, K.M., Hagen, A., Han, D., Papa, F.R., Oakes, S.A.**, 2008. Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell Biol.* **28**, 3943-3951.

- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D.**, 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**, 664-666.
- Vahsen, N., Cande, C., Dupaigne, P., Giordanetto, F., Kroemer, R.T., Herker, E., Scholz, S., Modjtahedi, N., Madeo, F., Le Cam, E., Kroemer, G.**, 2006. Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene* **25**, 1763-1774.
- Van Assche, G., Van Ranst, M., Sciot, R., Dubois, B., Vermeire, S., Noman, M., Verbeeck, J., Geboes, K., Robberecht, W., Rutgeerts, P.**, 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **353**, 362-368.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B.**, 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 368-373.
- van der Meer, Y., van Tol, H., Locker, J.K., Snijder, E.J.**, 1998. ORF1a-encoded replicase subunits are involved in the membrane association of the arterivirus replication complex. *J. Virol.* **72**, 6689-6698.
- van Dinten, L.C., Wassenaar, A.L., Gorbalya, A.E., Spaan, W.J., Snijder, E.J.**, 1996. Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. *J. Virol.* **70**, 6625-6633.
- van Huizen, R., Martindale, J.L., Gorospe, M., Holbrook, N.J.**, 2003. P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 15558-15564.
- van Laar, T., van der Eb, A.J., Terleth, C.**, 2002. A role for Rad23 proteins in 26S proteasome-dependent protein degradation? *Mutat. Res.* **499**, 53-61.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Vandenabeele, P.**, 2002. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* **9**, 20-26.

- Vattem, K.M., Wek, R.C.**, 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11269-11274.
- Vennema, H., Poland, A., Foley, J., Pedersen, N.C.**, 1998. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* **243**, 150-157.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L.**, 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 445-454.
- Verkhratsky, A.**, 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev.* **85**, 201-279.
- Versteeg, G.A., van de Nes, P.S., Bredenbeek, P.J., Spaan, W.J.**, 2007. The coronavirus spike protein induces endoplasmic reticulum stress and upregulation of intracellular chemokine mRNA concentrations. *J. Virol.* **81**, 10981-10990.
- Vijgen, L., Keyaerts, E., Moes, E., Thoelen, I., Wollants, E., Lemey, P., Vandamme, A.M., Van Ranst, M.**, 2005. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J. Virol.* **79**, 1595-1604.
- Wang, F.I., Fleming, J.O., Lai, M.M.**, 1992. Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: study of genetic sites affecting neuropathogenicity. *Virology* **186**, 742-749.
- Wang, H., Yu, S.W., Koh, D.W., Lew, J., Coombs, C., Bowers, W., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L.**, 2004. Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J. Neurosci.* **24**, 10963-10973.
- Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M., Lenardo, M.J.**, 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13884-13888.
- Wang, J., Lenardo, M.J.**, 1997. Essential lymphocyte function associated 1 (LFA-1): intercellular adhesion molecule interactions for T cell-mediated B cell apoptosis by Fas/APO-1/CD95. *J. Exp. Med.* **186**, 1171-1176.

- Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J., Prywes, R.**, 2000. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* **275**, 27013-27020.
- Wassenaar, A.L., Spaan, W.J., Gorbatenya, A.E., Snijder, E.J.**, 1997. Alternative proteolytic processing of the arterivirus replicase ORF1a polyprotein: evidence that NSP2 acts as a cofactor for the NSP4 serine protease. *J. Virol.* **71**, 9313-9322.
- Watanabe, R., Wege, H., ter Meulen, V.**, 1983. Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Nature* **305**, 150-153.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J.**, 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730.
- Weiner, L.P.**, 1973. Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis. *Arch. Neurol.* **28**, 298-303.
- Weiss, S.R., Leibowitz, J.L.**, 2008. Pathogenesis of murine coronavirus infection, in: Perlman, S., Gallagher, T., Snijder, E.J. (Eds.), *Nidoviruses*. ASM Press, Washington, pp. 259-278.
- Wild, T.F., Bijlenga, G.**, 1981. A rabies virus persistent infection in BHK21 cells. *J. Gen. Virol.* **57**, 169-177.
- Williams, B.L., Lipkin, W.I.**, 2006. Endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration in rats neonatally infected with borna disease virus. *J. Virol.* **80**, 8613-8626.
- Williams, R.K., Jiang, G.S., Holmes, K.V.**, 1991. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5533-5536.
- Williamson, J.S., Sykes, K.C., Stohlman, S.A.**, 1991. Characterization of brain-infiltrating mononuclear cells during infection with mouse hepatitis virus strain JHM. *J. Neuroimmunol.* **32**, 199-207.
- Wilquet, V., De Strooper, B.**, 2004. Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 582-588.
- Wilson, L., McKinlay, C., Gage, P., Ewart, G.**, 2004. SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology* **330**, 322-331.

- Woo, P.C., Lau, S.K., Chu, C.M., Chan, K.H., Tsoi, H.W., Huang, Y., Wong, B.H., Poon, R.W., Cai, J.J., Luk, W.K., Poon, L.L., Wong, S.S., Guan, Y., Peiris, J.S., Yuen, K.Y.,** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* **79**, 884-895.
- Woolhouse, M.E., Webster, J.P., Domingo, E., Charlesworth, B., Levin, B.R.,** 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat. Genet.* **32**, 569-577.
- Wu, G.F., Perlman, S.,** 1999. Macrophage infiltration, but not apoptosis, is correlated with immune-mediated demyelination following murine infection with a neurotropic coronavirus. *J. Virol.* **73**, 8771-8780.
- Xu, Y., Lou, Z., Liu, Y., Pang, H., Tien, P., Gao, G.F., Rao, Z.,** 2004. Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core. *J. Biol. Chem.* **279**, 49414-49419.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., Korsmeyer, S.J.,** 1999. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell Biol.* **19**, 8469-8478.
- Yamamoto, K., Suzuki, N., Wada, T., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R.J., Mori, K.,** 2008. Human HRD1 Promoter Carries a Functional Unfolded Protein Response Element to Which XBP1 but not ATF6 Directly Binds. *J. Biochem.* **144**, 477-486
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R.J., Mori, K.,** 2004. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem.* **136**, 343-350.
- Yan, W., Frank, C.L., Korth, M.J., Sopher, B.L., Novoa, I., Ron, D., Katze, M.G.,** 2002. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15920-15925.
- Yang, J., Murphy, T.L., Ouyang, W., Murphy, K.M.,** 1999. Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur. J. Immunol.* **29**, 548-555.
- Yang, X., Chang, H.Y., Baltimore, D.,** 1998. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol. Cell* **1**, 319-325.

- Yasuda, O., Fukuo, K., Sun, X., Nishitani, M., Yotsui, T., Higuchi, M., Suzuki, T., Rakugi, H., Smithies, O., Maeda, N., Ogihara, T.**, 2006. Apop-1, a novel protein inducing cyclophilin D-dependent but Bax/Bak-related channel-independent apoptosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 23899-23907.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L.**, 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**, 1355-1364.
- Yeh, E.A., Collins, A., Cohen, M.E., Duffner, P.K., Faden, H.**, 2004. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* **113**, e73-76.
- Yokomori, K., Banner, L.R., Lai, M.M.**, 1991. Heterogeneity of gene expression of the hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronaviruses. *Virology* **183**, 647-657.
- Yokomori, K., Lai, M.M.**, 1992. Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *J. Virol.* **66**, 6194-6199.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., Tohyama, M.**, 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* **276**, 13935-13940.
- Yoo, D.W., Parker, M.D., Babiuk, L.A.**, 1991. The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. *Virology* **180**, 395-399.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K.**, 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 33741-33749.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K.**, 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K.**, 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6755-6767.

- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., Mori, K.**, 2006. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* **172**, 565-575.
- Youngner, J.S., Preble, O.T., Jones, E.V.**, 1978. Persistent infection of L cells with vesicular stomatitis virus: evolution of virus populations. *J. Virol.* **28**, 6-12.
- Yount, B., Curtis, K.M., Fritz, E.A., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Prentice, E., Denison, M.R., Geisbert, T.W., Baric, R.S.**, 2003. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12995-13000.
- Yu, C.Y., Hsu, Y.W., Liao, C.L., Lin, Y.L.**, 2006. Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J. Virol.* **80**, 11868-11880.
- Zaichick, S.V., Bohannon, K.P., Smith, G.A.**, 2011. Alphaherpesviruses and the cytoskeleton in neuronal infections. *Viruses* **3**, 941-981.
- Zamzami, N., Larochette, N., Kroemer, G.**, 2005. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**, 1478-1480.
- Zelus, B.D., Schickli, J.H., Blau, D.M., Weiss, S.R., Holmes, K.V.**, 2003. Conformational changes in the spike glycoprotein of murine coronavirus are induced at 37 degrees C either by soluble murine CEACAM1 receptors or by pH 8. *J. Virol.* **77**, 830-840.
- Zhang, C., Kawauchi, J., Adachi, M.T., Hashimoto, Y., Oshiro, S., Aso, T., Kitajima, S.**, 2001. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAFF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 718-724.
- Zhang, C.Y., Wei, J.F., He, S.H.**, 2006. Adaptive evolution of the spike gene of SARS coronavirus: changes in positively selected sites in different epidemic groups. *BMC Microbiol.* **6**, 88.
- Zhang, K., Kaufman, R.J.**, 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455-462.
- Zheng, L., Trageser, C.L., Willerford, D.M., Lenardo, M.J.**, 1998. T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. *J. Immunol.* **160**, 763-769.

- Zheng, Y., Gao, B., Ye, L., Kong, L., Jing, W., Yang, X., Wu, Z., Ye, L.**, 2005. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *J. Microbiol.* **43**, 529-536.
- Zhirnov, O.P., Konakova, T.E., Garten, W., Klenk, H.**, 1999. Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. *J. Virol.* **73**, 10158-10163.
- Zhivotovsky, B.**, 2003. Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem.* **39**, 25-40.
- Zhou, D., Hemmer, B.**, 2004. Specificity and degeneracy: T cell recognition in CNS autoimmunity. *Mol. Immunol.* **40**, 1057-1061.
- Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R.**, 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* **92**, 57-70.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., Ron, D.**, 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **12**, 982-995.
- Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J., Thompson, C.B.**, 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* **162**, 59-69.
- Zoratti, M., Szabo, I.**, 1994. Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 543-553.
- Zoratti, M., Szabo, I.**, 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 139-176.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X.**, 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549-11556.
- Zuniga, S., Cruz, J.L., Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L., Enjuanes, L.**, 2010. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* **84**, 2169-2175.
- Zuniga, S., Sola, I., Moreno, J.L., Sabella, P., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.**, 2007. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* **357**, 215-227.