

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

CONSEQUENCES NEUROLOGIQUES DES CLIVAGES DE LA GLYCOPROTEINE S DU CORONAVIRUS NEUROINVASIF HUMAIN OC43

Par Alain Le Coupanec

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

Philosophiae doctor (Ph.D.)

en virologie et immunologie

Soutenue le 26 mars 2018

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Examinateur externe

Examinateur externe

Directeur de recherche

Laurent Chatel-Chaix INRS-Institut Armand-Frappier

Marceline Cote Université d'Ottawa

Catherine Larochelle Université du Montréal, CrCHUM

Pierre Talbot INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Alain Le Coupanec, 2018

"Un pessimiste voit la difficulté dans chaque opportunité, un optimiste voit l'opportunité dans chaque difficulté"

"C'est une belle chose d'être honnête, mais il est également important d'avoir raison"

WINSTON CHURCHILL

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 m'aider à relativiser les choses. Il m'est difficile ici de souligner la participation de tous, mais ma reconnaissance s'exprime bien au-delà de ces lignes.

Premièrement, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le professeur Pierre J. Talbot, d'une part pour m'avoir accepté dans son laboratoire de neuro-immunovirologie et d'autre part, pour m'avoir transmis ce désir de se dépasser et de diriger pour devenir un scientifique accompli. Merci pour les nombreux conseils formateurs et perfectionnistes qui m'ont permis d'avancer et de prendre confiance en mes recherches et mes convictions. Merci enfin de m'avoir permis d'assister à de nombreux congrès scientifiques nationaux et internationaux associant le plaisir de voyager et de rencontrer des scientifiques du monde entier.

Je ne pourrais passer sous silence l'importance du "bras droit" de Pierre, le Dr Marc Desforges, l'associé de recherche sans qui ce doctorat n'aurait pas été le même. Merci pour tes conseils formateurs, les nombreuses discussions, tes suggestions, tes encouragements, ton encadrement et pour l'ambiance de travail très agréable durant ces cinq années de recherche.

Je remercie les collègues étudiants en maitrise ou au doctorat, passés ou présents, pour les moments agréables passés avec eux, leurs encouragements et leurs conseils.

Une mention particulière s'impose pour Carl Langevin, Marie-Eve Dube et leurs enfants Florent et Ellie-Rose Langevin. Vous avez été tout simplement superbes pendant ces cinq années. Vous m'avez accueillis au sein de votre famille, fait découvrir certaines traditions du Québec. Et par-dessus tous, vous avez été d'excellent amis. Pour tous ceci, un grand merci!

Il ne fait aucun doute que sans l'amitié précieuse d'une certaine personne, je n'aurai probablement pas terminé ce doctorat. Et oui, il s'agit bien de toi « mon beau Marc ». Tu as été ce que l'on appelle nous les Français, un meilleur ami! Je ne saurai jamais assez te remercier pour avoir fait de moi ce que je suis devenu aujourd'hui, tant sur le plan scientifique que personnel. Même si il est encore difficile de voir autre chose que le blanc et le noir, je parviens à percevoir de faibles teintes de gris par moments! Puis n'oublie pas, dans la vie, « il y a toujours quelqu'un qui tombe, fait en sorte que se ne soit pas toi » :-) Crois moi, jamais je ne pourrai oublier tous tes efforts me concernant. Pour tout ceci, un énorme merci.

Enfin j'aimerais souligner la participation inestimable de ma famille. Mes parents Jean-Claude et Sylvie Le Coupanec, mon frère Jean-Pierre Le Coupanec et mon fidèle compagnon Rex, vous avez été une aide primordiale lors de cette aventure. Certaines personnes disent que pour faire un doctorat, il faut être cinglé, et bien je vous le confirme. Sans votre soutien moral, psychologique et financier je n'aurai sans doute jamais fini, voire même commencé ce périple. C'est avec la plus grande des émotions que je vous remercie infiniment pour tout.

MERCI à vous tous!!!

RESUME

Les coronavirus humains (HCoV) sont des virus respiratoires opportunistes infectant les voies respiratoires supérieures pour y provoquer le rhume. Ces virus peuvent également envahir le système nerveux central (SNC) et y infecter les cellules résidentes, étant ainsi potentiellement associés au développement de maladies neurologiques. Les travaux de recherche du laboratoire ont montré que la souche HCoV-OC43 est neuroinvasive et neurotrope chez l'humain et chez la souris. La glycoprotéine virale S est un des facteurs de virulence majeurs pour plusieurs coronavirus, incluant le HCoV-OC43. Afin d'étudier le rôle de cette protéine dans la neuroinvasion et dans la propagation virale au SNC et d'identifier les acides aminés associés à cette fonction, nous avons comparé la séquence du gène S de la souche de référence du laboratoire à celles de virus détectés à partir d'isolats cliniques des voies respiratoires humaines. Bien que la séquence du site de clivage potentiel S2' situé en amont du peptide de fusion reste inchangée, nous avons pu mettre en évidence que l'ensemble des virus provenant des isolats cliniques possédait (parmi 7 mutations prépondérantes), une mutation dans le gène S favorisant la création d'un site de clivage pour la furine nommée S1/S2. Ainsi, nous avons, à l'aide de clones infectieux, obtenus des virus mutants au niveau des sites S1/S2 (G758R) et à S2' (R903A). Nous avons pu mettre en évidence que les propriétés neuroinvasives de ces variants sont altérées. De plus, nous avons observé une diminution de la propagation des variants G758R et R903A dans des lignées de cellules neurales, ainsi qu'à l'intérieur du SNC associée à une neurovirulence atténuée, voire inexistante chez la souris. Nous avons pu démontrer que le HCoV-OC43 envahit le SNC principalement par le nerf olfactif et l'ensemble de nos résultats suggère un rôle important des différents clivages (S1/S2 et S2') de la glycoprotéine S dans une interaction hôte-pathogène.

Cette étude nous a permis de mieux caractériser le rôle des clivages de la glycoprotéine S dans la neuroinvasion, le neurotropisme et la neurovirulence. Nous pouvons maintenant spéculer quant à de possibles cibles thérapeutiques. En permettant un clivage au niveau de S1/S2 par des protéases de l'hôte, et en inactivant celui à S2', nous pourrions affecter la neuroinvasion et la neuropropagation, ainsi que la neurovirulence potentielle associée à une infection par le HCoV-OC43 chez l'humain.

Keywords : HCoV-OC43, Coronavirus, Glycoprotéine de surface, Clivage protéolytique, Protéases, Neuroinvasion, Neuropropagation, Neurotropisme, Production virale, Pathogénèse

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	V
RESUME	vii
SOMMAIRE	ix
LISTE DE FIGURES	xiii
LISTE DE TABLEAUX	xix
LISTE DES ABREVIATIONS	xxi
LISTE DES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	xxv
LISTE DES PUBLICATIONS	xxvii
LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES	xxix
LISTE DES COMMUNICATIONS PAR AFFICHES	xxxi
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES	33
1. LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL (SNC)	35
1.1- Structure, organisation et protection du SNC	35
1.1.1- Structure et organisation et fonction du SNC	35
1.1.2- Protection et maintien du SNC	38
1.1.2.1- Les méninges	38
1.1.2.2- Le liquide céphalo-rachidien	39
1.1.2.3- La barrière hémato-encéphalique	41
1.2- Les cellules du SNC	43
1.2.1- Les neurones	43
1.2.2- Les astrocytes	46
1.2.3- Les oligodendrocytes	48
1.2.4- Les microglies	48
1.2.5- Les cellules épendymaires	49
1.3- La matrice extracellulaire	50
1.4- Les nerfs crâniens	50
1.5- Infection virale du SNC	51
1.5.1- Neuroinvasion, neurotropisme, neurovirulence et neuropropagation	51
1.5.2- Stratégies d'entrée virale au SNC	52
1.5.3- SNC: adaptation, persistance et évasion virale	55
1.5.4- Pathologies neurologiques associées aux infections virales	56
1.5.5- Réponses immunitaires face aux infections virales	60
2. LES CORONAVIRUS	67

2.1- Généralités et classification	67
2.1.1- Généralités	67
2.1.2- Classification	67
2.2- Le cycle réplicatif	69
2.3- Biologie des coronavirus	72
2.3.1- Morphologie des virions	72
2.3.2- Protéines accessoires	73
2.3.3- Protéines non structurales	73
2.3.4- Protéines structurales	74
2.3.4.1- Protéine de la nucléocapside N	74
2.3.4.2- Protéine de membrane M	74
2.3.4.3- Protéine d'enveloppe E	75
2.3.4.4- Protéine hémagglutinine-estérase HE	75
2.4- La glycoprotéine de spicule S	76
2.4.1- Généralités	76
2.4.2- Structure	76
2.4.3- Fonctions	77
2.4.4- Évolution et adaptation	79
2.5- Pathologies et réponses immunitaires associées aux infections coron	avirales82
2.5.1- Les Coronavirus non humains	82
2.5.1.1- MuCoV	82
2.5.1.2- FeCoV	83
2.5.1.3- PHEV	84
2.5.2- Les Coronavirus humains endémiques	84
2.5.2.1- HCoV-OC43	84
2.5.2.2- Les HCoV-229E, -NL63 et -HKU1	86
2.5.3- Les Coronavirus émergents	87
2.5.3.1- Le SARS-CoV	87
2.5.3.2- Le MERS-CoV	88
3. ENTREE ET PROPAGATION VIRALE	89
	89
3.1- Entrée des coronavirus dans la cellule	
3.1- Entrée des coronavirus dans la cellule3.2- Les protéases	92
3.1- Entrée des coronavirus dans la cellule3.2- Les protéases3.2.1- Généralités	
 3.1- Entrée des coronavirus dans la cellule 3.2- Les protéases 3.2.1- Généralités 3.2.2- Les protéases à Sérine 	
 3.1- Entrée des coronavirus dans la cellule 3.2- Les protéases 3.2.1- Généralités	

3.2.2.3- Les trypsine-like protéases transmembranaires	96
3.2.3- Les protéases à cystéines: les cathepsines	
3.3- Clivage des glycoprotéines virales par des protéases cellulaires	
3.3.1- Généralités	
3.3.2- Les Coronavirus	101
3.3.2.1- MuCoV	101
3.3.2.2- IBV	101
3.3.2.3- FCoV	102
3.3.2.4- SARS-CoV	102
3.3.2.5- MERS-CoV	103
3.3.3- Les autres virus enveloppés	104
4. CONCLUSIONS	107
HYPOTHESES ET OBJECTIFS	109
CHAPITRE II: PUBLICATIONS	111
Publication n°1	113
Publication n°2	167
Publication n°3	223
Publication n°4	
CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE	293
CONCLUSION	313
PERSPECTIVES	315
BIBLIOGRAPHIE	317

LISTE DE FIGURES

INTRODUCTION:

Figure 1: Schéma représentant les fonctions essentielles du système nerveux......35

Figure 3. Schéma d'une coupe transversale d'un cerveau humain. La matière blanche est constituée des axones des neurones et est située à l'intérieur du cerveau, tandis que la matière grise est constituée des corps cellulaires des neurones et est située à la périphérie du cerveau. Tiré de http://www.cours pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html37

Figure 5. Schéma de la circulation du LCR dans le SNC. Les flèches noires indiquent le sens du flux du LCR provenant des plexus choroïdes, puis regagnant le sang dans les sinus duraux; les flèches blanches indiquent le flux de sang. Tiré de http://www.remede.org/librairiemedicale/pdf/e-9782224029944.pdf......40

Figure 7. A-Schéma représentant les différents types neuronaux : multipolaires, bipolaire et unipolaire. Tiré de https://de.123rf.com/photo_54018259_neuron-typen-nervenzellen-die-denhauptteil-des nervensystems-ist.html. B- Schéma représentant les différentes parties d'un neurone. Tiré de http://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html.46

Figure 8. Schéma de la muqueuse et du bulbe olfactif. La muqueuse olfactive est composée de l'épithélium olfactif (OE) et de la lamina propria. Trois types de cellules se trouvent dans l'OE, les neurones sensoriels olfactifs (OSN), les cellules sustentaculaires et les cellules basales. Les dendrites des OSN se projettent vers la couche de mucus où les cils exprimant

Figure 9. A-Schéma représentant les différents types neuronaux : multipolaires, bipolaire et unipolaire. Tiré de https://de.123rf.com/photo_54018259_neuron-typen-nervenzellen-die-denhauptteil-des nervensystems-ist.html. B- Schéma représentant les différentes parties d'un neurone. Tiré de http://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html.46

Figure 13. Localisation des mutations prédominantes (D24Y, S83T, H183R et Y241H) acquises suite à l'infection persistante du virus sur des lignées neurales humaines. Les

Figure 16. Diagramme des différentes protéases de la cellule hôte connues pour cliver et activer la glycoprotéine S des coronavirus. Tirée de (Millet *et al.*, 2015)......100

Figure 17: Cleavage of S glycoprotein is also observed in human LA-N-5 cells for mutant virus. The differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was infected with rOC/ATCC or rOC/SG758R at MOI 0.1. Proteins in association with cell or in supernatant were extracted at 24 and 48 hpi, and kinetics of viral replication was evaluated over a period of 48 hpi for (A) cell-associated virus or (B) free virus (supernatant). Titers of cell-associated and free virus were significantly higher for rOC/S_{G758R} compared to rOC/ATCC (* P≤0.05 and ** P≤0.01). Western blot analysis of whole cell lysates (C) or cell culture supernatant (D) (10 µg of proteins) revealed the presence of the uncleaved form of the S glycoprotein (180 kDa), and of a cleaved form at around 100 kDa (S1/S2). Results shown are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments. Figure 6: The S glycoprotein harboring a predominant point mutation found in clinical isolates was cleaved more efficiently in supernatant of CNS cells. Mixed primary cultures from BALB/c mice brain were infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.03. Kinetics of infectious virus production in cellassociated (A) and in cell culture supernatant (free virus) (B) was performed. Release of free virus in the supernatant was significantly higher for rOC/S_{G758R} compared to rOC/ATCC (* P≤0.05). (C) Western blot analysis of whole cell lysates (C) or cell culture supernatant (D) (10 µg of proteins) revealed the presence of the uncleaved form of the S glycoprotein (180 kDa), and of a cleaved form at around 100 kDa (S1/S2). Results shown are the mean values (with

Figure 18: Cleavage of S glycoprotein is also observed in human LA-N-5 cells for mutant virus. The differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.1. Proteins in association with cell or in supernatant were extracted at 24 and 48 hpi, and kinetics of viral replication was evaluated over a period of 48 hpi for (A) cell-associated virus or (B) free virus (supernatant). Titers of cell-associated and free virus were significantly higher for rOC/S_{G758R} compared to rOC/ATCC (* P≤0.05 and ** P≤0.01). Western blot analysis of whole cell lysates (C) or cell culture supernatant (D) (10 μ g of proteins) revealed the presence of the uncleaved form of the S glycoprotein (180 kDa),

Figure 7: Cleavage of S glycoprotein is also observed in human LA-N-5 cells for mutant virus. The differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was infected with rOC/ATCC or rOC/SG758R at MOI 0.1. Proteins in association with cell or in supernatant were extracted at 24 and 48 hpi, and kinetics of viral replication was evaluated over a period of 48 hpi for (A) cell-associated virus or (B) free virus (supernatant). Titers of cell-associated and free virus were significantly higher for rOC/SG758R compared to rOC/ATCC (* P≤0.05 and ** P≤0.01). Western blot analysis of whole cell lysates (C) or cell culture supernatant (D) (10 µg of proteins) revealed the presence of the uncleaved form of the S glycoprotein (180 kDa), and of a cleaved form at around 100 kDa (S1/S2). Results shown are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments. Figure 19: Cleavage of S glycoprotein is also observed in human LA-N-5 cells for mutant virus. The differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.1. Proteins in association with cell or in supernatant were extracted at 24 and 48 hpi, and kinetics of viral replication was evaluated over a period of 48 hpi for (A) cell-associated virus or (B) free virus (supernatant). Titers of cell-associated and free virus were significantly higher for rOC/S_{G758R} compared to rOC/ATCC (* P≤0.05 and ** P≤0.01). Western blot analysis of whole cell lysates (C) or cell culture supernatant (D) (10 µg of proteins) revealed the presence of the uncleaved form of the S glycoprotein (180 kDa), and of a cleaved form at around 100 kDa (S1/S2). Results shown are the mean values (with standard deviations) of

PUBLICATION 1:

Figure 2: A delay in viral spread is observed in brain of rOC/SG758R -infected mice compared to rOC/ATCC after intranasal inoculation in 10 day-old BALB/c mice......128

Figure 4: A delay in viral spread is observed in brains of rOC/SG758R -infected mice compared to rOC/ATCC after intracerebral infection in 21 day-old BALB/c female mice.....133

S2 Fig: Astrogliosis is more important for rOC/ATCC compared to rOC/SG758R in infected mouse brain after intracerebral injection in 21 day-old BALB/c female mice......134

S3 Fig: Both variants are able to infect astrocytes as a secondary target in mixed primary NS cultures from BALB/c mice at 24 hpi
Figure 6: The S glycoprotein harboring a predominant point mutation found in clinical isolates was cleaved more efficiently in supernatant of CNS cells
Figure 7: Cleavage of S glycoprotein is also observed in human LA-N-5 cells for mutant virus
S4 Fig: The S glycoprotein was cleaved at a second cleavage site139
Figure 8: Proprotein convertase as a potential player in S glycoprotein cleavage140
S5 Fig: Modulation of viral replication in a dose-dependent manner by dec-RVLR-cmk141
Figure 9: Morphology of viral crown peplomers is dependent on cleavage of the S glycoprotein but does not affect virus infectivity

PUBLICATION 2:

Figure 1: Mutation in S1/S2 and S2' site does not impaired viral infectivity of HCoV-OC43 in epithelial cell, but does in neuronal cell
Figure 2: Cathepsin B and L are potential players in S glycoprotein cleavage at S2' site185
Figure 3: Endosomal acidification and proteases are necessary for efficient entry of HCoV- OC43 into neuronal cells
S1 Fig: The cleavage at S1/S2 site in S glycoprotein module viral entry by endosomal pathway
S2 Fig: Camostate mesylate does not alter viral entry of rOC/ATCC and rOC/SG758R mutant virus in LA-N-5 cell
Figure 4: The S2' site in S glycoprotein is necessary to efficiently produce infectious viral particles and for high propagation in neuronal cell culture
Figure 5: rOC/SR903A mutant virus have difficulty to spread in the CNS compared to rOC/ATCC and rOC/SG758R after intracerebral inoculation
Figure 6: Putative S2' cleavage site is essential for efficient replication in CNS194
Figure 7: Ependymal cells were infected by reference virus, but not by both mutant rOC/SG758R and rOC/SR903A viruses
S3 Fig: Ependymal cells were infected by rOC/ATCC reference virus after IC injection on

Figure 9: rOC/SR903A mutant viruses is less neurinvasive compared to rOC/ATCC and rOC/SG758R viruses in C57BI/6 mice after intranasal (IN) injection......202

PUBLICATION 3:

Figure 1: Intranasal inoculation of HCoV-OC43 leads to direct colonization of the CNS241
Figure 2. Intranasally inoculated HCoV-OC43 infects olfactory sensory neurons (OSN) in the nasal cavity of 15 day-old mice to invade the CNS242
Figure 3. HCoV-OC43 enters the CNS at the olfactory bulb and starts to propagate using neuronal networks associated with olfaction before spreading towards brainstem
Figure 4: HCoV-OC43 Spike and nucleocapsid proteins are associated with axons in vivo
Figure 5 : HCoV-OC43 forms viral platform at the surface of axons in culture246
S3 Fig: The Spike-specific polyclonal antibody is not neutralizing248
Figure 6 Spike platforms on LA-N-5 axons are static along axons, yet temporally dynamic
Figure 7: HCoV-OC43 sustains cell-to-cell propagation252
S1 Fig: HCoV-OC43 propagation without syncytium formation253
S2 Fig: Microtubule-disturbing agents disrupt LA-N-5 axons
Figure 8: Axons allow neuron-to-neuron propagation255
Figure 9: Neuron-to-neuron propagation is modulated by both cellular and viral factors258

PUBLICATION 4:

Figure 1: Modèle de neuroinvasion par le nerf olfactif et dissémination dans le sy	ystème
nerveux central	287
Figure 2: Modèle d'infection de cellule neuronale et de production de nouvelles par	rticules
virales par le coronavirus humain OC43	290

LISTE DE TABLEAUX

Tableau I: Exemples de neurotransmetteurs (NT) et leurs fonctions au sein du SNC. 46
Tableau II: Description des 12 paires de nerfs crâniens
Tableau III: Liste des virus neurotropes et pathologies associées. Modifié de Desforges M, Meessen-
Pinard M et Talbot PJ., 2016; McGavern DB et Kang SS, De chiara G et al, 2012; Huan HI et Shih SR
2015; Swanson PA, McGavern DB 2015. HCoV : Coronavirus humain; GB :syndrome de Guillain-
Barré ; ADEM : encéphalomyélite aiguë disséminée ; MD: Maladie d'Alzheimer; MP: Maladie de
Parkinson; SLA: Sclérose latérale amyotrophique; SEP : sclérose en plaques ; CNP: cellule neurale
progénitrice; ND : non-déterminé
Tableau IV: Distribution tissulaire des différentes proprotéines convertases. Adapté de (Seidah et al.,
2012)
Tableau V: Distribution associée à la sous-famille des Hepsin/TMPRSS. Adapté de (Szabo et al., 2008).
Niveaux d'ARNm confirmés expérimentalement dans différents tissus: co, côlon; fo, foie; pou,
poumon; pa, pancréas; pro, prostate; tr, trachée; coc, cochlée; coe, coeur; ova, ovaires; pl, placenta;
rat, rate; ig, intestin grêle; tes, testicules; thr, thyroïde; ves, vessie; oes, oesophage; es, estomac; duo,
duodénum; me, moelle épinière; cer, cerveau; hyp, hypophyse; thm, thymus; cn, cavité nasale 97
Tableau VI: Distribution associée aux cathepsines à cystéines humaines. Adapté de (Small et al.,
2011)

PUBLICATION 3:

LISTE DES ABREVIATIONS

ACE2: Angiotensin converting enzyme 2

AMPA: a-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

APN: *Aminopeptidase-N*

ATP: Adénosine triphosphate

BHE: Barrière hémato-encéphalique

BDNF: Facteur de croissance des nerfs dérivés du cerveau (*Brain-derivated nerve growth factor*)

BMECs: Cellules endothéliales microvasculaires du cerveau (*Brain microvascular endothelial cells*)

BO: Bulbe olfactif

CEACAM1a: Carcinoembryonic cell adhesion molecule 1a

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: Cellules présentatrices d'antigènes

DAMPs: Patron moléculaire associé aux dommages (*Damage-associated molecular patterns*)

DESC: Differentially expressed in squamous cell carcinoma-1

DPP4: *Dipeptidyl peptidase 4*

EBV: Virus Epstein-Barr

EPL: Couche plexiforme externe

FCoV: Coronavirus félin (Feline Coronavirus)

GABA: Acide γ-aminobutyrique (*Gamma-aminobutyric acid*)

GAPDH: Glycéraldhyde-3-phosphate dehydrogénase

GDNF: Facteur de croissance des nerfs dérivés des cellules gliales (*Growth derivatived nerve factor*)

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GL: Couche glomérulaire

HAT: *human airway trypsin-like protease*

HCoV: Coronavirus humain (Human Coronavirus)

HR: Heptad repeat 1 and 2, HR1and HR2

HSV-1,2: Virus de l'Herpes 1, 2

HTLV-1: Virus lymphotrope T humain (Human T-lymphotropic virus)

IBV: Avian Infectious Bronchitis Virus

IFN-y: Interferon gamma

IGF-1: Facteur de croissance à l'insuline (Insulin-like growth factor)

IL: Interleukine

ISG: Gènes stimulant l'interféron (Interferon-stimulated genes)

JAM: Molécule jonctionnelle d'adhésion

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

LCR: Liquide céphalo-rachidien

LDLR: Lipopolyprotéine à faible densité

LPS: Lipopolysaccharides

MAP: Protéines associées aux microtubules (Microtubule-associated protein)

MBP: Protéine basique de la myéline (Myelin basic protein)

MD: Maladie d'Alzheimer

MCL: Couche de cellules mitrale

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

MEC: Matrice extracellulaire

MERS-CoV: Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus

MHV: Murine Hepatitis Virus

MMP: Métalloprotéinase de la matrice (Matrix metalloproteinase)

MOBP: Protéine basique de la myéline associée aux oligodendrocytes (Myelin-Associated Oligodendrocyte Basic Protein)

MOG: Glycoprotéine de la myéline d'oligodendrocytes (*Myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

MP: Maladie de Parkinson

NF-KB: Nuclear factor-kappa B

NGF: Facteur de croissance des nerfs (Nerve growth factor)

NK: Cellules Natural Killer

NMDA: N-methyl-D-aspartic acid

NO: Oxyde nitrique (*Nitrogen oxide*)

NRO: Neurones récepteurs olfactifs

OE: Epithélium olfactif

ONL: Couche de nerf olfactif (olfactory nerve layer)

OPC: Cellules progénitrices des oligodendrocytes (Oligodendrocytes progenitor cells)

ORF: Cadre de lecture (Open Reading Frame)

OSN: Neurone sensoriel olfactif

PAMPs: Motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-associated molecular patterns*)

PC: Protéine convertases

PCR: Polymerase chain reaction

PCSK: Proprotein convertase subtilisin/kesin

PDEV: DESC (differentially expressed in squamous cell carcinoma-1)

PHEV: Porcine Hemagglutine encephalitis virus

PDGF: Facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-derivated growth factor*)

PLP: Protéine protéolipidique (Proteolipid protein)

PRRs: Récepteurs de reconnaissance de motifs (Pattern recognition receptors)

RdRp: ARN polymérase ARN-dépendante

RBD: Région de liaison au récepteur, Receptor Binding Domain

RLR: RIG-like receptor

ROS: Espèces réactives oxygénées (Reactive oxygen species)

RTC: Complexe de réplication-transcription (Replication-Transcription complex)

SARS-CoV: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus

SEP: Sclérose en plaques

SLA: Sclérose latérale amyotrophique

SN: Système nerveux

SNC: Système nerveux central

SNP: Système nerveux périphérique

STAT1: Signal transducer and activator of transcription 1

TLR: Récepteur homologue à Toll (Toll-like receptor)

TGF-β: Facteur beta de croissance des tissus (*Tissus growth factor beta*)

TGN: Trans golgi network

TGEV: Virus de la gastroentérite transmissible porcine (*Transmissible gastroenteritis virus*)

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

TMPRSS: Transmembrane serine protease

TNF-α: Tumour-necrosis alpha

TRS: Séquence régulatrice transcriptionnelle

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VSV: Virus de la stomatite vésiculaire

WNV: Virus du Nil occidental (West Nile virus)

ZO: Zonula occludens

LISTE DES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

LISTE DES PUBLICATIONS

ALAIN LE COUPANEC, MARC DESFORGES, MATHIEU MEESSEN-PINARD, MATHIEU DUBE, ROBERT DAY, NABIL G SEIDAH, PIERRE J TALBOT - (2015) *Cleavage of a neuroinvasive human respiratory virus spike glycoprotein by proprotein convertases modulates neurovirulence and virus spread within the central nervous system.* Plos Pathogens. 2015;11(11).

ALAIN LE COUPANEC, BENEDIKT KAUFER, MARC DESFORGES, PIERRE J TALBOT - (2017) *Manipulating neuroinvasive human coronavirus OC43 S protein cleavage by host-cell proteases as potential therapeutic approach to abrogate viral infection, propagation, and neuropathology within central nervous system.* Plos Pathogens. Soumis 11/2017

MATHIEU DUBE, <u>ALAIN LE COUPANEC</u>, ALAN H. M WONG, JAMES M. RINI, MARC DESFORGES, PIERRE J TALBOT - (2017) Axonal transport enables neuron-to-neuron neuroinvasion and propagation of HCoV-OC43 in the CNS. Plos Pathogens. Soumis 11/2017

PIERRE J TALBOT, MARC DESFORGES, MATHIEU DUBE, <u>ALAIN LE COUPANEC</u> - (2016). Coronavirus respiratoires humains neurotropes: une relation ambigüe entre neurovirulence et clivage protéique - Medecine/Science.

MATHIEU MEESSEN-PINARD, **ALAIN LE COUPANEC**, MARC DESFORGES, PIERRE J TALBOT - (2017) Pivotal role of receptor-interacting protein kinase 1 and mixed lineage kinage domain-like in neuronal cell death induced by the human neuroinvasive coronavirus OC43. Journal of Virology. 91 (1). J'ai réalisé la partie *in vivo* de cet article, en plus d'avoir effectué les cultures de cellules neurales primaires murines.

JENNY K STODOLA, GUILLAUME DUBOIS, <u>ALAIN LE COUPANEC</u>, MARC DESFORGES, PIERRE J TALBOT - (2018). *The neurinvasive OC43 human coronavirus envelope protein is a critical determinant of neurovirulence in CNS pathology* - Virology 515 (134-139). J'ai apporté l'expertise nécessaire pour effectuer les cultures primaires mixtes du SNC de souris, ainsi que toutes les connaissances théoriques et pratique pour les expériences *in vivo*.

MARC DESFORGES, <u>ALAIN LE COUPANEC</u>, ELODIE BRISON, MATHIEU MEESSEN-PINARD, PIERRE J TALBOT (2014) - *Neuroinvasive and neurotropic human respiratory coronaviruses: potential neurovirulent agents in humans* - Adv. Exp. Med. Biol. 807: 75-96.

MARC DESFORGES, <u>ALAIN LE COUPANEC</u>, ELODIE BRISON, MATHIEU MEESSEN-PINARD, PIERRE J TALBOT (2014). Coronavirus humains respiratoires neuroinvasifs et neurotropes: agents neurovirulents potentiels - Virologie. 18 (1): 5-16.

MARC DESFORGES, <u>ALAIN LE COUPANEC</u>, JENNY STODOLA, MATHIEU MEESSEN-PINARD, PIERRE J TALBOT (2014). *Human coronaviruses : viral and cellular factors involved in neuroinvasiveness and neuropathogenesis* - Virus Res. 19 ;194 :145-58.

LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES

<u>ALAIN LE COUPANEC</u>, MARC DESFORGES, PIERRE J TALBOT - (2014) A single point mutation in the spike glycoprotein of HCoV-OC43 modulates neurovirulence and neuroinvasion in mice. XIIth International Nidovirus Symposium, Salamanca, Espagne, 2 juin 2014.

ALAIN LE COUPANEC, MATHIEU MEESSEN-PINARD, ROBERT DAY, NABIL G SEIDAH, MARC DESFORGES, and PIERRE J TALBOT - (2015) *Cleavage of the human coronavirus OC43 spike glycoprotein modulates viral infection and neurovirulence in mice: a possible link with innate immunity and viral persistence.* 10th Annual Neuroinflammation Symposium , Residence Hall, McGill University, Montréal, Québec, 10 juin 2015.

ALAIN LE COUPANEC, MARC DESFORGES, MATHIEU MEESSEN-PINARD, MATHIEU DUBE et PIERRE J TALBOT - (2015) Rôle du clivage de la glycoprotéine S du coronavirus respiratoire humain HCoV-OC43 dans la **neurovirulence chez la souris.** 9^{ème} édition du congrès Armand-Frappier 2015, Hotel Chéribourg, Orford, Québec, 12-14 novembre 2015.

LISTE DES COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

<u>ALAIN LE COUPANEC</u>, MARC DESFORGES, PIERRE J TALBOT - (2013) *The importance of genetic variation of human coronavirus OC43 in neuroinvasion, neurotropism and neuropathology.* 8th Annual Neuroinflammation Symposium , Residence Hall, McGill University, Montréal, Québec, 6 juin 2013.

ALAIN LE COUPANEC, MARC DESFORGES, PIERRE J TALBOT - (2013) Importance de la variation génétique du coronavirus humain OC43 dans la neuroinvasion, le neurotropisme et la neuropathologie. 8ème édition du congrès Armand-Frappier 2013, Hôtel Estrimont Suites et Spa, Orford, Québec, 14-16 novembre 2013.

ALAIN LE COUPANEC, MARC DESFORGES, PIERRE J TALBOT - (2014) The importance of the genetic variation of human respiratory coronavirus OC43 in neuroinvasion, neurotropism and neuropathology. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014) - XIVth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XIVth International Congress of Mycology, XVIth International Congress of Virology, Palais des congrès, Montréal 27 juillet - 1er août 2014.

ALAIN LE COUPANEC, MARC DESFORGES, MATHIEU DUBE, PIERRE J TALBOT - (2016) *Cleavage of the human coronavirus -OC43 spike glycoprotein modulates viral spreading in the mouse CNS: potential implication of the innate immune system*. 11th Annual Neuroinflammation Symposium, Residence Hall, McGill University, Montréal, Québec, 7 juin 2016.

<u>ALAIN LE COUPANEC</u>, MARC DESFORGES, MATHIEU DUBE, PIERRE J TALBOT - (2017) *Conséquences neurologiques des clivages de la glycoprotéine S du coronavirus neuroinvasif humain OC43.* 10ème édition du congrès Armand-Frappier 2013, Manoir des sables, Orford, Québec, 9-11 novembre 2017.

CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

1. LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL (SNC)

1.1- Structure, organisation et protection du SNC

1.1.1- Structure et organisation et fonction du SNC

Le système nerveux (SN) est spécialisé dans la conduction, la transmission et le traitement des informations. Présent dans toutes les régions du corps humain, il représente le plus important moyen de communication de l'organisme. L'encéphale, partie du SN située dans la boite crânienne, ne pèse que 2% du poids total d'un adulte mais son importance est mise en avant quand on sait qu'il utilise plus de 20 % de l'oxygène et du glucose consommés par le corps (Mink *et al.*, 1981)

D'un point de vue fonctionnel, le SN possède trois fonctions essentielles: **une fonction sensorielle**, qui grâce à des récepteurs, détectent toutes les informations de l'environnement (ex: le toucher, la vue). **Une fonction d'intégration** et d'analyse des informations qu'il reçoit des récepteurs. **Et une fonction motrice** qui véhicule l'information motrice de l'encéphale ou de la moelle épinière vers les différents effecteurs (Figure 1) (Mader, 2008).



Figure 1: Schéma représentant les fonctions essentielles du système nerveux.

D'un point de vue anatomique, on distingue le SNC du système nerveux périphérique (SNP). Placé à l'intérieur de la boîte crânienne et de la colonne vertébrale, le SNC se divise en deux parties : l'encéphale et la moelle épinière. L'encéphale lui-même est composé de quatre parties qui sont le cerveau, le cervelet, le diencéphale et le tronc cérébral, lequel fait le lien avec la moelle épinière (figure 2). Le **cerveau**, siège de l'intelligence, représente la plus grosse partie de l'encéphale et est impliqué dans le traitement des informations sensorielles et motrices (Kandel et al., 2000). Il est constitué par deux hémisphères cérébraux qui sont séparés en hémisphères droit et gauche par un sillon profond appelé fissure longitudinale et reliés entre eux par le corps calleux. Ces hémisphères, représentant la partie la plus volumineuse du cerveau, sont formés de substance blanche, principalement composée d'axones associés à des gaines de myéline et de substance grise, composée surtout de corps cellulaires. La substance blanche constitue la partie interne du cerveau et la partie externe de la moelle épinière. Cette matière blanche relie différentes aires de la substance grise (partie des tissus du SNC composée essentiellement des corps cellulaires des neurones), qui est située en périphérie de l'encéphale et au centre de la moelle épinière (Guyton, 1989) (figure 3). Le cerveau est le site de la pensée, de la mémoire et des fonctions mentales.

Le diencéphale, quant à lui, se situe entre les hémisphères cérébraux et le tronc cérébral. Il est constitué de l'hypothalamus qui contrôle le système nerveux autonome, du thalamus qui va trier et rediriger les influx sensitifs et de l'hypophyse (Kandel *et al.*, 2000).

Le cervelet est localisé immédiatement après les hémisphères cérébraux et il se connecte avec ces derniers, le tronc cérébral et la moelle épinière via le pont. Il ne représente que 10% du volume total du cerveau, mais contient plus de la moitié de ces neurones. Le cervelet reçoit des informations sur la sensation somatique de la moelle épinière, des informations sur l'équilibre entre le système vestibulaire de l'oreille interne et les informations motrices et sensorielles provenant de diverses régions du cortex cérébral via les noyaux pontins (Kandel *et al.*, 2000).

Le tronc cérébral se subdivise en trois régions : le mésencéphale, le pont et le bulbe rachidien (figure 2). Le mésencéphale est le centre des réflexes oculaires et auditifs. Il permet le conduit des influx nerveux entre les parties supérieures et inférieures de l'encéphale. Le pont se situe après le mésencéphale et est constitué de fibres nerveuses myélinisées ainsi que différents noyaux important. Il permet la connexion entre le cervelet et le reste du SNC. Tout comme le pont, le bulbe rachidien est constitué de fibres nerveuses richement myélinisées. Il possède des noyaux gérant les centres respiratoire, cardiaque et vasomoteur, et est un centre de réflexe important (Kandel *et al.*, 2000).

36
Le SNC représente donc la fonction d'intégration du SN en ce qu'il traite l'information, la conserve (mémorisation) et détermine les réactions en réponse à certaines situations.

Figure 2. Schéma d'une coupe longitudinale d'un cerveau humain. L'encéphale est composé du cerveau, du diencéphale, du tronc cérébral et du cervelet. La moelle épinière est connectée à l'encéphale par le tronc cérébral. Tiré de <u>http://www.remede.org/librairie-me-dicale/pdf/e9782224029944.pdf</u>.



Figure 3. Schéma d'une coupe transversale d'un cerveau humain. La matière blanche est constituée des axones des neurones et est située à l'intérieur du cerveau, tandis que la matière grise est constituée des corps cellulaires des neurones et est située à la périphérie du cerveau. Tiré de <u>http://www.cours.pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html</u>



1.1.2- Protection et maintien du SNC

Système primordial et fragile, le SNC bénéficie d'une protection structurelle et fonctionnelle. Il est ainsi préservé de l'environnement extérieur par la boîte crânienne et les vertèbres. Il bénéficie également de protections internes dont les méninges, le liquide céphalo-rachidien (LCR) et la barrière hémato-encéphalique.

1.1.2.1- Les méninges

Les méninges sont une des structures qui permet la protection du SNC. Ces dernières sont constituées de trois couches de tissus conjonctifs qui entourent le cerveau et la moelle épinière pour former une enveloppe (figure 4). La première couche (la plus externe) correspond à la dure-mère. C'est une couche épaisse et résistante qui se divise en deux feuillets, dont la

plus externe fusionne avec la paroi de l'os crânien. La seconde couche, dite arachnoïde, est la couche intermédiaire. Elle est composée de fibres élastiques, et, contrairement à la dure-mère, a une consistance plus molle. L'arachnoïde forme des villosités qui permettent au liquide céphalo-rachidien (LCR) usagé de retourner dans la circulation sanguine pour y être drainé. Ces villosités servent de valves à sens unique, permettant au LCR de sortir des méninges, mais pas d'y rentrer. Cela permet de réguler la pression du LCR en augmentant ou diminuant son drainage et, sauf lors de certaines pathologies, la pression du LCR est supérieure à la pression sanguine. Enfin, la troisième couche, la plus interne, est la pie-mère. Elle entoure directement le cerveau et la moelle épinière et est formée de tissu conjonctif et contient des vaisseaux sanguins comme la dure-mère (à l'inverse de l'arachnoïde) qui apportent les nutriments et l'oxygène au SNC (Kandel *et al.*, 2000).

Figure 4. Schéma des différentes couches constituants les méninges, lesquelles sont les membranes enveloppant le SNC. La couche la plus externe est la dure-mère, l'intermédiaire est l'arachnoïde et la plus interne est la pie-mère. Tiré de <u>http://www.mabiologie.com/20-15/11/SNC.html</u>



1.1.2.2- Le liquide céphalo-rachidien

Le LCR est un liquide translucide sécrété en grande majorité par les épendymocytes au niveau des plexus choroïdes au niveau des quatre ventricules, mais aussi au niveau des capillaires de l'espace sous-arachnoïdien (Guyton, 1989). Il circule autour et dans le SNC par les espaces sous-arachnoïdiens, mais aussi par quatre ventricules présents dans l'encéphale (figure 5). Avec un volume total de 150mL, le LCR est renouvelé trois fois par jour. Il constitue

un milieu permettant l'apport des nutriments, ainsi que l'évacuation des déchets (Liddelow, 2011). Trois fonctions lui sont associées. **D'abord une fonction mécanique** : il soutient le tissu nerveux et fait office de coussin contre les chocs venant de l'extérieur (Guyton, 1989). **Ensuite, une fonction biologique** : il permet le transport d'hormones, nutriments, neurotransmetteurs, anticorps et lymphocytes. Cela se fait principalement grâce aux échanges effectués avec le sang au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE). **Enfin, une fonction d'élimination des déchets**. Il s'agit d'un système appelé le système glymphatique qui contribue à la circulation du LCR dans le parenchyme cérébral, permettant ainsi d'en drainer les déchets. Le LCR va pénétrer dans le parenchyme cérébral pour capter les déchets présents dans le cerveau. Par la suite, il sera éliminé via les espaces péri-vasculaires de Virchow-Robin le long des veines (Jessen *et al.*, 2015). Par conséquent, la composition du LCR reflète le plus souvent l'état physiopathologique du SNC (inflammation, infection...) (Sakka *et al.*, 2011).

Figure 5. Schéma de la circulation du LCR dans le SNC. Les flèches noires indiquent le sens du flux du LCR provenant des plexus choroïdes, puis regagnant le sang dans les sinus duraux; les flèches blanches indiquent le flux de sang. Tiré de http://www.remede.org/librairiemedicale/pdf/e-9782224029944.pdf



1.1.2.3- La barrière hémato-encéphalique

En 1885, le biologiste allemand Paul Ehrlich fut le premier à découvrir la présence d'une barrière entre le sang et le cerveau (Hawkins et al., 2005). En effet, après avoir injecté un colorant par voie systémique à des animaux, il constata que tous les organes étaient colorés à l'exception du cerveau. Cette barrière se nomme la barrière hémato-encéphalique (BHE) et se situe au niveau des capillaires cérébraux. C'est une structure multicellulaire qui protège le SNC de l'entrée de composés toxiques ou de pathogènes présents dans la circulation sanguine et qui restreint le passage de leucocytes ou de grosses molécules comme les cytokines ou les immunoglobulines vers le SNC. La BHE se compose de cellules endothéliales, d'une membrane basale, de péricytes et d'astrocytes (figure 6) (Ballabh et al., 2004). L'effet barrière est dû à la présence de jonctions serrées existantes entre les cellules endothéliales, qui limitent le passage de molécules. Ces jonctions sont constituées de plusieurs protéines : la claudine, l'occludine et la molécule jonctionnelle d'adhésion (JAM) (Huber et al., 2001). On distingue en deux membranes basales: endothéliale et parenchymale, cette dernière formant avec les pieds astrocytaires la glia limitans. Un espace périvasculaire virtuel se situe entre les deux. Ces membranes sont constituées de collagène de type IV et de laminine (Copin et al., 2003, Scherrmann, 2002) et servent de support physique pour les cellules endothéliales. Les péricytes sont ancrés dans la membrane basale. Ils ont un rôle dans la vascularisation cérébrale et régulent la perméabilisation de la BHE en laissant passer des molécules de différentes tailles n'affectant pas le cerveau, et en empêchant le passage des molécules pouvant induire des lésions au cerveau (Ballabh et al., 2004, Hawkins et al., 2005). Ils servent également de première ligne de défense en cas de rupture de la BHE grâce à leurs facultés de phagocytose (Copin et al., 2003). Enfin les astrocytes, grâce aux pieds astrocytaires en contact avec la membrane basale des vaisseaux sanguins, régulent le flux sanguin ainsi que l'intégrité de la BHE (Quaegebeur et al., 2011, Sofroniew et al., 2010).

Bien qu'elle forme une barrière très étanche, la BHE peut être altérée lorsque l'intégrité des jonctions serrées entre les cellules est affectée, notamment par la présence des cytokines IL-1β, IL- 6 et TNFα ou de MMPs, favorisant du même coup l'entrée de leucocytes (Mink *et al.*, 1981, Nair *et al.*, 2015). De nombreux pathogènes peuvent donc briser la perméabilité de la BHE afin d'atteindre le SNC (Alvarez *et al.*, 2011, Bataveljic *et al.*, 2014, Deane *et al.*, 2007).

41

Figure 6. Schéma la BHE qui est formée par les cellules endothéliales des capillaires sanguins et est caractérisée par l'existence de jonction serrées. Les pieds astrocytaires associés aux cellules endothéliales participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique. Tiré de <u>http://viro-logie.free.fr/documents/virologie/09Pathogenese_infections_vir_neuro/Pathogenese_infections_vir_neuro.htm.</u>



1.2- Les cellules du SNC

1.2.1- Les neurones

La cellule nerveuse s'appelle le neurone et dérive d'une cellule souche embryonnaire appelée neuroblaste. L'encéphale humain contient environ 10¹³ neurones, formant l'unité fonctionnelle de base du SN en constituant des réseaux permettant la dissémination d'influx nerveux et donc, la transmission d'informations (Pelvig *et al.*, 2008). Bien qu'elles ne soient pas les cellules les plus nombreuses dans le SN, ce sont les plus importantes. En effet, les neurones sont des cellules spécialisées d'une grande variété fonctionnelle, hautement différenciées, capables de répondre à des stimuli. Elles communiquent les unes avec les autres et avec les cellules effectrices (cellules musculaires ou glandulaires par exemple) par l'intermédiaire de contacts spécialisés appelés synapses (Kandel *et al.*, 2000). Les réseaux neuronaux comportent des neurones afférents (qui transportent l'information de la périphérie vers le SNC), et des neurones efférents (qui véhiculent le signal en dehors, du SNC vers le SNP).

Il existe plusieurs types neuronaux différents. Tout d'abord, les neurones multipolaires (en forme d'étoile), sont situés dans l'ensemble du SNC et sont les plus nombreux. Ils ont un seul axone mais plusieurs dendrites. Ensuite, les neurones bipolaires, qui possèdent une seule dendrite et un seul axone. Le sens de la propagation de l'influx nerveux se fait toujours de la dendrite vers l'axone, en passant par le corps cellulaire (ou soma). Ces neurones sont principalement situés dans la rétine et dans l'épithélium olfactif. Enfin, les neurones en T qui semblent être unipolaires. Leur forme spéciale résulte d'un accolement partiel entre la dendrite et l'axone. Ces cellules en T existent dans les ganglions spinaux (figure 7A) et sont en général désignés sous le terme de pseudo-unipolaire (Kandel *et al.*, 2000).

Le neurone comprend trois parties principales: le soma, les dendrites et l'axone qui possèdent une membrane neuronale (plasmique) ainsi qu'un cytosquelette (figure 7B). La membrane neuronale délimite le pourtour cellulaire et permet aux neurones de véhiculer et de transmettre les messages nerveux. Le cytosquelette est constitué de microtubules, de microfilaments et de neurofilaments. Les microtubules possèdent un diamètre de 20nm et sont localisés principalement le long des neurites qui sont les prolongements du corps cellulaire (dendrites et axones) du neurone. Ils sont formés par un groupe de protéines qui participe à la régulation de l'assemblage et de la fonction des microtubules: les protéines associées aux microtubules ou MAPs (microtubule-associated proteins). Les microfilaments, d'un diamètre de 5 nm, sont présents dans tout le neurone, mais sont particulièrement nombreux dans les neurites. Ils sont constitués d'assemblages de petits filaments formés par des polymères

43

d'actine, jouant un rôle dans la forme de la cellule. Les neurofilaments, d'un diamètre de 10 nm, constituent l'ossature du cytosquelette neuronal (Jean-Francois Camps et al., 2013). Le corps cellulaire ou soma a une forme variable. Il contient un noyau, le cytoplasme, un réticulum endoplasmique, des ribosomes, un appareil de Golgi, une forte proportion des mitochondries (permettant la production d'énergie de la cellule) et les autres organites nécessaires au fonctionnement de toute cellule. Par conséquent, un des rôles du soma est d'assurer la synthèse d'une très grande partie des constituants nécessaires à la structure et aux fonctions du neurone (Takano et al., 2015). Les dendrites sont de fines ramifications multiples et courtes, qui naissent du corps cellulaire et forment l'arborisation dendritique de taille et forme très variées (Takano et al., 2015). Elles se terminent généralement en pointe effilée et ont rarement plus de 2 mm de longueur. Les dendrites sont considérées comme des structures spécialisées dans la réception de l'information. En effet, elles sont couvertes de centaines de synapses et possèdent de très nombreux récepteurs des neurotransmetteurs. L'axone se différencie du soma par une composition protéique membranaire différente, par l'absence de réticulum rugueux et la très faible quantité de ribosomes. Par conséquent, la très grande majorité de la synthèse protéique se fera dans le corps cellulaire, même si il peut y en avoir dans l'axone. La majorité des protéines formées dans le soma seront transportées jusqu'à l'extrémité de l'axone. Les molécules transportées du soma vers les axones sont contenues dans des vésicules qui "descendent" le long des microtubules de l'axone. Ce transport est réalisé par une protéine : la kinésine, et est qualifié d'antérograde. A l'inverse, le transport rétrograde (de l'axone vers le soma) se fait par l'intermédiaire de la dynéine (Jean-Francois Camps et al., 2013).

Le bouton terminal de l'axone est le site qui entre en contact avec d'autres neurones ou d'autres cellules non neuronales effectrices et qui leur transmet l'information. Ce point de contact s'appelle la synapse et est à l'origine de la transmission synaptique. Les prolongements axonaux permettent la conduction des potentiels d'action qui déclenche la libération de neurotransmetteurs aux extrémités axonales ramifiées, ce qui transfère l'influx nerveux à travers le bouton synaptique et la propagation de l'information d'un neurone à un autre (Jan *et al.*, 2010, Koch *et al.*, 1993). L'axone est parcouru de transporteurs membranaires qui laissent passer des ions, notamment le potassium, le sodium, le calcium et le chlore. La différence de concentration en ions de part et d'autre de la membrane plasmique détermine le potentiel transmembranaire qui se déplacera le long de l'axone. La transmission de l'influx nerveux d'un neurone à un autre s'effectue à travers la synapse. Les synapses comportent deux éléments distincts, l'élément présynaptique et l'élément post-synaptique. L'élément pré-synaptique est généralement composé d'un bouton terminal, alors que l'élément post-synaptique peut être une dendrite, le soma d'un

autre neurone ou une cellule non neuronale comme une cellule épithéliale glandulaire ou une cellule musculaire par exemple. L'espace entre la membrane pré-synaptique et la membrane post-synaptique représente la fente synaptique. Il existe deux types de synapses : les synapses de type chimique ou de type électrique (Kandel et al., 2000). Les synapses électriques sont minoritaires, mais présentes dans tout le SN. Elles sont constituées de neurones extrêmement proches les uns des autres qui sont reliés entre eux par des jonctions communicantes. Cette proximité est nécessaire puisque la transmission de l'influx nerveux n'utilise pas de neurotransmetteurs mais se propage directement d'un neurone à un autre (O'Brien, 2014, Pereda, 2014). Ces jonctions directes permettent une très haute vitesse de transmission d'un neurone à l'autre (le délai synaptique est de l'ordre du 10e de ms). Dans la majorité des cas, la communication est bidirectionnelle. Les synapses chimiques utilisent des neurotransmetteurs, substances chimiques libérées par les neurones présynaptiques, comme support de la communication. Elles sont nettement plus nombreuses que les synapses électriques. Dans le cas d'une synapse chimique, l'influx nerveux au niveau de l'axone déclenche la fusion d'une vésicule synaptique transportant un neurotransmetteur avec la membrane externe de l'axone terminal. La libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique lui permet d'atteindre le récepteur (ionotrope ou métabotrope) situé au niveau des dendrites et de poursuivre le passage de l'influx nerveux. Les neurotransmetteurs sont des molécules libérées dans la fente synaptique par les terminaisons pré-synaptiques et utilisées comme support de la communication neuronale. Leur nombre dépasse la centaine, et ils ont des fonctions variées (tableau I) (Rangel-Gomez et al., 2016). Ces substances se lient à des récepteurs spécifiques post-synaptiques et provoquent une brève modification du potentiel de membrane de la cellule cible. Un même neurotransmetteur peut avoir des effets synaptiques divers (activateur ou inhibiteur) selon les récepteurs auxquels il est associé.

Figure 7. A-Schéma représentant les différents types neuronaux : multipolaires, bipolaire et unipolaire. Tiré de <u>https://de.123rf.com/photo 54018259 neuron-typen-nervenzellen-die-denhauptteil-des nervensystems-ist.html</u>. B- Schéma représentant les différentes parties d'un neurone. Tiré de <u>http://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html</u>



Tableau I: Exemples de neurotransmetteurs (NT) et leurs fonctions au sein du SNC.

Neurotransmetteurs	Fonctions au SNC	Activateur/inhibiteur
Glutamate	Mémoire / Mouvements	Principal excitateur
GABA	Mouvements / Sommeil	Principal inhibiteur
Dopamine	Émotions / Apprentissage/ Éveil / Mouvements	excitateur ou inhibiteur
acétylcholine	Mouvements / Mémoire Éveil / Apprentissage	principalement excitateur
Sérotonine	Sommeil / Appétit / humeur	principalement inhibiteur
Norépinephrine	Émotions / Apprentissage/ Appétit / Éveil	excitateur ou inhibiteur
Endorphines	Réduction douleur et stress	principalement inhibiteur

1.2.2- Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses qu'on ne trouve que dans le SNC. Ce sont des cellules de petite taille (de 6 à 11 µm de diamètre) munies de nombreux prolongements ramifiés et terminés par une partie élargie : le pied astrocytaire. Ces cellules se caractérisent par la présence d'une protéine spécifique : la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*).

Leurs phénotypes sont très variés et ils constituent un lien très important entre les différents types cellulaires du SNC (Hu *et al.*, 2016). On peut les classer en fonction de leurs morphologies ou de leurs fonctions. **Au niveau morphologique**, on en distingue deux types différents : soit fibrillaires, qui présentent de longs prolongements et qui sont localisés au niveau de la substance blanche, soit protoplasmiques, présentant des prolongements plus courts et étant plutôt localisés dans la substance grise. Au **niveau fonctionnel**, deux types d'astrocytes existent. Les astrocytes de type I qui participent à la formation et au maintien de la BHE, et les astrocytes de type II qui jouent un rôle de soutien métabolique et de nutrition vis-à-vis des neurones et des oligodendrocytes (Nag, 2011).

Plusieurs fonctions sont associées à ce type cellulaire. En effet, ils maintiennent un environnement chimique extracellulaire adéquat pour la production des signaux nerveux. Pour ce faire, ils forment une sorte d'enveloppe autour des jonctions synaptiques, contribuant à réduire la diffusion des neurotransmetteurs qui ont été libérés. Ils captent également de nombreux neurotransmetteurs et autres molécules agissant dans l'espace synaptique. En effet, au niveau de la synapse, les astrocytes interviennent dans le recyclage des neurotransmetteurs (GABA et le glutamate entre autres) et sont capables de produire des co-agonistes comme la Dsérine et la glycine permettant l'activation du récepteur NMDA avec le glutamate, modulant l'efficacité de la synapse (Danbolt, 2001, Nag, 2011, Simard et al., 2004). Ils renferment également un stock de sucre, sous la forme de glycogène, qui constitue la principale réserve énergétique du cerveau (Belanger et al., 2011, Freeman, 2010). Ils participent également au maintien de la BHE. En effet, grâce aux pieds astrocytaires en contact avec la membrane basale des vaisseaux sanguins, ils régulent le flux sanguin ainsi que l'intégrité de la BHE (Quaegebeur et al., 2011, Sofroniew et al., 2010). Les astrocytes contribuent également à la réponse immunitaire en sécrétant des molécules inflammatoires comme les cytokines (IL-1, IL-3, IL-6, IL-15), les chimiokines (MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10), des facteurs de croissance (TGF- β), de l'interféron-y (IFN-y), le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α) et des ROS (*Reactive Oxygen* Species) (Farina et al., 2007, Nag, 2011). Il a également été démontré la présence de récepteurs aux signaux de dangers (récepteurs aux Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs) et récepteurs de type Toll 2, 3 et 4 (Toll-like receptor, TLRs) à la surface des astrocytes (Rossi, 2015). Enfin, les astrocytes sont également impliqués dans le processus de réparation et cicatrisation après une lésion de par leur capacité à proliférer et ainsi, à remplir les espaces laissés par la destruction de cellules neurales, formant une cicatrice gliale (Nag, 2011).

1.2.3- Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules exclusives au SNC que l'on retrouve aussi bien dans la substance grise que dans la substance blanche. Dans la substance grise, les oligodendrocytes ont une position proche des corps cellulaires des neurones et ont un rôle métabolique (Mekhail *et al.*, 2012, Wilkins *et al.*, 2003). Dans la substance blanche, ils ont le rôle de myélinisation axonale qui promeut la survie et le développement neuronal ainsi que la vitesse de propagation des influx nerveux (Mekhail *et al.*, 2012). La myélinisation des neurones consiste en un enroulement progressif de leurs prolongements autour de l'axone, puis un accolement des membranes et une fusion formant ainsi la gaine de myéline, avec certains endroits laissés sans myéline appelés nœud de Ranvier, au niveau desquels l'axone est entouré par des prolongements astrocytaires (Chong *et al.*, 2012, Nave, 2010). Un seul oligodendrocyte est capable de myéliniser jusqu'à 50 axones.

La gaine de myéline est composée de 80% de lipides (choléstérol, phospholipides et glycolipides) et 20% de protéines. Cette richesse en lipides exclut l'eau et les ions qui y sont dissouts, et fait de la myéline un bon isolant électrique. Les principales protéines spécifiques de la myéline du SNC sont la protéine protéolipidique (PLP), la protéine basique de la myéline (MBP), la protéine basique de la myéline associée aux oligodendrocytes (MOBP) et la glycoprotéine myéline-oligodendrocyte (MOG) (de Monasterio-Schrader *et al.*, 2012). Les oligodendrocytes sont des cellules essentielles au fonctionnement et à la survie des neurones. Dans le système nerveux périphérique (SNP) ce sont les cellules de Schwann qui assurent la myélinisation.

1.2.4- Les microglies

Les microglies (ou microgliocytes) sont des cellules gliales représentant les macrophages résidents du cerveau et de la moelle épinière, formant ainsi la principale défense immunitaire active du SNC. Ces petites cellules, généralement de forme étoilée, sont mobiles et constituent environ 20% de toutes les cellules gliales en condition physiologique (Frost *et al.*, 2016). Puisqu'elles appartiennent au groupe des macrophages, elles sont capables de phagocytose. Dû au fait de l'absence de marqueurs permettant de les identifier sans ambiguïté, l'origine des cellules microgliales a longtemps été sujette à controverses et n'est toujours pas clairement établie à l'heure actuelle. Ainsi, plusieurs hypothèses majeures ont été émises : origine mésodermale; origine neuroectodermale et origine hématopoïétique (Kaur *et al.*, 2001). Très récemment, des études sur l'origine microgliale indiquent que ces cellules pourraient se

48

developper tôt au cours du développement à partir de progéniteur dans le sac vitellin embryonnaire (Ginhoux *et al.*, 2013).

L'une des caractéristiques des microglies est la réponse rapide de ces cellules en cas d'infection par des pathogènes (Rock *et al.*, 2004), lors d'ischémie cérébrale (Stoll *et al.*, 1998), lors de dégénérescence axonale par coupure de nerf, de lésions excitotoxiques, ou lors de maladies neurodégénératives (Giulian, 1999, Heppner *et al.*, 2005, Ponomarev *et al.*, 2005). Dans le SNC au repos et en condition physiologique, les microglies présentent un petit soma et de nombreux prolongements fins et très ramifiés partant dans toutes les directions permettant d'analyser en permanence leur microenvironnement (Kettenmann *et al.*, 2011, Vilhardt, 2005). Suite à une activation, elles prolifèrent et deviennent alors mobiles par des déplacements de type amiboïde pour rejoindre le site de lésion (Ladeby *et al.*, 2005). Ces cellules expriment les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type I et II pour devenir des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et sécréter une panoplie de facteurs impliqués dans la réponse immunitaire, dont des cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- β , IL-10), des facteurs neurotropes (NGF, BDNF, GDNF) ou des composés potentiellement cytotoxiques (NO, glutamate) (Wake *et al.*, 2011).

Les microglies participent aussi à la régulation du fonctionnement synaptique. En effet, en absence de pathogènes, elles établissent des contacts avec les éléments pré- et postsynaptiques. Elles régulent le niveau basal de glutamate relâché par les astrocytes (Parkhurst *et al.*, 2013, Pascual *et al.*, 2012). Enfin, ces cellules sont impliquées dans la différenciation des cellules souches neurales en astrocytes par la sécrétion de d'IL-6 et dans la différenciation des cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) en oligodendrocytes matures en produisant du NF-κB, IL-6, IL- 1β et de l'Insuline-like growth factor (IGF-1) (Lu *et al.*, 2013, Nakanishi *et al.*, 2007, Nicholas *et al.*, 2001, O'Kusky *et al.*, 2012, Shigemoto-Mogami *et al.*, 2014).

1.2.5- Les cellules épendymaires

Les cellules épendymaires ou épendymocytes sont un des quatre types de cellules gliales du SNC. Chez les mammifères adultes, les épendymocytes apparaissent comme des cellules ciliées qui forment une couche continue tout au long de la paroi des cavités du système ventriculaire cérébral et spinal (Bruni *et al.*, 1985). Elles permettent, entre autres, la circulation du LCR de par leurs cils mobiles qui battent à environ 200 fois par minute. Ce sont des cellules cuboïdes avec une partie basale et une partie apicale. Les cellules épendymaires sont unies entre elles par des jonctions latérales (*zonulae adherens*) qui sont communicantes, ce qui laisse la place à des échanges importants entre les cavités ventriculaires, dans lesquelles circule le

LCR, et le parenchyme cérébral. Une simple lame basale sépare cette couche épendymocytaire qui ne forme donc pas une barrière imperméable (pas de *zonula occludens*, excepté au niveau des plexus choroïdes). Les cellules épendymaires spécialisées qui fabriquent le LCR forment des structures anatomiques appelées: plexus choroïdes. On retrouve aussi ces cellules dans le canal de l'épendyme situé à l'intérieur de la moelle épinière.

1.3- La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est formée de deux types de composants: les éléments fibrillaires comme le collagène et la fibronectine, et les éléments non fibrillaires comme l'acide hyaluronique, les protéoglycanes et certaines glycoprotéines. Ces molécules interagissent entre elles pour former un réseau moléculaire dans l'espace extracellulaire qui permet la communication intercellulaire. Le SNC, comme tous les autres tissus de l'organisme, présente une MEC mais celle-ci a une composition unique qui lui donne des propriétés spécifiques. En effet, la MEC du SNC ne contient pas d'éléments fibrillaires. C'est l'absence d'éléments fibreux et la fragilité du complexe moléculaire qui font que la MEC du SNC est différente de toutes les autres matrices chez les mammifères (Hockfield, 1996). Bien que les cellules du SNC, ainsi que leurs prolongements, soient tassées les unes contre les autres, il persiste entre elles un espace extracellulaire qui représenterait 20% du volume total du cerveau (Nicholson, 1995). La MEC joue un rôle fondamental dans les échanges entre les neurones qui n'ont aucun contact direct avec les capillaires sanguins et le sang, mais également dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Ces échanges s'effectuent par l'intermédiaire des astrocytes et par diffusion dans les espaces extracellulaires.

1.4- Les nerfs crâniens

Le SNP est la partie du SN formée des ganglions et des nerfs à l'extérieur du cerveau et de la moelle épinière. Sa fonction principale est de faire circuler l'information entre les organes et le SNC. Ce système n'est pas protégé par les os du crâne ou de la colonne vertébrale ni par une BHE, ce qui le rend plus exposé aux lésions mécaniques, ou aux toxines (Anthea Maton et al., 1993).

Les nerfs crâniens font partie du SNP. Ils émergent directement du cerveau et du tronc cérébral (à l'inverse des nerfs spinaux qui émergent de la moelle épinière). Il existe 12 paires de nerfs crâniens. Les nerfs I et II (nerf olfactif et nerf optique) ne sont techniquement pas des nerfs crâniens proprement dits, mais des extensions respectivement du télencéphale et diencéphale

(James, 2012). Les autres nerfs crâniens prennent leur origine au niveau du tronc cérébral. Trois sont sensoriels, cinq sont moteurs et les quatre autres sont dits mixtes c'est-à-dire qu'ils ont à la fois une fonction sensorielle (ou sensitive) et motrice (tableau II).

Numéro	Nom du nerf	Sensoriel/Moteur	Fonction
I	olfactif	sensoriel	odorat
II	optique	sensoriel	vision
	occulomoteur	Mixte	motricité oculaire
IV	trochléaire	moteur	muscle oblique oculaire
v	Trijumeau : ophtalmique, maxillaire et mandibulaire	mixte	muscles de la mastication
VI	abducens	moteur	muscle droit externe oculaire
VII	facial	mixte	muscles de la mimique, langue, glandes sublinguales et submandibulaires, glandes salivaires et lacrymales
VIII	vestibulocochléaire	sensoriel	audition et équilibre
IX	glossopharyngien	mixte	tiers postérieur de la langue (goût) et le palais
x	vague	mixte	possède une fonction spécifique sur tout le corps (digestion, fréquence cardiaque)
XI	accessoire	moteur	muscle sterno-cléido- mastoïdien et le muscle trapèze
XII	hypoglosse	moteur	muscles de la langue

Tableau II: Description des 12 paires de nerfs crâniens.

1.5- Infection virale du SNC

1.5.1- Neuroinvasion, neurotropisme, neurovirulence et neuropropagation

La neuroinvasion est la capacité qu'a un pathogène à envahir le SNC à partir de la périphérie (voir chapitre suivant : Stratégies d'entrées virales au SNC). En effet, en conditions

physiologiques normales, le SNC est un système très hermétique. Par conséquent, les pathogènes seront très limités dans leur capacité à atteindre le SNC directement à moins d'un traumatisme lésionnel, d'un acte chirurgical ou dans le contexte d'une immunosuppression (Pulzova *et al.*, 2009). Le neurotropisme est l'aptitude d'un pathogène à infecter les cellules du SNC. La neurovirulence désigne le caractère pathogène d'un microorganisme, c'est-à-dire sa capacité à causer une pathologie au SNC. Ces pathologies se traduisent de différentes façons, notamment par l'apparition de signes cliniques, un changement dans la prise de poids de l'hôte, mais encore par des observations histologiques et/ou cliniques, voire la mort de l'hôte (A.L. Notkins *et al.*, 1986). Enfin, la neuropropagation est l'aptitude que possède un pathogène à se propager dans les différentes régions du SNC (cerveau, moelle épinière).

1.5.2- Stratégies d'entrée virale au SNC

Le SNC est un système étanche aux pathogènes du fait de la présence d'une BHE. Par conséquent, les microorganismes ont dû s'adapter en élaborant des stratégies pour pouvoir passer cette BHE et entrer dans le SNC (McGavern *et al.*, 2011, Shrestha *et al.*, 2013). Les virus ont développé différentes stratégies pour envahir le SNC. Certains virus vont passer à travers la BHE via la voie sanguine, tandis que d'autres vont éviter la BHE, et atteindre le SNC via une voie non hématogène (par le SNP). La première voie d'entrée des virus au SNC est la voie sanguine.

Les pathogènes peuvent entrer dans le SNC via l'épithélium des capillaires du cerveau. Ce type d'entrée virale est utilisée par différents virus tel que le polyomavirus JC (Chapagain *et al.*, 2007), le virus de la poliomyélite (Coyne *et al.*, 2007), le virus Epstein-Barr (EBV) (Casiraghi *et al.*, 2011), l'adénovirus murin (MAV-1) (Gralinski *et al.*, 2009), le virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) (Afonso *et al.*, 2008) et le virus du Nil Occidental (WNV) (Verma *et al.*, 2010), qui peuvent infecter directement les cellules de l'endothélium microvasculaire du SNC humain (BMECs). Ils vont se répliquer dans leur site d'infection respectif (en périphérie) et emprunter la circulation sanguine avant d'atteindre et d'altérer la BHE. Certains virus peuvent inhiber la production d'IFN- β par les BMEC infectés, altérant l'expression des protéines de jonctions serrées ZO-1, VE-cadherine et occludines affectant donc la perméabilité de la BHE (Bleau *et al.*, 2015). Enfin, certains virus sont capables d'utiliser des protéines exprimées par les cellules endothéliales pour pénétrer dans le SNC. L'exemple du réovirus illustre parfaitement bien ce point, alors que ce virus est capable de se lier à la protéine de jonction (JAM-A) qui participe à la formation de la BHE, et ainsi entrer dans le SNC (Antar *et al.*, 2009).

52

Les pathogènes peuvent entrer dans le SNC via la stratégie du « cheval de Troie ». Comme le nom de la stratégie l'indique, certains pathogènes peuvent utiliser les monocytes/macrophages comme « véhicule » afin d'entrer dans le SNC. Un des virus les mieux connus pour utiliser ce type d'entrée est le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, après avoir infecté les lymphocytes T et les monocytes/macrophages circulants, le virus devient latent (Alexaki *et al.*, 2008). La présence de cytokines (IL-6), de chimiokines (CCL2 et CXCL12) et de MMPs (MMP-9) du à l'infection des leucocytes va fragiliser l'intégrité de la BHE, facilitant l'entrée des cellules immunitaire dans le SNC (Ancuta *et al.*, 2006, Strazza *et al.*, 2011). Les leucocytes infectés peuvent ensuite entrer dans le SNC via la BHE. Un deuxième virus ayant adopté cette stratégie est le virus JC. Après avoir infecté les lymphocytes T CD4+, le virus pourrait se propager aux lymphocytes B pour migrer vers le SNC en passant à travers la BHE, et ainsi infecter les oligodendrocytes (Chapagain *et al.*, 2010, Houff *et al.*, 1988). Enfin, le coronavirus humain 229E ainsi que le virus du SRAS (SARS-CoV) ont la capacité d'infecter les monocytes, ce qui pourrait leur conférer un moyen d'envahir le SNC (Collins, 2002, Desforges *et al.*, 2007, Law *et al.*, 2005).

Les pathogènes peuvent entrer dans le SNC via les plexus choroïdes. Certains virus, notamment comme le virus LCMV sont capable d'infecter les cellules du plexus choroïdes pour atteindre le LCR, et ensuite se propager dans le SNC. De plus, d'autres virus comme le virus de la varicelle-zona, le virus des oreillons et le virus herpès-simplex sont capables d'infecter les cellules épendymales qui recouvrent les ventricules du SNC (Tuomanen, 1996).

Les pathogènes peuvent entrer dans le SNC via les nerfs périphériques. La quatrième voie d'entrée au SNC implique l'utilisation du réseau du SN. Un des nerfs les plus courts pour atteindre le cerveau par la cavité nasale est le nerf olfactif (figure 8). Ce nerf est composé de neurones récepteurs olfactifs (NRO) dont les dendrites sont dans la cavité nasale, et les prolongements axonaux se prolongent jusque dans le bulbe olfactif, formant ainsi le nerf olfactif. Plusieurs virus sont capables d'utiliser cette voie pour atteindre le SNC. Les virus de l'Influenza, le virus HSV-1, le virus de la poliomyélite, le virus Hendra, le virus Nipah, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le coronavirus murin MHV (van Riel *et al.*, 2015), et le coronavirus humain HCoV-OC43 (Dubé-Le Coupanec et al 2017) sont capables d'atteindre le SNC en empruntant cette voie. Il existe d'autres nerfs que le nerf olfactif permettant l'entrée dans le SNC. En utilisant le SNP pour entrer dans le SNC, les pathogènes évitent la BHE et ne provoquent pas forcément l'activation du SI (van Riel *et al.*, 2015). Le virus de la poliomyélite, les adénovirus et le virus de la rage peuvent se lier au neurone à la jonction neuromusculaire via l'expression de récepteurs viraux et ainsi pénétrer dans le SNC (H. I. Huang *et al.*, 2015a). De

plus, le virus de l'herpès et le virus de la pseudo-rage peuvent infecter des neurones sensoriels et ainsi pénétrer le SNC (McGavern *et al.*, 2011).

Figure 8. Schéma de la muqueuse et du bulbe olfactif. La muqueuse olfactive est composée de l'épithélium olfactif (OE) et de la lamina propria. Trois types de cellules se trouvent dans l'OE, les neurones sensoriels olfactifs (OSN), les cellules sustentaculaires et les cellules basales. Les dendrites des OSN se projettent vers la couche de mucus où les cils exprimant les récepteurs odorants dépassent. La lamina propria est une couche de tissu conjonctif, qui se trouve sous l'OE, et contient des fibroblastes, des vaisseaux sanguins et des glandes de Bowman. Le bulbe olfactif (BO) est divisé en plusieurs couches. Chaque axone des OSN tapissent la surface du BO, la couche de nerf olfactif (ONL), et se projette dans un glomérule dans la couche glomérulaire (GL). EPL: couche plexiforme externe, MCL: couche de cellules mitrales, GCL: couche de cellules granuleuses. Adapté de (Imamura *et al.*, 2016)



1.5.3- SNC: adaptation, persistance et évasion virale

De nombreux organes peuvent être des sites d'infection virale. Ceux-ci dépendent de la famille de virus concernée et de l'hôte. Par conséquent, un même virus peut infecter un tissu lors de la première infection, et ensuite persister ailleurs dans l'organisme. Malgré la diversité des tissus concernés par les infections persistantes, les tissus lymphoïdes et le SNC (Koyuncu et al., 2013) sont les deux principaux sites de persistance virale. La grande facilité à maintenir une persistance virale dans le SNC est due en grande partie au fait qu'il soit isolé de la circulation sanguine par la BHE qui contrôle de facon très serrée l'entrée des constituants sanguins solubles ou cellulaires à l'intérieur du SNC. De plus, la BHE limite la libre circulation des composantes du système immunitaire comme les lymphocytes B (LB) et T (LT), les macrophages et les cellules dendritiques (CD). Par conséquent, le SNC est immunologiquement moins rapide ou moins efficace par rapport à d'autres organes (Lauvau et al., 2015). Lors d'une infection virale, les réactions immunitaires devraient conduire à l'élimination complète du virus. Cependant, la disparition des symptômes et la régression de la maladie ne s'accompagne pas forcément de l'élimination complète de l'agent infectieux. En effet, par des mécanismes variés comme l'échappement à la réponse immunitaire ou une répression générale de l'expression des gènes antiviraux, les virus vont pouvoir persister, s'accompagnant parfois de conséguences à long terme sur la santé humaine (Koyuncu et al., 2013, H. Lipton et al., 1996, Marc Desforges et al., 2016). Après une première phase aiguë où le virus neurotrope se réplique et se dissémine abondamment à travers le SNC, certains virus ont adopté des stratégies pour devenir persistants dans le SNC (Galluzzi et al., 2010, Ramakrishna et al., 2002). Les infections virales persistantes sont divisées en deux types: les infections chroniques et les infections latentes.

Les infections latentes : seul le génome viral est présent dans les cellules infectées. La production de particules virales n'apparaît qu'épisodiquement lors des périodes de réactivation. Un des virus les plus connus pour utiliser ce genre de persistance est le virus de l'herpès (HSV-1) qui persiste dans les neurones sensitifs des ganglions trijumeaux (Nicoll *et al.*, 2012). Le virus JC est également considéré comme latent puisque ce dernier se réactive à partir de réservoirs périphériques lorsque le SI est supprimé (F. Weber *et al.*, 2001).

Les infections chroniques : lors desquelles il y a production permanente de particules virales infectieuses, mais le SI n'est pas en mesure de restreindre le virus, ce qui engendre souvent des maladies chroniques caractérisées par un débalancement continu de l'homéostasie au SNC (Giraudon *et al.*, 2009, Karim *et al.*, 2014). La production de particules virales infectieuses peut être soutenue et constante comme pour le virus de la rougeole (Schonberger *et al.*, 2013), le virus de la poliomyélite (Miller, 1995), le virus de l'encéphalomyélite de Theiler

(TMEV) (H. L. Lipton, 1975), le virus LCMV (Chakraborty *et al.*, 2010) et plusieurs entérovirus (H. I. Huang *et al.*, 2015a). La production de particules virales infectieuses peut aussi être produite en faible quantité, comme pour le VIH qui, pendant de longues périodes de temps persiste dans les LT CD4+ et les macrophages, et se reproduit activement, causant des dommages au SI (J. Weber, 2001). De la même manière, le virus HTLV est capable de persister longuement, ce qui engendre des pathologies dégénératives plus lentes (Lepoutre *et al.*, 2009, Petito *et al.*, 1999).

Pour persister, plusieurs conditions sont nécessaires. Tour d'abord, le virus ne doit pas lyser toutes les cellules infectées, et son potentiel cytolytique doit être régulé. Ensuite, le génome viral doit être maintenu dans l'hôte, comme font les rétrovirus (comme le VIH et HTLV) en incorporant leur génome sous forme d'ADN dans le génome de la cellule hôte, ou d'autre virus, comme le HSV dont le génome viral est maintenu sous forme d'épisome. Enfin, le virus doit échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Pour cela, les virus ont développé de nombreuses stratégies comme l'émergence de variants antigéniques rapides (VIH et virus de l'hépatite C (HCV), la faible expression de protéines virales (virus de l'herpès et VIH), la suppression de molécules cellulaires de surface nécessaires à la reconnaissance par les LT (Adénovirus, virus de l'herpès) (Gonzales-Scarano, 2002, Tyler, 2001).

1.5.4- Pathologies neurologiques associées aux infections virales

Il existe de nombreux pathogènes, qui, après avoir atteint le SNC, engendreront des conséquences très différentes selon l'hôte. Différents facteurs vont contribuer à l'augmentation de la sévérité de la maladie. Le virus lui-même est le principal acteur du type de maladie engendrée. En effet, ces derniers peuvent être impliqués dans des maladies neurologiques chez l'humain, soit comme point de départ dans l'induction de ces maladies ou comme facteur aggravant. Ces maladies provoquent généralement une détérioration du fonctionnement des cellules nerveuses, pouvant conduire à leur mort. D'autres facteurs comme la voie de l'infection, la capacité à persister et à se répliquer et la génétique de l'hôte vont influencer les neuropathologies. Ainsi, l'aptitude des virus à induire des maladies neurologiques peut résulter soit d'un effet direct de celui-ci, en induisant la dégénérescence et la mort neuronale, ou d'un effet indirect via une activation non-contrôlée du SI pouvant induire des effets nuisibles sur les cellules du SNC (Amor *et al.*, 2010). Le tableau III présente une liste de virus neuroinvasifs, neurotropes et potentiellement neurovirulents associés aux différentes maladies du SNC.

Tableau III: Liste des virus neurotropes et pathologies associées. Modifié de Desforges M, Meessen-Pinard M et Talbot PJ., 2016; McGavern DB et Kang SS, De chiara G et al, 2012; Huan HI et Shih SR 2015; Swanson PA, McGavern DB 2015. HCoV : Coronavirus humain; GB :syndrome de Guillain-Barré ; ADEM : encéphalomyélite aiguë disséminée ; MD: Maladie d'Alzheimer; MP: Maladie de Parkinson; SLA: Sclérose latérale amyotrophique; SEP : sclérose en plaques ; CNP: cellule neurale progénitrice; ND : non-déterminé.

Virus	Hôte	Site d'infection	Site de persistance	Pathologies
	-	Bunyavirid	ae	
Virus de la Crosse	Humains	ND	ND	Encéphalite
		Togavirida	ae	
Chikungunya virus	Humains	ND	ND	Complications neurologiques, GB
		Flavivirida	1e	
Encéphalite de Saint-Louis	Humains	ND	ND	Encéphalite, méningite
Japanese encephalitis virus	Humains/ bétails	SNC	ND	Encéphalite, paralysie légère
West Nile virus	Humains	ND	ND	Encéphalite, paralysie légère
Tick-borne encephalitis virus	Humains	ND	ND	Encéphalite, paralysie légère
Zika virus	Humains	CNP et microglies chez le foetus	ND	Neurovirulent chez le foetus, et GB chez l'adulte
Parainfluenza				
Oreillons	Humains	ND	ND	Encéphalite, Méningite
Rhabdoviridae				
Rage	Humains	Neurone	ND	Encéphalomyélite, SEP?
Orthomyxoviridae				
Influenza	Humains	Neurone/astrocyte	ND	Encéphalomyélite, MP?, SEP?

Virus	Hôte	Site d'infection	Site de persistance	Pathologies
INFECTIONS CHRONIQUES				
		Arenavirida	ae	
Lymphocytic choriomeningitis virus	Humains	Microglie	ND	Méningite, oedème cérébral
		Coronavirid	ae	
Mouse hepatitis virus	Souris/rat	ND	SNC	Encéphalomyélite
Human coronavirus	Humains	ND	SNC	Encéphalite, SEP?
		Polyomaviri	dae	
John Cunningham virus	Humains	Oligodendrocytes	SNC	Leucoencéphalopathie Multifocale progressive
		Paramyxovir	idae	
Rougeole	Humains	Neuron/ astrocyte	Neurones/cellules gliales	Panencéphalite subaigüe sclérosante, SEP?
Canine distemper	Chiens	ND	Oligodendrocytes/ Neurones	Encéphalite démyélinisation
Togaviridae				
Rubéole	Humains	ND	SNC	Panencéphalite progressive
Fôret de Semliki	Souris	ND	SNC	Encéphalite
Picornaviridae				
Theiler's encephalomyelitis virus	Souris	ND	Neurones/ Microglies/ Oligodendrocytes	Encéphalomyélite
Poliovirus	Humains	Neurone moteur	Neurones	Poliomyélite
Coxsackievirus	Humains	Neurone/ astrocyte	ND	Méningite, encéphalite, SLA?, MP?

Echovirus	Humains	ND ND	ND	Méningite
Enterovirus 71	Humains	Neurone	ND	Méningite, encéphalite
	Retroviridae			
Human T- lymphotropic virus	Humains	Lymphocytes T	Lymphocytes T	Myélopathie, SEP?
Human immunodeficiency virus	Humains	Monocyte CD16+/Microglie/ astrocyte	Lymphocytes T CD4+/ Monocytes / Macrophages/ Microglies	Démence, MD?
Visna	Moutons	ND	Monocytes / Astrocytes	Encéphalomyélite

Virus	Hôte	Site d'infection	Site de	Pathologies
			persistance	5
INFECTIONS LATENTES				
		Herpesv	iridae	
Enstein-Barr		Cellules	Cellules	Encénhalite méningite
virus	Humains	épithéliales/	épithéliales du	
virus		lympocytes B	pharynx/	ADEM, GB
Cytomegalovirus	Humains/souris	Glandes salivaires/ macrophage	Lymphocytes B Glandes salivaires/ Lymphocytes/ Macrophages	Encéphalite, ADEM, GB, SEP?
Herpes simplex	Humains	Neurone	Neurones	Encéphalite, ADEM, SEP?,
virus	numains	sensoriel	sensoriels	MD?
Human	Humaina	ND	Monocytes /	Encánhalite
herpesvirus 6	Turnains		macrophages	
Varicella zoster	Humains	Neurone	Neurones	Encéphalite, Méningite /
virus		sensoriel	sensoriels	Myélite, SEP?

1.5.5- Réponses immunitaires face aux infections virales

Pour assurer sa protection, l'hôte dispose d'un éventail de stratégies lui permettant de prévenir l'entrée d'un pathogène. Des barrières naturelles comme la peau et les muqueuses jusqu'aux réponses immunitaires spécifiques, le SI assure le maintien de l'intégrité et l'équilibre de l'organisme. Ces différents mécanismes de défense permettent à l'organisme de reconnaître et contrôler les constituants appartenant à l'organisme, et de lutter efficacement contre les agressions extérieures dues aux pathogènes, toxines, etc. (Chaplin, 2010). L'immunité est divisée en deux catégories agissant de concert pour protéger l'organisme : l'immunité innée, qui entre en action rapidement, mais qui n'est pas spécifique à un pathogène en particulier, et l'immunité adaptative, qui est une défense acquise, moins rapide mais plus spécifique et dotée d'une mémoire.

L'immunité innée étant la première ligne de défense de l'hôte, elle réunit un ensemble de mécanismes qui interviennent rapidement pour empêcher la pénétration ou la prolifération d'agents infectieux dans l'organisme. Étant indispensable, elle n'est pas toujours suffisante pour éradiquer le pathogène, mais elle permet à l'organisme de mener à bien une première défense en attendant que l'immunité adaptative se mette en place. L'immunité innée comprend deux types de défenses. La première constitue une défense externe. Elle se compose de barrières physiques empêchant la pénétration des pathogènes dans l'organisme. Les tissus épithéliaux comme la peau (J. X. Wang et al., 2016), les muqueuses du tube digestif (Turner, 2009) et des voies respiratoires (S. Sato et al., 2012), ainsi que les sécrétions produites par ces tissus (mucus, larmes, ...) sont utilisés pour réduire le risque d'invasion microbienne. La seconde défense est plus interne, ce qui permet de lutter contre les pathogènes qui auront réussi à pénétrer dans l'hôte. Pour ce faire, il y aura une reconnaissance des pathogènes par des récepteurs portés par les cellules immunitaires : les Toll-like receptors (TLR) (Aoshi et al., 2011). Cette ligne de défense est activée par des médiateurs chimiques dans les minutes suivant la rencontre avec un pathogène. Son rôle est donc d'empêcher la propagation de l'infection et de permettre l'élimination rapide de l'agent infectieux. Ce mécanisme fait appel aux cellules phagocytaires (comme les neutrophiles, les monocytes et les macrophages), ainsi qu'aux cellules natural killers (cellules NK) qui sont capables de lyser des cellules étrangères de manière indépendante de l'antigène, sans activation préalable. Enfin, les cellules dendritiques (CD) jouent également un rôle dans ce type d'immunité. En effet, dans les tissus de l'organisme où elles résident (surtout le derme et les muqueuses), les CD immatures exercent des fonctions de sentinelles permanentes permettant ainsi de détecter tous les intrus.

La seconde ligne de défense est l'immunité adaptative qui permet l'élimination d'agents infectieux qui auront réussi à déjouer les défenses naturelles. Elle met en jeu des cellules spécialisées, les lymphocytes, cellules clés de l'immunité adaptative, capables de reconnaître et mémoriser des structures spécifiques de souches particulières et de variants pathogènes, afin d'apporter la réponse adéquate à chaque cas (Parkin et al., 2001). Produits dans la moelle osseuse au cours de l'hématopoïèse, les lymphocytes circulent dans le sang, les vaisseaux lymphatiques et résidents dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions ou ils peuvent s'activer. A ce stade, deux types de populations peuvent être distingués : les LB qui sécrètent des immunoglobulines (anticorps), conduisant à une immunité à médiation humorale, et les LT subdivisé en lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et en lymphocytes T cytotoxiques (CD8+). Les LB et LT CD4+ sont impliquées dans l'orientation de la réponse immunitaire, ainsi que dans l'activation de macrophages et dans la différenciation des LT en LT CD8+, conduisant ainsi à une immunité à médiation cellulaire (Bergereau, 2010). Les LT CD8+ ont un rôle essentiel lors d'une infection virale, car ils vont reconnaître les cellules infectées et induire leur lyse afin de limiter la prolifération et la propagation du virus (Aoshi et al., 2011). Les LT CD4+, sont quant à eux, impliqués dans l'activation des LB et de la réponse humorale, et sont également importants quant à leur capacité à sécréter de l'IFN-y, qui aide à la mise en place et à la maturation des réponses lymphocytaires CD8+ et lymphocytaires B en stimulant la présentation antigénique, en favorisant l'état antiviral et en inhibant la prolifération cellulaire des cellules infectées afin de limiter la propagation virale (Schroder et al., 2004). Les lymphocytes sont capables de reconnaître spécifiquement des antigènes de par leurs récepteurs BCR (Bcell-receptor) ou TCR (T-cell-receptor). L'antigène peut donc activer directement les LB. À ce moment, les LB deviennent des plasmocytes et sécréteront des anticorps spécifiques visant la destruction de l'antigène. Concernant l'activation de LT, elle se fait via une présentation de l'antigène, qu'il soit d'origine intracellulaire ou extracellulaire, par des cellules présentatrice d'antigènes (CPA). Les CPA peuvent être des CD, des macrophages ou des LB (Owen J et al., 2014). Le ligand reconnu par le TCR est un complexe formé à la surface des CPA par une protéine de surface spécifique de l'hôte, appelée molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et par un peptide antigénique (Bergereau, 2010, Owen J et al., 2014). La classe des molécules du CMH présentant l'antigène va déterminer l'activation des sous-populations de LT (CD4+ ou CD8+). En effet, les LT CD4+ sont activés suite à une présentation d'antigène avec le CMH de classe II, alors que les LT CD8+ sont activés suite à une présentation d'antigène avec le CMH de classe I (Bergereau, 2010, Owen J et al., 2014).

Le cerveau a longtemps été considéré comme un organe privilégié d'un point de vue immunologique, puisque la BHE limite de façon importante la migration des cellules du SI. Toutefois, le cerveau possède son propre système de défense qui peut se mettre rapidement en état d'alerte à la moindre infection systémique. Tel que mentionné au début de ce chapitre, plusieurs virus ont la capacité de pénétrer et d'infecter le SNC. Dès son entrée dans le SNC, le virus doit se répliquer et se disséminer le plus efficacement possible, tout en évitant le SI. Plusieurs facteurs vont influencer l'activation du SI, comme le type de virus, le type de cellules infectées ainsi que la facon dont se propage le virus, etc. La première étape de la défense de l'hôte est la mise en place d'une réponse immunitaire innée après reconnaissance de motifs spécifiques conservés par les pathogènes, ou PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) par des récepteurs spécifiques, les PRRs (*Pattern Recognition Receptor*). Les acides nucléiques des virus stimulent la production d'IFN-α/β (Bergmann et al., 2006) via les PRRs membranaires, comme les TLRs (Paul et al., 2007), ou cytosolique comme les récepteurs de type RIG-I (RLR) (Bowie et al., 2005), les récepteurs de type NOD (NLR) et les récepteurs lectine de type C (CLR) (Palm et al., 2009, Shayakhmetov, 2010). Les microglies et les astrocytes expriment principalement des TLRs dans le SNC et sont donc capables d'initier une réponse immunitaire innée envers des virus neurotropes (Pichlmair et al., 2007). De plus, les neurones sont également capables d'induire une réponse innée car ils expriment certains TLR (TLR-3) et les RLRs (Bieback et al., 2002, Lafon et al., 2006, Rassa et al., 2002).

La détection virale dans le cytosol, les endosomes ou à la surface cellulaire se fait grâce aux PAMPs viraux qui se divisent en deux catégories : les acides nucléiques et les protéines virales (Peltier *et al.*, 2010). **Les hélicases à ARN cytosoliques ou RLR (RIG-like receptor)** sont des senseurs qui détectent l'ARN viral et activent la réponse à l'IFN. À l'heure actuelle, trois RLRs ont été identifiés : RIG-I, MDA5 et LGP2. Les deux premiers sont respectivement activés par l'ARN double brin court triphosphorylé en 5' (< 2kb), l'ARN double brin long (> 2 kb), alors que le stimulus activant le troisième est encore inconnu (Peltier *et al.*, 2010). En plus d'être activé par des ARN double brin court triphosphorylé en 5', RIG-I peut aussi être stimulé par des séquences poly-U (Zeng *et al.*, 2010). Les neurones sont capables de limiter la réplication virale par RIG-I et MDA-5, comme démontré pour le virus West Nile (Fredericksen *et al.*, 2008). De la même manière, les astrocytes possèdent les mécanismes de reconnaissance par les RLR. En effet, le virus VSV provoque une augmentation des niveaux en ARNm et en protéines correspondant à RIG-I et MDA5 dans les astrocytes, contribuant ainsi à générer une réponse immunitaire protectrice contre ce virus neurotrope (Furr *et al.*, 2008). A l'inverse, les coronavirus, comme la souche 229E sont capablent de modifier leur ARN par l'activité 2'-O-méthylation de la

polymérase pour échapper à la reconnaissance par les MDA5 et diminuer la production d'IFN (Zust et al., 2011). Les récepteurs de type NOD (NLR) sont impliqués dans la reconnaissance de pathogènes intracellulaires, initiant ainsi l'inflammasome (Martinon et al., 2002), qui est un complexe protéique oligomérique impliqué dans l'immunité innée. Ce complexe est formé à la suite de la reconnaissance de signaux inflammatoire comme le lipopolysacharide (LPS) ou des composantes virales diverses. Six formes d'inflammasomes existent, mais seulement trois sont retrouvées dans le SNC : NLRP1 chez les neurones, le NLRP2 chez les astrocytes et le NLRP3 chez les microglies (Kigerl et al., 2014). Les récepteurs lectines de type C (CLR) représentent un groupe de différents récepteurs cytosoliques ou endosomaux qui reconnaissent des structures comme les lectines de type C tel le mannose ou le galactose (Geijtenbeek et al., 2009). Cette immunité antivirale peut diminuer l'inflammation et les dommages aux tissus infectés pour plusieurs virus comme: HSV-1 (Zelenay et al., 2012), Vaccinia (Iborra et al., 2012) et Chikungunya (Long et al., 2013). Toutefois, dans certains cas, notamment pour les virus JEV et de la dengue, la détection par les CLRs va accentuer l'inflammation au CNS (Hoving et al., 2014). Les détecteurs de type cGAS-STING représentent un groupe récemment identifié de capteur d'ADN cytosolique. Une fois la liaison de cGAS à l'ADN, il y aura synthèse de cGAMP qui servira par la suite de second messager pour activer STING (Stimulator of interferon gene), menant à la production d'interferon de type I (Ablasser et al., 2013, D. Gao et al., 2013, L. Sun et al., 2013). Ce type d'immunité va jouer un rôle important dans la réponse à l'IFN de type I lors d'infection par des virus à ADN comme HSV-1 et KSHV (Ma et al., 2015, L. Sun et al., 2013). De manière interessante, il a également été démontré que cGAS-STING pouvait être activé par des virus à ARN simple brin de polarité positive, comme WNV (Ma et al., 2016, Schoggins et al., 2014). Les récepteurs de type Toll (TLR) ont été identifiés au nombre de dix chez l'humain, et sont exprimés dans les endosomes (TLR3, 7, 8 et 9) et à la surface de la cellule (TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10). La plupart des virus utilisent les voies d'endocytose/exocytose cellulaire, que ce soit pour entrer ou sortir de la cellule (Takaoka et al., 2007, Z. Zhang et al., 2017). Les TLR endosomaux sont activables par les acides nucléiques. La signalisation de tous les TLR passe par la cascade des MAPK et l'activation de NFkB, induisant la transcription de gènes de cytokines et chimiokines. Toutefois, les TLR endosomaux possèdent des voies de signalisation additionnelles et activent IRF1, IRF3 et IRF7, induisant l'expression d'IFN de type 1. En plus des TLR endosomaux, TLR2 et TLR4 jouent également un rôle dans la détection virale. Bien qu'ils soient exprimés à la surface cellulaire, ils peuvent être recrutés au cytosol par des ligands internalisés. Au niveau du SNC, les neurones, astrocytes et oligodendrocytes expriment les TLR3, 4, 7, 8 et 9 qui vont reconnaître respectivement les ARN double brin, les glycoprotéines

virales, les ARN simple brin et de l'ADN riche en îlots CgG (Mukherjee et al., 2015, Peltier et al., 2010, Y. Zhou et al., 2009). Les microglies quant à elles, expriment tout le répertoire des TLR (Jack et al., 2005) et augmentent leur expression lorsqu'elles sont en présence d'un pathogène (Olson et al., 2004). Une fois la détection des virus dans le SNC effectuée par les différents acteurs mentionnés ci-dessus, ces derniers vont activer les interferon regulated factors (IRFs) menant à l'expression des IFN, et le nuclear factor καρρα B (NF-kB) menant à l'expression de cytokines proinflammatoires. Les IFNs vont donc, une fois fixés sur leurs récepteurs (IFNAR), mener à l'expression de divers gènes en réponse à l'IFN (ISGs), responsables d'inhiber l'entrée. la traduction de tous les ARNm présents dans la cellule et la réplication ou la sortie du virus (Schneider et al., 2014). Plusieurs virus peuvent être pris comme exemple, comme les virus WNV, VSV, JEV, HSV-1 ou MHV, pour lesquels les réponses liées à l'IFN, notamment l'IFN de type I, va restreindre leur réplication virale (Cho et al., 2013, Lafaille et al., 2012, Reinert et al., 2012). De plus, l'activation de la protéine kinase R (PKR) ainsi que de l'endonucléase RNAse L va être dépendante de l'activation des ISGs dans le SNC. La PKR détecte la présence cytoplasmique d'ARN double brin viral et inhibe la synthèse protéigue de la cellule afin de restreindre la traduction des ARN viraux (Meurs et al., 1992) alors que la RNAse L, dégrade l'ARNm cellulaire ou viral, inhibant la réplication virale et la synthèse protéigue du virus (Silverman, 2007). Ces systèmes antiviraux sont entre autres impliqués dans les infections du SNC par les virus WNV (Samuel et al., 2006) et MHV (L. Zhao et al., 2012).

Malgré son rôle important dans la reconnaissance virale et sa capacité à ralentir la dissémination virale, la réponse immunitaire innée est rarement suffisante pour contrôler les infections du SNC. Les virus neurotropes infectent le SNC via la périphérie, que ce soit par les tractus gastrointestinal et respiratoire, la piqûre d'un moustique contaminé ou la morsure d'un animal infecté. Par conséquent, l'activation de la réponse immunitaire antivirale a lieu en périphérie via la capture du virus ou de ses Ag par les CD, qui présenteront les Ag viraux au niveau du nœud lymphatique drainant. Cette activation va permettre le recrutement au SNC des LT CD4+ et CD8+, causé par la chimiokine CXCL12 produite par les astrocytes (Cruz-Orengo *et al.*, 2011). Les LT CD8+ sont indispensables à la réponse antivirale dans le SNC (Divito *et al.*, 2006). Ces cellules vont donc contrôler la propagation virale en produisant de l'IFN γ , du TNF α , de la perforine, des granzymes, les ligands Fas ou TRAIL et provoquer la mort des cellules infectées (Russo *et al.*, 2015). Enfin, les neurones, comme les microglies, peuvent exprimer des gènes codant le CMH, complexe responsable de la présentation d'antigènes viraux. Bien que l'expression du CMH de type I est réprimée chez les neurones en santé, une infection du SNC par le virus de la rage (Irwin *et al.*, 1999), le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)

(Truong *et al.*, 2009), le virus HSV-1 (Abendroth *et al.*, 2000), le virus de la rougeole (Gogate *et al.*, 1996) ou le virus JEV (Das *et al.*, 2009) entraine une augmentation de la présentation antigénique du neurone aux lymphocytes T par les CMH de type I. Tous ces mécanismes de l'immunité innée et adaptative sont mis en place afin de pouvoir réprimer une infection virale. Par la suite, le SNC va devoir mettre en place un processus pour contrôler et réprimer la réponse immunitaire adaptative afin de rétablir l'homéostasie. Ce contrôle se fera principalement par la production de ligands de mort programmé (PD-L1 et PD-L2), qui une fois liés à leur récepteur PD-1, entraineront la mort des LT activés dans le SNC par apoptose (Lafon *et al.*, 2008, Nguyen *et al.*, 2015).

Le développement de maladies neurologiques implique des facteurs génétiques, mais également des facteurs environnementaux, comme des pathogènes d'origine virales. Les coronavirus humains sont un bon exemple de pathogènes viraux pouvant être impliqués dans les maladies neurologiques.

2. LES CORONAVIRUS

2.1- Généralités et classification

2.1.1- Généralités

Le nom de coronavirus provient de l'aspect visuel de ces virus. En effet, la présence de trimère de la glycoprotéine structurale S leur confère un aspect en forme de couronne, observable au microscope électronique, (Davies et al., 1979). Ce sont des virus ubiquitaires pouvant infecter un large éventail d'hôtes. Ils sont connus pour induire d'abord et avant tout des maladies respiratoires et entériques (S.H Myint, 1994). Initialement identifié au cours des années 1960 (Almeida et al., 1967, Hamre et al., 1966, McIntosh et al., 1967), les premiers coronavirus humains 229E (HCoV-229E) et OC43 (HCoV-OC43) provoquent des infections respiratoires bénignes comme le rhume (Hamre et al., 1966, McIntosh et al., 1967, S.H Myint, 1994). En 2003, un regain d'intérêt pour les coronavirus humains (HCoV) s'est manifesté suite à l'émergence d'une nouvelle souche, le SARS-CoV, principalement retrouvée dans les pays asiatiques et en Amérique du Nord. Cette souche, extrêmement contagieuse et sévère, provoque un syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) (Drosten et al., 2003, Fouchier et al., 2003, Ksiazek et al., 2003). Par la suite, deux autres coronavirus humains (HCoV) associés aux maladies respiratoires ont été découverts : les souches NL63 et HKU1 (van der Hoek et al., 2004, Woo et al., 2005). Dans le courant de l'année 2012, une nouvelle souche de coronavirus causant des pathologies respiratoires encore plus sévères que celles associées au SARS-CoV chez l'homme a émergé au Moyen-Orient. Cette souche nommée Middle-East Respiratory Syndrome (MERS-CoV) est issue d'une transmission zoonotique du chameau (Reusken et al., 2016).

2.1.2- Classification

Au sein de la classification de Baltimore, les coronavirus font partie de l'ordre des *Nidovirales*, de la famille des *Coronaviridae* et de la sous-famille des *Coronavirinae* (R.J. de Groot *et al.*, 2013, R.J. de Groot *et al.*, 2012). Cette sous-famille se divise en quatre genres (α -, β -, γ -, et δ -) (R.J. de Groot *et al.*, 2013), classés sur la base de données sérologiques puis moléculaires, qui regroupent des virus animaux connus depuis les années 1930 et des virus humains identifiés dans les années 1960 (Almeida *et al.*, 1967, Hamre *et al.*, 1966, McIntosh *et al.*, 1967). Les genres α - et β -coronavirus infectent les mammifères et ceux du genre γ - et δ - coronavirus infectent entre autres les oiseaux (figure 9). Les HCoV-229E et -NL63 se retrouvent dans le genre α -coronavirus et les HCoV-HKU1 et -OC43 (comme les souches du SARS-CoV et du MERS-CoV) appartiennent au genre des β -coronavirus.





2.2- Le cycle réplicatif

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN monocaténaire de polarité positive possédant des mécanismes similaires aux autres virus à ARN, comme le mode d'entrée (Brian et al., 2005). En revanche, ils possèdent un cycle réplicatif intracytoplasmique particulier ayant donné son nom à l'ordre des Nidovirales. En effet, Nido signifie en latin « le nid », ce qui est directement relié à la façon dont le génome est transcrit pour la production d'une multitude d'ARN sous-génomiques. La première étape de l'infection se produit lors de l'attachement de la glycoprotéine S à son récepteur cellulaire (figure 10). Les coronavirus utilisent des récepteurs différents selon l'espèce ou le type cellulaire qu'ils infectent. Suite à l'attachement, il y aura un changement conformationnel de la protéine S qui entrainera un rapprochement des domaines de fusion de la protéine avec la membrane de la cellule. Selon le coronavirus et le type de clivage protéique (voir chapitre 3.1 et 3.3), la particule virale va donc pénétrer dans la cellule soit par un mécanisme d'endocytose ou soit par fusion membranaire à la surface de la cellule (Matsuyama et al., 2005, Simmons et al., 2005). Suivant l'entrée du coronavirus dans la cellule, il y aura décapsidation pour libérer l'ARN viral dans le cytosol et la traduction des gènes viraux pourra alors commencer puisque le génome à ARN est de polarité positive. Ainsi, les cadres de lecture ORF1a et ORF1ab sont immédiatement traduits, en polyproteines pp1a et pp1ab. Cependant, la synthèse de la polyprotéine pp1ab requiert un décalage de lecture par le ribosome (Ribosomal Frame Shifting) qui sera nécessaire pour continuer la traduction de l'ARN génomique (Namy et al., 2006). Ces polyprotéines sont par la suite clivées par les protéases virales papain-like protease (PLPro) et protease 3C-like (3CLPro) permettant la formation des protéines non structurales (nsp : non structural protein) associées aux fonctions de réplication et de transcription. Selon les coronavirus, jusqu'à 16 nsp seront nécessaires pour la suite de la réplication et de la traduction des gènes viraux (Sawicki et al., 2007). La RdRp (ARN polymerase ARN-dépendante) est une des protéines produites suite au clivage. Elle participera, en association à la protéine N (Enjuanes et al., 2006), à la formation du complexe de transcription-réplication (RTC) qui va permettre de produire des copies d'ARN génomiques à polarité négative qui serviront à l'amplification des copies d'ARN à polarité positive en vue de l'encapsidation des futures particules virales (Zuniga et al., 2010). Le RTC participe également à la transcription des ARN sous-génomiques dédiés à la traduction des protéines virales par un processus caractéristique de l'ordre des Nidovirales, la « transcription discontinue ». Les segments sous-génomiques de polarité négative de différentes longueurs seront produits et ensuite amplifiés par la RTC afin de produire des ARN sous génomiques de polarité positive (Britton et al., 2008). La RdRp reconnaît une séquence dans la région 3' du génome, formée de structures secondaire hairpin et tertiaire pseudoknot, et débute la transcription de la copie négative du génome (de Haan et al., 2002, den Boon et al., 1996, S. Siddell et al., 2005, S.G. Siddell, 1995). Lorsque cette enzyme rencontre une séquence régulatrice de la transcription (TRS), la transcription peut s'arrêter et le RTC est alors relocalisé dans la portion 5' du génome où la transcription recommence afin de générer la séquence leader présente sur tous les ARN génomiques. 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. La protéine de nucléocapside N semble jouer un rôle dans le cette transcription discontinue favorisant le passage d'un TRS à l'autre (Zuniga et al., 2010). Ce mécanisme permet de générer des ARN sous-génomiques de polarité négative de différentes longueurs qui seront ensuite transcrits en ARN sous-génomiques de polarité positive puis traduits en protéines. Les protéines virales ainsi produites seront acheminées à la membrane du compartiment intermédiaire (ERGIC: Endoplasmic Reticulum/Golgi Intermediate Compartiment) afin d'y être encapsidées (de Haan et al., 1999). Pour finir, l'enveloppe de ce virus proviendrait des membranes du ERGIC puis la libération des nouveaux virions serait effectuée par exocytose (Blau et al., 2001). De plus, il a récemment été montré que les coronavirus avaient la capacité d'induirent des usines de réplication qui étaient issues du réticulum endoplasmique sous forme de vésicules à double membrane (Knoops et al., 2008).

Figure 10. A- Représentation schématique du génome de HCoV-OC43 dans le clone infectieux pBAC-OC43FL, adapté de Julien St-Jean. B- Cycle de réplication des coronavirus. Suite à l'attachement de la glycoprotéine S à son récepteur, le virus pénètre dans la cellule. L'ARN monocaténaire de polarité positive est libéré de la capside dans le cytosol où les ORF1a et 1ab sont traduits en polyprotéines pp1a et pp1ab qui seront clivées et associées au complexe de transcription-réplication. S'en suit alors la transcription continue et discontinue du génome viral qui génère respectivement des copies négatives du génome et des ARNm sous-génomiques 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 différentes lorg situes du génome et des différentes virales. Les particules virales peuvent dès lors s'assembler au sein du réticulum endoplasmique (RE), puis de l'appareil de Golgi, où elles acquièrent leur enveloppe puis sont libérées dans le milieu extracellulaire. Tirée de (Stadler *et al.*, 2003).



2.3- Biologie des coronavirus

2.3.1- Morphologie des virions

Les coronavirus sont des virus enveloppés de forme sphérique dont le génome, protégé par une capside hélicoïdale, est composé d'un ARN monocaténaire de très grande taille de polarité positive d'environ 26 à 32 kb (Lai, 1997) (figure 11). Ils possèdent une structure dont le diamètre est compris entre 100 et 160nm (Gagneur et al., 2002). Le génome code pour des protéines structurales nécessaires à la formation des nouveaux virions (les protéines S, M, N, E, et pour certains β -coronavirus, HE), et des protéines non structurales (ORF 1a et 1b) responsables de la réplication du matériel génomique et de la synthèse des protéines virales. Le génome des coronavirus possède également des gènes codant pour des protéines accessoires (tels que les gènes ns2 et ns5 présents chez HCoV-OC43) qui varient en nombre selon l'espèce, et qui influencent certains processus comme la prolifération, la mort cellulaire et la pathogenèse (Cruz *et al.*, 2013, Dedeurwaerder *et al.*, 2014, D. X. Liu *et al.*, 2014).

Figure 11. Représentation du virion des *Coronaviridae*. Le génome viral est associé aux protéines de la nucléocapside (N) formant ainsi la capside virale. Les protéines de structure de la membrane (M), de l'enveloppe (E), de la glycoprotéine de surface (S) ainsi que la protéine Hemagglutinin-Estérase (HE) sont associées à l'enveloppe lipidique. Tiré de (P. J. Talbot *et al.*, 2016).


2.3.2- Protéines accessoires

Le génome des coronavirus possède des cadres de lectures (ORFs) qui codent pour des protéines accessoires. Les dites protéines sont dépendantes de l'espèce des coronavirus, et leurs gènes sont retrouvés partout dans les régions intergéniques entre les ORFs des protéines structurales. La plupart des gènes accessoires sont précédés d'une séquence régulatrice transcriptionnelle (TRS), pour une traduction ultérieure en protéine. Par exemple, l'ORF3b du SARS-CoV est synthétisée via un site interne d'entrée du ribosome (Rota et al., 2003). Le maintien de leurs séguences dans le génome viral suggère qu'elles sont pertinentes in vivo. En effet, parmi les α-coronavirus, les gènes codant pour les protéines accessoires qui jouent un rôle dans la virulence ont été mis en évidence chez les coronavirus FCoV (Haijema et al., 2004), TGEV (McGoldrick et al., 1999), PHEV et HCoV-229E (D. X. Liu et al., 2014). Dans le cas de FIPV, la protéine 7a est nécessaire à la réplication in vitro, et participe comme antagoniste aux IFN de type I (Dedeurwaerder *et al.*, 2014). De plus, chez les β -coronavirus, plusieurs protéines accessoires ont été identifiées et leurs fonctions varient d'antagoniste à la production d'IFN ou de l'activation des ISRE comme pour le SARS-CoV et le MERS-CoV (D. X. Liu et al., 2014). Les génomes des virus BCoV, MHV et HCoV-OC43 (Goldstein et al., 2017) encodent également la protéine ns2 qui est un inhibiteur de l'endonucléase cellulaire RNAse L, responsable de la dégradation d'ARN double brin (Thornbrough et al., 2016, L. Zhao et al., 2012).

2.3.3- Protéines non structurales

Les protéines non structurales (nsp) des coronavirus sont codées par le génome viral, mais ne sont pas incorporées à l'intérieur des virions. La portion du génome viral qui encode les nsp se retrouve dans le cadre de lecture 1ab (ORF1ab), qui occupe les deux tiers du génome, et qui regroupe les gènes viraux qui sont nécessaires à la synthèse d'ARN viral. Suivant l'entrée du coronavirus dans la cellule, il y aura décapsidation pour libérer le génome dans le cytosol. La traduction des gènes viraux pourra alors commencer puisque le génome à ARN est de polarité positive, et le virus possède sa propre polymérase: l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp). Ainsi, les cadres de lecture ORF1a et ORF1ab sont immédiatement traduits. L'ORF1a est traduit en une polyprotéine nommée pp1a et code pour plusieurs protéines non structurales (nsp) (Namy *et al.*, 2006). Au cours de la traduction de l'ORF1a, le ribosome va éventuellement aussi traduire le cadre de lecture en entier (ORF1ab). Ce processus se fait dans 30% des cas. Ceci permet donc la production d'une polyproteine pp1ab et donne les protéines nsp1 à nsp16 (Ziebuhr *et al.*, 2000). Ce phénomène de changement de cadre de lecture, appelé *Programmed Ribosomal Frameshift*, est dû à un « glissement » d'un nucléotide, ce qui modifie le cadre de

lecture de la séquence. Les fonctions des nsp ont largement été étudiées, et sont liées à des activités diverses. Par exemple, les nsp 3 et 5 ont des activités de protéases, alors que d'autres vont avoir un impact sur l'interaction virus-hôte et sur la synthèse de l'ARN. En effet, plusieurs nsp possèderaient des rôles dans le détournement de la machinerie cellulaire (Lokugamage *et al.*, 2015, Narayanan *et al.*, 2015), la perturbation de la réponse immunitaire (Mielech *et al.*, 2014) et dans le tropisme tissulaire (Roth-Cross *et al.*, 2009).

2.3.4- Protéines structurales

2.3.4.1- Protéine de la nucléocapside N

La protéine de la nucléocapside N est une phosphoprotéine de 46 kDa. C'est une protéine chaperonne de l'ARN viral qui s'associe à l'ARN génomique en formant le complexe ribonucléoprotéique qui servira à la protection du génome (Lai, 1997). Cette protéine joue un rôle dans l'assemblage du virus (Hurst *et al.*, 2005, Narayanan *et al.*, 2003), la réplication, la transcription (Baric *et al.*, 1988, Denison *et al.*, 1999, van der Meer *et al.*, 1999, Zuniga *et al.*, 2010) et dans la traduction de l'ARNm viral (Tahara *et al.*, 1994). La protéine est organisée en deux domaines distincts : le domaine N-terminal (NTD) et le domaine C-terminal (CTD) qui sont intercalés avec des régions intrinsèquement désordonnées (*intrinsically disordered regions :* IDR) qui régulent les activités de liaisons de l'ARN. Ces IDRs vont réguler la fonction protéique, ainsi que l'interaction de la protéine N avec la protéine de membrane M (Narayanan *et al.*, 2000).

2.3.4.2- Protéine de membrane M

La glycoprotéine membranaire M, est la protéine virale la plus abondante. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type III formée d'environ 218 à 263 acides aminés, qui est impliquée dans le bourgeonnement et la formation des virions (Klumperman *et al.*, 1994, Mounir *et al.*, 1992). Principale composante structurelle dans l'enveloppe virale des coronavirus, cette protéine a une taille de 25 à 30kDa. Dans la cellule, elle se localise dans le RE (réticulum endoplasmique) et dans le golgi, à l'exception des coronavirus TGEV, SARS-CoV et FIPV où la protéine M peut atteindre la membrane plasmique (Jacobse-Geels *et al.*, 1983, Laviada *et al.*, 1990, Voss *et al.*, 2006). Lorsqu'elle est co-exprimée avec la protéine N, ces deux protéines peuvent, à elles seules, mener à la formation de pseudoparticules (Virus-like particles ; VLP) (Nal *et al.*, 2005, Tseng *et al.*, 2013).

2.3.4.3- Protéine d'enveloppe E

La protéine d'enveloppe E est la plus petite protéine structurale composée de seulement 76 à 109 acides aminés, avec une taille allant de 8 à 12kDa. Elle joue un rôle majeur dans l'assemblage et la morphogenèse des particules virales (Lim et al., 2001) ainsi que dans le bourgeonnement de ceux-ci (Kuo et al., 2003). Elle est présente en très faible proportion dans les virions. En effet, avec seulement 20 copies par particules, l'importance de cette protéine varie en fonction du coronavirus (Nieto-Torres et al., 2015, Ortego et al., 2002, Ye et al., 2007). En effet, pour le coronavirus HCoV-OC43, la protéine E est très importante dans la production de particules virales. Concernant TGEV (Curtis et al., 2002, Ortego et al., 2007, Ortego et al., 2002) et le MERS-CoV (Almazan et al., 2013), la délétion de la protéine E se traduit par une diminution de la propagation virale. Pour d'autre souches, comme MHV (Kuo et al., 2007, Kuo et al., 2003) et la SARS-CoV (DeDiego et al., 2007), la délétion de la protéine E entraine une diminution de la réplication virale. Cette protéine est également capable de former des canaux ioniques et d'augmenter la virulence chez le SARS-CoV (Jimenez-Guardeno et al., 2014, Liao et al., 2006, Nieto-Torres et al., 2015, Wilson et al., 2004), le MERS-CoV (Surya et al., 2015) et MHV (Madan et al., 2005). De plus, elle intervient dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 chez le SARS-CoV (Nieto-Torres et al., 2015).

2.3.4.4- Protéine hémagglutinine-estérase HE

La protéine hémagglutinine-estérase (HE) ne se retrouve pas chez tous les coronavirus. En effet, elle n'est présente que chez le sous-groupe 2A du genre des β-coronavirus tel que les virus BCoV, MHV et les coronavirus humains -HKU1 et -OC43. C'est une protéine transmembranaire de type I allant de 65 à 70 kDa qui possède deux activités spécifiques. La première est une activité hémagglutinine potentiellement impliquée dans l'interaction du virus avec un récepteur ayant les acides sialiques 4- ou 9-O-acétylé (Bakkers *et al.*, 2017). Sa deuxième fonction est une activité acétylestérase qui permet au virus de cliver sa liaison avec l'acide sialique (9-O ou 4-O acétylés) (R. J. de Groot, 2006, Rottier, 1990). Ces propriétés suggèrent que la protéine HE peut être impliquée dans la fixation du virion aux cellules hôtes ou lors de la relâche virale (Rottier, 1990). En effet, en ce qui concerne le HCoV-OC43 et HKU1, la fonction acétyl-estérase de la protéine HE influence la virulence en augmentant la production de particules infectieuses ou en facilitant la relâche des nouveaux virions à la fin du cycle de réplication (Desforges *et al.*, 2013a, X. Huang *et al.*, 2015b). Pour MHV, la protéine HE augmente sa neurovirulence (Kazi *et al.*, 2005).

2.4- La glycoprotéine de spicule S

2.4.1- Généralités

La glycoprotéine S est la protéine la plus étudiée et la mieux définie de toutes les protéines structurales. Cette protéine transmembranaire de type I possède une multitude de rôles et fonctions au niveau de la structure du virion, du tropisme cellulaire et d'organe, ainsi que dans la pathogenèse (Dalziel *et al.*, 1986, Fleming *et al.*, 1987, Gallagher *et al.*, 1990, Matsubara *et al.*, 1991, Taguchi, 1995, F. I. Wang *et al.*, 1992). De plus, elle est responsable de la liaison au récepteur (Dveksler *et al.*, 1991, Yokomori *et al.*, 1992) ainsi que de la fusion cellules-cellules ou virus-cellules. Du fait de sa présence à la surface des virions et des cellules infectées, elle est fortement reconnue par le SI, ce qui induit une production d'anticorps neutralisants (Collins *et al.*, 1982, Daniel *et al.*, 1993, P. J. Talbot *et al.*, 1984) ainsi que l'activation des LT cytotoxiques (Bergmann *et al.*, 1996, Castro *et al.*, 1995). Cette protéine représente un élément essentiel dans cette thèse, par conséquent, nous lui accorderons une section complète.

2.4.2- Structure

La glycoprotéine S est une protéine membranaire de 1160 à 1450 acides aminés, présente à la surface des particules virales sous forme trimérique (Krueger et al., 2001), et hautement glycosylée (Beniac et al., 2006). Cette glycoprotéine, séparée en deux sous-unités S1 et S2 (de Haan et al., 1999), fait partie des protéines membranaires de type I (figure 12). Le domaine S1 est impliqué dans la liaison au récepteur cellulaire. Il est constitué d'une région de liaison au récepteur (domaine de liaison au récepteur (DLR) et d'une région hypervariable, reconnu pour muter facilement, ce qui jouerait un rôle dans l'échappement au SI (Phillips et al., 2001, Rowe et al., 1997, Ujike et al., 2015). Entre les parties S1 et S2 de cette protéine, il y a un site de clivage protéolytique cellulaire nommé S1/S2 (Millet et al., 2015). Ce clivage, potentiellement effectué par différentes protéases cellulaires comme les pro-protéine convertases (comme la furine), les cathepsines et les protéases à sérines transmembranaires (Transmembrane Serine Protease: TMPRSS), se produit chez la plupart des coronavirus tel que MHV, BCoV, SARS-CoV, MERS-CoV, IBV, HCoV-HKU1, HCoV-229E et HCoV-OC43 (Belouzard et al., 2010, Bertram et al., 2013, Hasoksuz et al., 2002, Le Coupanec et al., 2015, Millet et al., 2015, Qian et al., 2013, Siu et al., 2014, Walls et al., 2016a). La région S2 quant à elle, contient une partie transmembranaire qui inclut un peptide de fusion (PF) (B. J. Bosch et al., 2003) et deux domaines répétés de 7 acides aminés (heptad repeats : HR1 et HR2)

impliqués dans la fusion membranaire (Supekar *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2004). Un deuxième site de clivage, nommé S2', se localise en amont du peptide de fusion chez la majorité des coronavirus (Belouzard *et al.*, 2009, Millet *et al.*, 2015). Le clivage de ce site se fera généralement pendant les premières étapes d'infection (entrée virale). Il pourra être effectué par différentes protéases cellulaires comme pour le site S1/S2 (Millet *et al.*, 2015).

Figure 12. Structure de la glycoprotéine S de HCoV-OC43. La glycoprotéine S est séparée en deux sous-unités S1 et S2. La sous-unité S1 comprend le DLR (domaine de liaison au récépteur) ainsi que la RHV (région hyper variable). La région S2 comprend quant à elle un segment intracytoplasmique et transmembranaire, ainsi que trois domaines fonctionnels juxtaposés l'un à l'autre qui incluent le PF (peptide de fusion) et les HR1 et HR2 (heptad repeat region). Les deux flèches représentent les deux sites de clivage S1/S2 et S2'. Adaptée de (Jacomy *et al.*, 2010).



2.4.3- Fonctions

Une des principales fonctions de la glycoprotéine S est l'attachement du virus à la cellule via son DLR situé du côté amino-terminal de la sous-unité S1 (Taguchi, 1995). Cette fonction en fait le déterminant majeur du tropisme cellulaire chez les différentes espèces de coronavirus (Gallagher *et al.*, 2001, Hofmann *et al.*, 2004). En effet, chez les coronavirus, la localisation du DLR ainsi que la capacité à reconnaître différents récepteurs spécifiques va varier. Certains récepteurs ont été bien caractérisés, tandis que d'autres ne sont pas encore connus, comme pour le HCoV-OC43. Parmi les α -coronavirus, FCoV, TGEV et HCoV-229E reconnaissent l'aminopeptidase N (APN), aussi appelé CD13, comme récepteur (Delmas *et al.*, 1992, Hegyi *et al.*, 1998, Lachance *et al.*, 1998, Yeager *et al.*, 1992), qui est une métalloprotéase de type I ubiquitaire exprimée dans plusieurs organes et tissus comme les reins et les poumons. Le HCoV-NL63 (membre des α -coronavirus) et le SARS-CoV (membre des β -coronavirus) reconnaissent *l'Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2) (Hofmann *et al.*, 2005, F. Q. Li *et al.*,

2007, Pohlmann et al., 2006, M. K. Smith et al., 2006). Il s'agit d'une exopeptidase principalement secrétée par les cellules endothéliales vasculaires et respiratoires. Elle catalyse la conversion de l'angiotensine I et II en angiotensine 1-7 et 1-9 (Keidar et al., 2007). Le SARS-CoV reconnaît également un récepteur alternatif : L-SIGN (CD209) qui est exprimé dans le foie et les poumons (Jeffers et al., 2004). Concernant les coronavirus murins (MuCoV représenté par les diverses souches de MHV) (membre des β -coronavirus), ils reconnaissent comme récepteur une glycoprotéine de surface cellulaire de la famille des immunoglobulines exprimée sur les cellules épithéliales et les leucocytes (Hemmila et al., 2004, Saeki et al., 1997, Williams et al., 1991); soit la Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1). Le MERS-CoV quant à lui utilise la peptidase dipeptityl 4 (DPP4) qui est une glycoprotéine jouant un rôle dans le métabolisme du glucose et dans l'adhésion cellulaire (Raj et al., 2013). Enfin, les espèces BCoV et HCoV-OC43 n'ont pas encore de récepteur cellulaire spécifique identifié à ce jour. En revanche, leur liaison au récepteur est dépendante de l'acide sialique acétylé en position C9 (Gelinas et al., 2001, Kunkel et al., 1993, Schwegmann-Wessels et al., 2006), et est essentielle pour l'infection. Dès lors que la glycoprotéine S se lie à son récepteur, une cascade de réaction va mener à l'internalisation du virus dans la cellule. Il y aura un clivage de la glycoprotéine qui va mener à un changement conformationnel. Celui-ci va se traduire par un repliement de la sous-unité S2 et l'exposition des domaines de fusion dont le PF et les régions répétées HR1 et HR2 à la membrane plasmique de la cellule-cible afin de permettre la fusion membranaire (B. J. Bosch et al., 2003, Hulswit et al., 2016, Matsuyama et al., 2002, Walls et al., 2016b). La glycoprotéine S joue également un rôle important dans la pathogenèse induite par les coronavirus. En effet, cette protéine est impliquée dans la neurovirulence ainsi que la dissémination virale (Fu et al., 2004, Phillips et al., 2001, Taguchi et al., 1995). La plupart des études portant sur le rôle de la protéine S dans la neurovirulence, ont été obtenues à l'aide du MuCoV (souche MHV-A59 et -JHM qui induit des neuropathologies différentes). En effet, la souche MHV-A59 est hépatotrope (induisant des hépatites) et neurotrope, menant à des lésions de démyélinisations. A l'inverse, la souche MHV-JHM est principalement neurotrope et induit une neurovirulence importante menant à la perte neuronale ainsi qu'à la mort de l'animal. Par génétique inverse, il a été démontré que la protéine S pouvait influencer la neurovirulence et la dissémination in vivo ou in vitro (Fu et al., 2004, Phillips et al., 2001, Taguchi et al., 1995). En effet, le remplacement de la protéine S de MHV-A59 par celle de -JHM mène à la production d'une souche recombinante possédant une neurovirulence accrue, ainsi qu'à une dissémination virale plus importante par rapport à la souche -A59 (Phillips et al., 1999, Phillips et al., 2002). De plus, cette souche recombinante n'est plus capable d'induire une hépatite comparativement à la souche de référence MHV-A59 (Navas *et al.*, 2001). Point important s'il en est, l'application du schéma inverse, c'est-à-dire le remplacement de la protéine S de MHV-JHM par celle de MHV-A59, met en évidence l'absence de diminution de la neurovirulence par la souche résultante (lacono *et al.*, 2006), et l'absence de phénotype hépatotrope (Navas *et al.*, 2003). Ces résultats permettent donc d'indiquer que la glycoprotéine S est un facteur important dans la neurovirulence et le tropisme d'organe, mais que d'autres facteurs viraux sont aussi impliqués dans le processus.

2.4.4- Évolution et adaptation

Les coronavirus ont la capacité d'acquérir différentes mutations dans leur génome, leur permettant de produire des variants pour accroître leur diversité génétique (Herrewegh et al., 1998, Woo et al., 2006a, Woo et al., 2006b). Cette capacité est le résultat de trois mécanismes différents, Premièrement, la polymérase virale des coronavirus (RdRp) a une très faible fidélité lors de la réplication virale. En effet, cette polymérase possède un taux d'erreur d'un nucléotide tous les 1000 à 10 000 nucléotides répliqués, ce qui contribue à sa faible fidélité lors de la réplication virale (Duffy et al., 2008, Jenkins et al., 2002), et permet la génération de plusieurs quasi-espèces (Lauring et al., 2010). En revanche, les coronavirus ont une exonucléase qui permet une correction lors d'une incorporation d'une mutation, ce qui rend ces virus plus fidèles comparativement aux autres virus à ARN (E. C. Smith et al., 2013a, E. C. Smith et al., 2013b). Deuxièmement, les coronavirus ont une fréquence de recombinaison homologue très élevée. En effet, de par leur mode de réplication (voir section 2.2 portant sur la réplication virale), les chances d'avoir de la recombinaison homologue au niveau des ARNs sont élevées, participant ainsi à la génération de nouvelles quasi-espèces (Lai, 1997, Pasternak et al., 2006). **Troisièmement**, le génome des coronavirus a la plus grande taille parmi tous les virus à ARN. Par conséquent, ils possèdent une meilleure plasticité dans la modification de leur gènes (Forni et al., 2017, Woo et al., 2009).

Les mutations produites au sein de la protéine S peuvent moduler les principaux rôles et fonctions de celle-ci, soit le tropisme et la pathogenèse. Par exemple, après une infection persistante, la souche hépatotrope -A59 de MHV va acquérir des mutations dans la protéine S au niveau du domaine de liaison au récepteur et dans le site de clivage. Ces mutations vont diminuer la capacité du virus à atteindre le foie et y causer des hépatites (Navas-Martin *et al.*, 2005). Il en est de même pour la souche -JHM qui va générer un variant dont la neurovirulence et la dissémination virale seront augmentées (Ontiveros *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré que suite à une infection persistante, ce virus pouvait développer une spécificité pour un second

récepteur comme l'héparane sulfate (de Haan et al., 2005, Ontiveros et al., 2003). Un autre exemple dont les mutations affectent le tropisme cellulaire est le cas du coronavirus félin (FCoV). En effet, après acquisition de mutations dans le site de clivage de la protéine S, ce virus, infectant initialement les cellules épithéliales du système gastro-intestinal, va infecter les macrophages, ce qui augmentera considérablement sa virulence (Licitra et al., 2013). Cette capacité d'adaptation de la protéine S via l'acquisition de mutations pourrait permettre aux virus de franchir la barrière d'espèce. Un exemple pouvant illustrer ce point est le virus du SARS-CoV. En effet, lors de l'épidémie de 2003 (Song et al., 2005), il a été démontré que les civettes, contaminées par les chauves-souris, peuvent être des hôtes intermédiaires lors de leur passage sur les marchés alimentaires. Elles seraient ainsi à l'origine de la contamination humaine, ce qui aurait permis le franchissement de barrière d'espèce et la capacité à infecter l'humain (Peiris et al., 2004). Enfin, pour le coronavirus porcin (Porcine epidemic diarrhea virus, PDEV), l'apparition de mutations dans la protéine S a permis au virus de développer une réplication virale plus efficace avec une virulence atténuée (T. Sato et al., 2011). De la même manière, des mutations acquises chez le coronavirus aviaire (Infectious bronchitis virus, IBV) a permis au virus de se propager par fusion cellule-cellule, lui permettant ainsi d'élargir son tropisme cellulaire (Yamada et al., 2009b).

C'est ici qu'intervient la souche HCoV-OC43, étudiée au cours de mon doctorat. Il a été démontré au sein du laboratoire du Dr Pierre Talbot, que cette souche pouvait effectuer des infections persistantes dans des lignées neurales humaines représentatives du SNC. Plusieurs mutations situées dans la glycoprotéine S ont été répertoriées suite à ces infections (St-Jean et al., 2006b) (figure 13). Parmi toutes les mutations ponctuelles acquises dans la protéine, quatre d'entre elles se sont avérées prépondérantes et ont été conservées à travers les passages cellulaires (St-Jean et al., 2006b). Ces mutations, D24Y, S83T, H183R et Y241H, ont été introduites dans un clone moléculaire infectieux (pBAC) afin de pouvoir étudier leur rôle biologique (St-Jean et al., 2006b). Ainsi, il a été mis en évidence que, en comparaison au virus de référence de HCoV-OC43 qui cause une encéphalite chez la souris ainsi qu'une inflammation et une dégénérescence neuronale (Jacomy et al., 2006, Jacomy et al., 2003), le virus mutant arborant les quatre mutations induit une encéphalite mais également une paralysie des membres postérieurs avec des lésions de démyélinisation dans la moelle épinière, et une accentuation de la mortalité des souris infectées (Jacomy et al., 2006, Jacomy et al., 2010, Jacomy et al., 2003). Ces mutations sont également à l'origine d'une dissémination accrue, d'une réplication virale augmentée et d'une neuroinflammation plus importante au sein du SNC (Jacomy et al., 2010). Néanmoins, ces mutations n'affectent pas le tropisme cellulaire du virus,

et le neurone reste la cible principale (Jacomy *et al.*, 2010). Enfin, le virus mutant rOC/Us241, qui contient une seule mutation et dont la réplication virale dans le SNC ou la moelle épinière est similaire au virus de référence, induit une paralysie des membres postérieurs impliquant l'excitotoxicité glutamatergique, sans toutefois provoquer une mortalité plus importante des souris, suggérant que cette mutation est davantage reliée aux dommages à la moelle épinière (Brison *et al.*, 2011, Brison *et al.*, 2014).

Figure 13. Localisation des mutations prédominantes (D24Y, S83T, H183R et Y241H) acquises suite à l'infection persistante du virus sur des lignées neurales humaines. Les quatre mutations ont toutes été identifiées dans la région de liaison aux récepteurs. Ces quatre mutations ont été réintroduites dans un clone moléculaire infectieux afin de générer un virus recombinant. Adaptée de (Jacomy *et al.*, 2010).



2.5- Pathologies et réponses immunitaires associées aux infections coronavirales

2.5.1- Les Coronavirus non humains

2.5.1.1- MuCoV

L'espèce MuCoV (*murine coronavirus*) regroupe plusieurs virus pouvant induire différentes variétés de maladies chez la souris et le rat, dont les hépatites, les gastro entériques et des encéphalites accompagnées de lésions de démyélinisation dans la moelle épinière. Les différentes souches de MuCoV sont divisées en deux sous-groupes : les virus entérotropes et ceux ayant un tropisme plus large. Les virus entérotropes regroupent les souches MHV -D, -Y, - RU, -S/CDC, -LIVIM et -DVIM, et produisent des infections confinées au niveau du système gastro-intestinal (Homberger *et al.*, 1998). 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, les voies respiratoires et le SNC. Bien que ces souches soient principalement entérotropes, elles entrent dans l'organisme via les voies respiratoires (Carthew *et al.*, 1981). Parmi les MuCoV, les souches MHV-A59 et -JHM sont les plus étudiées puisqu'elles servent de modèles pour différentes maladies humaines, telles que l'hépatite, l'encéphalite et les maladies démyélinisantes comme la SEP.

La première souche de MHV neurotrope a été 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). Il s'agit de la souche neurovirulente MHV-JHM. Cette neurovirulence de la souche MHV-JHM pourrait être attribuée à la capacité de la protéine S virale d'augmenter l'efficacité du virus à se disséminer à travers le SNC (Gallagher et al., 1992, Ontiveros et al., 2003). Cette souche est capable d'infecter les cellules gliales et neuronales, induisant une encéphalite aiguë avec un fort taux de mortalité chez la souris (Bailey et al., 1949, Cheever et al., 1949, Marten et al., 2000, P. J. Talbot et al., 2001). Les souris survivant à l'infection présentent une pathologie chronique associée à des lésions de démyélinisation avec des épisodes successifs de démyélinisation/remyélinisation (P. J. Talbot et al., 2001). L'infection par MHV-JHM induit une activation exacerbée du SI inné (IFN-β, d'IL-1 et d'IL-6) avec une infiltration importante de macrophages et de polynucléaires neutrophiles (Haring et al., 2001). De plus, cette souche active les deux branches du SI adaptatif, à savoir les LB et LT qui participeront à l'élimination du virus (Sussman et al., 1989). Les anticorps contre le virus sont importants pour prévenir une réactivation du virus ainsi que la mort de l'animal (Lin et al., 1999) et une composante auto-immunitaire a été suggérée (Houtman et al., 1996a, Houtman et al., 1996b,

Wu *et al.*, 2000). En effet, suite à une infection chez le rat, il y aura une induction de LT dirigé contre la MBP. Un transfert adoptif des dits LT à des rats sains induit une maladie similaire à l'EAE (R. Watanabe *et al.*, 1983). Plusieurs variants de -JHM, atténués de par le fait qu'il provoque moins de mortalité, ont été isolés et ont permis d'étudier plus efficacement la démyélinisation résultant de l'infection. Il s'agit entre autres des souches JHM-DL, -DM et -D (Stohlman *et al.*, 1982).

La deuxième souche, également utilisée comme modèle de maladies démyélinisantes, est la souche MHV-A59. Cette souche possède un tropisme neuronal et glial, mais est moins neurovirulente que MHV-JHM (Gombold et al., 1995, Lavi et al., 1984, Phillips et al., 2002). De ce fait, cela en fait un modèle intéressant pour l'étude de la démyélinisation (Das Sarma et al., 2000, Lavi et al., 1984, MacNamara et al., 2005). Suite à une infection, le virus ne sera jamais complètement éliminé. En effet, le virus va persister dans le SNC, et les lésions de démyélinisation vont être observées à compter d'une semaine suivant l'infection et vont devenir plus évidentes dès quatre semaines après (Bender et al., 2010b). Le mécanisme menant à la démyélinisation suite à l'infection n'est pas totalement élucidé. Deux mécanismes différents existent quant à la démyélinisation observée. Le premier repose sur les conséquences cellulaires directes de l'infection virale au SNC (Lampert et al., 1973, Weiner, 1973). Le second mécanisme repose sur les conséquences de la réponse immunitaire due à l'infection (Amor et al., 2010, R. Watanabe et al., 1983, Wu et al., 1999). Il est à noter que ces deux concepts ne sont pas mutuellement exclusifs et qu'une double contribution peut expliquer la démyélinisation induite par MHV. La capacité de MHV d'infecter et de tuer les neurones, participant ainsi à la neurodégénérescence menant à la perte de la myéline (Dales, 1995, Fazakerley et al., 1993) se définit par le mécanisme appelé : « inside-out » (Tsunoda et al., 2002). Cependant, la persistance d'ARN et des antigènes viraux favorise la rétention des LT et des macrophages au SNC, ainsi que la production des cytokines (IL10, CSCL10 et CCL5) (Glass et al., 2002). Cette inflammation importante va mener à la destruction de la gaine de myéline (Ramakrishna et al., 2006, Ramakrishna et al., 2004) en ciblant les oligodendrocytes infectées. Ce mécanisme est appelé, à l'inverse du précédent : « outside-in ».

2.5.1.2- FeCoV

Les infections par le coronavirus félin sont très répandues dans la population de chat et restent généralement asymptomatiques ou provoquent de légers problèmes entériques. Deux souches de FCoV existent. La première, avirulente, provoque des symptômes entériques doux et est appelée FeCoV (Coronavirus Entérique Félin). La seconde souche, la plus virulente et

létale est appelée FIPV (Péritonite Infectieuse Féline). Dans 5% des cas de FeCoV, il y aura apparition de mutations dans la glycoprotéine S (au niveau du site de clivage) provoquant ainsi l'émergence de la souche FIPV (Kipar *et al.*, 2014). Contrairement à FeCoV qui se réplique dans les entérocytes, le virus FIPV a un tropisme pour les monocytes/macrophages (Kipar *et al.*, 2010). L'infection de cellules conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, II-1ß et GM-CSF. L'infection de ces cellules permet au virus une meilleure dissémination à travers l'organisme, provoquant ainsi une plus grande inflammation, causant des dommages aux vaisseaux sanguins, la perte de fonctions de plusieurs organes, et la mort. L'utilisation de monocytes/macrophages par FIPV comme moyen de dissémination permet également au virus d'atteindre le SNC dans 30% des cas (Foley *et al.*, 1998). Une fois arrivé au SNC, le virus provoque une inflammation (Foley *et al.*, 2003) qui contribue au développement de pathologies comme la méningite ou des atteintes de la moelle épinière (Legendre *et al.*, 1975, Slauson *et al.*, 1972).

2.5.1.3- PHEV

Les porcs sont des animaux susceptibles aux coronavirus: le *porcine hemagglutinating encephalitis virus* (PHEV). Ce betacoronavirus a été isolé en 1962 au Canada d'un porcelet ayant eu une encéphalomyélite (Greig *et al.*, 1962). Ce virus est responsable de gastroentérites, mais également d'encéphalomyélites chez les porcelets (Jung *et al.*, 2016). Ce virus est capable d'envahir le SNC via les neurones périphériques (W. Gao *et al.*, 2011). Bien que ce virus se retrouve dans le cerveau des porcelets, il n'induit pas d'inflammation de façon très importante (Hirano *et al.*, 2004).

2.5.2- Les Coronavirus humains endémiques

2.5.2.1- HCoV-OC43

La souche humaine OC43, appartenant au genre des β-coronavirus, a été isolée en 1967 (McIntosh *et al.*, 1967). Connue pour induire des infections respiratoires chez l'homme (S. H. Myint, 1995), elle représente l'une des quatre souches de HCoV qui sont responsables d'environ 20% des rhumes annuels (S.H Myint, 1994, Vabret *et al.*, 2005). Endémiques, les pics d'infections par ces virus se produisent durant l'hiver et au printemps (Larson *et al.*, 1980, S. H. Myint, 1995). En plus d'induire des rhumes, ces virus sont capables d'induire des pathologies plus sévères telles que l'exacerbation d'asthme et des pneumonies chez des nouveau-nés ou chez des personnes immunodéprimées (Gagneur *et al.*, 2002, Gerna *et al.*, 2006, Sizun *et al.*,

1993, Sizun *et al.*, 1995, Woo *et al.*, 2005). Bien que la souche -OC43 soit un virus respiratoire, c'est sa capacité à atteindre le SNC, à se répliquer, se disséminer et à causer des pathologies au sein de ce système complexe qui ont attisé l'intérêt de notre laboratoire. En effet, il est reconnu comme étant un **agent étiologique potentiel** de différentes maladies neurologiques du SNC (Brison *et al.*, 2011, Desforges *et al.*, 2014a, P. J. Talbot *et al.*, 2001). La souche OC43 possède des propriétés neuroinvasives, neurotropes et neurovirulentes chez la souris.

La neuroinvasion, qui se définit comme la capacité d'un pathogène à atteindre le SNC à partir de la périphérie, est l'une des capacités dont peut user le virus HCoV-OC43. Les principales démonstrations de sa neuroinvasion chez l'humain proviennent de la détection de son ARN dans des cerveaux post-mortem (Arbour et al., 2000), et d'anticorps réactifs dans le LCR (Fazzini et al., 1992). L'utilisation d'un modèle murin (Jacomy et al., 2003) a permis de mieux définir son mécanisme de neuroinvasion. En effet, lorsqu'il est injecté par voie intranasale chez la souris, le virus va atteindre le SNC dans lequel il va se propager (Desforges et al., 2013a, Jacomy et al., 2003, Le Coupanec et al., 2015). La principale voie de neuroinvasion pour atteindre le SNC implique les nerfs périphériques, comme le nerf olfactif (Dubé et al 2017). Le nerf olfactif, qui fait le lien entre l'épithélium olfactif par les neurones sensoriels olfactifs et le bulbe olfactif au niveau de l'encéphale, est le chemin le plus court par lequel un virus peut atteindre le SNC. D'autre nerfs, comme le nerf voméronasal, impliqué dans la détection des phéromones, de même que les nerfs lingual et trijumeau, pourraient servir d'accès au virus pour aller jusqu'au SNC, comme le font les virus HSV-1 (Flowerdew et al., 2013), VZV (Gilden et al., 2015), VSV (Detje et al., 2009), influenza A (C. H. Park et al., 2002) ainsi que le virus de la maladie Borna (I. Mori et al., 2005).

Le neurotropisme se définit comme la capacité d'un virus à infecter les cellules du SNC. Suite à la neuroinvasion, HCoV-OC43 sera en mesure d'infecter plusieurs types cellulaires du SNC, dont le neurone qui représente la cible principale. HCoV-OC43 est également en mesure d'infecter de manière abortive les autres types cellulaires comme les astrocytes, microglies et oligodendrocytes (Jacomy *et al.*, 2006, Jacomy *et al.*, 2003). De plus, ce virus est capable d'établir des infections persistantes (Arbour *et al.*, 1999a, Arbour *et al.*, 1999b, Arbour *et al.*, 1998) en culture cellulaire et le virus peut persister plus d'un an dans le cerveau (présence d'ARN viral) chez la souris infectée (Jacomy *et al.*, 2006). De plus, chez l'humain, l'ARN de ce virus a été retrouvé dans le SNC de plusieurs personnes atteintes de maladies neurologiques comme l'Alzheimer, le Parkinson ou la sclérose en plaques, et même chez des patients ne présentant pas de maladies neurologiques (Arbour *et al.*, 2000), ce qui suggère qu'il peut aussi établir une persistance chez l'humain.

Enfin, la neurovirulence, l'un des principaux intérêts des études sur HCoV-OC43, porte sur le fait qu'il est potentiellement neurovirulent chez l'humain. Bien qu'aucune preuve formelle n'ait encore été publiée à ce jour, plusieurs indices tendent à démontrer que ce virus pourrait être neurovirulent chez l'Homme. En effet, de l'ARN de HCoV-OC43 a été détecté dans le LCR (Cristallo et al., 1997), ainsi que dans le cerveau (Arbour et al., 2000, Stewart et al., 1992) de patients atteints de maladies neurologiques comme la sclérose en plaques. 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). Finalement, une étude portant sur le décès d'un nourrisson de 11 mois suite à une encéphalite virale a démontré la présence du virus HCoV-OC43 au niveau du cerveau (S. Morfopoulou et al., 2016). Même s'il est impossible d'affirmer que le coronavirus est responsable de la mort de l'enfant, cet exemple tend à démontrer la neurovirulence du virus parmi des individus susceptibles à l'infection. Il est par contre clair que ce virus possède des propriétés neurovirulentes chez la souris (Jacomy et al., 2006, Jacomy et al., 2003). En effet, il a été établi, suite à des infections intracérébrale ou intranasale, que le virus pouvait induire des signes neurologiques menant à des encéphalites, des variations dans la prise de poids de la souris, mais également la mort de l'individu (Jacomy et al., 2003, Le Coupanec et al., 2015). Ce degré de neurovirulence est variable, et dépend des mutations présentes dans la glycoprotéine S (Jacomy et al., 2010, Le Coupanec et al., 2015, Meessen-Pinard et al., 2017). Il a également été démontré, au sein de notre laboratoire, qu'un des variants induisait une paralysie des membres postérieurs, menant à une démyélinisation (Brison et al., 2011). Le fait que ce variant soit capable d'induire des neuropathologies associées à la paralysie et à de la démyélinisation appuie l'hypothèse d'un possible lien entre le HCoV-OC43 et les maladies neurologiques. Enfin, l'activation du système immunitaire (SI) pourrait également participer aux dommages neuronaux. En effet, le virus HCoV-OC43 provoque une sécrétion de cytokines (TNF α , IFN- γ , IL-1, IL-6), de chimiokines (CCL5, CCL2 et CXCL10) ainsi que l'infiltration de LT (CD4+ et CD8+) (Jacomy et al., 2010). Des LT autoréactifs capables de reconnaître le virus HCoV-OC43 et les protéines de la myéline ont été mis en évidence chez des patients atteints de la SEP (Boucher et al., 2007).

2.5.2.2- Les HCoV-229E, -NL63 et -HKU1

Outre la souche -OC43, il existe trois autres coronavirus humains endémiques : les souches -229, -NL63 et -HKU1. La souche -229E est capable d'atteindre et d'envahir le SNC humain. Par contre, nous n'avons pas encore pu identifier les souches -HKU1 et -NL63 dans le

SNC de l'Homme. Ce sont tous des virus respiratoires dont la transmission s'effectue par aérosols avec des durées d'incubation courtes de l'ordre de trois jours (Vabret et al., 2009b). L'infection s'amorce par la présence de gouttelettes de sécrétions oropharyngées infectées qui atteignent les muqueuses nasales. Les coronavirus humains induisent les symptômes du rhume : éternuements, écoulements nasaux, maux de tête et de gorge (Tyrrell et al., 1993). La primo-infection survient en bas âge et les réinfections sont fréquentes tout au long de la vie. Chez une personne adulte saine et immunocompétente, l'infection se limitera aux voies respiratoires supérieures (Vabret et al., 2009b). Les anticorps anti-HCoV, présents dans le sérum, seront dirigés principalement contre la glycoprotéine S (Macnaughton et al., 1981). Ces anticorps vont être nécessaires pour l'atténuation des symptômes, mais n'empêcheront pas une nouvelle infection (Callow, 1985). Ces virus peuvent également, dans certaines circonstances, atteindre les voies respiratoires inférieures comme la trachée, les bronches et les poumons, pour y provoquer des pathologies plus sévères de type pneumonie ou bronchite. Ce genre de complication est principalement observé chez des personnes immunodéprimées comme les personnes âgées ou les nourrissons (Gagneur et al., 2002, Gerna et al., 2006, Johnston et al., 1995, Woo et al., 2005).

2.5.3- Les Coronavirus émergents

Depuis 2003, deux nouvelles souches de coronavirus pouvant infecter l'humain ont émergé, soit le SARS-CoV et le MERS-CoV. Le réservoir naturel de ces deux virus est les chauves-souris, et ils furent d'abord transmis à des civettes pour le SARS-CoV, et à des dromadaires pour le MERS-CoV avant d'être transmis à l'homme (W. Li *et al.*, 2005, Zumla *et al.*, 2015). Ces virus, extrêmement virulents, provoquent des infections sévères au niveau des voies respiratoires inférieures. La facilité de transmission, ainsi que le taux de mortalité diffèrent entre les deux virus. Le SARS-CoV est bien plus contagieux que le MERS-CoV, mais moins virulent (Peiris *et al.*, 2004, J. Zhou *et al.*, 2015).

2.5.3.1- Le SARS-CoV

L'épidémie du SARS-CoV a commencé dans la province du Guangdong en Chine en novembre 2002 avec une épidémie de syndrome respiratoire aigu qui a provoqué 300 cas humains et 5 décès. Fin février 2003, cette épidémie a atteint Hong Kong, puis s'est propagée dans plusieurs pays (CDC, 2003). Avec plus de 8270 cas et 775 décès, il s'agit ici de la plus grosse épidémie due à un coronavirus jusqu'en 2003 (Poon *et al.*, 2004). La période d'incubation de ce virus est de 2 à 6 jours. Par la suite, les patients développent les symptômes

de la grippe (fièvre, frissons, anorexie et raideurs) (Cheng et al., 2013). Plusieurs jours après ce début de maladie, des symptômes respiratoires plus graves apparaissent. Le virus du SARS infecte principalement les pneumocytes de type I, cellules responsables des échanges gazeux (Haagmans et al., 2004). Cependant, il infecte aussi le tractus gastro-intestinal, le foie, les reins et le cerveau (Gu et al., 2005b). Les patients infectés par ce virus présentent des dommages alvéolaires importants, des œdèmes pulmonaires, des inflammations aux poumons, des complications thromboemboliques et dans certains cas, la pathologie va devenir un syndrome de détresse respiratoire aiguë sévère (SRAS) (Graham et al., 2013, Kong et al., 2009). Lors du développement du syndrome du SRAS, il y aura une forte dérégulation de la réponse immunitaire. Une augmentation des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des chimiokines est observée, entrainant une inflammation dommageable pour l'organisme (Chen et al., 2010, Kong et al., 2009). Le virus est également capable, de par ses protéines virales comme nsp1, d'inhiber l'activation des gènes stimulant l'interféron (ISG) (Yoshikawa 2010), prévenant ainsi la sécrétion des IFNs de type I. De plus, les protéines ORF3b et 6 bloquent également la voie liée à l'IFN en inhibant les voies NF-kB et JAK-STAT (Frieman et al., 2007, Kopecky-Bromberg et al., 2007). Ce virus est aussi capable de retarder la réponse à l'IFN pour augmenter la présence des monocytes/macrophages présents dans les poumons, entrainant une augmentation de cytokines pro-inflammatoire et un dysfonctionnement de la réponse des cellules T vis-à-vis du virus, provoguant ainsi des pneumopathies (Channappanavar et al., 2016). Le virus répond rapidement pour faire face à la réponse immunitaire, et ainsi la contrer. Il a même évolué pour restreindre le nombre de cellules LT (CD4+ et CD8+), ainsi que retarder leur activation, qui sont essentielles pour éliminer les cellules infectées par ce pathogène (T.li 2004a, Cameron 2008).

2.5.3.2- Le MERS-CoV

Le virus du MERS a été identifié pour la première fois en 2012 en Arabie Saoudite (Zaki *et al.*, 2012). Depuis, il a largement circulé dans la péninsule arabique (Al-Tawfiq *et al.*, 2014). Les symptômes causés par ce virus diffèrent chez les patients, mais ressemblent à ceux observés pour le SARS-CoV. Il peut être asymptomatique, mais également causer de la fièvre, de la toux, des détresses respiratoires et des pneumonies, conduisant à la mort dans environ 30% des cas. Il infecte les monocytes et macrophages, mais de manière abortive comparativement au SARS-CoV (Tynell *et al.*, 2016, J. Zhou *et al.*, 2014). Le fait que le virus du MERS soit capable d'infecter divers types cellulaires permet possiblement au virus de mieux se disséminer à travers l'organisme. De l'ARN viral a pu être détecté dans les cerveaux de souris exprimant le récepteur DDP4, suggérant les capacités neuroinvasives de ce dernier (Agrawal *et*

al., 2015, Corman *et al.*, 2016). L'infection par le MERS-CoV conduit, comme par le SARS-CoV, à une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (H. Chu *et al.*, 2014, J. Zhou *et al.*, 2014). De plus, ce virus a su adopter une stratégie efficace pour inhiber l'activation de la voie d'IFN. En effet, il cible le réarrangement structural de la chromatine condensée, empêchant ainsi la transcription des ISGs (Menachery *et al.*, 2014). Il est également en mesure de provoquer la mort des LT en les infectant, diminuant ainsi l'efficacité de la réponse immunitaire adaptative (H. Chu *et al.*, 2014). Le détournement du SI par ce virus lui permet donc d'augmenter sa virulence, et par conséquent, la sévérité de la maladie chez l'humain.

Les coronavirus vont avoir des modes d'action différents, se traduisant par des pathologies différentes. La capacité des coronavirus à entrer dans les cellules va dépendre du clivage de leurs glycoprotéines d'enveloppe. Cette étape va régir le type d'entrée virale, à savoir si le virus entre dans la cellule par la voie d'endocytose ou s'il est capable de directement fusionner à la membrane plasmique de la cellule sans utiliser la voie endosomale. Dans tous les cas, le mode d'entrée de ces virus va avoir un impact sur les tropisme d'organes et cellulaire, ayant pour conséquences des pathologies plus ou moins importantes.

3. ENTREE ET PROPAGATION VIRALE

3.1- Entrée des coronavirus dans la cellule

Il est maintenant clair que la glycoprotéine S joue un rôle important dans l'attachement et dans l'entrée virale lors d'infections des cellules-cibles par les coronavirus (Belouzard *et al.*, 2012). L'entrée virale repose sur l'interaction entre le virus et la cellule hôte et celle des virus enveloppés peut se faire via deux mécanismes distincts: soit par fusion à la surface de la cellule avec sa membrane plasmique, ou par endocytose (Figure 14).

Figure 14. Voies utilisées par les coronavirus pour entrer dans la cellule. Le SARS-CoV, comme le MERS-CoV et HCoV-229E peut utiliser deux voies différentes, qui sont déterminées par la localisation des protéases nécessaires à l'activation de la protéine S. La liaison du SRAS au récepteur cellulaire, l'ACE2, peut entraîner l'absorption des virions dans les endosomes, où la protéine S est activée par la cathepsine L. Alternativement, la protéine S peut être activée par les TMPRSS2 de surface, entraînant la fusion de la membrane virale avec la membrane plasmatique Adaptée de (Simmons *et al.*, 2013).



Certains virus comme HSV, le virus de sendai et le VIH sont capables de délivrer leur génome dans le cytoplasme de la cellule après fusion directe à la membrane plasmique (Fuller *et al.*, 1987, Okada, 1969, Permanyer *et al.*, 2010). En revanche, d'autres virus comme le RSV et le virus d'Ebola, requièrent un processus protéolytique pour réaliser leur fusion en dehors des endosomes (Krzyzaniak *et al.*, 2013, Zimmer *et al.*, 2001). En effet, la fusion de la membrane virale avec la membrane des endosomes est déclenchée par des changements conformationnels de leur glycoprotéines. Ces changements peuvent être initiés par un abaissement du pH et/ou une activation protéolytique.

Les coronavirus ont des mécanismes d'entrée assez complexes qui diffèrent selon les souches. Le MuCoV est un bon exemple de coronavirus ayant un mode d'entrée flexible dépendamment du clivage de sa glycoprotéine. En effet, la souche MHV-JHM est capable de fusionner directement à la surface des cellules à pH neutre, mais le virus pourra également entrer par endocytose (Nash *et al.*, 1997). Dans les deux cas, la fusion est uniquement déclenchée par la liaison au récepteur. En effet, il a été démontré que l'incubation de la protéine S de la souche –JHM avec une forme soluble du récepteur CEACAM1 induisait des modifications dans l'hydrophobicité de S, ainsi qu'un changement conformationnel de la région S2 (Matsuyama *et al.*, 2002, Sturman *et al.*, 1990, Zelus *et al.*, 2003). La souche MHV-A59 quant à elle, requiert un abaissement du pH pour entrer dans la cellule, ce qui suggère qu'elle peut entrer par endocytose (Eifart *et al.*, 2007). La liaison au récepteur est un déterminant clé pour l'entrée de MHV, cependant ce mécanisme pourrait utiliser d'autres déclencheurs pour permettre la fusion de ce virus.

L'entrée du SARS-CoV dans la cellule a d'abord été démontrée comme nécessitant un processus de fusion directement à la membrane plasmique de la cellule (Ng *et al.*, 2003, Qinfen *et al.*, 2004, Simmons *et al.*, 2004). Plusieurs études ont également mis en évidence que ce virus pouvait utiliser la variation du pH (Yang *et al.*, 2004), ainsi que certaines protéases comme la cathepsine L (I. C. Huang *et al.*, 2006b, Simmons *et al.*, 2005) pour entrer dans la cellule, ce qui tend à démontrer que ce virus pourrait utiliser la voie d'endocytose. Comme pour le SARS-CoV, le MERS-CoV est un virus zoonotique transmis de l'animal à l'humain (Hemida *et al.*, 2017). Il entre dans la cellule via les deux voies distinctes : soit par endocytose en utilisant la cathepsine L et un abaissement du pH, soit par fusion à la membrane plasmique (Qian *et al.*, 2013, Shirato *et al.*, 2013).

Pendant longtemps, on pensait que le coronavirus IBV entrait à pH neutre car les cellules formaient des syncytia à ce pH. Mais il a été également démontré que l'infection par IBV était bloquée en présence d'agents lysosomotropes et que cette dernière était rétablie lors d'un traitement à pH acide (V. C. Chu *et al.*, 2006). Par conséquent, il en a été déduit que ce coronavirus aviaire pouvait entrer par la voie d'endocytose, en plus de pouvoir fusionner directement à la surface des cellules. Cette souche a la particularité de posséder un deuxième site de clivage de type furine dans sa région S2, lui permettant probablement de fusionner à la surface cellulaire. Les coronavirus qui n'ont pas de protéine S clivée à leur surface vont utiliser des protéases endosomales pour entrer. L'entrée de ces virus va généralement dépendre de la cathepsine B et/ou L (Qiu *et al.*, 2006). Pour le virus du SARS-CoV, le lien entre le clivage et la fusion est plus complexe. En effet, il a été démontré que l'infection par ce virus est inhibée par des agents lysosomotropes (Simmons *et al.*, 2005). En outre, la fusion virus-cellule et cellule-cellule peut être déclenchée par un traitement à la trypsine (Simmons *et al.*, 2004). Le SARS-

CoV, tout comme le MERS-CoV et le HCoV-229E, est capable de fusionner directement à la surface cellulaire en présence de certaines protéases. Cette voie d'entrée est plus efficace que la voie endosomale (Matsuyama *et al.*, 2005).

3.2- Les protéases

3.2.1- Généralités

Les protéases constituent une importante famille de protéines qui représente 2% du génome humain (Puente et al., 2003, N. D. Rawlings et al., 2012). Elles sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques incluant la protéolyse, la maturation des protéines et la mort cellulaire programmée (Gomes et al., 2011). Les protéases sont divisées en neuf classes regroupées selon leur mécanisme catalytique. Les différentes classes sont les protéases aspartiques (A), les protéases à cystéine (C), les protéases glutamiques (G), les métalloprotéases (M), les protéases à asparagine (N), les mixtes (P), les protéases à sérine (S), les protéases à thréonine (T) et les protéases sans site catalytique identifié (U). Selon la classification fournie par la base de données MEROPS qui est la plus utilisée (N. D. Rawlings et al., 2012), il existe cinq classes de protéases chez l'homme (A, T, C, M et S) dont la plus représentée est la classe des protéases à sérine (S). L'action de ces protéases peut se faire dans les différents compartiments cellulaires, à la membrane plasmique et dans le milieu extracellulaire suite à la reconnaissance d'un substrat présentant une séquence particulière au sein de sa poche catalytique. Ces séguences sont décrites à l'aide d'une nomenclature qui permet de désigner la position des acides aminés par rapport au site de clivage. En effet, PX (X=1, 2, 3...) sera assignée aux acides aminés en N-terminal du site de clivage (P1 étant adjacent au site de clivage) et PX' (X=1, 2, 3...) aux acides aminés en C-terminal (Schechter et al., 1967).

3.2.2- Les protéases à Sérine

Les protéases à sérine comportent pour la plupart trois résidus essentiels à la catalyse dans leur site actif. Il s'agit d'une sérine, d'une histidine et d'un aspartate (Hedstrom, 2002, N. D. Rawlings *et al.*, 1993).

3.2.2.1- La Trypsine

La trypsine appartient à la famille des protéases à sérine, dont elle est l'archétype. Elle est l'une des protéases les plus connues pour ses fonctions dans la digestion de nourriture (Y. Wang et al., 2008). Elle est synthétisée dans le pancréas sous forme de proenzyme inactive (trypsinogène). L'activation du trypsinogène en trypsine est la conséquence de l'hydrolyse d'un propeptide sous l'action de l'entérokinase. Il existe quatre isoformes de la trypsine: la trypsine 1 à 4 (Koistinen et al., 2009, Luo et al., 2007, Y. Wang et al., 2008). La trypsine 4 est le seul isoforme qui est exprimé dans le cerveau humain, que ce soit dans les neurones ou dans les cellules gliales (Toth et al., 2007, Wiegand et al., 1993). La trypsine a été largement étudiée dans le contexte de l'activation de glycoprotéines virales. Elle clive à pH neutre, préférentiellement des résidus d'arginine (R) ou de lysine (K) (Millet et al., 2015). D'autres résidus sont en général non discriminatoires, mais les résidus hydrophobes ou basiques à P2 diminuent l'activité catalytique (comme un résidu de proline à P3) (Halfon et al., 2004). Dans l'ensemble, le clivage est pour un seul résidu de base à P1. La trypsine n'étant pas très sélective dans la reconnaissance du substrat, il existe potentiellement de nombreux sites dans les protéines S du coronavirus qui peuvent être clivés par cette enzyme. Cependant, de par la conformation trimérique de la glycoprotéine S, seuls quelques sites sont accessibles par la trypsine (Millet et al., 2015). Etant une enzyme principalement digestive, elle est susceptible de pouvoir cliver directement les protéines S de nombreux coronavirus entériques. Un exemple est le coronavirus porcin, où la majorité des souches sont dépendantes de la trypsine (Millet et al., 2015). Dans le cas du PEDV produit dans les cellules Vero, le clivage par la trypsine se produit après la liaison du récepteur et non sur les particules libres (J. E. Park et al., 2011). Outre le fait que cette enzyme soit exprimée dans le cerveau, elle est également présente dans les voies respiratoires, où son activité est inhibée par l'alpha-1-antitrypsine. Chez les coronavirus à tropisme respiratoire, il a été démontré qu'en culture cellulaire, la trypsine agissait probablement comme un substitut pour des protéases plus biologiquement pertinentes, comme les membres de la famille TMPRSS, qui ont des spécificités de substrats similaires. Un des meilleurs exemples est le SARS-CoV produit dans les cellules VeroE6, où la trypsine pallie le besoin de clivage médié par la cathepsine, ce qui rend l'entrée de ce virus indépendant du pH dans ce type cellulaire. Comme pour PEDV, la liaison préalable au récepteur est une condition préalable à l'activation de la fusion par le SARS-CoV (Matsuyama et al., 2005).

3.2.2.2- Les proprotéines convertases

Les proproteines convertases font partie de la classe des protéases à sérine. Leurs gènes sont nommés "proprotein convertase subtilisin/kesin" (PCSK), et il en existe neuf différents chez les mammifères (PCSK 1 à 9). Ces gènes codent respectivement pour les protéines convertases (PC) suivantes: PC1/3, PC2, la furine, PC4, PC5/6, PACE4 (paired basic amino acid residue-cleaving enzyme 4), PC7, SKI-1/S1P et PCSK9 (Creemers et al., 1993, Hosaka et al., 1991, Seidah et al., 2006, Siezen et al., 1997). Les sept premières enzymes clivent des substrats multibasiques dont le motif est consensuel R-(X)-R/K-R1 (avec préférentiellement un résidu arginine en P4) (Hosaka et al., 1991, Remacle et al., 2008, Seidah et al., 1999a, A. Zhou et al., 1999). La huitième enzyme, SKI-1/S1P, reconnaît des substrats qui ont un résidu hydrophobe en P2, et qui ont comme séquence consensus: R-X-(V, L)-(T, K, F, L) J. Ce type d'enzyme est impliqué dans le clivage de facteurs de transcription membranaires (Elagoz et al., 2002, Seidah, 2011, Seidah et al., 1999b). La dernière enzyme, PCSK9, clive au site V-F-A-Q↓. Son rôle est d'interagir avec le récepteur de lipoprotéine à faible densité (LDLR) afin de promouvoir sa dégradation (Benjannet et al., 2004, Seidah et al., 2003, Yamamoto et al., 2011). Tout comme les trypsines, ces protéases doivent être soumises à des étapes d'activation protéolytique dans leur région N-terminale qui contient un peptide signal et un prodomaine. Le peptide signal permet l'introduction des PC dans les voies de sécrétions du réticulum endoplasmique (RE), tandis que le prodomaine exerce un rôle de chaperon quant au bon repliement, ainsi qu'un rôle d'auto-inhibition de l'enzyme (Anderson et al., 1997, Bissonnette et al., 2004, Leduc et al., 1992, Lindberg, 1994).

La régulation de la localisation et du trafic intracellulaire des PC par leur domaines Cterminaux, contribue à la diversité fonctionnelle des PC. En effet, on retrouve la furine, PC4, PC5/6 et PACE4 dans différents compartiments intracellulaires de la voie de sécrétion, dans les endosomes, à la surface cellulaire et dans le milieu extracellulaire (Figure 15). Certaines PC comme la furine, PC7 et PC4 possèdent un domaine transmembranaire qui leur permet d'être retenues à la membrane plasmique, qui seront relâchées dans le milieu extracellulaire après un clivage (Plaimauer *et al.*, 2001, Rousselet *et al.*, 2011, Seidah *et al.*, 1992, Seidah *et al.*, 2008). L'expression des PC est très répandue dans l'organisme (tableau VI). En effet, la furine, ainsi que PC7 sont exprimées à des niveaux variables dans la majorité des tissus, mais PACE4 et PC5/6 sont plus spécifiques (tableau VI).





Les PC peuvent être recrutées par des pathogènes comme les virus, pour activer leur protéines virales, comme la protéine gp120 du HIV, la protéine F du VRS, la protéine L2 de la capside du papillomavirus, la prM du virus de la dengue ou encore la p62 du virus chikungunya (McCune *et al.*, 1988, Ozden *et al.*, 2008, Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010, Zimmer *et al.*, 2001). Parmi toutes les PC, la furine est la plus fréquemment caractérisée dans le clivage des glycoprotéines S des coronavirus, même si les degrés de redondance entre les substrats sont très similaires entre la furine, PC5 et PACE4. De ce fait, une étude a démontré que la surexpression de ces PC pourrait améliorer le clivage de la glycoprotéine S du SARS-CoV (Bergeron *et al.*, 2005) II en est de même pour la souche OC43. En effet, notre étude *In Silico* a mis en évidence que la furine, en plus de PACE4 et de PC7 sont capables de cliver la glycoprotéine S de HCoV-OC43 (Le Coupanec *et al.*, 2015). La furine nécessite un pH neutre pour son activité protéolytique. Cette dernière est largement exprimée et est souvent considérée comme ubiquitaire dans l'organisme humain, bien que son niveau d'expression soit faible dans

la plupart des cas (Shapiro *et al.*, 1997). Étant produite dans le RE, la furine circule dans les voies sécrétrices, où elle active la glycoprotéine S des coronavirus dans les cellules infectées. Même si pour la majorité des coronavirus, la furine clive au niveau du site S1/S2, elle est aussi capable de cliver un deuxième site, S2', chez certains coronavirus comme le MERS-CoV et IBV (Millet *et al.*, 2014a, Yamada *et al.*, 2009b).

Proprotréines convertases	Distribution tissulaire
PC1/3	Système neuroendocrinien
PC2	Système neuroendocrinien
Furine	Ubiquitaire
PC4	Germinal
PC5/6	Surrénale, intestin, reins, ovaires
PACE4	Muscles, coeur, hypophyse, intestin, cervelet, reins
PC7	ubiquitaire

Tableau IV: Distribution	tissulaire des	différentes	proprotéines	convertases.	Adapté de	(Seidah et
<i>al.</i> , 2012)						

3.2.2.3- Les trypsine-like protéases transmembranaires

Les membres de la famille des protéases à sérine transmembranaires sont des protéases de type trypsine qui se trouvent à la surface de la cellule, ou dans la voie de sécrétion des cellules (Antalis *et al.*, 2011, Simmons *et al.*, 2013) (Tableau V). Elles diffèrent des enzymes qui sont sécrétées en ce qui concerne leurs fonctions biologiques. En effet, ces enzymes catalysent une réaction directement à la membrane plasmique (Netzel-Arnett *et al.*, 2003). Elles jouent un rôle important dans l'interaction entre les cellules et l'environnement (Ramsay *et al.*, 2009) en régulant différents processus, comme la transduction des *stimuli* extracellulaires (Netzel-Arnett *et al.*, 2003). Ces enzymes ont la propriété d'être ancrées à la surface cellulaire à l'aide d'une extension hydrophobe située dans la région carboxy-terminale (pour les transmembranaires de type I) ou amino-terminale (pour les transmembranaires de type II), ce qui permet une orientation extracellulaire du domaine catalytique (Ramsay *et al.*, 2009).

Parmi ces protéases, les types II sont les plus répandus. On en dénombre 17 membres chez l'humain (Szabo *et al.*, 2011) qui se divisent en quatre sous-familles basées sur leur domaine de protéase à sérine et de la composition de leur ectodomaine (Szabo *et al.*, 2011). Il s'agit des familles HAT/DESC, Hepsines/TMPRSS, des Matriptases et de la Corine. La première famille qui est la plus grande, est celle des HAT/DESC qui comprend les HAT (human airway trypin-like protease), les DESC (differentially expressed in squamous cell carcinoma-1) et les HATL1, 4 et 5 (HAT-like). La sous-famille des Hepsin-TMPRSS est formée de 7 membres comprenant l'hepsine, les TMPRSS2, 3, 4, la spinesine (TMPRSS5), le MSPL et l'enteropeptidase. La sous-famille des matriptases se compose des matriptases 1, 2 et 3, alors que celle des corines n'est constituée que de la corine.

Bien que la spécificité des substrats de ces protéases ne soit pas bien définie, on la considère similaire à celle de la trypsine. Les TMPRSS sont largement exprimées dans les voies respiratoires humaines. Elles sont impliquées dans l'activation de la glycoprotéine S des coronavirus tels que le SARS-CoV, le MERS-CoV et HCoV-229E (Bertram *et al.*, 2013, Gierer *et al.*, 2013, Glowacka *et al.*, 2011, Shirato *et al.*, 2013). Les TMPRSS2 jouent également un rôle dans les étapes tardives du cycle de réplication de PEDV (Shirato *et al.*, 2011). Les membres MSPL et DESC1 peuvent activer les protéines HA du virus de la grippe (Bertram *et al.*, 2010, Choi *et al.*, 2009).

Tableau V: Distribution associée à la sous-famille des Hepsin/TMPRSS. Adapté de (Szabo *et al.*, 2008). Niveaux d'ARNm confirmés expérimentalement dans différents tissus: co, côlon; fo, foie; pou, poumon; pa, pancréas; pro, prostate; tr, trachée; coc, cochlée; coe, coeur; ova, ovaires; pl, placenta; rat, rate; ig, intestin grêle; tes, testicules; thr, thyroïde; ves, vessie; oes, oesophage; es, estomac; duo, duodénum; me, moelle épinière; cer, cerveau; hyp, hypophyse; thm, thymus; cn, cavité nasale.

TTST	Noms auxiliaires	Distribution tissulaire		
TMPRSS2	PRSS10	co, cn, fo, pou, pa, pro, tr		
		co, coc, coe, cn, fo, pou, ova,		
TMPRSS3	TADG-12	pa,		
		pl, pro, ig, rat, tes, thm		
TMPRSS4	MT-SP2, CAPH2	ves, co, oes, cn, ig, es		
Entéropeptidase	TMPRSS15, PRSS7	duo		
MSPL	TMPRSS13	pou, pa, pl, pro		
Spinesine	TMPRSS5	cer, me		
Hepsine	TMPRSS1	cn, fo, pou, pa, hyp, pro, thm,		
		thr		

3.2.3- Les protéases à cystéines: les cathepsines

Il existe onze cathepsines à cystéine chez l'humain: les cathepsines B, C, F, H, K, L, O, S, V, W et X (tableau VI). Le terme cathepsine provient du grec "kathepsine", qui signifie digérer. Il a été créé pour des enzymes protéolytiques lysosomales. De ce fait, en plus des cathepsines à cystéine, il existe certaines cathepsines à sérine comme les cathepsines A et G, des cathepsines aspartiques comme les D et E. En plus de leur localisation lysosomale, les cathepsines peuvent se retrouver dans le milieu extracellulaire et dans la membrane basale (Lecaille *et al.*, 2008).

Les cathepsines à cystéines sont présentes sous forme de préproenzymes, c'est pourquoi elles ont besoin d'être clivées pour être activées. De manière générale, la spécificité des substrats des cathepsines est large. En effet, il a été démontré que les résidus d'arginine (R) sont préférés à la position P1, souvent avec un résidu aromatique en P2 (Choe *et al.*, 2006, Polgár, 1989, Rawlings *et al.*, 2004). Cependant, la base de données des protéases (MEROPS), fait ressortir une préférence pour des résidus non polaires tels que la glycine (G), l'alanine (A), la thréonine (T) et la glutamine (Q) à la position P1, et un résidu hydrophobe volumineux en P2. Compte tenu de leur localisation endosomale et lysosomale prédominante, leur activité enzymatique requiert un pH faible. Lorsque les cathepsines sont localisées à l'extérieur de la cellule, elles sont rapidement inactivées par le pH neutre (Turk *et al.*, 1995). Une des exceptions est la cathepsine S qui reste stable à pH neutre, ce qui maintient son activité (Kirschke *et al.*, 1989).

La cathepsine L joue un rôle important lors de l'activation de glycoprotéines virales, avec un pH optimum de 3 à 6.5. Il a été démontré qu'elle pouvait activer la glycoprotéine S du SARS-CoV, ainsi que de d'autres coronavirus tels que le MERS-CoV, HCoV-229E et MHV-2 (Kawase *et al.*, 2009, Qiu *et al.*, 2006, Shirato *et al.*, 2013, Simmons *et al.*, 2005). La cathepsine B, quant à elle, a des propriétés distinctes par rapport à la cathepsine L. En effet, son pH d'activation optimal est généralement plus élevé que les autres membres de la famille et elle préfère un résidu aromatique en P2. De plus, elle est capable de cliver des substrats di-basique à l'inverse de toutes les autres cathepsines (Choe *et al.*, 2006, Mort, 2004, Polgár, 1989). Elle est également impliquée dans l'entrée des coronavirus comme le coronavirus félin et MHV-2 (Qiu *et al.*, 2006, Regan *et al.*, 2008).

 Tableau VI: Distribution associée aux cathepsines à cystéines humaines. Adapté de (Small et al., 2011)

Cathep	Spécificité de	Distribution Cathensine Spécificité de		Spécificité de	Distribution	
sine	clivage	Distribution	ounopoine	clivage	Distribution	
-	Endonentidase					
в	Carboxydinentid	Ubiquitairo		Endonontidaso	Ubiquitairo	
		Obiquitaire	E	Lindopeptidase	Obiquitaire	
	ase					
С	Aminodipeptidase	Ubiquitaire	0	Endopeptidase	Ubiquitaire	
					Cellules	
		Macrophage			présentatrices	
F	Endopeptidase	s	S	Endopeptidase	d'antigène	
		Ū			(macrophages,	
					lymphocytes)	
	Endopentidase					
Н		Ubiquitaire	V	Endopeptidase	Thymus	
	Ammopeptidase					
		Ostéoclastes				
		,				
K	Endopeptidase	épithéliums	W	Endopeptidase	Cellules CD8+	
			V	Carboxymono et		
			Х	dipeptidase	Ubiquitaire	

3.3- Clivage des glycoprotéines virales par des protéases cellulaires

3.3.1- Généralités

Un large éventail d'agents pathogènes y compris les principaux virus humains ont évolué pour détourner les protéases cellulaires pour leurs propres besoins. Les virus enveloppés dépendent du clivage de leurs glycoprotéines d'enveloppe par les protéases cellulaires pour activer la fusion avec la membrane plasmique. Les protéases sont donc importantes pour déterminer le tropisme tissulaire et cellulaire de ces dits virus. Le clivage des glycoprotéines d'enveloppe est une caractéristique commune des protéines de classe I comme la protéine S des coronavirus. Pour la grippe, le site de clivage de la protéine HA est très important pour la pathogénécité du virus. Les souches du virus de la grippe qui sont clivées par la furine sont hautement pathogènes, car elles provoquent une infection systémique (Steinhauer, 1999). Chez les coronavirus, la relation entre le clivage de la protéine S et sa capacité à fusionner est bien établie. Le clivage de la protéine S joue un rôle important dans la fusion, mais le lien entre la fusion virus-cellule et la pathogénicité n'est pas encore très clair. Une des particularités de la protéine S des coronavirus est qu'elle contient plus d'un site de clivage (Masters, 2003). Le premier site de clivage identifié est localisé entre la partie S1 et S2 de la protéine S (appelé S1/S2). Plus récemment, un autre site de clivage a été caractérisé au niveau de la partie S2 du gène S (appelé S2'), en amont du peptide de fusion (Belouzard *et al.*, 2009). En fonction du coronavirus et de la cellule qu'il infecte, le clivage à ces différents sites peut se produire à différents stades du cycle réplicatif, par exemple, lors de l'entrée ou de la sortie des virions (Figure 16).





3.3.2- Les Coronavirus

3.3.2.1- MuCoV

Dépendamment de la souche de MuCoV, la fusion peut avoir lieu à la surface cellulaire après attachement avec le récepteur, ou après endocytose. La souche MHV-JHM est capable de fusionner à la membrane plasmique à pH neutre, bien que le virus ait pu être détecté dans les vésicules endosomales (Nash et al., 1997). Le choix du type d'entrée va dépendre du type cellulaire, mais dans les deux cas, la fusion sera déclenchée après l'attachement au récepteur (Matsuyama et al., 2002, Sturman et al., 1990, Zelus et al., 2003). Le clivage protéolytique de la glycoprotéine S des coronavirus semble être important pour l'induction de la fusion virus-cellule, ou pour la fusion cellule-cellule. Différents sites de clivage ont été identifiés pour les différents coronavirus, dont l'importance varie grandement concernant la fusion cellule-cellule ou viruscellule. En effet, dans le cas de la souche MHV-A59 du coronavirus murin, la glycoprotéine S est clivée au niveau de S1/S2 par des protéases telles que la furine lors du transport des virions nouvellement assemblés par la voie de sécrétion (de Haan et al., 2004, Frana et al., 1985, Luytjes et al., 1987, Ricard et al., 1985). Une mutation dans ce site de clivage affecte très largement le degré de clivage de cette protéine (de Haan et al., 2004). L'inhibition de ce clivage résulte d'une inhibition de la fusion cellule-cellule, sans affecter l'entrée de cette souche dans les cellules hôtes (de Haan et al., 2004, Gombold et al., 1995, Leparc-Goffart et al., 1997). La souche MHV-2 possède une glycoprotéine S qui n'est pas clivée à la position S1/S2. Bien que les souches MHV-2 et -A59 entrent dans la cellule par endocytose, l'entrée de MHV-2, mais pas celle de A59 est bloquée par des inhibiteurs de protéases telles que les cathepsines B et L (Qiu et al., 2006). De récents travaux ont démontré qu'en plus d'être clivée à S1/S2, la protéine S de la souche A59 est clivée une deuxième fois au niveau du site S2', en amont du peptide de fusion (Wicht et al., 2014). Ce clivage active la protéine S en jouant un rôle important dans la régulation de l'entrée de MHV, notamment au niveau de la fusion dans les endosomes.

3.3.2.2- IBV

Le coronavirus aviaire IBV a bien été caractérisé concernant la glycoprotéine S. Toutes les souches de IBV possèdent un site de clivage S1/S2 dépendant de la furine. Ce clivage se fait durant la biosynthèse de la protéine. En plus d'être clivée à S1/S2, la protéine S de la souche IBV-Beaudette a acquis une mutation au niveau du site S2', lui permettant d'être reconnue par la furine (Yamada *et al.*, 2009a). Ce deuxième site de clivage est activé lors de la biosynthèse des protéines, le site S2' joue un rôle important dans la formation de syncitia et

dans l'entrée des virus dans la cellule (Belouzard *et al.*, 2009, Yamada *et al.*, 2009b). Le tropisme tissulaire et cellulaire de cette souche contraste avec le tropisme des autres souches ne possédant pas de site de clivage S2' pour la furine. Ce site S2' permet probablement à la souche Beaudette d'élargir son tropisme tissulaire et cellulaire (Millet *et al.*, 2015).

3.3.2.3- FCoV

Les études sur le coronavirus félin ont permis de bien caractériser le rôle de la protéine S, en particulier en ce qui concerne son clivage protéolytique et son activation de la fusion dans la pathogenèse et le tropisme cellulaire. La protéine S des coronavirus félins de type I possède une protéine S ayant les sites de clivages S1/S2 et S2'. La protéine S de la souche avirulente UCD, obtenue à partir de fèces de félins, contient seulement le site S1/S2 et est clivée par la furine. A l'inverse, la souche UCD1, qui est une adaptation de FIPV en culture cellulaire, a acquis une mutation à la position P1, inactivant le site de clivage S1/S2. Une situation similaire a été observé chez HCoV-OC43, pour lequel des passages successifs en culture cellulaire de la souche de référence ont créé une mutation dans le site de clivage S1/S2, ayant pour conséquence l'inactivation du clivage de la glycoprotéine (Le Coupanec et al., 2015). Possédant une protéine S non clivée, la souche UCD1 garde son motif heparan sulfate intacte, permettant au virus de fixer des polysaccharides. C'est un exemple important de la façon dont une modification du site de clivage S peut conduire à l'acquisition de nouvelles caractéristiques. telles que la liaison au sulfate d'héparane, qui peuvent conduire à la modulation du tropisme cellulaire et de la pathogénicité. Il a également été démontré que la protéine S de souches circulantes de FeCoV avait une protéine S clivée à S1/S2 par la furine, alors que celles trouvées dans les souches circulantes de FIPV avaient une protéine S non clivée à S1/S2 (Licitra et al., 2013).

3.3.2.4- SARS-CoV

L'activation protéolytique de la protéine S du SARS-CoV est la plus étudiée et sert de modèle pour étudier le clivage de la glycoprotéine S de plusieurs coronavirus, ainsi que les différentes protéases impliquées dans ce processus. Le SARS-CoV a su évoluer pour développer une approche à plusieurs volets concernant l'activation de sa protéine S. En effet, il a été montré que de nombreuses protéases cellulaires pouvaient permettre l'entrée médiée par la protéine S, et que la plupart agissent sur le virus en dehors de la cellule. La cathepsine L clive le résidu T678 à la position S1/S2 (B. J. Bosch *et al.*, 2008). Il a été montré que la trypsine pouvait induire la formation de syncitia, sans le besoin d'une acidification du milieu

extracellulaire, indiquant que la faible acidification observée lors de l'entrée du SARS-CoV n'est pas dû au fait que la protéine S requiert un faible pH pour sa compétence de fusion (Simmons *et al.*, 2004). La trypsine clive la protéine S au résidu R667 au niveau du site S1/S2 (F. Li *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré que la thermolysine et l'élastase pouvaient activer la protéine S pour permettre la fusion virus-cellule (Matsuyama *et al.*, 2005). Le clivage par la trypsine et la thermolysine permet une entrée 100 fois plus efficace des virions que la voie endosomale.

Le clivage de la glycoprotéine S du SARS-CoV peut se faire à deux niveaux différents. Le premier niveau se situe à S1/S2 au résidu R667, tandis que le deuxième niveau est à S2' au résidu R797 (Belouzard *et al.*, 2009). Il est important de noter que le clivage par la trypsine se fait de manière séquentielle. En effet, le clivage de S1/S2 se produirait en premier, permettant ainsi le clivage subséquent à S2'. Ce deuxième clivage, à S2', est considéré comme crucial pour l'activation de la protéine S. A l'inverse, le clivage S1/S2 n'est pas indispensable pour la formation de syncitia et pour la fusion virus-cellule. L'élastase cliverait la protéine S au niveau de S2', à la position T795 (Belouzard *et al.*, 2010).

Au niveau du tractus respiratoire, les protéases exprimées telles que les TMRSS2 et TMPRSS11a (HAT) sont capables de cliver la protéine S du SARS-CoV pour permettre son entrée dans la cellule (Glowacka *et al.*, 2011, Kam *et al.*, 2009). Ce type d'activation est également observé pour d'autres virus, comme celui de la grippe, pour lequel la protéine HA est activée par ce type de protéases (Bottcher *et al.*, 2006). De manière remarquable, il a été montré que l'activation de la protéine S du SARS-CoV par les TMPRSS2 lui permettait d'entrer dans la cellule directement, en fusionnant à la membrane plasmique (Shulla *et al.*, 2011). Il en est de même pour la protéase TMPRSS11d, aussi connue sous le nom de "human airway trypsin-like protease" (HAT). (Bertram *et al.*, 2011). Alors que le clivage par TMPRSS2 semble se produire à des sites différents dans S, le clivage TMPRSS11d se produit principalement au site S1/S2 (R667), ce qui pourrait expliquer que l'activation par les TMPRSS11d apparaît suffisante pour la fusion cellule-cellule mais pas pour la fusion virus-cellule. Après le clivage de TMPRSS2, des fragments de la protéine S sont détectés dans le surnageant des cellules. Ils agissent possiblement comme des leurres aux anticorps neutralisants anti-S (Glowacka *et al.*, 2011).

3.3.2.5- MERS-CoV

Le MERS-CoV, un virus récemment émergé du Moyen-Orient, est associé à une pneumonie sévère avec un taux élevé de létalité. Il est un autre exemple d'un coronavirus dont la protéine S peut être activée par une multitude de protéases. Les TMPRSS2, ainsi que les

cathepsines endosomales ont la capacité d'activer la protéine S pour la fusion virus-cellule (Cho *et al.*, 2013). L'entrée de ce virus médiée par les TMPRSS2 serait 100 fois plus efficace que l'entrée impliquant la voie endosomale, comme montré pour le virus du SARS-CoV (Shirato *et al.*, 2013). Selon le type de cellule, ce virus pourrait utiliser différentes voies d'entrée. Les TMPRSS4 sont également capables d'activer le MERS pour la fusion cellule-cellule (Qian *et al.*, 2013).

Récemment, il a été démontré que la protéine S du MERS-CoV pouvait être clivée par la furine aux positions S1/S2 et S2', avec le clivage S1/S2 se produisant pendant la biosynthèse de la protéine S, et le clivage S2' se faisant durant l'entrée du virus dans la cellule (Burkard *et al.*, 2014, Millet *et al.*, 2014a).

3.3.3- Les autres virus enveloppés

Les protéases jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en activant ou désactivant des protéines par protéolyse. Une grande proportion de pathogènes incluant des virus humains ont évolué pour détourner les protéases cellulaires pour leur propre besoin. Les virus enveloppés dépendent du clivage de leur glycoprotéine pour leur fusion dans la cellule. Les protéases sont donc un déterminant important dans le type d'hôte, le tropisme cellulaire et tissulaire, et le potentiel pathogène de ces virus.

Le virus de l'influenza, caractérisé par son habilité à évoluer rapidement, possède une hémagglutinine estérase qui est initialement synthétisée en une chaîne polypeptidique unique HA0, qui va subir par la suite un traitement protéolytique pour donner HA1 qui va être exposé à la surface cellulaire, et HA2 qui va être transmembranaire. La partie HA1 est responsable de l'attachement aux cellules, tandis que HA2 est responsable de la fusion, déclenchée par un abaissement de pH (Skehel et al., 2000). L'entrée du virus de l'influenza dans la cellule dépend drastiquement de la libération du peptide de fusion de la sous unité HA2 par clivage. De plus, le clivage de HA0 est reconnu comme un déterminant de la virulence de certaines souches d'influenza. En effet, lorsque le site de clivage contient des acides aminés basiques, la souche est faiblement pathogène (LPAI), et HA0 est préférentiellement clivée par des endoprotéases telles que la trypsine. A l'inverse, lorsque HA0 contient des sites multibasiques, elle est clivée par des PC, et la souche est hautement pathogène (HPAI) (Stieneke-Grober et al., 1992). Le clivage des souches faiblement pathogènes se fait préférentiellement à la surface des cellules, impliquant des TTSP (Bottcher-Friebertshauser et al., 2010, Okumura et al., 2010). Contrairement aux souches LPAI, la HA0 des souches HPAI est activée par des PC dans les réseaux transgolgiens (trans golgien network ; TGN) (Hamilton et al., 2012).

La famille des paramyxoviridae inclut des pathogènes humains tels que le virus de la rougeole, le RSV et le virus des oreillons (Lamb, 2001). Les paramyxovirus possèdent deux glycoprotéines d'enveloppe: la protéine de fusion F et la protéine responsable de l'attachement aux cellules, désignée selon les virus hémagglutinine-neuraminidase HN, protéine hémagglutinine H ou la glycoprotéine G. La protéine F est responsable de la fusion membranaire, indépendamment du pH (Morrison, 2003), qui se produit entre les membranes virales et cellulaires, mais aussi entre les membranes des cellules infectées voisines, formant donc des syncitia (Horvath et al., 1992). La protéine F est une protéine de type I, initialement synthétisée en un précurseur inactif F0, qui, après activation protéolytique par des protéases cellulaires, forme les sous-unités F1 et F2. Ce clivage s'effectue par des endoprotéases qui clivent des résidus basiques (Homma et al., 1973, Scheid et al., 1974). Le clivage du précurseur F0 se fait au niveau des réseaux TGN, ce qui semble impliquer la furine (Gotoh et al., 1992, Klenk et al., 1994). La protéine F0 ne contient pas de séquence consensus reconnue par la furine, mais plutôt un seul résidu basique, typiquement une arginine. Elle est clivée extracellulairement par des protéases exogènes de type trypsine. Elle peut également être soumise à une internalisation, suivi d'un traitement par des cathepsines endosomales (Diederich et al., 2008, Pager et al., 2006, Pager et al., 2005). Un mécanisme d'activation en deux étapes semble se produire pour l'entrée du RSV (Gonzalez-Reyes et al., 2001, Krzyzaniak et al., 2013, Zimmer et al., 2001). Il a été démontré pour le RSV bovin que les événements à double clivage génèrent un petit fragment peptidique, la virokinine, qui est libérée lors de l'activation et de l'entrée et qui possède des propriétés bioactives impliquées dans la pathogenèse (Valarcher et al., 2006, Zimmer et al., 2003).

La famille des flaviviridae inclut plusieurs pathogènes humains importants comme le virus du Nil occidental (*West Nile virus*), l'encéphalite à tiques et la Dengue (Lindenbach *et al.*, 2007). La protéine E du virus de la dengue est responsable de l'attachement et de l'entrée virale (L. Li *et al.*, 2008, Yu *et al.*, 2008). L'assemblage et le bourgeonnement du virus de la dengue ont lieu à la membrane du RE, entraînant une libération de virions immatures dans le lumen du RE. Ces particules virales immatures possèdent des hétérodimères composés de la protéine précurseur prM et de la protéine E. Pendant le transport à travers les voies de sécrétions, il y aura abaissement du pH, ce qui va permettre une exposition d'une séquence consensus à la furine. Le clivage de cette séquence par les protéases de type furine dans le TGN est crucial pour la maturation de la protéine E (Yu *et al.*, 2008), et donc pour l'infectivité des nouveaux virions produits.

Les lentivirus humains, comme le virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-I) possèdent une glycoprotéine d'enveloppe, dont le précurseur est la protéine gp160 qui sera clivée en deux protéines matures gp41/gp120 par des protéases de type furine (Hallenberger *et al.*, 1992). La protéine gp120 est responsable de l'attachement aux cellules via le récepteur CD4 et les co-récepteurs CCR5/CXCR4, tandis que la gp41 est responsable de la fusion virale. Le précurseur gp160 est clivé au motif REKR↓ par des PC (Decroly *et al.*, 1994). Ce clivage est nécessaire pour la production de particules virales infectieuses (Dubay *et al.*, 1995). Un second site de clivage, dont la séquence consensus KAKR est reconnue par les PC, se situe en amont du premier site (Fenouillet *et al.*, 1992). Il jouerait une fonction importante dans la maturation de la glycoprotéine (V. Bosch *et al.*, 1990).

4. CONCLUSIONS

Les maladies neurologiques sont diverses et restent souvent mal comprises. Elles peuvent être génétiquement déterminées et/ou causées par des facteurs environnementaux, notamment d'origine microbienne. L'origine virale de certaines maladies neurologiques est régulièrement soupçonnée, mais reste difficilement démontrable. Les coronavirus humains (HCoV), des pathogènes respiratoires très répandus, représentent des candidats importants potentiellement associés au développement ou à l'exacerbation de ce type de maladie puisqu'ils atteignent le système nerveux central (SNC) de façon naturelle chez l'être humain. Dans le cas de la souche coronavirale HCoV-OC43, cette association pourrait impliquer la protéine virale S, facteur viral majoritairement responsable de la neurovirulence. Il est reconnu que la variabilité génétique, au niveau du gène codant, est grande et engendre la production de protéines S variées. Certaines mutations pourraient en bonne partie expliquer la capacité du virus à envahir plus ou moins efficacement le SNC (neuroinvasion) et à s'y propager, avec des conséquences pathologiques possibles.

Sachant que la glycoprotéine S est impliquée dans l'attachement et la propagation virale, elle a été au cœur de ce projet. Nous avons comparé la séquence du gène S de la souche de référence du laboratoire à celles de virus détectés à partir d'isolats cliniques des voies respiratoires humaines. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'ensemble des virus provenant des isolats cliniques possédaient entre autres une mutation dans le gène S, favorisant la création d'un site de clivage potentiel pour les proprotéines convertases tel que la furine. La glycoprotéine S du virus mutant est clivée de manière significative comparativement à celle du virus de référence. Ce clivage module les capacités de neuroinvasion, de neuropropagation et de neurovirulence de cette souche virale.

L'identification des mutations impliquées dans la neuroinvasion et le neurotropisme nous permettra par la suite de mieux cerner les interactions de HCoV-OC43 avec le SNC et ainsi de pouvoir mieux comprendre les éventuelles conséquences de l'infection du SNC par un coronavirus chez l'Humain.
HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Le coronavirus humain HCoV-OC43 est un pathogène respiratoire ayant des propriétés neuroinvasives et neurotropes chez l'humain et la souris. De plus, cette souche est neurovirulente chez la souris. Un des principaux facteurs responsables de la neuroinvasion, de la neuropropagation et de la neurovirulence, est la protéine virale S. Il est reconnu que la variabilité génétique au niveau du gène correspondant est grande et engendre la production de protéines S variées. Certaines mutations pourraient expliquer la capacité du virus à envahir plus ou moins efficacement le SNC et à s'y propager avec des conséquences pathologiques possibles.

Nous avons pu identifier une mutation prédominante (G758R) dans le site de clivage S1/S2 de la protéine S de variants du HCoV-OC43 provenant d'isolats cliniques des voies respiratoires, comparé à la souche de laboratoire de référence. Ainsi, considérant le caractère neuroinvasif, neurotrope et neurovirulent du virus HCoV-OC43 et que sa protéine S est un facteur important dans la liaison au récepteur, ainsi que dans la neurovirulence, nous avons émis l'hypothèse que les clivages de la glycoprotéine S au niveau des site S1/S2 et S2' pourraient moduler la capacité du virus à envahir plus ou moins efficacement le SNC et à s'y propager avec des conséquences pathologiques possibles.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons, dans un premier temps, établi l'importance des sites de clivage S1/S2 et S2' de la protéine S dans la neurovirulence chez le modèle murin. Nous avons donc évalué le taux de survie, les variations de poids, les scores cliniques reliés à des troubles neurologiques, ainsi que la propagation des différents variants dans le SNC murin. Dans un second temps, en comparant les différents variants, à l'aide de deux modèles de cultures neuronales (murines et humaines), nous avons pu identifier le rôle de chacun des sites de clivages, dans une infection par un coronavirus.

CHAPITRE II: PUBLICATIONS

Publication n°1

Cleavage of a neuroinvasive human respiratory virus spike glycoprotein

by proprotein convertases modulates neurovirulence and virus spread

within the central nervous system

Alain Le Coupanec^{1†}, Marc Desforges^{1†*}, Mathieu Meessen-Pinard¹, Mathieu Dubé¹,

Robert Day², Nabil G. Seidah³, and Pierre J. Talbot^{1*}

- ¹ Laboratory of Neuroimmunovirology, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7V 1B7
- ² Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Faculté de Médecine et Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4
- ³ Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, Montréal, Québec, Canada H2W 1R7

Contributions des auteurs:

- Alain Le Coupanec: j'ai conçu et réalisé la majorité des expérimentations présentées dans cet article, en plus d'analyser tous les résultats et d'écrire l'ensemble du manuscrit.

- **Marc Desforges**: participation à la conception et à la réalisation des expériences, ainsi que discussion des données et correction du manuscrit.

- Mathieu Dubé, Pierre J Talbot: discussion des données et correction du manuscrit.

- Robert Day, Nabil G. Seidah: réalisation des expériences de clivages in silico (Fig 8 C-D)

- **Mathieu Meessen-Pinard**: participation à la préparation des cultures primaires mixtes murines du CNS

Running head: Coronavirus S protein cleavage modulates neurovirulence and spread

[†]<u>These authors contributed equally to this work</u>

*Co-Corresponding Authors :

E-mail: <u>pierre.talbot@iaf.inrs.ca</u> (PJT)

E-mail:<u>marc.desforges@iaf.inrs.ca</u> (MDe)

Résumé

Les coronavirus humains sont des pathogènes respiratoires qui peuvent être associés au développement de maladies neurologiques, compte tenu de leurs propriétés neuroinvasives et neurotropes. La glycoprotéine de surface (S) est un facteur de virulence important pour plusieurs coronavirus, y compris pour la souche OC43. Afin d'étudier le rôle de cette protéine dans la propagation du virus dans le système nerveux central (SNC) et dans la neurovirulence, ainsi que pour identifier les acides aminés importants dans ces fonctions, nous avons comparé la séquence du gène S de la souche de laboratoire HCoV-OC43 ATCC VR-759 aux séquences de la protéine S de virus détectés dans des isolats cliniques provenant des voies respiratoires humaines. Nous avons identifié une mutation prédominante au niveau de l'acide aminé 758 (de RRSR \downarrow **G**₇₅₈ à RRSR \downarrow **R**₇₅₈), qui introduit un site de clivage (\downarrow) putatif de type furine. En utilisant un clone infectieux pour générer le virus recombinant correspondant, nous montrons pour la première fois qu'une telle mutation dans la glycoprotéine S créé un site de clivage fonctionnel entre les portions S1 et S2 de la protéine S. Alors que le virus recombinant conserve ses propriétés neuroinvasives, cette mutation diminue la neurovirulence tout en modifiant potentiellement le mode de propagation du virus, conduisant probablement à une dissémination limitée dans le SNC. Pris dans leur ensemble, ces résultats sont cohérents avec l'adaptation de HCoV-OC43 à l'environnement du SNC, résultant de la sélection de quasi-espèces hébergeant des mutations qui conduisent à des changements d'acides aminés dans les gènes viraux, comme le gène S, qui peut contribuer à une mise en place plus efficace d'une infection persistante au SNC. Ce mécanisme d'adaptation pourrait potentiellement être associé à des encéphalites chez l'humain ou à d'autres pathologies dégénératives neurologiques.

Abstract

Human coronaviruses (HCoV) are respiratory pathogens that may be associated with the development of neurological diseases, in view of their neuroinvasive and neurotropic properties. The viral spike (S) glycoprotein is a major virulence factor for several coronavirus species, including the OC43 strain of HCoV (HCoV-OC43). In an attempt to study the role of this protein in virus spread within the central nervous system (CNS) and neurovirulence, as well as to identify amino acid residues important for such functions, we compared the sequence of the S gene found in the laboratory reference strain HCoV-OC43 ATCC VR-759 to S sequences of viruses detected in clinical isolates from the human respiratory tract. We identified one predominant mutation at amino acid 758 (from RRSR $\downarrow \underline{G}_{758}$ to RRSR $\downarrow \underline{R}_{758}$), which introduces a putative furin-like cleavage (\downarrow) site. Using a molecular cDNA infectious clone to generate a corresponding recombinant virus, we show for the first time that such point mutation in the HCoV-OC43 S glycoprotein creates a functional cleavage site between the S1 and S2 portions of the S protein. While the corresponding recombinant virus retained its neuroinvasive properties, this mutation led to decreased neurovirulence while potentially modifying the mode of virus spread, likely leading to a limited dissemination within the CNS. Taken together, these results are consistent with the adaptation of HCoV-OC43 to the CNS environment, resulting from the selection of quasi-species harboring mutations that lead to amino acid changes in viral genes, like the S gene in HCoV-OC43, which may contribute to a more efficient establishment of a less pathogenic but persistent CNS infection. This adaptative mechanism could potentially be associated with human encephalitis or other neurological degenerative pathologies.

Author Summary

Human coronaviruses (HCoV) are respiratory pathogens involved in a sizable proportion of common colds. They have over the years been associated with the development of neurological diseases, given their demonstrated neuroinvasive and neurotropic properties. The viral spike (S) glycoprotein appears to be associated with these neurologic features and is a major factor of virulence for several coronavirus species, including HCoV-OC43. To further characterize the role of this protein in neurovirulence and virus spread within the CNS, we sought to identify amino acid residues that may be important for this function. Our data revealed that one of them, G758R, introduces a functional furin-like cleavage site in the S protein (RRSR \downarrow R₇₅₈). This change in S protein mostly impacts neurovirulence, which seems associated with a modified viral dissemination, without significantly affecting its neuroinvasive capacity. This mutation, found in all characterized contemporary human clinical respiratory isolates, underlines previous findings that naturally existing field isolates of HCoV-OC43 variants still possess the capacity to invade the CNS where they could eventually adapt and establish a persistent human CNS infection, a mechanism potentially associated with human encephalitis or neurodegenerative pathologies of unknown etiologies.

Introduction

Human coronaviruses (HCoV) are enveloped positive-stranded RNA viruses belonging to the family *Coronaviridae* in the order *Nidovirales* and are mostly responsible for upper respiratory tract infections [1]. Being opportunistic pathogens, they have also been associated with other more serious human pathologies, such as pneumonia and bronchiolitis, and even meningitis [2-4] in more vulnerable populations. Moreover, at least HCoV-229E and HCoV-OC43 are naturally neuroinvasive and neurotropic in humans [5]. Indeed, we have previously reported that HCoV can infect and persist in human neural cells [6-8], and in human brains [9]. Moreover, the OC43 strain (HCoV-OC43) induces encephalitis in susceptible mice, with neurons being the main target of infection [10, 11].

Enveloped viruses use different types of proteins to induce fusion of the host-cell membrane to their own in order to initiate infection. For coronaviruses, the spike (S) protein is responsible for cell entry [12], and was shown to be a major factor of virulence in the central nervous system (CNS) for several coronavirus species, including HCoV-OC43. We previously reported that persistent HCoV-OC43 infections of human neural cell lines led to the appearance of predominant point mutations in the putative receptor-binding domain of the S glycoprotein gene [13] and that these mutations were sufficient to significantly increase neurovirulence and modify neuropathology in BALB/c mice [14].

In order to identify amino acid residues in the S glycoprotein that are involved in viral spread within the CNS, we compared the sequence of the gene encoding the viral S protein in the laboratory reference strain HCoV-OC43 (ATCC VR-759) with sequences of the S gene in viruses detected in clinical isolates from sputum of upper and lower respiratory tract of seven children, aged 3 to 36 months, admitted to the University Hospital of Caen, France, in 2003 [15], as well as with all S protein sequences found in the NCBI data bank. This characterization led to the identification of predominant mutations, including one at the amino acid Gly₇₅₈, which introduces a putative furin-like protease cleavage site RRSR \downarrow R₇₅₈ in the viral S protein [16].

Several class 1 viral fusion proteins, such as the coronavirus S protein, are proteolytically processed during infection of the host cell, a mechanism that is often essential for the initiation of infection of receptor-bearing cells, tissue tropism and in eventual pathogenesis [17-20]. Moreover, its cleavage by different types of host proteases, including furin-like proteases designated proprotein convertases (PCs) that cleave at paired basic residues [20] are involved in various steps of coronavirus infection [21-23].

In the present study, we show for the first time, that while the S glycoprotein of the laboratory reference strain HCoV-OC43 ATCC VR-759 is not cleaved by host cell proteases, the sequences of more than 60 clinical isolates reveal a common G758R resulting from a single nucleotide polymorphism (SNP) in the S gene. This creates a functional PC-cleavage site between the S1 and S2 portions of the viral S glycoprotein, thereby modulating viral spread and neurovirulence in susceptible mice, without affecting the neuroinvasive capacities of the virus or its infectivity (capacity to infect) of a neuronal cell line. These results, which suggest that PC-cleavage can be dispensable for efficient infection by HCoV-OC43, appear surprising compared to other coronaviruses, for which S protein cleavage is required for efficient virus infection [21, 23, 24]. Importantly, our results may help to better characterize the possible adaptation of HCoV-OC43 to the CNS environment, which, in the end, results in a decreased neurovirulence potentially associated to a modified spreading and a more efficient mechanism for the establishment of a persistent infection in human CNS, a phenomenon that could influence the severity of human viral encephalitis or exacerbate neurological degenerative pathologies of unknown etiologies.

Results

Both rOC/ATCC and rOC/S_{G758R} variants are neuroinvasive and neurovirulent.

We first sought to investigate the potential biological function of the viral G758R mutation located in the HCoV-OC43 S gene between the S1 and S2 domains, detected in the viral S protein of several clinical isolates from human sputum of upper and lower respiratory tract. Accordingly, we introduced this mutation in the infectious cDNA clone of HCoV-OC43 (pBAC-OC43^{FL}) [25] to produce a recombinant mutated rOC/S_{G758R} virus, and we first studied its neuroinvasive and neurovirulent properties compared to reference rOC/ATCC virus (Fig. 1). For this, 10 day-old BALB/c mice were inoculated by the intranasal (IN) route [10, 14] and survival curves were obtained (Fig. 1A). After infection with the reference virus, over half of BALB/c mice died within the first 15 days post-infection, with symptoms of social isolation and hunched backs. In comparison, the viral mutant was less neurovirulent, with about 30% of mortality. Despite this difference in survival, there were no changes in the symptoms induced by the mutant virus compared to reference strain. Mice were also investigated for variation of weight during infection (Fig. 1B) as previously described [14]: mice infected with mutant virus showed a delay in body weight gain of about 50% at 9 days post-infection compared to control mice. Comparison of survival curves of mice infected by both variants, coupled with weight variations, suggested that the rOC/S_{G758R} variant was less neurovirulent than reference virus rOC/ATCC after inoculation by the IN route.

Figure 1: Both variants rOC/ATCC and rOC/S_{G758R} are neuroinvasive and neurovirulent in 10 day-old BALB/c mice infected by the intranasal route. 10-day old BALB/c mice received $10^{3.25}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} or PBS by the IN route. (A) Survival curves of mice in percentage (%) during 21 days post-infection. Difference between the two variants was significant (** P≤0.01) (B) Surviving BALB/c mice were weighed every 2 days after infection during 21 dpi to estimate weight variations. The weight variation was expressed in %, compared to day 0, which was set at 100%. Production of infectious viral particles was measured in brains (C) and spinal cords (D) every 2 days for 21 dpi. LOD represents the Limit of Detection of infectious viral particles. Results shown are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments.



Viral replication reaches the same level but is delayed for the mutant virus compared to the reference virus after intranasal injection.

To determine whether the slight difference in neurovirulence between the two viruses could be related to differences in viral replication kinetics within the CNS, brains (Fig. 1C) and spinal cords (Fig. 1D) were harvested and infectious virus production was evaluated every 2 days over a period of 21 days post-infection (dpi). Even though the difference in neurovirulence between the two viruses did not correlate with a different amount in production of infectious viral particles in the CNS (brain and spinal cord), there was a delay in viral replication kinetics of the mutant virus compared to reference virus. Viral spread in mouse brain (Fig. 2) was also studied with a focus on the olfactory bulb and the hippocampus regions, because we have previously determined that these regions are primarily infected by the reference virus strain [14]. At 5 dpi, viral antigens were already present everywhere in the olfactory bulb infected by the reference wild-type virus (Fig. 2A), compared to mutant virus for which antigens were only scarcely distributed. At 7 dpi, the kinetics was restored as the mutant infected this region as efficiently as the reference virus. In the hippocampus, we observed the same trend: no viral antigens were detected in this region for the mutant virus at 7 dpi, whereas the spread of both viruses was similar at 9 dpi (Fig. 2B). When viruses had spread to all regions of the brain, activation of astrocytes and microglial cells was evident in all infected regions (S1 Fig.). Even though no precise quantitation was performed, a slight increase in the number of astrocytes was observed in the olfactory bulb (S1A Fig.) and in the hippocampus (S1B Fig 18) of mice infected by the reference virus compared to mutant virus. Activation of microglial cells was evident in the hippocampus region for both variants at 9 dpi (S1C Fig.). As the mutant virus S protein harbors a SNP present in respiratory clinical isolates, we also evaluated viral dissemination towards the respiratory tract. Neither infectious virus particles nor viral RNA were detectable in the lungs of all the mice tested.

Figure 2: A delay in viral spread is observed in brain of rOC/S_{G758R} -infected mice compared to rOC/ATCC after intranasal inoculation in 10 day-old BALB/c mice. Histological examination of virus spread within the brain of 10-day old BALB/c mice infected with $10^{3.25}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R}, or PBS by the IN route. (A) Detection of viral antigens in the olfactory bulb of infected mice at 5 and 7 dpi. (B) Detection of viral antigens in the hippocampus of infected mice at 7 and 9 dpi. Magnification 40x.



S1 Fig: Astrogliosis is more important for rOC/ATCC compared to rOC/S_{G758R} in infected mouse brain after intranasal inoculation in 10 day-old BALB/c mice. Histological examination of astrogliosis and microgliosis in the brain. 10-day old BALB/c mice received $10^{3.25}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC, rOC/S_{G758R}, or PBS by the IN route. Detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes in olfactory bulb (A) and in hippocampus (B) of infected mice at 9 dpi. (C) Detection of activated macrophages/microglia by an ascites fluid of the rat Mac-2 antibody in hippocampus of infected mice at 7 dpi. Magnification 200x.



Reference virus rOC/ATCC is more neurovirulent in 21 day-old BALB/c female mice inoculated by the intracerebral route.

Having demonstrated that both virus variants retained their neuroinvasive and neurovirulent capacities in our mouse model after intranasal (IN) inoculation, we sought to study the spreading and neurovirulent capacities of the two recombinant viruses after intracerebral (IC) inoculation, as this route results in a more reproducible infection associated with a better control of viral doses introduced into the brain. In order to do so, 21 day-old female BALB/c mice were used [11] and experiments were performed by characterizing mouse survival and weight curves, clinical symptoms of encephalitis and viral replication in brain and spinal cord (Fig. 3). There was a significant difference in survival after inoculation with either virus (Fig. 3A): the mutant virus, like the sham control, induced no mortality compared to reference virus, which led to a 20% mortality rate over a period of 21 days. We then measured the weight of mice during the infection (Fig. 3B), and observed that there was a significant delay in body weight gain for the reference virus and the mutant virus compared to the sham control between 7 and 11 dpi, which correlates with the survival curves. Using a clinical score scale based on neurological symptoms of mice described in the Materials and Methods section [26], we next studied the clinical symptoms of mice after injection of both variants (Fig. 3C and 3D). The only clinical sign caused by mutant virus was the abnormal flexion of the four limbs (level 1) whereas mice infected by the reference virus developed encephalitis associated with the 4 different levels of clinical scores. No clinical signs were noted for sham mice. Taken together, survival and weight curves coupled with the clinical scores indicate that the mutant virus was less neurovirulent than reference virus after IC inoculation in 21-day old mice.

Figure 3: A decreased neurovirulence is observed for rOC/S_{G758R} variant in 21 day-old BALB/c female mice infected by the intracerebral route. 21 day-old BALB/c mice received $10^{2.5}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} or PBS by the IC route. (A) Survival curves of mice in % during 21 day post-infection. Difference between the two virus variants was significant (* P≤0.05). (B) BALB/c mice were weighed every 2 days during 21 dpi to estimate weight variations, which were expressed in %, compared to day 0 (100%). Differences were significant (*** P≤0.001) when the three conditions (rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} or PBS) were compared between 9 and 11 dpi. Evaluation of the clinical scores (percentage of mice at each level of the scale) of mice infected by rOC/ATCC (C) or rOC/S_{G758R} (D) based on neurological symptoms described in clinical score scale between level 0 and 3 (see Materials and Methods section). Production of infectious viral particles was measured in brains (E) and spinal cords (F) every 2 days for 21 dpi. LOD represents the Limit of Detection of infectious viral particles. Results shown are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments.



131

Viral replication is delayed for the mutant virus compared to the reference virus after intracerebral inoculation in 21 day-old female BALB/c mice.

Given our observation that reference virus was more neurovirulent compared to the mutant virus after inoculation by the IC route, we wished to evaluate whether this correlated with a difference in viral replication in the CNS. Brains and spinal cords were harvested and infectious virus titers were assayed every 2 days for a period of 21 dpi (Fig. 3E and 3F). The difference in neurovirulence did not correlate with a significant difference in the amount of infectious viral particles in the brain (Fig. 3E). However, there was a drastic difference in the production of infectious virus between both variants in the spinal cord (Fig. 3F): virus titers of the reference strain (rOC/ATCC) were almost identical to what was detected in the brain, whereas the less virulent mutant (rOC/SG758R) reached the spinal cord only in one out of thirty infected mice. In this mouse, an important delay and a production of viral infectious particles close to the limit of detection suggested that mutant virus had difficulty reaching this portion of the CNS. Histological examination of infected mice revealed that the infected regions were similar following infection by both viruses in the brain, but that the kinetics were different (Fig. 4). Indeed, as was the case after the IN route of infection, the IC route of infection also led to a delay in viral replication in the olfactory bulb and in the hippocampus, as no viral antigens were detected before 7 dpi for the mutant virus (compared to 5 dpi for the reference virus). As in 10 day-old BALB/c mice infected IN, when virus had spread to all regions of the brain, activation of astrocytes and microglial cells was evident in all infected regions (S2 Fig.). As seen in 10 dayold mice after IN inoculation, even though no precise quantitation was performed, a slight increase in the number of astrocytes in the olfactory bulb (S2A Fig.) and in the hippocampus (S2B Fig.) could be observed in brains of mice infected by reference virus compared to the mutant virus. The same was observed for microglial cells at 7 dpi in the olfactory bulb (S2C Fig.) and in the hippocampus (S2D Fig.).

Figure 4: A delay in viral spread is observed in brains of rOC/S_{G758R}-infected mice compared to rOC/ATCC after intracerebral infection in 21 day-old BALB/c female mice. Histological examination of virus spread within the brain. 21 day-old BALB/c mice received $10^{2.5}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R}, or PBS by the IC route. Detection of viral antigens in the olfactory bulb (A) or in the hippocampus (B) of infected mice at 5 and 7 dpi at magnitude X40. Black arrows indicate viral particles staining for the S protein.



S2 Fig: Astrogliosis is more important for rOC/ATCC compared to rOC/S_{G758R} in infected mouse brain after intracerebral injection in 21 day-old BALB/c female mice. Histological examination of astrogliosis and microgliosis in the brain. 21-day old BALB/c mice received $10^{2.5}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC, rOC/S_{G758R}, or PBS by the IC route. Detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in olfactory bulb (A) or in hippocampus (B) of infected mice at 9 dpi. Detection of activated macrophages/microglia by an polyclonal anti-rabbit antibodies IBA-1 in the olfactory bulb (C) or in the hippocampus (D) of infected mice at 7 dpi. Magnification 200x.



The predominant G758R mutation in the spike glycoprotein induces an increase in infectious virus release associated with a functional cleavage site.

In order to further study the role of the G758R mutation on the biology of both HCoV-OC43 variants, we first evaluated the kinetics of viral replication and spread within mixed primary CNS cultures from BALB/c mice over a period of 72 h post-infection (hpi). Using immunofluorescence, we observed no change in cell tropism, with neurons remaining the main target of infection by both virus variants (Fig. 5), even though astrocytes could also be infected later in the infection (S3 Fig.) as we previously reported [10]. Interestingly, we did observe a delay in viral spread in neurons for the mutant virus at 8 and 24 hpi compared to the reference strain (Fig. 5).

Figure 5: Mutation in the spike glycoprotein of mutant virus delays viral spreading compared to the reference strain in mixed primary CNS cultures from BALB/c mice. Mixed primary cultures from BALB/c mice brain were infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.03. Viral spread was evaluated at 8, 24 and 48 hpi. Neurons were stained in green with a mAb against microtubule-associated protein 2 (MAP2) antibody and the S viral glycoprotein in red, was detected with a rabbit antiserum. Results are representative of three independent experiments. Magnification 200x.



S3 Fig: Both variants are able to infect astrocytes as a secondary target in mixed primary CNS cultures from BALB/c mice at 24 hpi. Mixed primary cultures from BALB/c mice brain were infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.1. Viral spread was evaluated at 8, 24, and 48 hpi. Astrocytes were stained in green with a mAb against a polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the S viral glycoprotein in red. Results are representative of three independent experiments. Magnification 200x.



Interestingly, even though the infection was shown to be productive for both variants in primary CNS cultures from BALB/c mice, there was a significant increase in the total amount of infectious virus in the cell culture supernatant (free virus) between 48 and 72 hpi for the mutant virus compared to the reference virus rOC/ATCC (Fig. 6B). As the G758R mutation creates a putative furin-like cleavage site [16] in the S glycoprotein previously reported to influence viral infectivity [20-22, 24], we wished to evaluate whether cleavage was indeed associated with the delayed spreading in neuronal cells, the increased release of infectious virus and eventually with neurovirulence. As seen in Fig. 6, our data correlated with a much stronger cleavage of the S

protein of the rOC/S_{G758R} mutant into S1/S2 fragments, compared to reference virus rOC/ATCC at 24 and 48 hpi (Fig. 6C; whole cell lysate), which was even more obvious at 48 hpi in the cell supernatant (Fig. 6D).

Figure 6: The S glycoprotein harboring a predominant point mutation found in clinical isolates was cleaved more efficiently in supernatant of CNS cells. Mixed primary cultures from BALB/c mice brain were infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.03. Kinetics of infectious virus production in cell-associated (A) and in cell culture supernatant (free virus) (B) was performed. Release of free virus in the supernatant was significantly higher for rOC/S_{G758R} compared to rOC/ATCC (* P≤0.05). (C) Western blot analysis of whole cell lysates (C) or cell culture supernatant (D) (10 μ g of proteins) revealed the presence of the uncleaved form of the S glycoprotein (180 kDa), and of a cleaved form at around 100 kDa (S1/S2). Results shown are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments.



In order to evaluate whether this cleavage of the viral S protein also took place in human cells, we made use of the differentiated LA-N-5 neuronal cell line described in the Materials and Methods section [27] and showed, first, that the kinetics of viral replication was similar to that observed between both viruses in murine primary cells (Fig. 7, panels A-B), as there was a significant increase of virus release for the rOC/S_{G758R} mutant and, second, that the cleavage of

the S protein into S1/S2 fragments was again predominantly detected in the cell culture supernatant (Fig. 7D) compared to the protein associated with cells (Fig. 7C). Again, this cleavage was more evident for mutant than for reference virus. Similar results were obtained with HRT-18 cells. Even though the S protein of HCoV-OC43 reference virus was present mostly in the uncleaved form, our results also show that there are intermediate size bands between the uncleaved and furin-like cleaved forms of the protein. These secondary bands may be unspecific degradation products, but we suggest that among these intermediate size fragments seen on SDS-PAGE, there could be a fragment corresponding to the S protein cleaved at a potential alternative site (S2' in Figs 6, 7, and 8; as well as S4 Fig, the latter showing corresponding overexpositions).

Figure 7: Cleavage of S glycoprotein is also observed in human LA-N-5 cells for mutant virus. The differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.1. Proteins in association with cell or in supernatant were extracted at 24 and 48 hpi, and kinetics of viral replication was evaluated over a period of 48 hpi for (A) cell-associated virus or (B) free virus (supernatant). Titers of cell-associated and free virus were significantly higher for rOC/S_{G758R} compared to rOC/ATCC (* P \leq 0.05 and ** P \leq 0.01). Western blot analysis of whole cell lysates (C) or cell culture supernatant (D) (10 µg of proteins) revealed the presence of the uncleaved form of the S glycoprotein (180 kDa), and of a cleaved form at around 100 kDa (S1/S2). Results shown are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments.



S4 Fig: The S glycoprotein was cleaved at a second cleavage site. Overexposition of gels presented in Figs 6D and 7D. Western blot analysis of cell culture supernatant from mixed primary cultures from BALB/c mice brain (A) or differentiated human LA-N-5 cells (B) revealed the presence of an intermediate size fragment, S2'. Results are representative of three independent experiments.



Proprotein convertases (PCs) are proteases that potentially cleave the HCoV-OC43 S glycoprotein at the putative furin-like cleavage site.

In an attempt to determine whether the mutation identified at amino acid 758 (G758R) in the viral S protein could indeed create a furin-like cleavage site, we used a cell-permeable general inhibitor of furin-like PCs to investigate the potential involvement of these proteases in the process. Differentiated LA-N-5 cells were infected in the presence of different concentrations of the decanoylated furin-like inhibitor (dec-RVKR-cmk), and at 48 hpi, proteins in the supernatant were harvested and analyzed (Fig. 8). As expected, the S glycoprotein of the reference virus was not cleaved at all (Fig. 8A) whereas the cleavage of the S protein of mutant virus was inhibited in a dose-dependent manner by dec-RVKR-cmk (Fig. 8B). To evaluate whether the kinetics of viral replication was also affected, supernatants were harvested over a period of 48 hpi, and evaluation of infectious viral particles revealed no significant differences (S5 Fig.). As the furin-like inhibitor reduced the cleavage of the S protein for the rOC/S_{G758R} variant, we sought to identify which proprotein convertase(s) could play a role in cleavage of the S glycoprotein during infection. As shown in Fig. 8C and D, a synthetic peptide containing the sequence of reference virus (RRSRG), was only cleaved by recombinant furin after 15 hours, likely at RRSR \downarrow G. On the other hand, the synthetic peptide containing the sequence of mutant virus (RRSRR) was cleaved in only 30-60 minutes, likely at RRSR k, by furin and less so by three additional proprotein convertases: PACE4, PC5/6 and much less efficiently by PC7.

Figure 8: Proprotein convertase as a potential player in S glycoprotein cleavage. (A-B) Differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was incubated before and after infection with different concentration of furin-like inhibitor (dec-RVLR-cmk; 0, 5, 10 μ M). Infection was performed with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.1. Proteins in supernatant were extracted at 48 hpi and analyzed by Western blot (50 μ g of proteins) of supernatant from LA-N-5 cells infected by reference virus (A) or mutant virus (B). Western blot was directed against viral S glycoprotein. (C-D) Incubation of synthetic peptide containing the sequence of the putative cleavage site of reference virus (C) and mutant virus (D) with different recombinant proprotein convertases *in vitro*. The % of cleaved peptide was quantified over time.



S5 Fig: Modulation of viral replication in a dose-dependent manner by dec-RVLR-cmk. The differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was incubated only before infection or before and after infection with different concentration of furin-like inhibitor (dec-RVLR-cmk; 0, 5, 10, 20 and 40 μ M). Infection was performed with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.1. Kinetics of viral replication over a period of 48 h was evaluated. Titers of cell-associated virus for reference (A) or mutant virus (B), and free virus for reference (C) or mutant (D) virus were measured in cell and supernatant supplemented or not with dec-RVLR-cmk. (* P≤0.05). Results, shown in $log_{10}TCID_{50}/mL$ are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments.



Differential cleavage of the S glycoprotein leads to a modification in morphology of the viral particle.

Having shown that proprotein convertases are able to cleave the viral S glycoprotein *in vitro*, we sought to determine whether this cleavage could be associated with a change in viral particle morphology for the rOC/S_{G758R} variant compared to reference rOC/ATCC. Our observations by transmission electron microscopy (TEM), suggest that the typical coronavirus double crown-shape of the HCoV-OC43 virion was present in two different forms in cell supernatants that were harvested at 48 hpi during infection of mixed primary CNS cultures from BALB/c mice. Indeed, Fig. 9A (left panel) represents the first type of morphology, which we named "long" for long S peplomers as measurements of the spike (S) and the hemagglutininesterase (HE) peplomer is shown for the same particle in the right panel. The same relative length of S and HE proteins were previously determined for other coronaviruses [28]. The second type of crown morphology, which we named "short" for short S peplomers is presented in

Fig. 9B. This short S morphology shows normal HE peplomers of similar length. For a more accurate characterization of the spike length on viral particles from both variants, we measured the spike length of an equal number of virions (10 for each virus), for which the crown presented long (long S) or short (short S) peplomers (Fig. 9C). The average length of the spike associated with a long S type of crown morphology was 24 nm, whereas the average length of the spikes on short S virions was about 15 nm. This apparent average difference of 9 nm represents a reduction of about 37.5 % in the total length of the spike, which could presumably play a role in viral infectivity. Therefore, we next counted the number of viral particles that have a long-S or short-S crown for both viruses (Fig. 9D) and found a significant difference, which tended to demonstrate that viral particles of the mutant virus were mostly in the short S state (about 72%) compared to the reference virus, which showed mainly long S crown (about 68%).

Given that the rOC/S_{G758R} variant was less neurovirulent and presented a delay in dissemination within the mouse CNS compared to rOC/ATCC reference virus, two observations that can relate to a difference in viral infectivity in neuronal cells, we sought to evaluate whether there was a correlation between the morphological differences of the crown of viral particles (Fig. 9, panels A-D) and their relative infectivity (capacity to infect the target cell). No significant differences were found in the ratio of infectious viral particles over total viral particles (evaluated by the number of viral genome present in viral stocks used for all experiments), which establishes itself at 1/200 for both variants (Fig. 9E). Furthermore the amount of viral RNA associated with infected LA-N-5 cells remained the same over a period of 16 hours (Fig. 9F), suggesting that attachment and cell entry was similar for both viruses.

Figure 9: Morphology of viral crown peplomers is dependent on cleavage of the S glycoprotein but does not affect virus infectivity. Observation of virus crown peplomers was made by Transmission Electron Microscopy (TEM). Mixed primary cultures from BALB/c mice brain were infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.03 and supernatants were harvested at 48 hpi. After negative staining by PTA, viral particles were observed. (A) Left panel represents the "long S" morphology at magnification 50,000x and right panel indicates spike size in µm on the same viral particle. (B) Left panel shows the "short S" morphology at magnification 50,000x and right panel indicates spike size in um on the same viral particle. Black arrows represent different sizes of spike glycoprotein, and white arrows show the viral hemagglutinin-esterase (HE) protein peplomers. (C) Mean size of spike glycoprotein (in nm) was evaluated for long S and short S types of viral particles. Measurements between 20 and 26 nm in length were considered as long S and those between 14 nm and 20 nm in length were considered as short S spikes on viral particles. The difference between long S and short S viral particles was significant (*** P≤0.001). (D) Quantification of 650 long S and shortS viral particles of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} shows a significant difference between both viruses (*** P≤0.001). (E) Infectivity assay between viruses: quantification of viral RNA (absolute quantity in RNA copy) over the number of infectious particles in viral stocks. (F) The amount of viral RNA copy found associated with LA-N-5 cells during the early steps of infection at 0.5, 2, 4, 8, 16 hpi. Results are shown in absolute number of viral RNA copy.


Discussion

Being opportunistic pathogens, HCoV are naturally neuroinvasive and neurotropic in humans [5]. Herein, making use of our cDNA infectious clone, we show that a single nucleotide polymorphism (SNP) naturally found in the S gene of all known HCoV-OC43 contemporary clinical isolates leads to a G758R mutation in the S protein, without significantly affecting the virus neuroinvasive properties and infectivity in cell culture. However, this mutation was sufficient to modify viral spread and neurovirulence in susceptible mice by modulating the cleavage of the S protein, which appears related to furin-like activity in susceptible neuronal cells.

Even though the rOC/S_{G758R} mutant harbors a SNP present in respiratory clinical isolates, we were not able to detect any viral presence in the respiratory tract of infected mice. Further studies are underway to try to identify other naturally occurring S mutations that could be important for viral spread to the respiratory tract in mice. Nevertheless, our results indicate that, despite the difference in neurovirulence, the recombinant virus rOC/S_{G758R} retains its full neuroinvasive properties even though there was a delay in viral spread and in the production of infectious virus (Figs 1-4). This phenomenon may in part explain the mutant reduced neurovirulence accompanied by less severe neurological symptoms and a less frequent spread to the spinal cord, as previously reported for other S protein mutants of HCoV-OC43 [14] and for the murine coronavirus, MHV [29].

When viruses had spread to all regions of the brain, the innate immune response was well established, as observed by astrogliosis and microgliosis after both routes of infection where we detected viral antigens [10, 14, 30] and S1 Fig and S2 Fig. The stronger astrogliosis and microgliosis observed after infection by the reference virus may also be related to a faster spread throughout the CNS compared to the mutant virus [14]. The same difference in viral spread was confirmed in primary cultures of mouse brain cells, where both variants were still infecting neurons as primary targets (Fig. 5), even though astrocytes could also be infected (S3 Fig). This is in agreement with our previous reports in these cultures [14] and underlines the fact that the change in neurovirulence was not associated with a change in cell tropism as was previously shown for MHV [31], but could rather be related to a modification in the spread between infected neurons. The differential neurovirulence and spread could certainly be the consequence of the G758R mutation in the S protein, which introduces a typical furin-like recognition site [16, 32] probably recognized by cellular proprotein convertases (PCs) as this mutation was the only difference found in the whole genome of both recombinant viruses used in the present study. Proteolytic cleavage of coronaviruses S proteins was characterized several

145

years ago for the murine coronavirus [33]. Since then, several reports have indicated that PCs appear to be important for cell-cell fusion and/or virus entry into host cells [21-23], or during transport of the newly assembled virions through the secretory pathway of the producer cell [21, 34-36] for different coronaviruses including MHV, SARS-CoV and FIPV[21, 23, 37, 38].

The data presented in Fig. 6 and 7 clearly show that the S protein harboring the G758R mutation is more easily cleaved during infection. This S1/S2 cleaved version of the S protein is easily detected in the free virus present in cell culture supernatant but it is barely detectable in cell-associated proteins. Taken together, these results strongly suggest that this cleavage of S takes place during the late steps of infection, probably during particle assembly and egress, as it was previously shown for MERS-CoV [35] and MHV [39]. Furthermore, cleavage of the HCoV-OC43 S glycoprotein also has an impact on pathology, as it decreases neurovirulence and spread within the CNS. It is highly interesting to note that this association between decreased virulence and cleavage of coronavirus S glycoprotein was only suggested for FCoV [32]. In fact, for other coronaviruses, including the murine (MHV) and the bovine coronavirus (BCoV), no clear association was established between S cleavage and virulence [40, 41].

The data presented in Fig. 8 (panels A and B) strongly suggest that PCs can indeed be involved in the cleavage of HCoV-OC43 S protein during infection of neuronal cells. Inhibition of furin-like protease (PCs) was already demonstrated for other coronaviruses like MERS-CoV and MHV with the same type of inhibitor [21, 35]. These results are supported by observation of S protein in reference virus rOC/ATCC (Fig. 8A) for which the ratio of uncleaved S protein over S1/S2 cleaved form remained equal at all inhibitor concentrations. In contrast, this ratio increased for mutant virus rOC/S_{G758R} (Fig. 8B) in a dose-dependent manner. Results presented in Figs. 8C and D bring even more interesting new information about which of these proteases could be involved in the actual cleavage. Indeed, the synthetic peptide harboring the G758R mutation was cleaved with much more efficiency by PCs than the model peptide mimicking the reference virus S protein. Furthermore, even though furin represented the most efficient convertase, PC5/6 and PACE4, and to a much lesser extent PC7, were also able to cleave the synthetic peptide and could therefore cleave the HCoV-OC43 S protein during infection of susceptible cells as it was previously shown for SARS-CoV [42]. Inhibition of furin-like activity during infection of human neuronal cells, lead us to suggest that PCs (most notably furin) are the cognate proteases involved in the S protein cleavage at amino acid 758 (Fig. 8).

The number and morphology of glycoproteins on virions can modulate infectivity for different RNA viruses harboring a class I fusion protein, including other coronaviruses [43-46]. In the case of HCoV-OC43, the apparent modification of crown-shaped virions (Fig. 9A-D),

associated with the observed differential S protein cleavage, does not seem to increase or decrease viral infectivity (Fig. 9E and F). Moreover, inhibition of furin-like-activity did not influence the capacity of the viruses to enter these cells (S5 Fig). Therefore, even though the S cleavage associated with furin-like activity was shown to influence viral entry for IBV [24], the HCoV-OC43 S protein cleavage by PCs did not appear to modulate infectivity as it was shown for MERS-CoV [47].

On the other hand, the modified virion morphology associated with preferential cleavage of the rOC/S_{G758R} HCoV-OC43 variant S protein at the S1/S2 domain interface correlates with a decrease CNS viral spread and neurovirulence in susceptible mice. Indeed, the delays in spreading in both primary cultures (Fig. 5) and within the CNS (Fig. 2) were observed despite a more efficient release of infectious rOC/S_{G758R} particles in the cell culture medium as compared to the reference rOC/ATCC virus, a relationship that may seem counterintuitive but is in fact reminiscent of the cell-to-cell mode of propagation prevailing for a growing list of viruses [48]. For example, HTLV-1 is famously inefficient at spreading through free-virus particles diffusion, the particles remaining instead associated to the plasma membrane from where productive transfer towards target cell occurs [49, 50]. By analogy, it is tempting to speculate that S1/S2 HCoV-OC43 spike cleavage limits the amount of particles at the plasma membrane available for a cell-to-cell transfer to naive neurons. This can explain the difference in kinetics of dissemination between both viruses and the difficulty for mutant rOC/S_{G758R} to reach the spinal cord even though it does disseminate throughout the brain. This hypothesis may appear in contradiction with the previously documented positive impact of S1/S2 spike cleavage on MHV and SARS-CoV cell-to-cell transfer occurring upon fusion-dependent syncytium formation [21, 22, 39]. Furthermore, even though syncytium formation upon MHV infection has often been linked to S cleavage, in some instances, this type of cell-cell fusion was shown to occur without cleavage of the S protein [51-53] and the MHV-2 strain S protein can be cleaved without being able to induce syncytia [54]. In fact, regardless of the cleavage status of its S protein, HCoV-OC43 was never able to induce syncytia in any type of cells we studied and we therefore tend to think that distinct, but not mutually exclusive, cell-to-cell propagation mechanisms may prevail among coronaviruses like it does for other enveloped viruses, especially within the CNS, where cell-cell movement of viruses may take place at synapses [48]. Altogether, these observations suggest that the influence of spike cleavage on coronavirus propagation is not an absolute prerequisite and therefore, cannot per se predict accurately the efficiency of cell-to-cell spread. The reasons underlying this variable outcome are still unclear but may well reside in the different virus receptors, structural features and attachment factors exploited by coronaviruses. Given the expected influence of virus spread on neurovirulence, host survival and potentially establishment of CNS viral persistence, further studies are indeed warranted to characterize the underlying mechanisms associated with HCoV-OC43 spread within the CNS.

The SDS-PAGE (Fig. 6, 7 and 8 and S4 Fig) shows intermediate size fragments migrating between the uncleaved and furin-like cleaved forms of the S protein that may represent unspecific degradation products. However, analysis of the S protein gene sequences of HCoV-OC43, revealed a second putative cleavage site (S2') between amino acid 899 and 903 (KASSR). If functional, this second putative cleavage site could be used by other types of cell proteases, including trypsin, TMPRSS and cathepsins [20, 55-57] to produce a fragment of such molecular weight. Further studies to characterize the possible involvement of this second putative cleavage site cleavage site of the second putative cleavage site here possible involvement of the second putative cleavage site and the identification of host proteases involved in the potential processing of the HCoV-OC43 S protein are ongoing.

Taken together, the results of the current study indicate for the first time that HCoV-OC43 is clearly able to infect neuronal cells and to spread with or without the need for a furin-like S protein cleavage. The difference in viral spread within CNS and in brain primary cultures, associated with the increase of infectious viral particles in the culture medium for the virus harboring the G758R mutation present in all known clinical isolates, as well as the absence of modification in infectivity between the two viruses, strongly suggests that the PC-activityassociated cleavage of HCoV-OC43 S protein plays a more important role during the egress and viral budding from infected cells, which could influence the mode of viral transmission between CNS cells. This is of importance to better understand the mechanisms underlying viral spread within the CNS, potentially associated with an adaptation of HCoV-OC43 to this particular environment. Even though HCoV-OC43 reference strain is highly neurovirulent, we have already shown that its RNA persists in the mouse CNS for up to one year in a significant proportion of infected mice [10]. Nevertheless, the delayed dissemination and reduced neurovirulence of mutant rOC/S_{G758R} increase host survival and therefore could favor the establishment of CNS viral persistence associated with a potential viral adaptation to the CNS environment, which could result in the selection of better adapted quasi-species, as it was shown for MHV [58]. In the end, such a persistent infection in the human CNS could, in certain circumstances, be associated with recurrent human encephalitis or neurological degenerative pathologies. Therefore, the observation that HCoVs are naturally neuroinvasive in both mice and humans [9, 59, 60] underlines the need to further characterize viral and cellular determinants of these neuroinvasive properties. Understanding mechanisms and consequences of virus interactions with the nervous system is essential to better understand potentially pathologically relevant consequences and in the design of diagnostic and therapeutic strategies, including modulation of host proteases such as proprotein convertases.

Materials and Methods

Ethics statement.

All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Ethics Committee (IACUC) of the *Institut National de la Recherche Scientifique* (INRS) and conform to the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Animal care and used protocols numbers 1304-02 and 1205-03 were issued by the IACUC of INRS for the animal experiments described herein.

Viruses and cell lines.

The wild-type reference virus HCoV-OC43 (VR-759) was obtained in the 1980s from the American Type Culture Collection (ATCC). The recombinant HCoV-OC43 virus (rOC/ATCC) was generated using the full-length cDNA clone pBAC-OC43^{FL} and displayed the same phenotypic properties as the wild-type virus, as previously described [25]. This recombinant virus was used as the reference control virus for all experiments. Using site-directed mutagenesis (Stratagene QuikChange Multisite-directed mutagenesis kit) as recommended by the supplier, we introduced a point mutation in the gene coding for the spike glycoprotein of HCoV-OC43 at nucleotide 2272, corresponding to an amino acid change at position 758 (corresponding recombinant virus designated rOC/S_{G758R}). Each cDNA clone was transfected in BHK-21 cells, amplified by two passages in the HRT-18 cell line, and sequenced to make sure that only the introduced G758R mutation was present and that no other mutations appeared. The HRT-18 cell line (a gift from the late David Brian, University of Tennessee) was cultured in minimal essential medium alpha (MEM-alpha; Life Technologies) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; PAA GE Healthcare) and was used to produce viral stocks. The LA-N-5 cell line (a kind gift of Stephan Ladisch, George Washington University School of Medicine) was cultured in RPMI medium supplemented with 15% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 100 µM non-essential amino acids (Gibco- Invitrogen). LA-N-5 cells were differentiated into human neurons as previously described [61]. Briefly, cells were seeded in Cell+ petri dishes (5x10⁵ cells in RPMI medium supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 100 μ M non-essential amino acids. The next day and every 2 days for 6 days, the medium was replaced with the same medium supplemented with 10% (vol/vol) FBS and 10 μ M all-trans retinoic acid (Sigma-Aldrich).

Treatment of cells with protease inhibitors.

Before infection, differentiated LA-N-5 cells in Petri dishes, and 24-well plates were pretreated with furin inhibitor Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketone (Dec-RVLR-cmk; Bachem N-1505) at different concentrations (5-10-20-40 µM) for 2 h at 37°C. The medium was removed and cells were infected at a defined multiplicity of infection (MOI) of 0.1, with reference and mutant virus and incubated for 2 h at 37°C without furin inhibitor, washed with PBS and incubated at 37°C with fresh RPMI containing Dec-RVLR-cmk at the concentrations used before infection. At 6, 24 and 48 hpi, supernatants and cells were harvested separately for protein extraction and evaluation of infectious virus production.

Mixed primary cultures of mouse CNS cells.

Embryos at 14 to 16 days of gestation were removed from pregnant anesthetized CD1 mice. The cortex and hippocampus of the embryonic pup brains were harvested and placed in Hanks balanced salt solution (HBSS) medium, without Ca^{2+} and Mg^{2+} , supplemented with 1.0 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES buffer. The tissues were incubated in 5 ml of HBSS+trypsin-EDTA 0.5% (ratio 10:1 respectively) for 15 min at 37°C with gentle tilting to mix. After digestion, the tissues were washed 5 minutes three times with HBSS, and the medium was removed and replaced by fresh HBSS medium (without Ca^{2+} and Mg^{2+} , supplemented with 1.0 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES buffer). Tissues were gently pipetted up and down with a Pasteur pipette to dissociate the cells. After a decantation step of 5 min at room temperature, supernatants were transferred in a 50 ml tube with 36 mL of neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 0.5 mM GlutaMAX-I (Life Technologies), 10 mM HEPES buffer, B27 supplement (Life Technologies), gentamycin and 10% (vol/vol) of Horse serum (Life Technologies). This step was performed twice to increase the final amount of cells. Cells were then seeded at $2x10^5$ cells/cm² and grown on collagen+poly-D-lysine (3:1 for a final concentration at 50 µg/mL for both)-treated glass coverslips in the same medium, which was

replaced by fresh neurobasal medium without horse medium the next day. The medium was changed every 2 days after and the cultures were ready for infection after 7 days in culture.

Infection of human cell lines and primary mouse CNS cultures.

The HRT-18 and LA-N-5 cells as well a primary mouse CNS cell cultures were infected at a defined MOI of 0.1, or mock-infected and then incubated at 33°C (HRT-18) or 37°C (LA-N-5 cell line and primary cultures), for 2 h (for virus adsorption), and incubated at 33°C with fresh MEM-alpha supplemented with 1% (vol/vol) FBS (for HRT-18 cells) or at 37°C with fresh neurobasal medium with B27-GlutaMAX-I (for primary murine CNS cell cultures) or at 37°C with fresh RPMI medium supplemented with 2.5% (vol/vol) FBS (for LA-N-5 cells) for different periods of time.

Mice, survival curves, body weight variations and evaluation of clinical scores.

Female BALB/c mice (Jackson Laboratories) aged 22 days post-natal (dpn) or 10 dpn were inoculated respectively by the IC route with $10^{2.5}$ or the intranasal route with $10^{3.25}$ of 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) recombinant virus, as previously described [14]. Groups of 10 mice infected by each recombinant virus were observed on a daily basis over a period of 21 dpi, and survival and weight variations were evaluated. Clinical scores were evaluated using a scale with 4 distinctive levels (0 to 3); where 0 was equivalent to the asymptomatic mouse; 1 for mice symptoms of abnormal flexion of the four limbs [10]. Mice presenting social isolation, ruffled fur, hunched backs and weight loss were classified as number 2 and number 3 was attributed to mice that were in moribund state or dead. This neurological scale was adapted from Burrer *et al.* already published for several viruses [26].

Evaluation of infectious virus production.

Mouse brain and spinal cord tissues or cell culture supernatants were processed for the presence and quantification of infectious virus by an indirect immunoperoxidase assay (IPA) on HRT-18 cells, as previously described [62]. Briefly, HRT-18 cells were incubated with the mouse primary antibody 4.3E4 (dilution 1/50) that detects the S protein of HCoV-OC43. After three PBS washes, cells were incubated with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse immunoglobulin antibody diluted 1/500 (Kirkegaard & Perry Laboratories). Finally, immune complexes were detected by incubation with 0.025% (wt/vol) 3,3-diaminobenzidine

tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) and 0.01% (vol/vol) hydrogen peroxide in PBS 1X, and infectious virus titers were calculated by the Karber method, as previously described [62].

Immunohistochemistry/immunofluorescence.

For immunohistochemistry, perfusion with 4% (wt/vol) paraformaldehyde (PFA) was performed on five infected BALB/c mice for each recombinant virus, every 2 days, between 1 and 15 dpi. Sagittal brain sections were prepared at a thickness of 60 µm with a Lancer Vibratome. Serial sections were collected and incubated overnight with primary antibodies, as previously described [11]. For detection of viral antigens, 1/1000 dilutions of ascites fluid from the 4.E.11.3 hybridoma secreting a murine monoclonal antibody against the viral N protein were used [8]. Astrocytes were identified with a rabbit anti-glial fibrillary acidic protein antibody (GFAP; Dako) diluted 1/500, and activated macrophages/microglia by a rabbit anti-Iba 1 (Wako) diluted 1/500 for 10 day-old BALB/c mice, or a rat anti-Mac 2 monoclonal antibody diluted 1/50 for 21 day-old female BALB/c mice. For immunofluorescence staining, primary murine CNS cell cultures were washed with sterile PBS and then fixed with 4% (wt/vol) paraformaldehyde for 30 min at room temperature. After washing, cells were permeabilized with 100% methanol at -20°C for 5 min. The samples were then incubated with primary antibodies: a polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (1/1000; Dako), and a monoclonal mouse anti-S protein antibody (1/2 of 4.3.E4 hybridoma supernatant) (S3 Fig) or polyclonal rabbit anti-S protein of the bovine coronavirus (BCoV) at 1/1000 dilution and a monoclonal mouse anti-microtubuleassociated protein 2 (MAP2) antibody (at a dilution of 1/1000), 1 h at room temperature. After three washes with PBS, cells were incubated in the dark for 1 h at room temperature with the secondary fluorescent antibodies Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit (1/1000; Life Technologies) or Alexa Fluor 488 anti-mouse (1/1000; Life Technologies). After three PBS washes, tissue sections were incubated for 5 min at room temperature with 4',6-diamidino-2 phenylindole (DAPI; 1 µg/ml; Life Technologies) washed once with PBS and water and then mounted with Immuno-Mount mounting medium (Fisher Scientific). Immuno-histochemical and fluorescent staining were observed under a Nikon Eclipse E800 microscope with a QImaging Retiga-EXi Fast 1394 digital camera using Procapture system software.

Protein extraction and Western blot analysis.

Proteins in the cell culture medium and cell-associated proteins were 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 pipetted up and down into RIPA buffer, incubated on ice for 20 min, centrifuged for 10 min at 4 °C at 17,000×g and supernatants were stored at -80 °C until further analyzed. Protein concentrations were determined using the BCA Protein assay kit (Novagen), according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE using a Criterion 4-12% gradient gel, or a Tris-Glycine 4–15% gradient gel, transferred to PVDF membrane with a semi-dry trans-blot apparatus (BIO-RAD). 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 the monoclonal mouse anti-S protein antibody 4.3E4 (hybridoma supernatant 1/2) for 1 h at room temperature. After three washes of 10 min with TBS-T, the membranes were incubated with a secondary anti-mouse antibody coupled to horseradish peroxidase (GE Life Sciences) and detection was performed using the enhanced chemiluminescence (ECL) kit (BIO-RAD) using Kodak-X-Omat L-S film (Kodak).

Transmission electron microscopy.

For the observation of viral particles by Transmission Electron Microscopy (TEM), 200 μ L of the supernatant of infected mixed primary cultures of murine CNS were ultracentrifuged on a nickel grid at 50,000 rpm for 5 min. The grids were then dried with bibulous paper before negative staining of 1 min with a drop of 3% phosphotungstic acid (PTA).

Infectivity assay.

Real time RT-PCR for the absolute quantitation of viral RNA (genome) in viral stocks and during infection of LA-N-5 cells, was modified from Vijgen and collaborators [63] using the Taqman technology and the use of cRNA standards for the generation of a standard curve and to evaluate the absolute number of viral genome in samples with the MEGAshortscript kit (Ambion/Life Technologies) [63, 64]. Briefly, total RNA was extracted with the Qiazol reagent (Qiagen) for HRT-18 cell culture supernatant to evaluate the amount of viral genome in virus stock and with Qiagen RNeasy mini extraction kit according to the manufacturer's instructions for total RNA extraction following infection of LA-N-5 cells at 0.5, 2, 4, 8, and 16 hpi. cRNA standards were constructed exactly as described elsewhere made as previously described [63]. RNA concentrations were evaluated in all samples and quantified using a ND1000 spectrophotometer (Nanodrop). Real-time quantitative RT-PCR was performed with the TaqMan-RNA-to-CT 1-Step kit (Applied Biosystems/Life Technologies) in a 20 µL reaction

mixture with 10 μ L of 2x TaqMan RT-PCR Mix (containing ROX as a passive reference dye), 900 nM of forward and reverse primers, and 200 nM of FAM BHQ1-TP probe. Four μ L of extracted RNA for supernatant samples and cRNA standards (serial dilutions), or 0.5 μ g of total RNA for cell-associated (LA-N-5 cells infection) were used for the reaction. Amplification and detection were performed in a StepOnePlus Realtime PCR system apparatus and analysis were performed with the StepOne software version 2.3 (Applied Biosystems).

Synthetic peptides and *in silico* cleavage assay.

The synthetic peptides N-322: VDYSKNRRSR<u>G</u>AITTGY; sequence of rOC/ATCC reference virus S protein (amino acid 748-764) and N-321: VDYSKNRRSR<u>R</u>AITTGY; sequence of rOC/S_{G758R} virus S protein (amino acid 748-764) were made in-house at the laboratory of Dr. Robert Day. The underlined amino acid represents the G758R polymorphism between reference and clinical isolates. Briefly, recombinant PC enzymes were first titrated using the Dec-RVKR-chloromethylketone inhibitor. Cleavage assays of coronavirus derived peptides (42 μ g/tube) were carried out with 5 nM of each PC with BSA in a final volume of 80 μ l. The reaction was stopped with TFA (1% final). HPLC analysis (0-30% acetonitrile gradient, 0.5%/min) was done and quantification was obtained with peak area relative to T=0 min. Peaks obatined were also collected and identified using MALDI-TOF.

Statistical tests.

For cell experiments, statistical analysis were conducted by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test, or a t-test. For mice experiments, results were compared using two non-parametric statistical tests: Kruskal-Wallis and Mann-Whitney. Survival rates were plotted as Kaplan–Meier survival curves and were compared using the log rank (Mantel–Cox) test. Statistical significance was defined as p < 0.05.

Acknowledgments

We thank Hélène Jacomy, Micheline Letarte, Johanne Lemay and Jessie Tremblay for excellent technical assistance. We are very grateful to Astrid Vabret, University Hospital of Caen, France, for generously providing us with virus isolates.

References

- Talbot PJ, Jacomy H, Desforges M. Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus. In: Perlman S, Gallagher T, Snijder EJ, editors. The Nidoviruses. ASM Press; 2008. pp. 313–24.
- Forgie S, Marrie TJ. Healthcare-associated atypical pneumonia. Seminars in respiratory and critical care medicine. 2009;30(1):67-85. Epub 2009/02/10. doi: 10.1055/s-0028-1119811. PubMed PMID: 19199189.
- Freymuth F, Vabret A, Dina J, Cuvillon-Nimal D, Lubin C, Vaudecrane A, et al. [Bronchiolitis viruses]. Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie. 2010;17(8):1192-201. Epub 2010/06/19. doi: 10.1016/j.arcped.2010.05.006. PubMed PMID: 20558050.
- Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F. [Human coronaviruses]. Pathologiebiologie. 2009;57(2):149-60. Epub 2008/05/06. doi: 10.1016/j.patbio.2008.02.018. PubMed PMID: 18456429.
- Desforges M, Le Coupanec A, Brison E, Meessen-Pinard M, Talbot PJ. Neuroinvasive and neurotropic human respiratory coronaviruses: potential neurovirulent agents in humans. Advances in experimental medicine and biology. 2014;807:75-96. Epub 2014/03/13. doi: 10.1007/978-81-322-1777-0_6. PubMed PMID: 24619619.
- Arbour N, Cote G, Lachance C, Tardieu M, Cashman NR, Talbot PJ. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. Journal of virology. 1999;73(4):3338-50. Epub 1999/03/12. PubMed PMID: 10074188; PubMed Central PMCID: PMC104098.
- Arbour N, Ekande S, Cote G, Lachance C, Chagnon F, Tardieu M, et al. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. Journal of virology. 1999;73(4):3326-37. Epub 1999/03/12. PubMed PMID: 10074187; PubMed Central PMCID: PMC104097.

- Bonavia A, Arbour N, Yong VW, Talbot PJ. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. Journal of virology. 1997;71(1):800-6. PubMed PMID: ISI:A1997VX29200105.
- Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. Journal of virology. 2000;74(19):8913-21. Epub 2000/09/12. PubMed PMID: 10982334; PubMed Central PMCID: PMC102086.
- Jacomy H, Fragoso G, Almazan G, Mushynski WE, Talbot PJ. Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. Virology. 2006;349(2):335-46. Epub 2006/03/11. doi: 10.1016/j.virol.2006.01.049. PubMed PMID: 16527322.
- 11. Jacomy H, Talbot PJ. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. Virology. 2003;315(1):20-33. Epub 2003/11/01. PubMed PMID: 14592756.
- Vlasak R, Luytjes W, Spaan W, Palese P. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1988;85(12):4526-9. Epub 1988/06/01. PubMed PMID: 3380803; PubMed Central PMCID: PMC280463.
- St-Jean JR, Desforges M, Talbot PJ. Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. Advances in experimental medicine and biology. 2006;581:499-502. Epub 2006/10/14. doi: 10.1007/978-0-387-33012-9_88. PubMed PMID: 17037584.
- Jacomy H, St-Jean JR, Brison E, Marceau G, Desforges M, Talbot PJ. 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. 2010;16(4):279-93. Epub 2010/07/21. doi: 10.3109/13550284.2010.497806. PubMed PMID: 20642316.
- 15. Vabret A, Dina J, Mourez T, Gouarin S, Petitjean J, van der Werf S, et al. Inter- and intravariant genetic heterogeneity of human coronavirus OC43 strains in France. The Journal

of general virology. 2006;87(Pt 11):3349-53. Epub 2006/10/13. doi: 10.1099/vir.0.82065-0. PubMed PMID: 17030869.

- de Haan CA, Haijema BJ, Schellen P, Wichgers Schreur P, te Lintelo E, Vennema H, et al. Cleavage of group 1 coronavirus spike proteins: how furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation. Journal of virology. 2008;82(12):6078-83. Epub 2008/04/11. doi: 10.1128/JVI.00074-08. PubMed PMID: 18400867; PubMed Central PMCID: PMC2395124.
- Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. Journal of virology. 2003;77(16):8801-11. Epub 2003/07/30. PubMed PMID: 12885899; PubMed Central PMCID: PMC167208.
- Gallagher TM, Buchmeier MJ. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. Virology. 2001;279(2):371-4. Epub 2001/02/13. doi: 10.1006/viro.2000.0757. PubMed PMID: 11162792.
- 19. Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. Trends in microbiology. 1994;2(2):39-43. Epub 1994/02/01. PubMed PMID: 8162439.
- Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. Virus research. 2014. Epub 2014/12/03. doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.021. PubMed PMID: 25445340.
- de Haan CA, Stadler K, Godeke GJ, Bosch BJ, Rottier PJ. Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. Journal of virology. 2004;78(11):6048-54. Epub 2004/05/14. doi: 10.1128/JVI.78.11.6048-6054.2004. PubMed PMID: 15141003; PubMed Central PMCID: PMC415802.
- Follis KE, York J, Nunberg JH. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. Virology. 2006;350(2):358-69. Epub 2006/03/08. doi: 10.1016/j.virol.2006.02.003. PubMed PMID: 16519916.

- Simmons G, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Chaipan C, Agudelo J, et al. Different host cell proteases activate the SARS-coronavirus spike-protein for cell-cell and virus-cell fusion. Virology. 2011;413(2):265-74. Epub 2011/03/26. doi: 10.1016/j.virol.2011.02.020. PubMed PMID: 21435673; PubMed Central PMCID: PMC3086175.
- Yamada Y, Liu DX. Proteolytic activation of the spike protein at a novel RRRR/S motif is implicated in furin-dependent entry, syncytium formation, and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells. Journal of virology. 2009;83(17):8744-58. Epub 2009/06/26. doi: 10.1128/JVI.00613-09. PubMed PMID: 19553314; PubMed Central PMCID: PMC2738192.
- St-Jean JR, Desforges M, Almazan F, Jacomy H, Enjuanes L, Talbot PJ. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. Journal of virology. 2006;80(7):3670-4. Epub 2006/03/16. doi: 10.1128/JVI.80.7.3670-3674.2006. PubMed PMID: 16537637; PubMed Central PMCID: PMC1440365.
- Burrer R, Buchmeier MJ, Wolfe T, Ting JP, Feuer R, Iglesias A, et al. Exacerbated pathology of viral encephalitis in mice with central nervous system-specific autoantibodies. The American journal of pathology. 2007;170(2):557-66. Epub 2007/01/27. doi: 10.2353/ajpath.2007.060893. PubMed PMID: 17255324; PubMed Central PMCID: PMC1851853.
- Favreau DJ, Desforges M, St-Jean JR, Talbot PJ. A human coronavirus OC43 variant harboring persistence-associated mutations in the S glycoprotein differentially induces the unfolded protein response in human neurons as compared to wild-type virus. Virology. 2009;395(2):255-67. Epub 2009/10/23. doi: 10.1016/j.virol.2009.09.026. PubMed PMID: 19846189.
- 28. de Groot RJ, Baker, SC, Baric, R, Enjuanes L, Gorbalenya AE, Holmes KV, Perlman S, Poon L, Rottier PJM, Talbot PJ, Woo PCY, and Ziebuhr J. *Coronaviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. Virus Taxonomy: Ninth report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, New York. 2012. pp. 806-828.

- Phillips JJ, Chua MM, Lavi E, Weiss SR. Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence. Journal of virology. 1999;73(9):7752-60. Epub 1999/08/10. PubMed PMID: 10438865; PubMed Central PMCID: PMC104302.
- Quick ED, Leser JS, Clarke P, Tyler KL. Activation of intrinsic immune responses and microglial phagocytosis in an ex vivo spinal cord slice culture model of West Nile virus infection. Journal of virology. 2014;88(22):13005-14. Epub 2014/08/29. doi: 10.1128/JVI.01994-14. PubMed PMID: 25165111; PubMed Central PMCID: PMC4249089.
- Das Sarma J, Iacono K, Gard L, Marek R, Kenyon LC, Koval M, et al. Demyelinating and nondemyelinating strains of mouse hepatitis virus differ in their neural cell tropism. Journal of virology. 2008;82(11):5519-26. Epub 2008/04/04. doi: 10.1128/JVI.01488-07. PubMed PMID: 18385249; PubMed Central PMCID: PMC2395180.
- Licitra BN, Millet JK, Regan AD, Hamilton BS, Rinaldi VD, Duhamel GE, et al. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. Emerging infectious diseases. 2013;19(7):1066-73. Epub 2013/06/15. doi: 10.3201/eid1907.121094. PubMed PMID: 23763835; PubMed Central PMCID: PMC3713968.
- Sturman LS, Ricard CS, Holmes KV. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. Journal of virology. 1985;56(3):904-11. PubMed PMID: 2999443; PubMed Central PMCID: PMCPMC252663.
- Luytjes W, Sturman LS, Bredenbeek PJ, Charite J, van der Zeijst BA, Horzinek MC, et al. Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. Virology. 1987;161(2):479-87. Epub 1987/12/01. PubMed PMID: 2825419.
- 35. Millet JK, Whittaker GR. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(42):15214-9. Epub

2014/10/08. doi: 10.1073/pnas.1407087111. PubMed PMID: 25288733; PubMed Central PMCID: PMC4210292.

- Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. Nature reviews Molecular cell biology. 2002;3(10):753-66. Epub 2002/10/03. doi: 10.1038/nrm934. PubMed PMID: 12360192; PubMed Central PMCID: PMC1964754.
- Leparc-Goffart I, Hingley ST, Chua MM, Jiang X, Lavi E, Weiss SR. Altered pathogenesis of a mutant of the murine coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in the spike protein. Virology. 1997;239(1):1-10. Epub 1998/01/14. doi: 10.1006/viro.1997.8877. PubMed PMID: 9426441.
- Regan AD, Shraybman R, Cohen RD, Whittaker GR. Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses. Veterinary microbiology. 2008;132(3-4):235-48. Epub 2008/07/09. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.019. PubMed PMID: 18606506; PubMed Central PMCID: PMC2588466.
- Frana MF, Behnke JN, Sturman LS, Holmes KV. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. Journal of virology. 1985;56(3):912-20. PubMed PMID: 2999444; PubMed Central PMCID: PMCPMC252664.
- Hingley ST, Leparc-Goffart I, Seo SH, Tsai JC, Weiss SR. The virulence of mouse hepatitis virus strain A59 is not dependent on efficient spike protein cleavage and cell-tocell fusion. Journal of neurovirology. 2002;8(5):400-10. doi: 10.1080/13550280260422703. PubMed PMID: 12402166.
- Zhang XM, Kousoulas KG, Storz J. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses. Virology. 1991;183(1):397-404. PubMed PMID: 2053289.
- 42. Bergeron E, Vincent MJ, Wickham L, Hamelin J, Basak A, Nichol ST, et al. Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome

coronavirus. Biochemical and biophysical research communications. 2005;326(3):554-63. Epub 2004/12/15. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.063. PubMed PMID: 15596135.

- Finzi A, Xiang SH, Pacheco B, Wang L, Haight J, Kassa A, et al. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. Mol Cell. 2010;37(5):656-67. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.012. PubMed PMID: 20227370; PubMed Central PMCID: PMC2854584.
- McKeating JA, McKnight A, Moore JP. Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization. Journal of virology. 1991;65(2):852-60. PubMed PMID: 1898972; PubMed Central PMCID: PMC239825.
- Peeples ME, Bratt MA. Mutation in the matrix protein of Newcastle disease virus can result in decreased fusion glycoprotein incorporation into particles and decreased infectivity. Journal of virology. 1984;51(1):81-90. Epub 1984/07/01. PubMed PMID: 6547186; PubMed Central PMCID: PMC254403.
- Shulla A, Gallagher T. Role of spike protein endodomains in regulating coronavirus entry. J Biol Chem. 2009;284(47):32725-34. doi: 10.1074/jbc.M109.043547. PubMed PMID: 19801669; PubMed Central PMCID: PMC2781689.
- 47. Gierer S, Muller MA, Heurich A, Ritz D, Springstein BL, Karsten CB, et al. Inhibition of proprotein convertases abrogates processing of the middle eastern respiratory syndrome coronavirus spike protein in infected cells but does not reduce viral infectivity. The Journal of infectious diseases. 2015;211(6):889-97. Epub 2014/07/25. doi: 10.1093/infdis/jiu407. PubMed PMID: 25057042.
- 48. Sattentau Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. Nature reviews Microbiology. 2008;6(11):815-26. doi: 10.1038/nrmicro1972. PubMed PMID: 18923409.
- Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. Science. 2003;299(5613):1713-6. doi: 10.1126/science.1080115. PubMed PMID: 12589003.

- Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. Front Microbiol. 2012;3:378. doi: 10.3389/fmicb.2012.00378. PubMed PMID: 23109932; PubMed Central PMCID: PMCPMC3479854.
- Bos EC, Heijnen L, Luytjes W, Spaan WJ. Mutational analysis of the murine coronavirus spike protein: effect on cell-to-cell fusion. Virology. 1995;214(2):453-63. doi: 10.1006/viro.1995.0056. PubMed PMID: 8553547.
- Stauber R, Pfleiderera M, Siddell S. Proteolytic cleavage of the murine coronavirus surface glycoprotein is not required for fusion activity. The Journal of general virology. 1993;74 (Pt 2):183-91. doi: 10.1099/0022-1317-74-2-183. PubMed PMID: 8381459.
- 53. Taguchi F. Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. Journal of virology. 1993;67(3):1195-202. PubMed PMID: 8437210; PubMed Central PMCID: PMCPMC237484.
- Tsai CW, Chang SC, Chang MF. A 12-amino acid stretch in the hypervariable region of the spike protein S1 subunit is critical for cell fusion activity of mouse hepatitis virus. J Biol Chem. 1999;274(37):26085-90. PubMed PMID: 10473557.
- Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. Viruses. 2012;4(6):1011-33. Epub 2012/07/21. doi: 10.3390/v4061011. PubMed PMID: 22816037; PubMed Central PMCID: PMC3397359.
- Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. Viruses. 2012;4(4):557-80. Epub 2012/05/17. doi: 10.3390/v4040557. PubMed PMID: 22590686; PubMed Central PMCID: PMC3347323.
- 57. Seidah NG, Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. Nature reviews Drug discovery. 2012;11(5):367-83. Epub 2012/06/12. PubMed PMID: 22679642.
- 58. Adami C, Pooley J, Glomb J, Stecker E, Fazal F, Fleming JO, et al. Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection: quasispecies nature of the persisting MHV

RNA. Virology. 1995;209(2):337-46. Epub 1995/06/01. doi: 10.1006/viro.1995.1265. PubMed PMID: 7778268.

- St-Jean JR, Jacomy H, Desforges M, Vabret A, Freymuth F, Talbot PJ. Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. Journal of virology. 2004;78(16):8824-34. Epub 2004/07/29. doi: 10.1128/JVI.78.16.8824-8834.2004. PubMed PMID: 15280490; PubMed Central PMCID: PMC479063.
- Yeh EA, Collins A, Cohen ME, Duffner PK, Faden H. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. Pediatrics. 2004;113(1 Pt 1):e73-6. Epub 2004/01/02. PubMed PMID: 14702500.
- Hill DP, Robertson KA. Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. Brain research Brain research protocols. 1998;2(3):183-90. Epub 1998/05/09. PubMed PMID: 9507116.
- Lambert F, Jacomy H, Marceau G, Talbot PJ. Titration of human coronaviruses using an immunoperoxidase assay. Journal of visualized experiments : JoVE. 2008;(14). Epub 2008/12/11. doi: 10.3791/751. PubMed PMID: 19066576; PubMed Central PMCID: PMC2582848.
- Vijgen L, Keyaerts E, Moes E, Maes P, Duson G, Van Ranst M. Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. Journal of clinical microbiology. 2005;43(11):5452-6. Epub 2005/11/08. doi: 10.1128/JCM.43.11.5452-5456.2005. PubMed PMID: 16272469; PubMed Central PMCID: PMC1287813.
- Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Bruning T, et al. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Molecular and cellular probes. 2002;16(2):99-110. Epub 2002/05/29. doi: 10.1006/mcpr.2002.0405. PubMed PMID: 12030760.

Publication n°2

Manipulating neuroinvasive human coronavirus OC43 S protein cleavage by host-

cell proteases as potential therapeutic approach to abrogate viral infection,

propagation, and neuropathology within central nervous system

Alain Le Coupanec¹, Benedikt Kaufer², Marc Desforges^{1*}, and Pierre J. Talbot^{1*}

¹ Laboratory of Neuroimmunovirology, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

² Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für virologie, Robert Von Ostertag-Str. 7 - 13 14163 Berlin

Contributions des auteurs:

- Alain Le Coupanec: j'ai conçu et réalisé la majorité des expérimentations présentées dans cet article, en plus d'analyser tous les résultats et d'écrire l'ensemble du manuscrit.

- **Marc Desforges**: participation à la conception des expériences, ainsi que discussion des données et correction du manuscrit.
- Pierre J Talbot: discussion des données et correction du manuscrit.
- Benedikt Kaufer: Aide précieuse dans la réalisation des mutants par « Recombineering »

<u>Running head</u>: Coronavirus S2' cleavage modulates neurovirulence and neuropropagation

*Co-Corresponding Authors :

E-mail: <u>pierre.talbot@iaf.inrs.ca</u> (PJT) E-mail:<u>marc.desforges@iaf.inrs.ca</u> (MDe)

Confirmation de soumission:

You are being carbon copied ("cc:'d") on an e-mail "To" "Marc Desforges" marc.desforges@iaf.inrs.ca CC: alain.lecoupanec@iaf.inrs.ca, pierre.talbot@iaf.inrs.ca, benedikt.kaufer@fu-berlin.de

Dear Dr Desforges,

Your submission entitled "Manipulating neuroinvasive human coronavirus OC43 S protein cleavage by host-cell proteases as potential therapeutic approach to abrogate viral infection, propagation, and neuropathology within central nervous system" has been received by PLOS Pathogens. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is http://ppathogens.edmgr.com/.

We will be in touch once we have checked through your files (typically 0-2 days), in case of any modifications needed prior to editor assignment.

Please note, if you have submitted a Research Article and it is accepted, an uncorrected proof of your manuscript will be published online ahead of the final version. If, for any reason, you do not want an earlier version of your Research Article published online, please let the journal staff know immediately at <u>plospathogens@plos.org</u>. Note this will only affect Research Articles and not any other article type.

PLOS requires an ORCID iD for all corresponding authors on papers submitted after December 6th, 2016. Please ensure that you have an ORCID iD and that it is validated in Editorial Manager. To do this, go to 'Update my Information' (in the upper left-hand corner of the main menu), and click on the Fetch/Validate link next to the ORCID field. This will take you to the ORCID site and allow you to create a new iD or authenticate a pre-existing iD in Editorial Manager

PLOS is considering offering a service where we would post your manuscript to a preprint server (like arXiv or bioRxiv) while it continues on its way through our editorial process. If this service were offered today, would you participate and allow us to post your manuscript?

Yes, I would allow you to post my manuscript. http://surveys.plos.org/s3/ppathPreprintInterest?answer=YesAllow

No, I would not allow you to post my manuscript. http://surveys.plos.org/s3/ppathPreprintInterest?answer=DoNotAllow

Thank you for submitting your work.

Kind regards,

PLOS Pathogens Staff plospathogens@plos.org

Résumé

Les coronavirus humains (HCoV) sont des pathogènes respiratoires qui peuvent être associés au développement de maladies neurologiques, en raison de leurs propriétés neuroinvasives et neurotropes. L'infection par le coronavirus est largement contrôlée par la glycoprotéine de surface S, car elle possède à la fois des capacités de liaison au récepteur et de fusion membranaire. En tant que telle, la glycoprotéine S peut être clivée à des sites spécifiques et est donc un déterminant crucial du tropisme tissulaire et cellulaire. Une caractéristique importante est que les événements de clivage protéolytique qui conduisent à la fusion membranaire peuvent se produire à la fois entre les domaines de liaison (S1) et de fusion (S2) du récepteur (S1/S2), et à proximité du peptide de fusion dans la partie S2 (S2'). Dans cette étude, nous avons montré que les deux sites S1/S2 et S2' présents dans la protéine S, sont importants pour une infection optimale dans le SNC ainsi que pour la neurovirulence. Alors qu'un clivage efficace à S1/S2 est associé à une neuropropagation et une neurovirulence diminuées, le site S2' semble essentiel pour une infection virale efficace. Il semble jouer un rôle important dans l'entrée et dans la propagation virale dans les cellules neuronales et dans le SNC de la souris. De plus, nos résultats soulignent l'implication importante des deux sites de clivages dans la protéine S et et nous permettent potentiellement d'identifier les protéases de l'hôte impliquées dans les processus qui peuvent directement régir la gravité et /ou la nature de la neuropathogenèse par HCoV-OC43. Pris dans leur ensemble, nos données pointent vers deux cibles thérapeutiques potentielles dans la protéine S: (1) le clivage efficace au site S1 / S2 par les protéases hôtes et (2) l'inactivation du site S2' pour prévenir ou au moins réduire la neuroinvasion, la neuropropation, et neurovirulence associée potentielle dans le SNC humain.

Abstract

Human coronaviruses (HCoV) are respiratory pathogens that may be associated with the development of neurological diseases, in view of their neuroinvasive and neurotropic properties. Coronavirus infection is largely controlled by the spike envelope glycoprotein (S) since it bears both receptor binding and membrane fusion capabilities. As such, the S glycoprotein can be cleaved at specific sites and is thus a crucial determinant of tissue and cell tropism as well as host range. One important key feature is that the proteolytic cleavage events that lead to membrane fusion can occur both at the interface between the receptor binding (S1) and fusion (S2) domains (S1/S2), as well as in a position adjacent to a fusion peptide within S2 (S2'). In the present study, we found that both the S1/S2 and S2' sites present in the HCoV-OC43 S protein are important for optimal infection in the CNS as well as neurovirulence. Whereas efficient cleavage at S1/S2 is associated with decreased phenotypes, potentially cleavable putative S2' site appears to be essential for efficient viral infection, from entry to propagation between neuronal cells in culture and in the mouse CNS. Furthermore, our results underline the important implication of both cleavable sites in the S protein and potentially identify host proteases involved in processes that may directly govern the severity and/or nature of HCoV-OC43 neuropathogenesis associated with neuronal propagation in different discrete regions of the CNS. Taken together, our data point towards two potential therapeutic targets in the S protein: (1) cleavage at the S1/S2 site by host proteases and (2) inactivation of cleavable S2' site to prevent or at least reduce neuroinvasion, neuropropation, and potential associated neurovirulence in human CNS.

Author Summary

Human coronaviruses (HCoV) are respiratory pathogens involved in a sizable proportion of common colds. They have over the years been associated with the development of neurological diseases, given their demonstrated neuroinvasive and neurotropic properties. For several coronavirus species, including HCoV-OC43, the spike (S) protein was shown to be a major factor of virulence in the central nervous system (CNS), and was important for viral entry and propagation in neuronal cells. To evaluate the relative importance of cleavable S1/S2 and S2' sites present in the S protein and to characterize their role in neuroinvasion, virus spread within the CNS, and associated neurovirulence, we compared the development and outcome of CNS infection by three different HCoV-OC43 variants. Our data revealed that cleavage at S1/S2 site of S glycoprotein decreases virus propagation and virulence, whereas cleavage at S2' site is necessary for efficient infection and neurovirulence. Understanding mechanisms of viral entry in neuronal cell and propagation to neighboring cells is essential to better design therapeutic strategies. Positively or negatively influencing cleavage at both S1/S2 and S2 sites in the S glycoprotein represent a potential therapeutic strategy to prevent infection by HCoV-OC43 in human CNS, therefore preventing potential neurological disorder in humans.

Introduction

Coronaviruses are a wide-ranging family of viruses that infect many species of birds and mammals, including humans (Woo *et al.*, 2009). Human coronaviruses (HCoV) are enveloped positive-stranded RNA viruses belonging to the family *Coronaviridae* in the order *Nidovirales* and are mostly responsible for upper respiratory tract infections (Talbot PJ *et al.*, 2008). Over the years, evidence has accumulated to support the idea that HCoV, being opportunistic pathogens, can be associated with other pathologies, including neurological diseases (Arabi *et al.*, 2015, Forgie *et al.*, 2009, McGavern *et al.*, 2011, Riski *et al.*, 1980, Yeh *et al.*, 2004). We have previously shown that -229E and -OC43 strains are naturally neuroinvasive and neurotropic in humans CNS (Desforges *et al.*, 2014a) and that they can infect and persist in human neural (neuronal and glial) cells (Arbour *et al.*, 1999a, Arbour *et al.*, 1999b, Bonavia *et al.*, 1997) and in humans brains (Arbour *et al.*, 2000). Moreover, the -OC43 strain induces encephalitis in susceptible mice, with neurons being the main target of infection (Jacomy *et al.*, 2010, Jacomy *et al.*, 2003) and has been potentially associated with cases of fatal encephalitis (S. Morfopoulou *et al.*, 2016) and acute disseminated encephalomyelitis (Yeh *et al.*, 2004) in immunodeficient children.

Coronavirus infection is largely controlled by the spike surface envelope glycoprotein (S) since it bears both receptor binding and membrane fusion capabilities (Masters, 2013, Vlasak *et al.*, 1988b). As such, the S glycoprotein is a crucial determinant of tissue and cell tropism as well as host range. At each step of coronavirus entry, which includes receptor binding, activation of fusion, and internalization, a multitude of mechanisms and strategies have evolved (Belouzard *et al.*, 2012). Coronaviruses can enter in cells via fusion either directly at the cell surface or can be internalized through the endosomal pathway. The Murine coronavirus (MuCoV) is a prime example of the flexibility in entry mechanisms used. Indeed, a variant of the mouse hepatitis virus strain 4 (MHV-4) was shown to be able to fuse directly at the cell surface at neutral pH and also enter cells through an endocytic route (Nash *et al.*, 1997).

Several class 1 viral fusion proteins, such as the coronavirus S protein, are proteolytically processed during infection of the host cell, a mechanism that is often essential for the initiation of infection of receptor-bearing cells, tissue tropism and in eventual pathogenesis (B. J. Bosch *et al.*, 2003, Gallagher *et al.*, 2001, Klenk *et al.*, 1994, Millet *et al.*, 2014b). A range of different proteases can cleave and activate the coronavirus spike (S) (Belouzard *et al.*, 2012). As such, coronaviruses may be considered to be viruses that can adapt well to new environments based on protease availability, along with the more conventional receptor-binding aspects of viral tropism. Another key feature of the coronavirus S protein is that the proteolytic cleavage events that lead to membrane fusion can occur both

179

at the interface between the receptor binding (S1) and fusion (S2) domains (S1/S2), as well as in a position adjacent to a fusion peptide within S2 (S2') (Belouzard *et al.*, 2009, Yamada *et al.*, 2009a). Fusion activation can be activated by low pH, receptor binding, or a combination of the two, with the cleavage event typically occurring in the vicinity of the viral fusion peptide, which becomes exposed upon activation-dependent conformational changes of the spike protein and initiates the fusion reaction following its insertion into the host cell membrane (Lai AL, 2005). Moreover, its cleavage by different types of host proteases, including furin-like proteases, is involved in various steps of coronavirus infection (de Haan *et al.*, 2004, Follis *et al.*, 2006, Simmons *et al.*, 2011).

For several coronavirus species, including HCoV-OC43, the spike (S) protein was shown to be a major factor of virulence in the central nervous system (CNS) (Jacomy *et al.*, 2010, Le Coupanec *et al.*, 2015). We have reported that persistent HCoV-OC43 infections of human neuronal and glial cell lines led to the appearance of point mutations in the S glycoprotein gene (St-Jean *et al.*, 2006b) and that these mutations were sufficient to significantly increase neurovirulence and modify neuropathology in mice (Jacomy *et al.*, 2010). Moreover, a predominant mutation identified in the S gene of viruses detected in clinical isolates (Gly758Arg), introduces a furin-like protease cleavage site RRSR↓R in the viral S glycoprotein and modulates neurovirulence in mice (Le Coupanec *et al.*, 2015)

In the present study, we have shown that even though the route of neuroinvasion remained the same as the reference virus, the dissemination capacities of recombinant viruses with mutated S1/S2 and S2' sites were partially abrogated, as well as neurovirulence. Therefore, our results demonstrate the implication of potential cleavage sites (S1/S2 and S2') in neurovirulence abilities of HCoV-OC43 and identify processes that may directly govern the severity and/or nature of HCoV-OC43 neuropathogenesis associated with neuronal propagation in different discrete regions of the CNS. Inhibitors of host cell proteases, including TMPRSS, cathepsins and proprotein-convertases, have been proposed as potential antiviral therapeutics for coronavirus infections, in particular for the treatment of SARS and MERS infections (Bergeron *et al.*, 2005, Gierer *et al.*, 2013, Millet *et al.*, 2014a, Simmons *et al.*, 2013) and our data indicate that these proteases could also represent relevant targets in order to modulate the S protein cleavage, especially at the S2' site, thus reducing CNS infection and potential neurovirulence of HCoV-OC43 in humans.

180
Results

Mutation at putative S protein cleavage site influences HCoV-OC43 infectivity and entry in infected cells.

Most coronaviruses (CoVs) have their S protein cleaved by host cell proteases at some point during infection at either the S1/S2 position (between S1 and S2 region of the S protein) or at a second site named S2' located just upstream a putative fusion peptide (in the S2 region of S) (Belouzard et al., 2009, Glowacka et al., 2011, Le Coupanec et al., 2015, Millet et al., 2014a, Millet et al., 2015). We previously reported that cleavage of the HCoV-OC43 S protein at S1/S2 site by host-cell proteases was not crucial for viral infectivity, but was an important determinant of virus spreading in CNS. By homology to other CoVs, we previously suggested (Le Coupanec et al., 2015) that a second type of cleavage site (S2'), which has been predicted by others using bioinformatics analysis and modeling (Millet et al., 2015) was present in the HCoV-OC43 S protein (Fig. 1A) and we wished to evaluate its importance during infection as was observed for other CoVs (Belouzard et al., 2009, Bertram et al., 2013, Glowacka et al., 2011, Millet et al., 2014a, Millet et al., 2015). We thus sought to investigate the potential biological relevance of the viral sequence KASSRS, located in the HCoV-OC43 S protein in the putative S2' cleavage site before the peptide fusion (amino acid 899 to 904). Accordingly, making use of our cDNA infectious clone (pBAC-OC43^{FL}) (St-Jean et al., 2006a), we wished to push further our understanding of the S cleavage mechanism and evaluate the relative involvement of the identified S1/S2 and putative S2' cleavage sites (Fig. 1A), during infection. Using recombineering (Tischer et al., 2010), different cDNA molecular infectious clones, mutated at either putative site of cleavage (S1/S2; pBAC-OC/S_{G758R}) and (S2'; pBAC-OC/S_{R903A}) or at both sites at the same time (S1/S2 and S2'; pBAC-OC/S_{G758R-R903A}) were obtained with their corresponding cleavage site presented in figure 1A. Transfection of BHK21 cells with the different cDNA molecular infectious clones was performed, followed by amplification in HRT-18 cells to produce infectious viruses (St-Jean et al., 2006a). Using 3 different cDNA molecular infectious clones for the double mutant (pBAC-OC/S_{G758R-R903A}) (for which the entire S gene was sequenced), we were never able to harvest any detectable infectious viral particles compared to reference and single mutant viruses, even with a limit of detection of 0.5 TCID₅₀/mL (Fig. 1B) after transfection (BHK-P0), and two rounds of viral amplification (HRT-P2), suggesting that both identified S1/S2 and putative S2' cleavage sites both play a role in the capacity to produce infectious virus. As seen in figure 1C, RT-PCR analysis on the HCoV-OC43 E gene revealed that transfections of all infectious clones produced viral RNA at comparable level in BHK21 cells (Fig. 1C) but that the presence of this viral RNA was already lost for double mutant after the first viral amplification in HRT-18 cells (HRT-P1; Fig. 1D), a result that probably explains the

181

incapacity to detect infectious virus in HRT-18 even after two rounds of amplification (HRT-P2; Fig. 1B). Given that no difference in viral infectivity between the rOC/S_{G758R} mutant virus and reference rOC/ATCC virus was observed in our previous study (Le Coupanec et al., 2015), we sought to evaluate if the inactivation of S2' putative cleavage site could impact this important parameter of infection. Our data revealed no difference in infectivity, defined as the ratio of infectious particles over total particles (Le Coupanec et al., 2015), between the three variants in viral stocks that were produced in human epithelial HRT-18 cells (Fig. 1E). Although no difference on viral infectivity was observed between the three variants in epithelial cells, (which all produce an average of 1 infectious viral particle for each 100 total particles), we then compared the capacity of each virus to enter neuronal LA-N-5 cells and determined that reference rOC/ATCC entered cells more efficiently than rOC/SG758R and rOC/S_{R903A} mutants (Fig. 1F). Indeed, after 20min of incubation at 37°C, an average of only 5% of rOC/S_{R903A} mutant virus entered cells compared to rOC/S_{G758R} and rOC/ATCC viruses for which 12% and 27% was calculated respectively. Consequently, during the first stages of entry, reference rOC/ATCC virus entered cells twice as fast as the mutant rOC/S_{G758R}, which in turn, also entered cells twice as fast as the mutant rOC/S_{R903A}. However, when evaluating entry globally by calculating the slope over a 50min time span, the difference between rOC/ATCC and mutant rOC/S_{G758R} was no more significant, in contrary to mutant rOC/S_{R903A} for which the difference with the two other viruses remained significant.

Figure 1: Mutation in S1/S2 and S2' site does not impaired viral infectivity of HCoV-OC43 in epithelial cell, but does in neuronal cell. (A) Representation of the full-length HCoV-OC43 genome found within the pBAC-OC43FL infectious clone with a schematic representation of the HCoV-OC43 S gene with the two cleavage sites: S1/S2 and putative S2' cleavage site (black arrows). The S protein is composed of two subunits, the S1 region that is composed of receptor binding domain (RBD) and hypervariable region (HVR), and the S2 region, composed by the fusion subunit. L: linker region between S1/S2 and S2' sites, FP: putative fusion peptide, HR1: heptad repeat 1, HR2: heptad repeat 2, TM: transmembrane domain, E: endodomain. Not drawn to scale. Data in table represent corresponding cleavage sequences of the different mutant virus, including reference pBAC-OC43^{FL}. (B) Infectious virus production evaluated after transfection of BK21 cells (BHK-P0), and two rounds of amplification in HRT-18 cells (HRT-P1 and P2). RT-PCR analysis for the presence of viral RNA after transfection of BHK21 (C): lane 1 is negative ctrl; lane 2 is wild type pBAC-OC43FL; lane 3 is pBAC-OC43/SG758R; lane 4 is clone 1 of pBAC-OC43/SR903A; lane 5 is clone 2 of pBAC-OC43/SR903A; lane 6 is clone 1 of pBAC-OC43/SG758R-R903A; lane 7 is clone 2 of pBAC-OC43/SG758R-R903A; lane 8 is clone 3 of pBAC-OC43/SG758R-R903A. RT-PCR analysis for the presence of viral RNA after two rounds of amplification (infection) in HRT-18 cells (D): lane 1 is negative ctrl; lane 2 is positive ctrl; lane 3 comes from clone 1 of pBAC-OC43/SG758R-R903A; lane 4 comes from clone 2 of pBAC-OC43/SG758R-R903A; lane 5 comes from clone 3 of pBAC-OC43/SG758R-R903A; lane 6 comes from clone 1 of pBAC-OC43/SR903A; lane 7 comes from clone 2 of pBAC-OC43/SR903A; lane 8 comes from pBAC-OC43/SG758R; lane 9 comes from wild type pBAC-OC43FL. (E) Infectivity assay between viruses: quantification of viral RNA in viral stock (absolute quantity in RNA copy representative of total viral particles) over the number of infectious particles in viral stocks produced on the HRT-18 cells. (F) Differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was incubated 1hre on ice with either rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} at maximal MOI 1. Then, 24- well plates were incubated 20, 30 and 50min at 37°C. After incubating time, medium was removed and new medium with chloroquine (200nM) was added. Incubation were done for 16hres at 37°C with CO₂. Positive controls were incubated for 16hres without chloroquine. Then, viral entry was evaluated by immunofluorescence assay and quantified with Cell profiler software. Relative infection was done on reference virus rOC/ATCC. Table below panel F represents the slope calculated over a 50min time period.



Cathepsin B and L are possible players in S glycoprotein putative cleavage at S2' site.

In order to evaluate if the putative cleavage at the S2' site of the viral S protein could be activated, we made use of the differentiated LA-N-5 neuronal cell line and confirmed previous results (Le Coupanec *et al.*, 2015) showing that the cleavage of the S protein in S1/S2 fragments was predominantly detected in the LA-N-5 cell culture supernatant for mutant rOC/S_{G758R} mutant virus (Fig. 2A) compared to the protein associated with cells (Fig. 2B). Secondly, our results also show a very faint intermediate size band between the uncleaved and S1/S2 cleaved forms of the S protein for reference virus and rOC/S_{G758R} mutant virus which we also already previously reported (Le Coupanec *et al.*, 2015) (Fig. 2A-B, black arrow). Proteases associated with the endocytic pathway have been shown to

modulate infection by many different coronavirus (Belouzard et al., 2009, Glowacka et al., 2011, I. C. Huang et al., 2006a, Qian et al., 2013, Qiu et al., 2006, Regan et al., 2008, Simmons et al., 2005). No data are presented for the rOC/S_{R903A} virus because infection of human neuronal LA-N-5 cells is highly inefficient and consequently does not produce enough viral proteins (including S) to be detectable. Therefore, we sought to identify which proteases could play a role in cleavage of the HCoV-OC43 S glycoprotein by designing synthetic peptides, described in detail in materials and methods and representing all viruses at S1/S2 site: RRSRG (rOC/ATCC) and RRSRR (rOC/S_{G758R}) (Le Coupanec et al., 2015), or at S2' site: KASSRS (rOC/ATCC) and KASSAS (rOC/S_{R903A}). As shown in figure 2C, we again confirmed previous results (Le Coupanec et al., 2015) showing that furin was effective at cleaving the peptides representing the S1/S2 site but that it was much more efficient on the peptide containing the sequence of mutant rOC/S_{G758R} virus (RRSRR) than on the one containing the rOC/ATCC sequence (RRSRG) and our new data indicate that this proprotein convertase has no affinity for the putative cleavage site at S2' (Fig. 2C). Both cathepsins tested were highly active at cleaving peptide representing the S1/S2 site (RRSRG) but only cathepsin L was able to cleave peptide RRSRR. Although equal and very efficient cleavage was observed for peptide KASSRS and KASSAS in the presence of cathepsin B (Fig. 2D), a marked difference was observed in the amount of peptide cleavage during incubation of cathepsin L with these two peptides representing the reference S2' cleavage site (KASSRS) and mutated S2' site (KASSAS) (Fig. 2E). Indeed, cleavage of peptide KASSRS was clearly complete in the presence of cathepsin L, whereas 1/3 (33%) of peptide KASSAS remained uncleaved. Even though, these results are obtained in silico, they presage that, during infection, both cathepsin B and cathepsin L could cleave the S glycoprotein at the S2' site but that the cleavage by cathepsin L would be less efficient for the mutated site in the rOC/S_{R903A} mutant virus.

Figure 2: Cathepsin B and L are potential players in S glycoprotein cleavage at S2' site. The differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0.1. Proteins in association with cell or in supernatant were extracted at 48 hpi, and protein state were analyzed. Western blot analysis of cell culture supernatant (A) or whole cell lysates (B) (10 μ g of proteins) revealed the presence of the uncleaved form of the S glycoprotein (180 kDa), and of a cleaved form at around 100 kDa (S1/S2), and probably the second cleaved site at around 110 kDa (S2'). Synthetic peptides represented all viruses at S1/S2 site: RRSRG (rOC/ATCC; black) and RRSRR (rOC/S_{G758R}; red), or at S2' site: KASSRS (rOC/ATCC; green) and KASSAS (rOC/S_{R903A}; blue). Different peptides were in incubated with furin (C), cathepsin B (D) or L (E) for 30min, and % of cleaved peptide were measured as described in material and methods.



S protein cleavage sites differentially influence entry in neuronal cells.

Having shown that cathepsins are able to cleave or not peptides representing the S protein S1/S2 and S2' sites (Fig. 2) and knowing that there are proteases often involved in early steps of infection (such as entry) for many viruses, including other CoVs (Belouzard *et al.*, 2009, Belouzard *et al.*, 2012, Glowacka *et al.*, 2011, Millet *et al.*, 2014a, Millet *et al.*, 2015, Qiu *et al.*, 2006, Shirato *et al.*, 2017), we sought to evaluate if they could be implicated during infection of neuronal cells by our different viruses. As cathepsins are predominantly and typically found in endosomes (cathepsin B) and lysosomes (cathepsin L), where they are optimally active at low pH, and as the endocytic path was shown to be used by CoVs (Gierer *et al.*, 2013, Simmons *et al.*, 2005, Simmons *et al.*, 2004) we first wanted to evaluate the relative importance of these proteases during endocytosis for our three variants. Therefore, we first evaluated the effect of pH neutralization on viral entry, with chloroquine being used

as neutralization agent of endosomal acidification. Entry of mutant rOC/S_{R903A} virus was mostly affected when endosomal pH was neutralized compared to other viruses in LA-N-5 cells in a dose-dependent manner. Indeed, 10nM of chloroquine significantly decreased mutant rOC/S_{R903A} entry by 80%, whereas this reduction was of 40% for rOC/ATCC and not signifant for rOC/S_{G758R}. With higher concentration of chloroquine (50nM), all three variants were affected (Fig. 3A). This decrease in viral entry was also observed after treatment with NH₄Cl and Bafilomycin A1 in LA-N-5 cell (S1 Fig. A-B). Moreover, acidification of endosomes was also demonstrated to be necessary for viral entry in primary CNS cultures of mice (S1 Fig. C). These data suggest that the rOC/S_{G758R} virus, harboring mostly an already cleaved S protein (at the S1/S2 site; (Le Coupanec *et al.*, 2015) and Fig. 2) relies less on endocytic acidification to enter cells and that, even though a significant difference in acidification of the wild type S2' site (KASSRS); found in both rOC/ATCC and rOC/ S_{G758R} viruses) to KASSAS (as in the rOC/S_{R903A} virus) does not prevent viral entry by endosomal pathway.

Having shown that endosomal acidification influenced entry with a differential impact for each variant and that cathepsins could be implicated in the process, we then sought to evaluate the implication of these endosomal proteases in the process (Fig. 3 B-C). For this, we infected LA-N-5 cells in the presence of either MLD-28170 (chemical inhibitor of cathepsin B; Fig 3B), or Z-FA-FMK (chemical inhibitor of both cathepsin B and L; Fig 3C). In both cases, viral entry of rOC/ATCC and rOC/S_{R903A} mutant virus, (which both harbor a suboptimal cleavage site at S1/S2) were mostly altered compared to rOC/S_{G758R} virus, for which entry inhibition was only 30% when only cathepsin B was inhibited (Fig. 3B) and did not exceed 50% when both cathepsins were inhibited (Fig. 3C). All these data suggest that the 3 viruses may use the endosomal pathway to enter in neuronal cells and that cathepsins have a differential impact associated with the presence or absence of optimal cleavage sites. Vesicular stomatitis virus (VSV) was used as a negative control as its glycoprotein G does not need to be cleaved by cellular proteases within the endocytic pathway in order for the virus to enter (Shirato *et al.*, 2017).

Our data suggest that endosomal cathepsins are involved during HCoV-OC43 entry. However, other host proteases such as membrane bound TMPRSS may also influence coronavirus infection, supposedly by initiating direct membrane fusion at the cell surface and subsequent viral entry in susceptible cells as it was reported for other coronaviruses (Bertram *et al.*, 2013, Glowacka *et al.*, 2011, Millet *et al.*, 2015, Nash *et al.*, 1997, Shirato *et al.*, 2017). To investigate if TMPRSS are involved in HCoV-OC43 entry in neuronal cells, we used the chemical inhibitor camostate mesylate and observed no difference in efficiency of entry between viruses in LA-N-5 cells (S2 Fig. A). RT-PCR revealed that TMPRSS2 and 5 are not expressed in LA-N-5 cells but that TMPRSS5/spinesin, a form of TMPRSS usually

186

expressed in CNS cells, is expressed in murine primary CNS cultures (S2 Fig. B, lane 4). We thus tested the implication of TMPRSS5 in these primary neural cells, by performing infection in the presence of camostate mesylate (Millet *et al.*, 2015) and found out that, like inhibition of cathepsins, entry of rOC/ATCC and rOC/S_{R903A} viruses was more affected than rOC/S_{G758R} virus. These data strongly suggest that viruses that harbor a suboptimal cleavage S1/S2 site (rOC/ATCC and rOC/S_{R903A}) rely more on cleavage by TMPRSS5 for efficient entry. And again, the modification of the wild type S2' site KASSRS (rOC/ATCC) to KASSAS (as in the rOC/S_{R903A} virus) does not prevent cleavage by TMPRSS5 and eventual associated entry path, such as the proposed fusion at the cell membrane.

Figure 3: Endosomal acidification and proteases are necessary for efficient entry of HCoV-OC43 into neuronal cells. (A) Differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was incubated before, during and after infection with different concentration of chloroguine (0, 10, and 50nM). Infection were done with either rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} at MOI 1. Incubation were done for 16hres at 37°C with CO₂. Then, viral entry was evaluated by immunofluorescence assay and quantified with Cell profiler software. Differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was incubated before and during with 20µM of MDL 28170 (B) or 20µM of Z-FA-FMK (C). Infection were done with either rOC/ATCC, rOC/S_{G758R}, rOC/S_{R903A} or VSV at maximal MOI 1. After infection, medium was removed, and fresh medium with 200nM of chloroquine were added. Incubation were done for 16hres at 37°C with CO₂. Then, viral entry was evaluated by immunofluorescence assay and quantified with Cell profiler software. Results shown are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments. (D) Mixed primary cultures of mice brain were incubated before, during and after infection with 200µM of camostate mesylate. Infection was done with either virus rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} at maximal MOI 0.2 for 16hres at 37°C. Then immunofluorescence assay was performed. After fixation, viral antigens were stained in red with mAb against the S viral glycoprotein, and neurons in green with a mAb against MAP2. (E) Then, viral entry was evaluated by immunofluorescence assay and quantified with Cell profiler software. Relative infection was done on reference virus rOC/ATCC.



S1 Fig: The cleavage at S1/S2 site in S glycoprotein module viral entry by endosomal pathway. Differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was incubated before, during and after infection with different concentration of NH₄Cl (A) or Bafilomycin A1 (B). Infection were done with either rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at maximal MOI 1. Incubation were done for 16hres at 37°C with CO₂. Then, viral entry was evaluated by immunofluorescence assay and quantified with Cell profiler software. (C) Mixed primary cultures of mice brain were incubated before, during and after infection with chloroquine (0 and 5µM). Cells were infected with rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at MOI 0,03. Immunofluorescence assay were done. After fixation, viral antigens were stained in red with mAb against the S viral glycoprotein, and neurons in green with a mAb against MAP2.



S2 Fig: Camostate mesylate does not alter viral entry of rOC/ATCC and rOC/S_{G758R} mutant virus in LA-N-5 cell. (A) Differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was incubated before, during and after infection with 200 μ M of camostate mesylate. Infection was done with either rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} at maximal MOI 1. Incubation were done for 16hres at 37°C with CO₂. Then, viral entry was evaluated by immunofluorescence assay and quantified with Cell profiler software. (B) Polymerase chain reaction were done on LA-N-5 cell and on mixed primary culture of mice brains to determine the presence of TMPRSS RNA. 1: molecular weight marker, 2: human TMPRSS5 in LA-N-5, 3: human TMPRSS2 in LA-N-5, 4: murine TMPRSS5 in primary mixed cultures of mice brain, 5: murine TMPRSS2 in primary mixed culture of mice brain, 6: negative control (water).



The arginine in the S2' site in the S glycoprotein is necessary to produce infectious viral particles that will efficiently propagate in neuronal cell culture.

To complete our investigation on the role of the S2' site during HCoV-OC43 infection, we evaluated the kinetics of viral replication and spreading in LA-N-5 human cells and in mixed primary CNS cultures over a period of 72hpi (Fig. 4). Interestingly, even though, as previously shown (Le Coupanec *et al.*, 2015), the infection was productive for rOC/ATCC and rOC/S_{G758R} in the human neuronal cell line (Fig. 4A) and in primary CNS cultures (Fig. 4B), the mutant rOC/S_{R903A} was not able to produce an increasing amount of infectious viral particles in both neuronal cell cultures supernatant between 12 and 72hpi (Fig. 4A-B). Immunofluorescence assay revealed that the reference rOC/ATCC virus spread significantly better than mutant rOC/S_{G758R} virus, which in turn, presented a more efficient spreading than the rOC/S_{R903A} mutant virus (Fig. 4C-D). In addition to a potential problem during entry in neuronal cells, this last mutant virus, which harbor only the one mutation (R903A), was almost completely unable to spread compared to the other two viruses.

Figure 4: The S2' site in S glycoprotein is necessary to efficiently produce infectious viral particles and for high propagation in neuronal cell culture. The differentiated human neuroblastoma cell line (LA-N-5) was infected with rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} at MOI 0,2. Mixed primary cultures from mice brain were infected with rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} at MOI 0,03. Kinetics of infectious virus production in cell culture supernatant (free virus) of LA-N-5 cell (A) and mixed primary cultured (B) was performed. Results were significant (* P≤0.05, ** P≤0.01 and *** P≤0.01). Kinetics of viral propagation were quantified in LA-N-5 cell between 8 and 72 hpi after infection at MOI 0,2 (C). Results shown are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments. Immunofluorescence assay was also done in LA-N-5 cell. After cell fixation with PFA 4%, viral antigens were stained in green with mAb against the S viral glycoprotein. Cell were counted with Cell profiler software. Immunofluorescence picture of LA-N-5 cell are shown in (D). Kinetics of viral propagation are also shown for mixed primary cultures from mice brain at 8 and 16 hpi (E). Infection was done at MOI 0,03. After fixation, viral antigens were stained in red with mAb against the S viral glycoprotein, and neurons in green with a mAb against microtubuleassociated protein 2 (MAP2).



Viral propagation in brain is delayed for mutant rOC/S_{R903A} virus compared to rOC/S_{G758R} and reference wt virus.

Having previously shown that S cleavage at the S1/S2 site had an impact on viral spreading into neuronal cells (Fig. 4) and within the CNS (Le Coupanec *et al.*, 2015), we wished to evaluate if the inefficient propagation in neuronal cells observed for rOC/S_{R903A} (S2' mutant) virus could also be observed in mice CNS. After IC injection in C57BL/6 mice, spreading of the mutant rOC/S_{R903A} virus was abrogated compared to rOC/ATCC as well as rOC/S_{G758R}. Indeed, histological examination of infected brains revealed that, even though the infected regions were similar for all 3 viruses, the kinetics of the process were very

different (Fig. 5A-B-C). Indeed, whereas rOC/ATCC can already spread in almost all regions of the brain at 7dpi (Fig. 5A, left panel), and is able to reach the spinal cord by travelling through the brainstem (Fig 5A, right panel), mutant virus rOC/S_{G758R} and rOC/S_{R903A} were both less efficient in their spreading within different regions of the brain (Fig. 5B and 5C, left panel) as less viral antigens were detected at 7dpi, especially in the brainstem where only scares cells appeared infected.

Figure 5: rOC/S_{R903A} mutant virus have difficulty to spread in the CNS compared to rOC/ATCC and rOC/S_{G758R} after intracerebral inoculation. 22 days-old C57BL/6 mice received $10^{1.5}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} or PBS by the IC route. (A) Histological examination of virus spread within the brain of 22-days old C57BL/6 mice infected with $10^{1.5}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC, (B) rOC/S_{G758R} or (C) rOC/S_{R903A} by the IC route. Detection of viral antigens in whole brain (left picture) or in the brainstem (right picture) of infected mice at 7 dpi. White arrows represent infected cells that were stained in green with mAb against the S viral glycoprotein. Magnification 10X. (1) is olfactory bulb, (2) pyriform cortex, (3) lateral ventricle, (4) hippocampus, and (5) brainstem.



Reduced infectious virus production in CNS is associated with a delayed presence in the spinal cord for S protein cleavage site mutants.

Given our observations on *in vivo* neuropropagation, we wished to evaluate whether this correlated with a difference in viral replication in the CNS. Brains and spinal cords were harvested and infectious virus production was assayed every 2 days for a period of 21 days. A very important reduction in the amount of infectious viral particles in the brain was observed for the mutant rOC/S_{R903A} (Fig. 6A) and there was a drastic difference in the production of infectious virus between both mutants compared to the rOC/ATCC virus in the spinal cord). As previously shown, infectious virus titers of rOC/ATCC were almost identical to what was detected in the brain whereas the less virulent mutant rOC/S_{G758R} (Le Coupanec *et al.*, 2015) and the avirulent rOC/S_{R903A} poorly reached the spinal cord, as infectious virus was detected only in one out of thirty infected mice (Fig. 6B).

In order to determine if the mutant viruses were able to reach spinal cord even in the absence of detectable infectious virus, we wished to investigate for the presence of viral RNA, which would indicate that these mutants were able to reach this part of the CNS. Between 3 and 13 days post-infection (dpi), RNA were extracted from all spinal cord samples where no infectious viral particles have been detected. Our data revealed that viral RNA was present for all three viruses but that there was a delay for mutant viruses. Indeed, rOC/ATCC RNA was detected as early as 3 days post-infection, whereas viral RNA was first detected only at 5 and 7dpi for mutant rOC/S_{G758R} and rOC/S_{R903A} respectively (Fig. 6C) indicating an important defect in viral propagation within mice CNS that correlates with the very rare detection of infectious virus.

Figure 6: Putative S2' cleavage site is essential for efficient replication in CNS. 22 days-old C57BL/6 mice received $10^{1.5}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} or PBS by the IC route. Production of infectious viral particles was measured in brains (A) and spinal cords (B) every 2 days between 3 and 13 dpi. LOD represents the Limit of Detection of infectious viral particles. Results shown are the mean values (with standard deviations) of three independent experiments. (C) Quantity of viral M RNA of each virus measured by q-RT-PCR between 3 and 13 dpi every 2 days after intracerebral injection in C57BL/6 mice. Every symbol represents one infected mice.



HCoV-OC43 capacity to enter CSF is independent of S protein cleavage site and is not influenced by infection of ependymal cells surrounding ventricles.

As both mutant viruses were able to reach the spinal cord (viral RNA detected), despite an apparent inefficiency to do that through the brainstem and to produce detectable infectious virus, we wished to evaluate the route of spreading through cerebrospinal fluid (CSF) for fast spreading towards spinal cord as described for other neurotropic viruses (Plakhov et al., 1995, Tuomanen, 1996). Therefore, we infected 22 days-old C57BL/6 mice by IC injection with the three viruses separately and evaluated if HCoV-OC43 RNA was present in this fluid at 3 and 5dpi. Data revealed that all 3 viruses were found at equivalent levels in the CSF between 3 and 5 dpi (Fig. 7A). We also harvested brains after 3 and 5dpi for histological observation (Fig. 7 B-C-D and S3 Fig.) and observed that rOC/ATCC virus can very efficiently infect non-neuronal cells surrounding the lateral ventricles (Fig. 7B, left panel) conversely to both mutant rOC/S_{G758R} and rOC/S_{R903A} viruses, which barely infected these cells (Fig. 7B-C, left panel). Observation at higher magnification, revealed that those cells were rOC/ATCC virus-infected ependymal cells (Fig. 7B, right panel and S3 Fig.), compared to both mutants for which infection was very rarely detected (Fig. 7B-C). These results presage another route of propagation for reference virus (rOC/ATCC) within the brain, which may have to do with a change in cell tropism as both mutant viruses almost completely lost their ability to efficiently infect ependymal cells.

Figure 7: Ependymal cells were infected by reference virus, but not by both mutant rOC/S_{G758R} and rOC/S_{R903A} viruses. 22 days-old C57BL/6 mice received $10^{1.5}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} or PBS by the IC route. (A) Quantity of viral M RNA of each virus was measured by q-RT-PCR at 3 and 5 dpi in CSF of C57BL/6 mice after intracerebral injection. Every symbol represents one infected mice. (B) Histological examination of virus spread after 5 dpi of rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} (B) or rOC/S_{R903A} (B) were stained in green with mAb against the S viral glycoprotein. Left panels represent lateral ventricles and surrounding region in mice brain and right panels represent higher magnification of ependymal cells surrounding ventricles.



S3 Fig: Ependymal cells were infected by rOC/ATCC reference virus after IC injection on C57BI/6 mice. Ependymal infected cells stained in green with mAb against the S viral glycoprotein. Magnification 60X of the Fig.6A.



Reference virus rOC/ATCC is more neurovirulent compared to rOC/S $_{G758R}$ and rOC/S $_{R903A}$ mutant viruses.

Having shown that cleavage at the S1/S2 site reduces neurovirulence of HCoV-OC43 in BALB/c mice (Le Coupanec et al., 2015), possibly associated with a defect in viral propagation within the CNS, and considering that such a defect in propagation in the brain of C57BL/6 mice was observed for the rOC/S_{R903A} mutant virus compared to the reference rOC/ATCC and mutant rOC/S_{G758R} viruses (Fig. 5-7), we decided to evaluate the neurovirulent properties of rOC/S_{R903A}. Therefore, 22 days-old C57BI/6 mice were infected by intracerebral injection (IC) and evaluated for survival, neurological symptoms and weight gain as previously described for BALB/c mice (Le Coupanec et al., 2015). There was a significant difference in survival after inoculation of either virus (Fig. 8A): like the sham control, the mutant virus rOC/S_{R903A}, induced no mortality compared to the mutant rOC/S_{G758R} and rOC/ATCC virus that induced 10% and 55% of mortality respectively, over a period of 21 days. We then measured the weight of mice during infection (Fig. 8B), and observed that there was a significant delay in body weight gain for the rOC/ATCC and the mutant rOC/S_{G758R} virus compared to mutant rOC/S_{R903A} and the sham control. On the other hand, no difference in the weight variation was observed between the mutant rOC/S_{R903A} and the sham control.

Using a clinical score scale based on neurological symptoms of mice previously described (Le Coupanec *et al.*, 2015), we next studied the symptoms of mice after injection of mutant viruses compared to reference virus. Mice infected by the mutant rOC/S_{R903A} virus, or by the sham control, developed no clinical sign. Conversely, mice infected by the mutant rOC/S_{G758R} developed the 4 levels of symptoms, but less frequently (10%) compared to reference rOC/ATCC virus-infected mice, which induced encephalitis associated with the 4 different levels of clinical score more frequently (70% of infected mice) (Fig. 8C). Taken together, survival and weight curves coupled with the clinical scores indicate that the mutant virus rOC/S_{R903A} was totally avirulent compared to mutant virus rOC/S_{G758R} and reference virus after IC inoculation in 22-days old mice.

Figure 8: The rOC/S_{R903A} mutant virus is avirulent in 22 days-old C57BI/6 female mice infected by the intracerebral route. 22 days-old C57BL/6 mice received $10^{1.5}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} or PBS by the IC route. (A) Survival curves of mice in % over a 21 days period. Differences between the three virus variants was significant compared to sham control (* P≤0.05, **P≤0.01, *** P≤0.001). (B) C57BI/6 mice were weighed every 2 days over a 21 days period to estimate weight variations, which were expressed in %, compared to day 0 (100%). Differences were significant when the three conditions (rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} or rOC/S_{GR903A}) were compared between 7 and 17 dpi to sham control. Evaluation of the clinical scores (percentage of mice at each level of the scale) of mice infected by rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} or rOC/S_{G758R} or rOC/S_{GR903A} (C) based on neurological symptoms described in clinical score scale between level 0 and 4 (see Materials and Methods section).



Mutation at putative S protein cleavage sites reduces infection and early propagation among olfactory sensory neurons.

Having shown that S2' mutant was totally avirulent and presented a decreased viral infectious particle production and neuropropagation in the CNS, we also wished to know if its neuroinvasive properties (defined as the capacity to reach the CNS after infecting the periphery) were attenuated. We previously reported that cleavage of the HCoV-OC43 S protein at S1/S2 site by host-cell proteases was not crucial for neuroinvasion, but was an important determinant of virus spreading in CNS. Therefore, 10 days-old C57Bl/6 mice were inoculated by the intranasal (IN) route and at 5dpi, brains were harvested and viral RNA quantified by RT-qPCR to compare the level of neuroinvasion between reference virus and both single mutant viruses (Fig. 9A). Viral RNA was detected in the brain of all infected mice, suggesting that neuroinvasion per se was not altered for both mutant viruses, however, the copy number of rOC/S_{R903A} virus RNA being significantly reduced may underline a defect in early propagation by the olfactory route towards the CNS.

In order to evaluate if these differences in viral RNA content could result in a difference in cell type infection on the olfactory epithelium, we performed immunofluorescence assay at 3 dpi on mice decalcified whole heads after IN inoculation by the three viruses as described in Materials and methods. Our data correlated with the amount of viral RNA found in the mice brains for all 3 viruses. Indeed, rOC/ATCC (Fig. 9B, left panel) was able to efficiently invade and spread in the CNS after IN injection and, conversely, both mutants (Fig. 9C-D, left panel), and particularly rOC/S_{R903A} mutant, presented a defect in their infection capacities compared to reference virus. These data could suggest a modulation of the neuroinvasion properties, especially for the mutant rOC/S_{R903A}. On the other hand, observations at higher magnifications revealed that all viruses were able to invade CNS by olfactory nerve after infection of olfactory sensory neurons (OSN) (Fig. 9; right panel top and bottom) and therefore that they retain their neuroinvasive capacity. Reference virus rOC/ATCC was clearly the most efficient virus to infect and spread among OSN in the olfactory epithelium (Fig. 9B, right panel top and bottom, that are higher magnification of left panel), followed by rOC/S_{G758R} and rOC/S_{R903A} mutants respectively (Fig. 9C-D, right panel top and bottom, that are higher magnification of left panel). Whereas these data could presage a relative defect in neuroinvasion for mutants particularly important for rOC/S_{R903A}, the observation that less OSN are infected may rather reveal a decreased capacity to propagate between the OSN in the nasal cavity, similar to the delay observed in neuronal cell cultures and within the CNS (Fig. 4-5). The decrease in viral antigens in the olfactory bulb for both mutant viruses could also result in a defect of viral replication and spreading into the CNS, as we have already demonstrated in figure 5 and 6. Together, these data clearly indicate that S1/S2 and mostly S2' sites in the S protein are important during HCoV-OC43 infection of the CNS, going from optimal neuroinvasion associated with the olfactory route and even more for downstream propagation.

Figure 9: rOC/S_{R903A} mutant viruses is less neuroinvasive compared to rOC/ATCC and rOC/S_{G758R} viruses in C57BI/6 mice after intranasal (IN) injection. 10-days old C57BL/6 mice received $10^{3.5}$ TCID₅₀/10µL of rOC/ATCC or rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} or PBS by the IN route. 5 dpi, brains were harvested and viral RNA were extracted. (A) quantification of viral M RNA of either virus was performed by q-RT-PCR. Every symbol represents one mouse. Differences were significant (**P≤0.01, *** P≤0.001). Histological examination of virus spread within the brain after IN injection in C57BL/6 mice of rOC/ATCC (B), rOC/S_{G758R} (C) or rOC/S_{R903A} (D). Detection of viral antigens in whole brain stained in green with mAb against the S viral glycoprotein are presented in left panel. Pictures in right top panel represent olfactory epithelium, and in right bottom represent higher magnification of olfactory sensorial infected neurons. Magnification 10X for left picture and 20X for right picture. (1) is nasal cavity, (2) olfactory bulb, (3) pyriform cortex, (4) hippocampus, and (5) brainstem.



Discussion

The human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) is an opportunistic pathogen, with neuroinvasive and neurotropic properties, which raises interest in studying the potential relationship between HCoV-OC43 and neurological disease (Jacomy *et al.*, 2006, Jacomy *et al.*, 2003, Le Coupanec *et al.*, 2015).

Proteolytic activation unlocks the fusogenic potential of viral envelope glycoproteins like coronaviruses S glycoprotein and is often a critical step in the entry of enveloped viruses, and modulation of this process can have a profound effect on cell tropism, host range, and pathogenicity. Having previously shown that HCoV-OC43 S protein cleavage was involved in CNS infection, we herein describe a novel feature of HCoV-OC43 S protein, which better characterize the importance of its cleavage and suggests that a protease-associated cleavable site, S2', located just upstream of the fusion peptide, could be proteolytically processed in the endosomes or at the cell surface. Making use of our cDNA infectious clone, we show that this S2' site is important for optimal infection, going from entry to propagation between CNS cells.

Proteolytic cleavage of coronaviruses S proteins was characterized several years ago for the murine coronavirus (Sturman et al., 1985). Several reports have now implicated cathepsins, (Belouzard et al., 2009, Gierer et al., 2013, I. C. Huang et al., 2006a, Kawase et al., 2012, Qian et al., 2013, Qiu et al., 2006, Regan et al., 2008, Simmons et al., 2011, Simmons et al., 2005), proprotein convertases such as furin (Burkard et al., 2014, Yamada et al., 2009a) and TMPRSS2 (Bertram et al., 2013, Gierer et al., 2013, Glowacka et al., 2011, Kawase et al., 2012, Matsuyama et al., 2010, Shulla et al., 2011) as host cell proteases that can cleave and activate the S protein during coronavirus infection (de Haan et al., 2004, Leparc-Goffart et al., 1997, Regan et al., 2008, Simmons et al., 2011) at early (entry) and late stages during transport of the newly assembled virions through the secretory pathway of the producer cell (de Haan et al., 2004, Luytjes et al., 1987, Millet et al., 2014a, Thomas, 2002) and even in cell-cell transmission (Bertram et al., 2013, Gierer et al., 2013, Glowacka et al., 2011, Shirato et al., 2013) and potentially in modulation of viral tropism (Glowacka et al., 2011). We previously partially characterized the cleavage at the S1/S2 site of HCoV-OC43 S glycoprotein (Le Coupanec et al., 2015) and we now bring new insights on the involvement of the putative S2' site. As previously shown (Le Coupanec et al., 2015), and as observed in figure 2A and B, faint intermediate size fragments potentially corresponding to cleavage at the S2'site are migrating between the uncleaved and furin-like cleaved forms (S1/S2) of the S protein for rOC/ATCC and rOC/S_{G758R}. No data are presented for the rOC/S_{R903A} virus as infection of neuronal cells (Fig. 4) produced very few viral proteins and particles and consequently, S protein was undetectable for this virus. Moreover, as stated by

Millet and Whittaker (Millet *et al.*, 2015), accumulating evidence indicates that cleavage at S2' mostly happens during viral entry and is probably transient in nature, making the phenomenon difficult to observe.

Coronaviruses use diverse proteases for entry, including acid-dependent endosomal/lysosomal proteases, such as cathepsins to enter cells via the late endosome (Belouzard et al., 2009, Gierer et al., 2013, I. C. Huang et al., 2006a, Kawase et al., 2012, Qian et al., 2013, Qiu et al., 2006, Regan et al., 2008, Simmons et al., 2011, Simmons et al., 2005), furin, to enter via the early endosome (Burkard et al., 2014, Yamada et al., 2009a), and TMPRSS2, to enter presumably at or near the cell surface (Bertram et al., 2013, Gierer et al., 2013, Glowacka et al., 2011, Kawase et al., 2012, Matsuyama et al., 2010, Shulla et al., 2011). The S2' putative cleavage site of the OC43 S protein could be used by these types of cell proteases, as shown for other coronaviruses (Belouzard et al., 2012, Heald-Sargent et al., 2012, Millet et al., 2014b, Seidah et al., 2012) to produce a fragment of such molecular weight. In silico studies using synthetic peptides confirmed previous results related to cleavage by furin-like proteases ((Le Coupanec et al., 2015); Fig 2) and revealed the cleavage capacity of cathepsin B and L. Interestingly, cathepsin B was able to cleave all peptides except peptide 322 (containing the RRSRR site), and cathepsin L cleaved less efficiently the KASSAS peptide (corresponding to the inactivated putative S2' site) compared to the reference sequence peptide (KASSRS), suggesting that this latter protease is principally used in endosomal pathway by HCoV-OC43 and that the mutated S2' site becomes a sub-optimal cleavage site for this latter endosomal protease. This may explain the delay observed in cell entry for the rOC/S_{R903A} virus despite the absence of difference in infectivity on viral stocks (Fig. 1E-F). These data are in correlation with what was observed for other coronaviruses like SARS-CoV (Simmons et al., 2005), MHV (Qiu et al., 2006) and MERS-CoV (Gierer et al., 2013), for which cathepsins allowed efficient cleavage and activation of S glycoprotein in the endosomal pathway. Moreover, the observation that wild type (reference virus) S2' site is critical for fast and optimal entry in neuronal cells for HCoV-OC43 (Fig. 1) is reminiscent of data on MERS-CoV, for which a circulating variant harboring a mutation at the critical P1' cleavage position in the S2' site decreases spike-mediated fusion and viral entry in cell (Millet et al., 2016). Mutant rOC/S_{G758R} is the less affected by cathepsin inhibitors compared to other viruses, probably because rOC/S_{G758R} is already cleaved at S1/S2, as it was demonstrated during infection by the murine coronavirus, for which a cathepsin-related cleavage of the S protein was important for the strain MHV-2 but not for strain A59 (Qiu et al., 2006), the latter being cleaved at S1/S2.

TMPRSS are also implicated in viral entry for many coronaviruses. It appears to promote infection by MERS-CoV (Gierer *et al.*, 2013, Shirato *et al.*, 2013), the human respiratory coronavirus NL63 (Kawase *et al.*, 2012), and clinical isolates of the human

respiratory coronavirus 229E (Bertram *et al.*, 2013). Members of the TMPRSS that have been associated to cleavage of coronavirus S protein are not expressed in LA-N-5 cells and therefore chemical inhibition of TMPRSS has no effect during infection of these human neuronal cells. On the other hand, and as seen in figure 3, inhibitor of TMPRSS in murine CNS primary cells significantly decreases infection by reference virus and mutant rOC/S_{R903A} virus, more than rOC/S_{G758R} mutant virus, suggesting that HCoV-OC43 S protein may also be activated by TMPRSS. However, cleavage by furin-like proteases at the optimal S1/S2 site in the S protein of rOC/S_{G758R} mutant virus (Fig. 2) (Le Coupanec *et al.*, 2015) possibly modifies the 3D structure of the glycoprotein and could render the S2' site poorly accessible to TMPRSS due to first cleavage at S1/S2, or modifies the virus-cell interaction in a way that these proteases become less efficient in cleaving the rOC/S_{G758R} virus S protein before viral entry in the cells.

Even though mutant viruses (particularly rOC/_{R903A}), appear to enter less efficiently than the other variant (especially reference virus), it cannot totally explain the major difference in propagation observed in figure 4, which clearly show that mutant rOC/S_{R903A} has an extremely limited replication and propagation compared to the other two viruses, underlining that optimal cleavage at the S2' site is necessary for efficient viral spreading. These results are in agreement with data on porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV) and SARS-CoV for which introduction of a furin-like cleavage site in S2' sequence positively impact viral replication in cell culture (Belouzard *et al.*, 2009, Wentao Li, 2005). Although mutant rOC/S_{G758R} have a small delay in its spreading as we previously reported (Le Coupanec *et al.*, 2015), the S2' site of S glycoprotein is much more important for efficient spreading in cell culture and in mice. In addition to their possible role in viral entry, TMPRSS have been shown to be involved in later stage of infection and virus release for other coronaviruses (Millet *et al.*, 2015, Shen *et al.*, 2017, Shirato *et al.*, 2011). Altogether, these observations suggest that the S2' spike cleavage is an absolute prerequisite for efficient cell propagation.

All three viruses reached the CNS after infecting olfactory sensitive neurons (OSN) and travelling through the olfactory nerve as seen in figure 9, indicating that the presence of optimally cleavable S1/S2 or S2' site does not change cellular tropism in the first step of neuroinvasion even though it was suggested that MERS-CoV was able to infect different respiratory cells expressing diverse proteases that would activate the S protein at the S2' site (Millet *et al.*, 2014a). On the other hand, the decreased efficiency of OSN infection may indicate a problem with viral entry and/or with neuropropagation between susceptible cells for mutant viruses.

It is highly interesting to note that a difference in virulence was suggested for FIPV (Beth N. Licitra, 2016) in association with cleavage at S2' but not at S1/S2 site. However, for the murine (MHV) and the bovine coronavirus (BCoV), no clear association was established between S cleavage and virulence (Hingley *et al.*, 2002, X. M. Zhang *et al.*, 1991). The sub-optimal S2' cleavage site (KASSAS) renders HCoV-OC43 totally avirulent and rOC/S_{R903A} is associated with an important defect in replication in both brain and spinal cord (Fig. 5-6 and 8). This phenomenon may partially explain the complete lack of neurovirulence (absence of any neurological symptoms and mortality) of mutant rOC/S_{R903A} and a less frequent spread to the spinal cord, as previously suggested for other S protein mutants of HCoV-OC43 (Le Coupanec *et al.*, 2015) and for the murine coronavirus, MHV (Phillips *et al.*, 1999).

Although both mutant viruses were delayed in their spreading towards the spinal cord, they were able to reach this organ as revealed by the presence of viral RNA after infection at level comparable to the reference virus (Fig. 6). As all 3 viruses were also detected at equivalent level in CSF, the difference in spreading through neuronal cells in the brainstem probably explain the differential capacity to reach the spinal cord and produce high levels of infectious virus associated with neurovirulence. The presence of viruses in the CSF is a typical feature of a CNS infection and has been suggested as a potential route of dissemination towards spinal cord for other viruses including Sendai virus, lymphocytic choriomeningitis virus and Vesicular stomatitis virus (Plakhov et al., 1995, Tuomanen, 1996). The presence of all 3 HCoV-OC43 variant RNA in the CSF may implicate spreading from the brain to the spinal cord, however, as there is no difference in the relative amount of RNA, this pathway probably does not account for the differential capacities of propagation towards spinal cord. The Glymphatic system, a clearance system that utilizes a unique system of perivascular channels, formed by astroglial cells, to make the bridge between CSF and interstitial fluid in the brain and promote efficient elimination of soluble proteins and metabolites from the central nervous system (Jessen et al., 2015), was proposed to participate in neuropropagation for viruses like chikungunya virus (Couderc et al., 2008) and SARS-CoV (Netland et al., 2008) and may account for the presence of the 3 viruses in CSF in our study. The capacity of viruses to infect ependymal cells surrounding the ventricles was suggested to help dissemination towards the spinal cord through CSF (Plakhov et al., 1995, Tuomanen, 1996). However, as reference virus rOC/ATCC is the only HCoV-OC43 variant able to efficiently infect ependymocytes (Fig. 7), our data underline that this infection does not appear to impact such a path of dissemination. On the other hand, as both mutant viruses almost completely lost their ability to efficiently infect ependymal cells, these results presage that differential cleavage of the S protein may influence HCoV-OC43 tropism and may partially help explain why the reference virus is spreading faster in the whole CNS.

Taken together, the results of the current study suggest for the first time that, to be able to optimally infect neuronal cells and propagate, HCoV-OC43 needs to limit the cleavage of its S protein at the S1/S2 site while making sure to have its S protein optimally cleaved at S2'. The difference in viral spread and production of new infectious particles within CNS and in neuronal cell cultures for the virus harboring the R903A mutation, strongly suggests that the S2' site of HCoV-OC43 S protein plays a major role at different steps, including the viral entry and even more in the production of infectious viral particles and egress, all of which may influence the mode of viral transmission between CNS cells.

The observation that HCoVs are naturally neuroinvasive and neurotropic in both mice and humans (Arbour *et al.*, 2000, St-Jean *et al.*, 2004, Yeh *et al.*, 2004) underlines the need to further characterize viral and cellular determinants of these "neuroproperties". Understanding mechanisms of CNS infection, from viral entry in neuronal cell to propagation to neighboring neurons, is essential to better design therapeutic strategies. Our data point towards the importance of a differential cleavage of the S protein by diverse cellular proteases. Allowing or even enhancing cleavage at S1/S2 and inhibiting (or at least decreasing) it at S2 ', appear to represent such an interesting therapeutic target to minimize and even prevent neuroinvasion by limiting viral dissemination between OSN and eventual propagation among neural cells within the CNS. A better understanding of virus interactions with this complex system will at the same time help design therapeutic strategies, including modulation of proteases such as cathepsins, proprotein convertases (such as furin), and TMPRSS that all act on the S protein of coronaviruses.

Materials and Methods

Ethics statement.

All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Ethics Committee (IACUC) of the *Institut national de la recherche scientifique* (INRS) and conform to the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Animal care and used protocols numbers 1304-02 and 1604-02 were issued by the IACUC of INRS for the animal experiments described herein.

Viruses and cell lines.

The wild-type reference virus HCoV-OC43 (VR-759) was obtained in the 1980s from the American Type Culture Collection (ATCC). The recombinant HCoV-OC43 virus (rOC/ATCC) was generated using the full-length cDNA clone pBAC-OC43^{FL} and displayed

the same phenotypic properties as the wild-type virus, as previously described (St-Jean *et al.*, 2006a). The recombinant virus rOC/S_{G758R} harbors a mutation in the gene coding for the spike glycoprotein of HCoV-OC43 at nucleotide 2272, corresponding to an amino acid change at position 758 (described elsewhere; (Le Coupanec *et al.*, 2015)). Both molecular clones pBAC-OC/S_{R903A} (single mutation R903A; mutated at nucleotides 2707-2708) and pBAC-OC/S_{G758R-R903A} (double mutant G758R and R903A; mutated at nucleotides 2272 and 2707-2708) has been created using a recombineering approach with the "en passant" mutagenesis system described elsewhere (Tischer *et al.*, 2010).

Each cDNA infectious clone was transfected in BHK-21 cells (ATCC CCL-10), amplified by two passages in the HRT-18 cell line, and sequenced to make sure that only the introduced G758R or R903A mutation was present and that no other mutations appeared. The HRT-18 cell line (a gift from the late David Brian, University of Tennessee) was cultured in minimal essential medium alpha (MEM-alpha; Life Technologies) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; PAA GE Healthcare) and was used to produce viral stocks. The LA-N-5 cell line (a kind gift of Stephan Ladisch, George Washington University School of Medicine) was cultured in RPMI medium supplemented with 15% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 100 µM non-essential amino acids (Gibco- Invitrogen). LA-N-5 cells were differentiated into human neurons as previously described (Hill et al., 1998). Briefly, 1.25x10⁴ LA-N-5 cells were seeded in RPMI supplemented with 20% (vol/vol) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 100 µM non-essential amino acids on 24-wells glass coverslips previously coated with gelatine 0.1% during 2 hours. The next day and every 2 days for 8 days, the medium was replaced with fresh RPMI supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 100 µM non-essential amino acids, 50 µg/ml gentamycin (Wisent) and 10 µM all-trans retinoic acid (Sigma-Aldrich).

Inhibitors

The following inhibitors were used in this study: Ammonium chloride (NH4Cl), Chloroquine phosphate (N4-(7-Chloro-4-quinolinyl)-N1,N1-dimethyl-1,4-pentanediamine diphosphate salt) sigma 50-63-5, Bafilomycin A1 from *Streptomyces griseus* (sigma catalog no. B1793), MDL 28170 (EnzoBML-PI130), Z-FA-FMK (RD System FMKC01), camostat mesylate (catalog no. 3193; Tocris Bioscience). The inhibitors were used at the concentrations indicated in the appropriate figure legends.

208

pH assay

Before infection, differentiated LA-N-5 cells in 24-well plates were pretreated with NH4Cl, Chloroquine phosphate or Bafilomycin A1 at different concentrations indicated in figure legends for 1 h at 37°C. The RPMI medium was removed and cells were infected at a defined multiplicity of infection (MOI) of 0.2, with reference and mutant viruses and incubated for 2 h at 37°C with inhibitors. Then, virus inoculums were removed and fresh RPMI medium with inhibitors were added. At 16 hpi, cells were fixed 15 min in 4% PFA. Immunofluorescence assay and cell count with the Cell Profiler software were performed as described below (www.cellprofiler.org/).

Protease inhibitor assay

Before infection, differentiated LA-N-5 cells in 24-well plates were pretreated with MDL 28170, ZFA-fmk and camostat mesylate at different concentrations (indicated in figure legends) for 1 h at 37°C. The RPMI medium was removed and cells were infected at a defined multiplicity of infection (MOI) of 0.2, with reference and mutant viruses and incubated for 2 h at 37°C with inhibitors. Then, virus inoculums were removed and fresh RMPI medium with chloroquine at 200nm were added. At 16 hpi, cells were fixed 15 min in 4% PFA. Immunofluorescence assay and cell count with the Cell Profiler software were performed as described below. For the Mixed primary cultures of mouse CNS, after their differentiation in 12-well plates, they were pretreated with camostate mesylate at different concentrations (indicated in supp figure legends) for 1 h at 37°C. The neurobasal medium was removed and cells were infected at a defined multiplicity of infection (MOI) of 0.03, with reference and mutant viruses and incubated for 2 h at 37°C with inhibitors. The next step was identical to LA-N-5 cells.

Kinetic of HCoV-OC43 internalization assay

To test virus internalization by the cells, differentiated LA-N-5 cells in 24-well plates were incubated 2 min with fresh cold medium RPMI. Then, medium has removed and viruses were incubated 1h on ice for virus binding. Ice-cold PBS was added to completely remove unbound viruses, and then we added fresh cold RPMI. Cell were then shifted to 37°C to allow internalization. After the cells were incubated for the indicated time spans, they were treated with chloroquine phosphate at 200nM in order to prevent re-infection. At 16hres post infection, cells were fixed with PFA 4% and immunofluorescence assay (described below) was performed.

Mixed primary cultures of mouse CNS cells.

Embryos at 15 days of gestation were removed from pregnant anesthetized CD1 mice. The cortex and hippocampus of the embryonic pup brains (obtained from pregnant female; Charles River Canada) were harvested and placed in Hanks balanced salt solution (HBSS) medium, without Ca²⁺ and Mg²⁺, supplemented with 1.0 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES buffer. The tissues were incubated in 5 ml of HBSS+trypsin-EDTA 0.5% (ratio 10:1 respectively) for 15 min at 37°C with gentle tilting to mix. After digestion, the tissues were washed 5 minutes three times with HBSS, and the medium was removed and replaced by fresh HBSS medium (without Ca²⁺ and Mg²⁺, supplemented with 1.0 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES buffer). Tissues were gently pipetted up and down with a Pasteur pipette to dissociate the cells. After a decantation step of 5 min at room temperature, supernatants were transferred in a 50 ml tube with 36 mL of neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 0.5 mM GlutaMAX-I (Life Technologies), 10 mM HEPES buffer, B27 supplement (Life Technologies), gentamycin and 10% (vol/vol) of Horse serum (Life Technologies). This step was performed twice to increase the final amount of cells. Cells were then seeded at 1x10⁵ cells/cm² and grown on poly-D-lysine (50 µg/mL)-treated glass coverslips in the same medium, which was replaced by fresh neurobasal medium without horse medium the next day. The medium was changed every 2 days after and the cultures were ready for infection after 7 days in culture.

Infection of human cell lines and primary mouse CNS cultures.

The LA-N-5 cells and primary mouse neuronal cell cultures (PMNCs) were infected with the indicated recombinant HCoV-OC43 virus at the indicated multiplicity of infection (MOI) for 2h in neurobasal medium with B27-GlutaMAX-I (PMNCs) or RPMI supplemented with 1% (vol/vol) FBS (LA-N-5 cells). The inoculum was then discarded and replaced for fresh neurobasal medium with B27-GlutaMAX-I (PMNCs) or fresh RPMI medium supplemented with 2.5% (vol/vol) FBS (LA-N-5 cells) and incubated for different periods time, as indicated. During infection and further incubation, LA-N-5 and PMNSs were kept at 37°C.

Mice, survival curves, body weight variations and evaluation of clinical scores.

Female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories) aged 22 days post-natal (dpn) or 10 dpn were inoculated respectively by the IC route with $10^{1.5}$ or the intranasal route with $10^{3.5}$ of 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) recombinant virus, as previously described (Jacomy *et al.*, 2010). Groups of 10 mice infected by each recombinant virus were

observed on a daily basis over a period of 21 dpi, and survival and weight variations were evaluated. Clinical scores were evaluated using a scale with 5 distinctive levels (0 to 4); where 0 was equivalent to the asymptomatic mouse; 1 for mice with early hunched back; 2 for mice presenting slight social isolation, weight loss, and abnormal gait ; 3 for mice presenting total social isolation, ruffled fur, hunched back, weight loss and almost no movement; and number 4 was attributed to mice that were in moribund state or dead (Le Coupanec *et al.*, 2015).

Viral RNA extraction from mouse tissue

Brain and spinal cord of mice were collected. CSL mouse fluid were collected as previously described (L. Liu *et al.*, 2008). Viral RNA was then extracted as described below, and quantification by Taqman q-RT-PCR were performed as described below.

Evaluation of neuroinvasiveness

10-days-old mice were subjected to intranasal (injection of 5 µl in each nostril) inoculation of rOC/ATCC, rOC/S_{G758R} or rOC/S_{R903A} using 10^{5.5}TCID₅₀ (50% tissue culture infective doses) per mL. Sham-infected mice received PBS. Infected brains were harvested 5 days later from peritoneally anesthetized mice (ketamine at 200 mg/kg and xylamine at 10 mg/kg) and frozen at -80°C. Whole brain tissue was shredded/lysed by extensive agitation in 1 ml QIAzol-lysis reagent (Qiagen) supplemented with shredding beads. Total brain RNA was extracted by a QIAzol/chloroform/propanol manufacturer's procedure, dosed using a ND1000 spectrophotometer (Nanodrop) and frozen at -80°C. Virus RNA copy number were quantified in triplicate by real-time RT-PCR using the TaqMan RNA-toC[™] 1-Step Kit (Applied Biosystems/Life Technologies) in a 20 µl reaction mixture with 10 µl 2x TaqMan RT-PCR Mix (containing ROX as a passive reference dye), 900 nM forward and reverse primers targeting a 68 bp region of HCoV-OC43 M gene (forward primer OC43-FP 5'-ATGTTAGGCCGATAATTGAGGACTAT-3', nt 433 to 458; and reverse primer OC43-RP (5'-AATGTAAAGATGGCCGCGTATT-3', nt 479 to 500), 200 nM FAM BHQ1-TP probe (OC43-TP (FAM-5'-CATACTCTGACGGTCACAAT-3', nt 459 to 478), 0.5 µl 40x TaqMan RT Enzyme Mix and 800 ng extracted brain RNA. Serially diluted cRNA standards were used for the generation of a standard curve. Amplification and detection were performed in a StepOnePlus Realtime PCR system apparatus and analyzed with StepOne software version 2.3 (Applied Biosystems). The limit of detection was defined as the average signal obtained in corresponding negative controls for each organ.

Evaluation of infectious virus production.

Mouse brain and spinal cord tissues or cell culture supernatants were processed for the presence and quantification of infectious virus by an indirect immunoperoxidase assay (IPA) on HRT-18 cells, as previously described (Lambert *et al.*, 2008). Briefly, HRT-18 cells were incubated with the mouse primary antibody 4.3E4 (dilution 1/50) that detects the S protein of HCoV-OC43. After three PBS washes, cells were incubated with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin antibody diluted 1/500 (Kirkegaard & Perry Laboratories). Finally, immune complexes were detected by incubation with 0.025% (wt/vol) 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) and 0.01% (vol/vol) hydrogen peroxide in PBS 1X, and infectious virus titers were calculated by the Karber method, as previously described (Lambert *et al.*, 2008).

Immunofluorescence.

Confocal immunofluorescence was performed either after intracerebral infection of 22-days-old mice, for which perfusion with 4% (wt/vol) PFA was performed on infected C57BL/6 mice for each recombinant virus, every 2 days, between 3 and 7 days post-infection or after intranasal infection on 10 days-old mice, for which perfusion was performed every day for 5 days. For intracerebral infection, brain sections were sagitally sliced in 60 µm thick sections with a cryostat (HM 525; Microm) and for intranasal infection, heads were harvested and fur, skin and lower jaw were removed. Whole heads were decalcified in 6% EDTA pH 8 at 4°C for 5 days then transferred to a 30% sucrose solution before being processed 3 days later. Serial sections were collected in PBS, treated 10 min H₂O₂ to disrupt erythrocytes, washed twice 5 min in PBS and permeabilized for 2h in PBS supplemented with 0.1% triton (vol/vol). Sections were further incubated for 1h in 0.1% triton/PBS supplemented 1% horse serum (vol/vol), then overnight at 4°C in 0.05% triton/PBS containing 1% horse serum and BCoV anti-S (1/500) (Le Coupanec et al., 2015). Sections were washed 3 times (15 minutes each) in 0.05% triton/PBS, incubated for 2h in 0.05% triton /PBS supplemented with 1% horse serum and 1/500 adequate Alexafluor 488-coupled secondary antibodies (Life Technologies). Immunostained sections were washed twice (5 minutes each) in 0.05% triton /PBS, counterstained for nuclei with 10 µg/ml DAPI (Invitrogen), then washed again 4 times (15 minutes each) in 0.05% triton /PBS. Sections were then mounted in Prolong® Diamond Antifade mounting media (Molecular Probes) on glass slide and imaged on a Zeiss LSM780 confocal microscope. All immunostaining steps were carried out at room temperature while agitating unless otherwise stipulated.

Virus propagation assay

For propagation assays, cells were always seeded on glass coverslips following above mentioned procedures (section viruses and cell lines). 2hres after infection of LA-N-5

cells (as described above), inoculums were substituted by RPMI that was supplemented with 2 mM GlutaMAX-I, 20 mM HEPES buffer, 100 μ g/ml gentamycin, 2 mM sodium pyruvate and 200 μ M (vol/vol) non-essential amino acids. FBS at 2.5% was also added for LA-N-5. Cells were incubated at 37°C for the indicated time periods after witch supernatants were discarded and cells directly fixed for 15 min in 4% PFA.

To quantify virus propagation in LA-N-5 at indicated time points, fixed cells were washed once in PBS and permeabilized in chilled 100% methanol for 5 min -20°C. Samples were rehydrated 5 min in PBS and stained 2h at 37°C using 1/2 dilution of hybridoma supernatants of 4-3E.4 anti-OC43 spike monoclonal antibodies. Cells were washed twice 5 min in PBS, then probed for 45 min at room temperature with anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary fluorescent antibodies (1/500; Life Technologies) along with 2 µg/ml Hoechst to counterstain nuclei. Following 3 PBS washes, coverslips were mounted with Immunomount (Fisher Scientific) on glass slides to analyze on our Zeiss LSM780 confocal microscope. Each sample was quantified using the cell image analysis software CellProfiler (www.cellprofiler.org/).

Synthetic peptides and in silico cleavage assay.

LC-MS/MS quantification of N-321, N-322, S2-ref and S2-mutant. The Michaelis-Menten constants (KM and Vmax) of Cathepsin B (Cat# 953-CY, R&D systems) and Cathepsin L (Cat# 952-CY, R&D systems) for their fluorogenic substrate Z-Leu-Arg-AMC (Cat# ES008, R&D systems) was determined in a 30min kinetic enzymatic assay with the recommended specifications provided by the manufacturer. Furin, kindly provided by Dr. Robert Day, Km and Vmax was previously determined (Kwiatkowska et al., 2014). Instrumentation, experimental conditions and software analysis were also previously described (Kwiatkowska et al., 2014). Each enzyme was incubated 30 min either with peptide N-321 (VDYSKN**RRSR<u>R</u>AITTGY)**, N-322 (VDYSKN**RRSR<u>G</u>AITTGY)**, S2-ref (GCLGSECSKASSRSAIEDL) or S2-mutant (GCLGSECSKASSASAIEDL), at their respective Km values determined with the fluorogenic substrate. In vitro cleavage by recombinant enzymes was performed and analyzed by LC-MS/MS as previously described (Semaan et al., 2015).

Statistical tests.

For cell experiments, statistical analyses were conducted by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test, or a t-test. For mice experiments,

213

results were compared using two non-parametric statistical tests: Kruskal-Wallis and Mann-Whitney. Survival rates were plotted as Kaplan–Meier survival curves and were compared using the log rank (Mantel–Cox) test. Statistical significance was defined as p < 0.05.

Acknowledgments

We thank Jessie Tremblay for excellent technical assistance and Mathieu Dubé for excellent advices and critical review of the manuscript.
References

- 1. Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY (2009) Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. Exp Biol Med (Maywood) 234: 1117-1127.
- 2. Talbot PJ, Jacomy H DM (2008) Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus. 313–324.
- Arabi YM, Harthi A, Hussein J, Bouchama A, Johani S, et al. (2015) Severe neurologic syndrome associated with Middle East respiratory syndrome corona virus (MERS-CoV). Infection 43: 495-501.
- 4. Forgie S, Marrie TJ (2009) Healthcare-associated atypical pneumonia. Semin Respir Crit Care Med 30: 67-85.
- 5. McGavern DB, Kang SS (2011) Illuminating viral infections in the nervous system. Nat Rev Immunol 11: 318-329.
- 6. Riski H, Hovi T (1980) Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. J Med Virol 6: 259-265.
- Yeh EA, Collins A, Cohen ME, Duffner PK, Faden H (2004) Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. Pediatrics 113: e73-76.
- 8. Desforges M, Le Coupanec A, Brison E, Meessen-Pinard M, Talbot PJ (2014) Neuroinvasive and neurotropic human respiratory coronaviruses: potential neurovirulent agents in humans. Adv Exp Med Biol 807: 75-96.
- 9. Arbour N, Cote G, Lachance C, Tardieu M, Cashman NR, et al. (1999) Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. J Virol 73: 3338-3350.
- Arbour N, Ekande S, Cote G, Lachance C, Chagnon F, et al. (1999) Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. J Virol 73: 3326-3337.
- 11. Bonavia A, Arbour N, Yong VW, Talbot PJ (1997) Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. J Virol 71: 800-806.
- 12. Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ (2000) Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. J Virol 74: 8913-8921.
- Jacomy H, St-Jean JR, Brison E, Marceau G, Desforges M, et al. (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.
- 14. Jacomy H, Talbot PJ (2003) Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. Virology 315: 20-33.
- 15. Morfopoulou S, Brown JR, Davies EG, Anderson G, Virasami A, et al. (2016) Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal Encephalitis. N Engl J Med 375: 497-498.

- 16. Masters P (2013) Coronaviridae. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), FieldsVirology, vol. 1, sixth ed. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp.825–858 (2 vols).
- 17. Vlasak R, Luytjes W, Spaan W, Palese P (1988) Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 4526-4529.
- 18. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR (2012) Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. Viruses 4: 1011-1033.
- 19. Nash TC, Buchmeier MJ (1997) Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways. Virology 233: 1-8.
- 20. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ (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.
- 21. Gallagher TM, Buchmeier MJ (2001) Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. Virology 279: 371-374.
- 22. Klenk HD, Garten W (1994) Host cell proteases controlling virus pathogenicity. Trends Microbiol 2: 39-43.
- 23. Millet JK, Whittaker GR (2014) Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. Virus Res.
- 24. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR (2009) Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 5871-5876.
- 25. Yamada Y, Liu DX (2009) Proteolytic activation of the spike protein at a novel RRRR/S motif is implicated in furin-dependent entry, syncytium formation, and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells. J Virol 83: 8744-8758.
- 26. Lai AL LY, Tamm LK (2005) in Protein–Lipid Interactions, ed Tamm LK (Wiley-VCH, Weinheim, Germany), pp 279–303.
- 27. de Haan CA, Stadler K, Godeke GJ, Bosch BJ, Rottier PJ (2004) Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. J Virol 78: 6048-6054.
- Follis KE, York J, Nunberg JH (2006) Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. Virology 350: 358-369.
- 29. Simmons G, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Chaipan C, et al. (2011) Different host cell proteases activate the SARS-coronavirus spike-protein for cell-cell and virus-cell fusion. Virology 413: 265-274.
- 30. Le Coupanec A, Desforges M, Meessen-Pinard M, Dube M, Day R, et al. (2015) Cleavage of a Neuroinvasive Human Respiratory Virus Spike Glycoprotein by Proprotein Convertases Modulates Neurovirulence and Virus Spread within the Central Nervous System. PLoS Pathog 11: e1005261.

- 31. St-Jean JR, Desforges M, Talbot PJ (2006) Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. Adv Exp Med Biol 581: 499-502.
- 32. Bergeron E, Vincent MJ, Wickham L, Hamelin J, Basak A, et al. (2005) Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Biochem Biophys Res Commun 326: 554-563.
- 33. Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, et al. (2013) The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. J Virol 87: 5502-5511.
- Millet JK, Whittaker GR (2014) Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 15214-15219.
- 35. Simmons G, Zmora P, Gierer S, Heurich A, Pohlmann S (2013) Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. Antiviral Res 100: 605-614.
- 36. Glowacka I, Bertram S, Muller MA, Allen P, Soilleux E, et al. (2011) Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. J Virol 85: 4122-4134.
- 37. Millet JK, Whittaker GR (2015) Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. Virus Res 202: 120-134.
- 38. Bertram S, Dijkman R, Habjan M, Heurich A, Gierer S, et al. (2013) TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. J Virol 87: 6150-6160.
- St-Jean JR, Desforges M, Almazan F, Jacomy H, Enjuanes L, et al. (2006) Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. J Virol 80: 3670-3674.
- 40. Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N (2010) En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. Methods Mol Biol 634: 421-430.
- Huang IC, Bosch BJ, Li F, Li W, Lee KH, et al. (2006) SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. J Biol Chem 281: 3198-3203.
- 42. Qian Z, Dominguez SR, Holmes KV (2013) Role of the spike glycoprotein of human Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in virus entry and syncytia formation. PLoS One 8: e76469.
- 43. Qiu Z, Hingley ST, Simmons G, Yu C, Das Sarma J, et al. (2006) Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. J Virol 80: 5768-5776.
- 44. Regan AD, Shraybman R, Cohen RD, Whittaker GR (2008) Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses. Vet Microbiol 132: 235-248.

- 45. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, et al. (2005) Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 11876-11881.
- 46. Shirato K, Kanou K, Kawase M, Matsuyama S (2017) Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. J Virol 91.
- 47. Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ, et al. (2004) Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4240-4245.
- 48. Plakhov IV, Arlund EE, Aoki C, Reiss CS (1995) The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. Virology 209: 257-262.
- 49. Tuomanen E (1996) Entry of pathogens into the central nervous system. FEMS Microbiol Rev 18: 289-299.
- 50. Jacomy H, Fragoso G, Almazan G, Mushynski WE, Talbot PJ (2006) Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. Virology 349: 335-346.
- 51. Sturman LS, Ricard CS, Holmes KV (1985) Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. J Virol 56: 904-911.
- 52. Kawase M, Shirato K, van der Hoek L, Taguchi F, Matsuyama S (2012) Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. J Virol 86: 6537-6545.
- 53. Burkard C, Verheije MH, Wicht O, van Kasteren SI, van Kuppeveld FJ, et al. (2014) Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysisdependent manner. PLoS Pathog 10: e1004502.
- 54. Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, et al. (2010) Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. J Virol 84: 12658-12664.
- 55. Shulla A, Heald-Sargent T, Subramanya G, Zhao J, Perlman S, et al. (2011) A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. J Virol 85: 873-882.
- 56. Leparc-Goffart I, Hingley ST, Chua MM, Jiang X, Lavi E, et al. (1997) Altered pathogenesis of a mutant of the murine coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in the spike protein. Virology 239: 1-10.
- 57. Luytjes W, Sturman LS, Bredenbeek PJ, Charite J, van der Zeijst BA, et al. (1987) Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. Virology 161: 479-487.
- 58. Thomas G (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 3: 753-766.

- 59. Shirato K, Kawase M, Matsuyama S (2013) Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. J Virol 87: 12552-12561.
- 60. Heald-Sargent T, Gallagher T (2012) Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. Viruses 4: 557-580.
- 61. Seidah NG, Prat A (2012) The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. Nat Rev Drug Discov 11: 367-383.
- 62. Millet JK, Goldstein ME, Labitt RN, Hsu HL, Daniel S, et al. (2016) A camel-derived MERS-CoV with a variant spike protein cleavage site and distinct fusion activation properties. Emerg Microbes Infect 5: e126.
- 63. Wentao Li OW, Frank J. M. van Kuppeveld, Qigai He, Peter J. M. Rottier, Berend-Jan Bosch (2005) A Single Point Mutation Creating a Furin Cleavage Site in the Spike Protein Renders Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Trypsin Independent for Cell Entry and Fusion. journal of virology.
- 64. Shirato K, Matsuyama S, Ujike M, Taguchi F (2011) Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. J Virol 85: 7872-7880.
- 65. Shen LW, Mao HJ, Wu YL, Tanaka Y, Zhang W (2017) TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections. Biochimie 142: 1-10.
- 66. Beth N. Licitra KLS, Donald W. Lee and Gary R.Whittaker (2016) Feline coronaviruses associated with feline infectious peritonitis have modifications to spike protein activation sites at two discrete positions.
- 67. Hingley ST, Leparc-Goffart I, Seo SH, Tsai JC, Weiss SR (2002) The virulence of mouse hepatitis virus strain A59 is not dependent on efficient spike protein cleavage and cell-to-cell fusion. J Neurovirol 8: 400-410.
- 68. Zhang XM, Kousoulas KG, Storz J (1991) Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses. Virology 183: 397-404.
- 69. Phillips JJ, Chua MM, Lavi E, Weiss SR (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.
- 70. Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M (2015) The Glymphatic System: A Beginner's Guide. Neurochem Res 40: 2583-2599.
- Couderc T, Chretien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, et al. (2008) A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. PLoS Pathog 4: e29.
- 72. Netland J, Meyerholz DK, 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.
- 73. St-Jean JR, Jacomy H, Desforges M, Vabret A, Freymuth F, et al. (2004) Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. J Virol 78: 8824-8834.

- 74. Hill DP, Robertson KA (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.
- 75. Liu L, Duff K (2008) A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. J Vis Exp.
- 76. Lambert F, Jacomy H, Marceau G, Talbot PJ (2008) Titration of human coronaviruses using an immunoperoxidase assay. J Vis Exp.
- 77. Kwiatkowska A, Couture F, Levesque C, Ly K, Desjardins R, et al. (2014) Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of a potent PACE4 inhibitor. J Med Chem 57: 98-109.
- Semaan W, Desbiens L, Houde M, Labonte J, Gagnon H, et al. (2015) Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1-31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase. Biochem Pharmacol 94: 91-100.

Publication n°3

Axonal Transport Enables Neuron-to-Neuron neuroinvasion and propagation of HCoV-OC43 in the CNS

Mathieu Dubé^{1a}, Alain Le Coupanec^{1a}, Alan H.M. Wong^{2,3}, James M. Rini^{2,3}, Marc

Desforges^{1*}, and Pierre J. Talbot^{1*}

¹ Laboratory of Neuroimmunovirology, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec,

Laval, Québec, Canada

² Department of Biochemistry, University of Toronto, Toronto, ON, Canada M5S 1A8

³ Departments of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON, Canada M5S 1A8

Contributions des auteurs:

- **Mathieu Dubé**: Il a conçu et réalisé la majorité des expérimentations *In Vitro* présentées dans cet article, en plus d'analyser les résultats et d'écrire l'article.

-Alain Le Coupanec: j'ai conçu et réalisé la majorité des expérimentations *In Vivo* présentées dans cet article ainsi que les cultures primaires du SNC murin, en plus d'analyser les résultats.

- **Marc Desforges**: participation à la conception des expériences, ainsi que discussions des données et correction du manuscrit.

- Pierre J Talbot: discussions des données et correction du manuscrit.

- Alan H.M Wong et James M. Rini: Aide précieuse dans la production de protéine

recombinante et la production d'anticorps spécifiques

Running head: Neuron-to-neuron propagation of HCoV-OC43

^a Contributed equally to this work

*<u>Co-Corresponding Authors :</u>

E-mail: <u>pierre.talbot@iaf.inrs.ca</u> (PJT)

E-mail:<u>marc.desforges@iaf.inrs.ca</u> (MDe)

You are being carbon copied ("cc:'d") on an e-mail "To" "Marc Desforges" marc.desforges@iaf.inrs.ca

CC:<u>mathieudubephd@gmail.com,alain.lecoupanec@iaf.inrs.ca,pierre.talbot@iaf.inr</u> <u>s.ca, alanhm.wong@mail.utoronto.ca, james.rini@utoronto.ca</u>

Dear Dr Desforges,

submission entitled "Axonal Transport Enables Neuron-to-Neuron Your neuroinvasion and propagation of HCoV-OC43 in the CNS" has been received by PLOS Pathogens. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is http://ppathogens.edmgr.com/.

We will be in touch once we have checked through your files (typically 0-2 days), in case of any modifications needed prior to editor assignment.

Please note, if you have submitted a Research Article and it is accepted, an uncorrected proof of your manuscript will be published online ahead of the final version. If, for any reason, you do not want an earlier version of your Research Article published online, please let the journal staff know immediately at <u>plospathogens@plos.org</u>. Note this will only affect Research Articles and not any other article type.

PLOS requires an ORCID iD for all corresponding authors on papers submitted after December 6th, 2016. Please ensure that you have an ORCID iD and that it is validated in Editorial Manager. To do this, go to 'Update my Information' (in the upper left-hand corner of the main menu), and click on the Fetch/Validate link next to the ORCID field. This will take you to the ORCID site and allow you to create a new iD or authenticate a pre-existing iD in Editorial Manager

PLOS is considering offering a service where we would post your manuscript to a preprint server (like arXiv or bioRxiv) while it continues on its way through our editorial process. If this service were offered today, would you participate and allow us to post your manuscript?

Yes, I would allow you to post my manuscript. http://surveys.plos.org/s3/ppathPreprintInterest?answer=YesAllow

No, I would not allow you to post my manuscript. http://surveys.plos.org/s3/ppathPreprintInterest?answer=DoNotAllow

Thank you for submitting your work.

Kind regards,

PLOS Pathogens Staff plospathogens@plos.org

Résumé

Les coronavirus humains (HCoV) sont des pathogènes respiratoires pouvant causer des pathologies aggravées chez les patients vulnérables. Les HCoV ne sont pas toujours confinés dans les voies respiratoires supérieures et peuvent envahir le SNC dans des circonstances encore peu claires. En utilisant un modèle animal de neuropathogenèse du HCoV et des cultures neuronales, nous avons obtenu des preuves soulignant un rôle important des nerfs et des bulbes olfactifs durant le processus de neuroinvasion par HCoV-OC43 pour accéder et se propager dans le SNC. La propagation de neurone à neurone a été identifiée comme un mode sous-jacent de propagation du virus. Nos données démontrent que la diffusion passive des particules virales libérées et le transport axonal sont des stratégies de propagation utilisées par le virus. Pour la première fois, nous décrivons la présence de plateformes virales le long des axones, dont le « dynamisme immobile » suggère une structure spécialisée polarisant localement la libération virale vers les neurones voisins, potentiellement pour alimenter la neuropropagation au sein du SNC. Les neuropathologies induites par le HCoV chez l'humain sont difficiles à diagnostiquer suffisamment tôt pour permettre des interventions thérapeutiques et des investigations mécanistiques. Comme nous avons cartographié le processus de neuroinvasion et de dissémination dans le SNC et révélé qu'il peut potentiellement être modulé par des protéines de HCoV-OC43 et des facteurs de l'hôtes, notre travail identifie les processus qui peuvent régir la gravité et/ou la nature de la neuropathogenèse par HCoV-OC43, ce qui pourra rendre possible le développement de stratégies thérapeutiques pour prévenir les dommages au SNC.

Abstract

Human coronaviruses (HCoV) are recognized respiratory pathogens for which accumulating evidence indicate that in vulnerable patients, infection can cause more serious pathologies. HCoV are not always confined to the upper respiratory tract and can invade the CNS upon still unclear circumstances. Making use of both our already described animal model of HCoV neuropathogenesis and neuronal cell cultures, we obtained evidence supporting a critical role of the olfactory nerves and bulbs during the neuroinvasion process taken by HCoV-OC43 to access and spread to and within the CNS, and identified neuron-toneuron propagation as one underlying mode of virus spreading. Our data demonstrate that both passive diffusion of released viral particles and axonal transport are valid propagation strategy used by the virus. We describe for the first time the presence along axons of viral platforms whose immobile dynamism suggests a specialized structure polarizing locally viral release towards neighboring neurons, thus potentially fueling neuropropagation within the CNS. HCoV-induced neuropathologies in human are difficult to diagnose early enough to allow therapeutic interventions and mechanistic investigations. As we further mapped the process of neuroinvasion and dissemination within CNS and revealed that it can potentially be modulated by selected HCoV-OC43 proteins and host factors, our work therefore identifies processes that may govern the severity and/or nature of HCoV-OC43 neuropathogenesis and will make possible the development of therapeutic strategies to prevent occurrences.

Author Summary

Coronaviruses have been shown to invade the CNS, disseminate and possibly induce or participate in the induction of neurological diseases. Their neuropathogenicity is being increasingly recognized in humans and the presence and persistence of human coronaviruses (HCoV) in human brains was proposed to cause long-term sequelae. To have a better understanding of the route of neuroinvasion and of the network of dissemination between cells within the CNS, we made use of our in vivo model of HCoV neuropathogenesis relying on natural susceptibility of mice to HCoV-OC43, and on neuronal cell cultures. We have defined the olfactory route as the most relevant path taken by HCoV-OC43 to access and spread to and within the CNS, and studied the underlying modes of intercellular propagation to better understand its neuropathogenesis. Even though both passive diffusion of released viral particles and axonal transport appear to be valid viral propagation, we hypothesize that the axonal mode of transport is the most relevant taking place in the CNS associated with neuron-to-neuron propagation. Exploiting knowledge on neuroinvasion and dissemination will enhance our ability to control viral infection of the CNS as it will shed light on underlying mechanisms of neuropathogenesis and uncover potential "druggable" molecular virus-host interfaces.

Introduction

Human coronaviruses (HCoV) are positive-stranded RNA viruses from the Coronaviridae family in the order Nidovirales that cause respiratory tract infections (PJ Talbot et al., 2008). In vulnerable patients, the infection can cause more serious pathologies such as pneumoniae, bronchiolitis and meningitis (Forgie et al., 2009, Freymuth et al., 2010, Vabret et al., 2009b). Nevertheless, the medical importance of these endemic respiratory viruses circulating worldwide was long neglected until the emergence of SARS and MERS epidemics (Drosten et al., 2003, Kuiken et al., 2003, Rota et al., 2003, Zaki et al., 2012). It is now becoming clear that these viruses are not always confined to the upper respiratory tract and can indeed invade the CNS upon still unclear circumstances (Drosten et al., 2003, Kuiken et al., 2003, Rota et al., 2003, Zaki et al., 2012). The neuroinvasive potential of coronaviruses was further documented when RNA from endemic prototype HCoV strains OC43 and 229E was detected in human brains (Arbour et al., 2000, Stewart et al., 1992). SARS-CoV particles were even found in the brain of infected patients (Gu et al., 2005b). Along with their neuroinvasive properties, the neuropathogenicity of HCoV is being increasingly recognized in humans as several recent reports associated cases of encephalitis (S. Morfopoulou et al., 2016), acute flaccid paralysis (Turgay et al., 2015) and other neurological symptoms (Algahtani et al., 2016, Arabi et al., 2015, Gu et al., 2007, Lau et al., 2004, Y. Li et al., 2016, Principi et al., 2010, Tsai et al., 2005, Yeh et al., 2004) with complications of acute HCoV infection. Recovery from acute infection seems not to guaranty complete clearance of the virus as HCoV can be detected in the brain of asymptomatic healthy patients suggesting persistence way after the onset of infection (Arbour et al., 2000, Cristallo et al., 1997, Stewart et al., 1992). This notion is indeed supported by the findings that HCoV can chronically infect mice brain (Jacomy et al., 2006, Jacomy et al., 2010) and neural cells culture (Arbour et al., 1999a, St-Jean et al., 2006b). The constant presence of the virus in the CNS and perhaps, the concomitant inflammation, were proposed to cause long-term and/or chronic sequelae related to the development or aggravation of chronic neurological diseases (Arbour et al., 2000, Cristallo et al., 1997, Fazzini et al., 1992, Johnson-Lussenburg et al., 1987, Sibley et al., 1985, Stewart et al., 1992). Giving their high prevalence (Vabret et al., 2009b), long-term persistence and their probable neuropathogenesis, the burden of HCoV-related diseases is likely currently underestimated.

HCoV-induced neuropathologies in human are difficult to diagnose early enough to allow therapeutic interventions and mechanistic investigations. To circumvent these limitations, a model of HCoV neuropathogenesis was developed by taking advantage of the natural susceptibility of mice to neuroinvasion by the widely circulating HCoV-OC43. Upon

235

infection, mice indeed developed neurological symptoms reminiscent of the afflictions reported in several human patients (S. Morfopoulou et al., 2016, Principi et al., 2010, Tsai et al., 2005, Turgay et al., 2015, Yeh et al., 2004) such as encephalitis, transient flaccid paralysis and long-term persistence in surviving mice (Brison et al., 2011, Brison et al., 2014, Do Carmo et al., 2008, Jacomy et al., 2006, Jacomy et al., 2010, Le Coupanec et al., 2015). The paths and underlying mechanisms governing the propagation of the virus from the upper respiratory tract to and within the CNS are currently incomplete, which hinders the elaboration of antiviral countermeasures adapted to this particular host compartment. By analogy to other neuroinvasive viruses, the virus is usually assumed to access to the CNS via the olfactory and/or trigeminal nerves (Barnett et al., 1993, I. Mori, 2015b, Perlman et al., 1990, Perlman et al., 1989, van Riel et al., 2015). We have gathered over the years (Jacomy et al., 2003, Le Coupanec et al., 2015, St-Jean et al., 2006b) data in line with this assumption. For instance, HCoV-OC43 appeared to infect neurons of the olfactory bulbs before propagating throughout the CNS including the brainstem and the spinal cord (Jacomy et al., 2010, Le Coupanec et al., 2015). The natures of these regions appear to be of importance for the outcome of the infection as a correlation between neurovirulence and presence of the virus in the spinal cord was previously suggested (Le Coupanec et al., 2015).

In our study, we defined the path taken by HCoV-OC43, the most prevalent HCoV (Jean et al., 2013, Lee et al., 2014), to access and spread to and within the CNS, and studied the underlying modes of intercellular propagation to better understand its neuropathogenesis in both humans and mice. We obtained evidence supporting a critical role of the olfactory nerve during the neuroinvasion process as chemically-induced degeneration of the olfactory sensory neurons by zinc sulfate (ZnSO4) (Charles et al., 1995, Rochel et al., 1980) abrogated HCoV-OC43 neuroinvasion. The chronology of HCoV-OC43 neuropropagation confirmed that the colonization of the brain initiates in the olfactory bulbs before spreading to the highly susceptible regions such as the hippocampus, the piriform cortex and other regions associated with olfaction, then globally through the CNS. Confocal microscopy revealed virus material along axons both in brain sections and neuronal cell cultures. We demonstrate that axonal transport is a valid propagation strategy that the virus may use to facilitate locally the infection of neuronal cells. This mode of neuron-to-neuron propagation shared mechanistic properties with the passive diffusion of released particles, although several dissimilarities were also noted. We describe for the first time the presence along axons of viral platforms whose immobile dynamism suggests a specialized structure polarizing locally viral release towards neighboring neurons, thus potentially fueling

236

neuropropagation within the CNS. Our work therefore identifies processes that may govern the severity and/or nature of HCoV-OC43 neuropathogenesis.

Results

HCoV-OC43 exploits a direct route of neuroinvasion.

Intranasal inoculation of HCoV-OC43 has successfully been used in mice to mimic infection of humans by aerosol droplets (Jacomy *et al.*, 2003, Le Coupanec *et al.*, 2015, St-Jean *et al.*, 2004). We hypothesized three non-mutually exclusive routes of neuroinvasion based on previous reports on other neuroinvasive viruses: the olfactory nerve, the subepithelial nerves surrounding the upper respiratory tract or through the bloodstream. To deduce validity in the context of HCoV-OC43 infection, mice were divided in three groups and subjected to different types of inoculation all using the same neuroinvasion-compatible dose of $10^{4.25}$ TCID₅₀/10µl HCoV-OC43 (as defined by the control intranasal inoculation, see below). Fifteen days-old C57BL/6 mice were used for this experiment because they represented the perfect compromise between susceptibility to neuroinvasion (table 1; (Jacomy *et al.*, 2003)) and the necessity to minimize the swelling of the tongue caused by the volume of the inoculum during intralingual injection.

8/12	66%
8/12	66%
2/12	17%
1/12	8%
	8/12 8/12 2/12 1/12

Table 1. Efficiency of neuroinvasion in C57BL/6 mice at different ages

In the first group, intracerebral injection inferred the theoretical maximum to be expected. In the second, intranasal inoculation referred to more realistic levels expected upon a more natural delivery. To facilitate the contact of the virus with subepithelial nerves, the epithelial barrier was bypassed in the third group by injecting directly in the tongue of the mice. Five days post-inoculation, brains were harvested, total RNA extracted and virus RNA copy number/gram of tissue determined by quantitative real-time RT-PCR using the gene encoding for the membrane (M) protein as a target. Upon intranasal inoculation, 68% of the mice CNS tested were found positive for HCoV-OC43 (Figure 1A). Expectedly, the range of the absolute virus RNA copy varied greatly from barely higher than the background (here determined by real-time RT-PCR from sham-infected naive brains) to very high levels reminiscent of those observed upon intracerebral injection. Subepithelial injection in the tongue led to a surprisingly comparable 38% of positive CNS. However, the absolute viral RNA copy remained strikingly lower than what was seen for intranasal inoculation despite the fact accession to subepithelial nerves was facilitated by the intralingual inoculation (Figure 1A). This suggested that productive neuroinvasion from peripheral subepithelial nerves, such as the hypoglossal, vagus, glossopharyngeal, trigeminal and facial nerves, is unlikely or at least, cannot explain the robust neuroinvasion observed by intranasal exposure. We were not able to detect viral RNA from any blood samples harvested from neuroinvaded animals (Figure 1B). To exclude the possibility that some virus particles in the blood eluded detection, we used a surrogate strategy. We reasoned that particles in the bloodstream should reach all susceptible organs after a comparable period of time and proliferate accordingly. Following intracerebral inoculation (Jacomy et al., 2003), the tropism of HCoV-OC43 for the murine liver was reportedly confirmed upon the finding of viral RNA in this organ. Here, viral RNA in the liver was detected in 2 out of 9 animals whose brain were HCoV-OC43-positive, but no correlation could be established in regards of neuroinvasion because viral RNA was not detected in the liver of 78% of the CNS-positive mice. Plotting the data per animal (Figure 1C) further emphasized the disconnection between a viral presence in the CNS compared to the liver as most highly positives animals (in the CNS) were negative in the liver. Indeed, these data do no support an indirect access to the CNS via the bloodstream.

Figure 1: Intranasal inoculation of HCoV-OC43 leads to direct colonization of the CNS. (A) 15-dayold mice were inoculated with HCoV-OC43 by intracerebral (I.C.), intranasal (I.N.) or intralingual (I.L.) routes. 5 days post-inoculation, brains were harvested and M RNA copy number assessed. Each circle represents a probed brain for a single mouse. The percentages of brains containing M RNA are shown underdeath. (B-C) In addition to the brain, blood and livers were also collected from mice inoculated intranasally and probed for M RNA. Data was plotted (B) globally (upper panel) or individually (lower panel). Note that the color code used in (C) is the same as in (B). (C)Zinc sulfate (ZnSO4) instillation 3 days prior to intranasal virus inoculation significantly abrogated neuroinvasion.



HCoV-OC43 neuroinvasion uses the olfactory nerve and neuropropagation is initiated at the olfactory bulbs.

Our data presented in Figure 1A-C pointed towards the olfactory nerve as the likely road to neuroinvasion. As a confirmation, we assess the capacity of HCoV-OC43 to invade the mice CNS after chemically inducing the destruction of the neuroepithelium through ZnSO₄ exposure (Charles *et al.*, 1995, Rochel *et al.*, 1980). Such treatment clearly prevented neuroinvasion by HCoV-OC43 at 5 days pi (Figure 1C). Furthermore, histological examination of coronally sectioned whole heads of intranasally infected mice allowed to

better define the pathway of neuroinvasion as revealed by the presence of viral antigens in dendrites-associated cilia and cell body of olfactory sensory neurons (OSN), which reside in the olfactory epithelium in the nasal cavity, as soon as 3 dpi (Figure 2A-B), with an increased number of infected cells at 4 dpi (Figure 2C-D), as well as in the olfactory bulb between 3 and 4 days post-infection (Fig. 3; panel A-B). Viral antigens were subsequently present in different areas of the brain related to olfaction (hippocampus, piriform cortex; Fig. 3A at 3dpi) and eventually in other regions of the CNS, including brainstem and spinal cord (Fig. 3B at 4dpi). Taken together, these findings, together with the data related to ZNSO₄ treatment, strongly suggest that neuropropagation in the CNS initiates at the olfactory bulb following neuroinvasion probably along the olfactory nerve.

Figure 2. Intranasally inoculated HCoV-OC43 infects olfactory sensory neurons (OSN) in the nasal cavity of 15 day-old mice to invade the CNS. Histological examination (confocal imaging) of viral spreading after IN infection of PBS/PFA- perfused C57BL/6 mice with $10^{4.25}$ TCID₅₀ (10µL) of rOC/ATCC reference virus. Detection of viral N protein (green) in OSN at 3 (A-B) and 4 (C-D) days post-infection. Magnification 63x. (B) is an enlargement of (A) and (D) is an enlargement of (C). Blue represents cell nuclei detected with DAPI.



Figure 3. HCoV-OC43 enters the CNS at the olfactory bulb and starts to propagate using neuronal networks associated with olfaction before spreading towards brainstem. Histological examination (confocal imaging) of viral spreading after IN infection of PBS/PFA perfused C57BL/6 mice with $10^{4.25}$ TCID₅₀ (10 µL) of rOC/ATCC reference virus. (1) is nasal cavity. Detection of viral N protein (green) at 3 (A) and 4 (B) days post-infection in (2) olfactory bulb, (3) pyriform cortex, (4) hippocampus, and (5) brainstem. Blue represents cell nuclei detected with DAPI.



HCoV-OC43 is found associated with axons both in vivo and in vitro.

The sequential nature of HCoV-OC43 neuropropagation, from the olfactory bulb to the olfaction-associated regions and then to the brainstem and spinal cord is hardly compatible with random diffusion of the virus within the CNS. Interestingly, immunostaining on brain sections of 5-days infected mice sections revealed the presence of HCoV-OC43 nucleocapsid (N) antigens along axons, as defined by the marker βIII-tubulin (Katsetos *et al.*, 2003), in several areas of the brains such as the hippocampus, diencephalon and cortex (Figure 4A). Although more difficult to detect, accumulation of spike glycoprotein, the structural glycoprotein forming the virus "crown", could also be noticed along nucleocapsidpositive axonal structures (Figure 4B). Similar accumulation of virus material could be detected both in human neuronal cell lines and murine primary mixed neuronal cultures (PMNCs). In these experiments, infected LA-N-5 (Figure 5A), a neuroblastoma cell line previously used as a convenient model of human neurons (Favreau et al., 2009, Hill et al., 1998, Le Coupanec et al., 2015), as well as PMNCs (Figure 5B) were gently fixed on ice with fresh commercial PFA before the surface spike glycoproteins were stained using a specific polyclonal serum. On a different experiment, cells were permeabilized and stained for BIIItubulin to delineate axonal structures. Discrete accumulation of the spike protein was found by confocal microscopy to decorate ßIII-tubulin-positive structures. Sequential staining for surface spike (polyclonal serum, before permeabilization) and total spike (monoclonal antibody, after permeabilization) revealed strong co-localization, thus indicating that spike proteins thus detected are indeed extracellularly associated to the plasma membrane. Coimmunostainings along with other structural viral proteins were performed to further characterize these spike-positive structures. Co-localization of N proteins with surface spike was found inconclusive because of the massive amount of N observed along the axons. Nevertheless, the strong co-localization of surface spike with total envelope (E) and surface hemagglutininesterase (HE), two other structural proteins, suggested that the aggregated signal of spike detected on axons (henceforth termed "spike platforms") represents viral proteins coalescing in assembled particles (Figure 5C). A kinetic performed on synchronously infected LA-N-5 revealed that detection of spike at the cell body precedes detection along the axons. Therefore, HCoV-OC43 particles may form at the cell body before being exported through or along the axons.

Figure 4: HCoV-OC43 Spike and nucleocapsid proteins are associated with axons in vivo. Brain from PFA-perfused mice 5 days post intracerebral inoculation were collected, sagitally sectioned and stained for either (A) β III-tubulin and nucleocapsid protein N, or (B) Spike glygoprotein and nucleocapsid then analyzed by confocal microscopy. Note that in (B) the image is a representative image taken in the hippocampal region of the brain.



Figure 5 : HCoV-OC43 forms viral platform at the surface of axons in culture. (A) LA-N-5 and (B) murine primary mixed neuronal cultures were infected at a MOI of 0.2 and 0.1 respectively. Fixed cells (on ice) were surface stained for Spike glycoprotein using a specific polyclonal rabbit antibody, fixed again and permeabilized, stained for the axonal marker βlll-tubulin and analyzed by confocal microscopy. (C) Surface Spike was labelled on live LA-N-5 cells before fixation, then permeabilized (or not for E staining) and stained back for either total Spike (using a monoclocal mouse antibody), total E, surface HE and total N proteins. In (A-C), shown zoomed insets above or beside panels represent the original area delimited by the blue doted boxes. (D) Kinetics of Spike association to axons. LA-N-5 were synchronously infected (MOI=3), then chased for the indicated time period before fixation, permeabilization and staining for total Spike using a specific monoclonal antibody. Samples were analyzed by confocal microscopy and the percentage of infected cells harboring Spike on their axons was then determined. The error bars represent the range from the mean of two independent experiments.



HCoV-OC43 spike platforms are static but temporally dynamic.

We next sought to determine whether the surface spike platforms are mobile or not along axons. A convenient method to distinguish and characterize these two generic options usually involves engineered molecular clones encoding for a structural protein in fusion with a fluorescent protein. Unfortunately, the genome of coronaviruses is particularly refractory to such kind of modification on structural proteins as earlier attempts resulted in dysfunctional viruses (B. J. Bosch et al., 2004) in which GFP expression in fusion with either S or N structural protein gave rise to unstable viruses with reduced infectivity that rapidly lost reporter expression (B. J. Bosch et al., 2004, Verheije et al., 2010). Completely functional GFP-harboring coronaviruses do exist, but the reporter gene is inserted in genes encoding accessory proteins (TGEV, MHV, SARS) that cannot give information on the assembled viral particles (Das Sarma et al., 2002, Sims et al., 2005, Sola et al., 2003). To circumvent this limitation, we instead relied on live cell imaging from surface-stained infected LA-N-5 cells. Surface spike was stained by indirect immunofluorescence on non-permeabilized LA-N-5 cells 24h post-infection (568 nm, red). At the concentration used (1/100), the polyclonal antibody was not found neutralizing (Supplementary figure 3). Serial images were taken every 5 seconds to generate near-continuous 15-20 min videos, a compromise for the observation of both fast (~1 µm/s) and slow (<0.1 µm/s) axonal transport events. Under these settings, spike platforms were easily perceptible. Bidirectional movement was rarely observed and never resulted in constant progression to either end of the axonal structure (Figure 6A, supplementary video 1-2). Globally, the platforms were rather static structures that remained roughly in the same area during the span of images acquisition. Similar results were obtained in PMNCs (Supplementary video 3). Re-staining, using a different monoclonal anti-spike antibody (488 nm, green), the infected cells about 1h after the initial acquisition revealed dim green platforms that most probably coalesced during the imaging period because no red signal derived from the initial set of antibodies was detected in their vicinity (Figure 6B). Brighter platforms were also observed and generally displayed dual signal, suggesting an older origin (Figure 6B). The red signal overlapping these brighter green platforms also confirmed that the initial antibodies did not shed from their targets despite the incubation period. The dynamics of platforms rise and collapse was further characterized quantitatively using a ratiometric approach. Infected LA-N-5 cells were subjected to a first indirect immunofluorescence procedure using the polyclonal anti-spike antibody (568 nm), chased for the indicated period of time at 37°C (the time gaps between the two sequential immunostainings are indicated in Figure 6C and D), then subjected to a second indirect immunofluorescence using the monoclonal anti-spike antibody (488 nm). To control for possible passive shedding of the bound-antibodies, the same procedures were performed but on infected cells fixed beforehand. The signals from single dots at both 488 and 568 nm

were quantified and 568/488 nm ratios calculated using the software ImageJ. Axons and cell bodies were also digitally separated (or not) for comparative purposes. For each data set, ratios were normalized to obtain arbitrarily at time 0 a ratio of 1 and then plotted on a linear regression curve (Figure 6C). While the ratios from fixed cells remained close to 1 throughout the experiment, indicating that antibodies stayed bound to their target during the whole experimental procedure, it steadily decreased in non-fixed cells. The same downward trend was observed on both cell bodies or axons. Because such a decrease could only be caused by a decreased numerator (568 nm, loss of old spike platforms) and/or an increased denominator (488 nm, emergence of new platforms) values, the absolute signal/infected cell in both channel was also plotted (Figure 6D). Again, no variation in signal was observed on fixed infected cells. In contrast, the signal from the 568 nm channel decreased overtime while that of the 488 nm remained stable. The stability of the 488 nm signal therefore signifies that the balance between the efflux/influx of old and new spike glycoproteins reached a stable perfect equilibrium in our conditions. Overall, these data suggest that spike platforms along axons, despite remaining anchored locally, are dynamically maintained through time by constant and balanced flux of spike proteins.

S3 Fig: The Spike-specific polyclonal antibody is not neutralizing. LA-N-5 cells were infected at MOI=0.02 and cultured for 72j in presence of different dilutions of either a pre-immune serum or the polyclonal anti-spike antibody. The infectivity was determined by immunofluorescence relative to untreated cultures.



Figure 6: Spike platforms on LA-N-5 axons are static along axons, yet temporally dynamic. (A) Infected (MOI = 0.25) LA-N-5 were incubated for 20h, then surface Spike plateforms (red) were immuno-labeled using a polyclonal rabbit antibody followed by a red-emiting secondary antibody (568, red). Movement along the axon was assessed by live-cell confocal microscopy. (B) After an hour of live-cell imaging, surface Spike plateforms were re-immuno-labeled using a specidic monoclonal mice antibody followed by a green-emiting secondary antibody (488, green). Yellow signal resulting from dual staining therefore highlights Spike proteins that remained at the surface through the imaging period whereas green signal identifies arising Spike plateforms immunoprotected during the original (red) staining. (C-D) Quantification of (B). As a control, cells were fixed immediately after the initial staining with the polyclonal antibody (red) and re-immuno-labeled after the indicated time period. (C) Spike plateforms dynamism over time. Red/green signal ratios were plotted from whole fields or only cell bodies or axons, as indicated. (D) Overall fluorescence decay. The absolute fluorescence signal per infected cells was plotted relative to time 0 for each individual channel. The error bars represent the standard deviation from the mean of 3 independent experiments.



HCoV-OC43 undergoes cell-to-cell propagation.

To evaluate whether the dynamic viral platforms along axons could represent a benefit for the virus, the propagation of HCoV-OC43 in culture was characterized. The current consensus on virus propagation lies on passive diffusion of released particles or cellto-cell transmission. Systems were herein designed to appreciate both the impact of virus diffusion and cell-to-cell propagation. First, HCoV-OC43 propagation was monitored in a lateral co-culture system. Cells of interest were seeded on two distinct sets of coverslips. Cells on "effector" coverslips were infected at a low MOI with the recombinant reference HCoV-OC43 (rOC/ATCC) for 2h, washed extensively, and then combined in a small petri dish with a second coverslip covered with the same susceptible but still naive "target" cells (Figure 7A). In this dish, both effectors and targets shared the same fluidic environment but without any direct contacts between the cells of the two sets. Parallel cultures were chased, and then at the indicated time points supernatants were harvested and cells fixed. The amount of released infectious virus particles and the percentage of infected cells were respectively determined by virus titration and immunofluorescence. Virus propagation was monitored both in human neuronal (LA-N-5) and non-neuronal epithelial (HRT-18) cell lines (Desforges et al., 2013a, Mounir et al., 1992). In both LA-N-5 (Figure 7B) and HRT-18 (Figure 7B) effector cells, the early 2.4% (LA-N-5) and 0.3% (HRT-18) infected cells at 24h rapidly progressed to reach 79% in LA-N-5 and 9% in HRT-18 by 72h of incubation which represented a 26-33 fold increase. Virus titers followed a similar trend. Colonization of distal target cells occurred but was delayed compared to effectors, and coincided with the emergence of high virus titers (Figure 7B-C). These data support the notion of passive long range diffusion of virus particles in both neuronal and epithelial cells, but also that cell proximity may somehow compensate when titers are still low. To better characterize the effect of cell proximity on virus propagation, methylcellulose was used to densify the culture media. A similar approach is commonly used to limit diffusion of particles when performing titration by plaque forming assays of a broad array of viruses (Alfson et al., 2015, Juarez et al., 2013, T. Watanabe et al., 1982, Zurbach et al., 2014). To ensure that the densified media truly hindered particles diffusion, the effect of densified media on primary HCoV-OC43 infection was tested by adding methylcellulose to an inoculum. In this single-cycle assay concluded 16h post-infection, densifying the media resulted in a ≈99% decrease in the inoculum infectivity (Figure 7D), thus confirming the validity of this approach. Next, propagation of HCoV-OC43 in such restrictive conditions was assessed for 72h and quantified by immunofluorescence from several tiled low-magnification fields using confocal microscopy. Densified media decreased substantially the propagation in LA-N-5 (Figure 7E) and PMNCs (Figure 7F) cultures without fully nullifying it. A similar trend was observed for HRT-18 (Figure 7G), indicating that cell-to-cell propagation is not solely observed in neuronal

250

cells. The absence of multinucleated syncytial cells in 72h cultures of infected LA-N-5 (Supplementary figure 1A) and PMNCs (Supplementary figure 1B) was noteworthy because such cytopathic structures were reported for other coronaviruses on certain cell lines (Biswas *et al.*, 2014, de Haan *et al.*, 2008, Follis *et al.*, 2006, Frana *et al.*, 1985, Taguchi, 1993). A close look revealed non-homogenous inhibition of propagation as colonies of virus-infected cells were clearly observed (Figure 7H). It became clear when plotting the percentage of infected cells within these colonies compared to whole fields that semifluid media has in fact little effect (although significant) on virus propagation locally while preventing the distal spread (Figure 7I). Interestingly, increasing cell density tended to stimulate the propagation but only in semifluid conditions (Figure 7J). Therefore, the "local" propagation highlighted in semifluid media is most probably dependent on close cell-cell contacts. Overall, these data suggest that HCoV-OC43 indeed undergoes virus particles diffusion, but that some productive cell-to-cell propagation occurs as well.

Figure 7: HCoV-OC43 sustains cell-to-cell propagation. (A) Schematic representation of the coculture system.-(B-C) Propagation of HCoV-OC43 in co-culture system in which two coverslips seeded with either infected (effector, MOI = 0.01) or naive target (B) LA-N-5 or (C) HRT-18 cells are placed side by side in a dish. Effector and target cells were cultured up to 72h postinfection. At the indicated time interval, supernatants were collected for titration of infectious virus (doted black lines, refer to Y axis to the right) and cells fixed and processed for immunofluorescence (colored lines, refer to the left Y axis). Propagation of the infection, defined as the percentage of infected cells, was plotted separately for effector and target cells. (D-J) Cell-to-cell propagation assays. (D) HRT-18 were incubated with a fluid or semifluid inoculum (both MOI=1) for 16h and infected cells were revealed by immunofluorescence. The resulting infectivity, defined as the percentage of infected cells, was normalized according to the fluid condition. (E) LA-N-5, (F) PMNC and (G) HRT-18 were infected at MOI 0.01 and then overlaid with fluid or semifluid media for 16-72h. Cells were then fixed and immuno-stained. The propagation efficiency was plotted as the ratios between the percentages of infected cells at 72h vs 16h. (H) A representative example of a wide field of infected LA-N-5 cells cultured in fluid and semifluid media. Viral colonies are delimited by yellow dashed lines. (I) Percentages of infected cells in whole field vs within colonies were compared. (J) A similar experiment was performed to appreciate the effect of cell density on propagation. LA-N-5 cells were seeded at 7000 or 14000 cells / cm2 before infection (MOI 0.01) 24h later. Error bars represent the standard deviation from the mean of (B-C; F) 3; (E) 13 independent experiments, (G, J) the range from the mean of two independent experiments and (I) >12 fields or >40 colonies from 3 independent experiments.


S1 Fig: HCoV-OC43 propagation without syncytium formation. (A) LA-N-5 or (B) PMNCs cells were infected at MOI=0.01 with HCoV-OC43 and incubated in 72h, fixed and immunostained for indicated proteins. The images show representative fields or infected cells defined by the presence of Spike protein.



Axonal transport likely enables HCoV-OC43 neuron-to-neuron propagation.

To verify if cell-to-cell propagation in neuronal (LA-N-5 and PMNCs) and epithelial (HRT-18) cells was mechanistically similar, we tested the effect of the microtubule disturbing agents Vinblastine (destabilizing) and Paclitaxel (stabilizing) on HCoV-OC43 propagation both in fluid (Supplementary figure 2) and semifluid conditions. Low concentrations were used to affect axonal transport while minimizing negative effects on other microtubule-dependent processes. In consequences, these drugs did not affect virus propagation at the range of concentration tested during the 72h of incubation in fluid conditions for both LA-N-5 (Figure8A) and HRT-18 (Figure 8B). In contrast, both drugs decreased virus propagation in a dose-dependent manner in LA-N-5 under semifluid conditions whereas no such effect was observed in HRT-18 cells (Figure 8A). Interestingly, significantly less spike platforms could be observed on the axonal structures of LA-N-5 infected cells upon a 24h treatment with Paclitaxel (Figure 8C-D), suggesting that the effect of the drug results from an interference with axonal transport. The neuron-specific requirement for microtubules under semifluid conditions indicates that axonal transport may play an important role during neuron-to-neuron HCoV-OC43 propagation.

S2 Fig: Microtubule-disturbing agents disrupt LA-N-5 axons. LA-N-5 cells were treated with the indicated conentration of vinblastine or paclitaxel in fluid media for 72h. Then immunostained for spike glycoprotein (red) or β III-tubulin (green) and nuclei were counter-stained (blue). Pictures were taken by confocal microscopy.

Control	2 nM Pac	10 nM Pac	50 nM Pac	250 nM Pac
	2 nM Vin	10 nM Vin	50 nM Vin	250 nM Vin

Figure 8: Axons allow neuron-to-neuron propagation. (A) LA-N-5, (B) HRT-18 were infected at MOI = 0.01 and cultured 72h in fluid or semifluid media containing the specified concentration of vinblastine or paclitaxel. Infected cells were then fixed and immunostained to determine the percentage of infection. (C-D) Effect of Paclitaxel on axonal association of Spike platforms. (C) Infected LA-N-5 (MOI = 0.2) were treated with 250 nM for 20h, fixed and immuno-stained. (D) Data plotted in the graph is the amount of Spike plateforms per μ m of infected axons. The error bars represent the (A-B) standard deviation from the mean of 3 independent experiments or the (D) standard deviation from >200 individual axonal structures.



HCoV-OC43 neuron-to-neuron propagation can be modulated.

The semifluid culture system was further used to verify if neuron-to-neuron propagation can be modulated by host or viral factors. First, the sensitivity to a neutralizing antibody was assessed. Non-blocking (clone 3-2B.2 recognizing the receptor binding region (RBD) mapped between amino acid 16-330) or blocking (clone 4-3E.4 recognizing the hypervariable region approximatively between amino acid 450-600) monoclonal antibodies targeting the spike glycoprotein were added to fluid or semifluid growth media for 72h. The level of infection was evaluated by quantitative immunofluorescence. Figure 9A clearly demonstrates the neutralizing capabilities of the blocking 43E4 antibody in this setting despite the viscosity of the media, suggesting that the Ab-driven neutralization is not specific to a particular mode of propagation. 9-O-acetyl sialic acid (SA) on glycolipids and/or O-linked glycoproteins, is a considered a determinant of HCoV-OC43 entry (Krempl et al., 1995, Kunkel et al., 1996, Vlasak et al., 1988b, D. E. Wentworth et al., 2001), thus likely to influence virus propagation. The effect of various recombinant lectins (which adhesion to corresponding sugars on cells was evaluated) was therefore tested in fluid or semifluid conditions (Figure 9B). The lectins LCA, Jacalin (JAC), MAA and CCA had little to no effect on propagation regardless of the fluidic conditions. The lectin SNA-1 harbored a very mild inhibition in fluid conditions but a striking and statistically significant effect in semifluid. Inversely, the wheat germ agglutinin (WGA) lectin reproducibly inhibited propagation in both conditions although the extent seemed exacerbated in fluidic conditions. On the other hand, the UEA-1 lectin from Ulex europaeus slightly yet significantly increased propagation in conditions that are semifluid without any perturbation when fluid. HCoV-OC43 also encodes for a hemagglutinin-esterase (HE) protein which confirmed acetyl-esterase activity removes acetyl groups from O-acetylated sialic acid to presumably free aggregated particles at the surface, thus promoting both virus entry and/or exit (R. J. de Groot, 2006, Desforges et al., 2013a, Rottier, 1990, Smits et al., 2005, Vlasak et al., 1988a). The effect of the recombinant WT HE protein and its HE S40T acetyl-esterase defective counterpart were tested in fluid and semifluid conditions (Figure 9C). The recombinant WT HE protein severely impaired propagation in both conditions, although a small but statistically significant exacerbation was noted in fluid conditions. In sharp contrast, the defective recombinant protein did not affect propagation. Therefore, glycosylation can conclusively modulate both modes of propagation, yet interesting differences in magnitude and specificity towards either mode were also noticeable. The major influence of the HCoV-OC43 spike glycoprotein on virus propagation can be appreciated from previous studies (Favreau et al., 2009, Jacomy et al., 2010, Le Coupanec et al., 2015, Meessen-Pinard et al., 2016, St-Jean et al., 2006b). To verify if the two modes of propagation are influenced equivalently by this important viral factor, two recombinant HCoV-OC43 encoding for previously characterized spike variants, namely spike

G758R and spike 183-241 (Favreau *et al.*, 2009, Le Coupanec *et al.*, 2015, Meessen-Pinard *et al.*), were compared in both fluid and semifluid conditions to the prototypical variant (herein termed WT) obtained by the American Type Culture Collection (ATCC). rOC/S₁₈₃₋₂₄₁ propagated 2-3 times faster than rOC/ATCC in both conditions, suggesting a more rapid and/or efficient replication cycle that benefits equivalently to both free-particle diffusion and neuron-to-neuron transfer (Figure 9D). In contrast, rOC/S_{G758R} propagated twice less efficiently in semifluid conditions while very comparable to rOC/ATCC in fluid conditions (Figure 9D), indicating that a single mutation on the spike glycoprotein is sufficient to abrogate specifically neuron-to-neuron transfer. Taken together, the data indicate that the combined effects of cellular and viral factors influence propagation both by passive particle diffusion and neuron-to-neuron propagation, thus jointly determining the rapidity of the global virus propagation. Although the data suggest that the two modes of propagation are not fundamentally mechanistically distinct, their different susceptibilities to certain cues highlighted subtle elements of divergence.

Figure 9: Neuron-to-neuron propagation is modulated by both cellular and viral factors. (A-D) All experiments were performed using the same general procedures. LA-N-5 cells were infected at MOI = 0.02, cultured for 72h in fluid or semifluid media, fixed and immuno-stained to score the infection efficiency by immunofluorescence. Different cues were applied. (A) Growing media were supplemented by non-neutralizing (32B2) or neutralizing (43E4) monoclonal antibody. (B) Various lectins or (C) recombinant WT HE or HE S407 protein were added to the growing media. (D) Cells were infected with various HCoV-OC43 variants encoding for the indicated Spike mutants. For convenience, data was either plotted as (A-C) infectivity relative to untreated controls; (D) ratios between 72h vs 16h percentages of infection. The error bar represent the standard deviation from (A-C) 3 or (D) >4 independent experiments.



DISCUSSION

The widely circulating respiratory HCoV-OC43 is naturally neuroinvasive and can disseminate within the CNS. Making use of our animal model and neuronal cell cultures, we herein bring new data that shed light on the underlying mechanisms which remain poorly understood up until today.

For instance, the ZnSO₄ experiment (Figure 1D) and HCoV-OC43 ex vivo detection on brain sections of intranasally inoculated mice (Figure 2-3) suggest the olfactory tract as the most probable route of neuroinvasion, from the infection of OSN in the nasal mucosa to the olfactory nerve and bulb. We cannot rule out that other less efficient route, including the peripheral nerves can contribute to neuroinvasion. However, HCoV-OC43 does not seem to infect other supporting cell types surrounding the OSN in the olfactory epithelium at least in mice (Figure 2). It is therefore difficult to imagine that it can cross the epithelial barrier. Moreover, the rare presence of HCoV-OC43 in the liver of intranasally inoculated mice as well as its undetectable level in the bloodstream are other arguments against this possibility. From the olfactory bulb, further neuropropagation along the various axonal connections through the CNS is a possibility compatible with other of our key observations: 1) the seemingly dynamic association of structural viral material along axons both ex vivo and in vitro (Figure 4-6); 2) the existence of a neuron-to-neuron mode of propagation particularly efficient at high cellular density (Figure 7E-J) and 3) the disruption of neuron-to-neuron propagation by IIIβ-tubulin-disrupting agents (Figure 8). Nevertheless, a contribution of freely-diffusing particles is not to be excluded. Although the propagation in the CNS seemed to follow the olfactory bulb-piriform cortex-brainstem axis (Figure 3), isolated infected cells could indeed be observed scattered through the brain at 3-4 days post-intranasal inoculation. This latter type of propagation appeared surprisingly dominant in our cell culture systems. However, a direct comparison is indeed to be made with caution because in vitro systems do not necessarily reflect the situation prevailing in vivo. For instance, various physical barriers impossible to mimic in vitro are expected to limit diffusion of free particles in vivo. In culture, particles precipitate homogenously on susceptible cells as a 2-D layer, which is not reflecting properly the dynamic heterogeneous 3D environment found in vivo. As suggested by the positive effect of cell-cell contacts on HCoV-OC43 propagation (Figure 7J), the interneuronal connection within the CNS is likely to boost neuron-to-neuron propagation efficiency in a way difficult to predict in vitro where neuronal connections are not necessarily fully mature. In spite of these limitations, neuron-to-neuron propagation in vitro appeared only twice less efficient. Interestingly, the colonization of distal cells in Figure 7B coincided with the rise of virus titers above 1x10⁵ TCID₅₀/ml while the spread among effector cells did not suffer delays upon the early initial infection. It is therefore tempting to speculate that neuron-to-neuron

propagation is a significant (if not the main) contributor of dissemination early upon infection until higher viral titers stochastic and distal infection occurrence by freely-diffusing particles increase concomitantly. In this model, freely-diffusing founder viral particles would initiate stochastic infections in "naive" regions of the brain, thus establishing a small viral colony expanding at the rhythm of the neuron-to-neuron propagation. Such local propagation combined with subsequent round of distal colonization with new founder virus particles would indeed ensure a fast spread throughout the CNS.

Our microscopy approaches shed light on the mechanisms by which HCoV-OC43 could leave the axon to promote neuron-to-neuron propagation. Accumulation of membraneembedded spike, E and HE structural proteins, herein termed spike platforms, were found decorating axons in vitro. These plateforms appeared spatially static, probably because anchored to elements of the cytoskeleton. Nevertheless, new viral products seemingly compensated over time for the gradual loss of older proteins, therefore demonstrating a certain degree of dynamism that relates well to sites of virus release. The anterograde transport of virus material along axons towards exit sites could be explained by two generic models (reviewed in (Taylor et al., 2015)): 1) virus assembly at the cell bodies then transport towards release sites (ex: Herpesviridae); or 2) convergence along axons of structural subunits in discrete sites where assembly and release can be achieved (ex: Rhabdoviridae). Our inability to detect nucleocapsid in viral platforms may suggest that its recruitment to spike/E/HE assembled scaffolds is a terminal process quickly resolved by the release of the particle, therefore precluding its transient observation. This possibility is in line with the second aforementioned model. However, we cannot exclude that the intense nucleocapsid signal across the axon cytosol, as seen in other previous studies (Frana et al., 1985, Jacomy et al., 2006, Pasick et al., 1994), masks a dimmer signal corresponding to nucleocapsid coassembled with the other structural proteins. It is interesting to note that viral platforms are phenotypically very similar to those deriving from the infection of neurons by the pseudorabies virus (PRV) and herpes simplex virus type 1 (Bauer et al., 2014, Howard et al., 2014, Saksena et al., 2006, Taylor et al., 2012), two α-Herpesviruses whose accumulation in varicosities enriched in pre-synaptic markers gave rise to the yet unconfirmed hypothesis of trans-synaptic viral transfer (De Regge et al., 2006, Saksena et al., 2006). Whether this trans-synaptic propagation could apply for HCoV-OC43 instead of a non-synaptic stochastic secretion along the axons remain to be verified. To this end, the development of tools enabling more accurate and sensitive live monitoring of HCoV-OC43 propagation will be of paramount importance.

Our data indicate that propagation via diffusion of free particles and neuron-to-neuron transfer share several mechanistic similarities, as seen for other viruses (reviewed in (Q. J.

Sattentau, 2011)). For instance, the two tested modes of propagation tended to be similarly affected after by anti-spike neutralizing Ab, recombinant HE and lectins (Figure 9A-C). Furthermore, Spike 183-241-encoding virus (rOC/U₁₈₃₋₂₄₁) showed a 2-3-fold increased propagation in both cases (Figure 9D). Subtle divergences were nevertheless noticed. The impact of the lectins SNA-I (inhibition), and UEA-I (stimulation) was significantly and consistently more pronounced in semifluid media. Moreover, spike G758R-encoding virus (rOC/S_{G758R}) cell-to-cell propagation appeared quite slower than WT virus whereas propagation by free diffusion remained equivalent. The functional significance of these intriguing quantitative differences is still unclear, but may underline the privileged contribution of some still-unknown attachment factor(s) to a specific mode of propagation. A precedent exists as the differential expression profile of MHV cellular receptors was shown to determine the type of neuronal spread (Bender et al., 2010a). Interestingly, our previous work demonstrated that HCoV-OC43 spike G758R and spike 183-241 mutants conferred attenuated and exacerbated neurovirulence in mice, respectively, despite equivalent virus loads in the brain at their onset of infection (Jacomy et al., 2010, Le Coupanec et al., 2015, Meessen-Pinard et al., 2016). A key observation was that HCoV-OC43 spike G758R was affected in its capacity to reach the spinal cord whereas HCoV-OC43 spike 183-241 did so even more efficiently than the reference virus. Combined with our current findings, it raises the intriguing possibility that neuron-to-neuron propagation efficiency defines the outcome of infection by enabling the colonization of areas of the CNS, such as the spinal cord, otherwise difficult for HCoV-OC43 to reach by stochastic diffusion. A similar interpretation was drawn in a report that compared the propagation of the A59 strain of MHV to the more virulent JHM.SD described as relying more on neuron-to-neuron transfer (Bender et al., 2010a).

Additional studies are warranted to push further our knowledge on HCoV neuroinvasion and dissemination throughout the CNS. In this context, the identification and characterization of the molecular determinants distinctly regulating the two aforementioned phenomenons, including their receptor(s) and attachment factor(s), will be the key of a better understanding of their associated neuropathology and eventually to the elaboration of antiviral countermeasures.

MATERIALS AND METHODS

Ethic statement

All mice experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Ethics Committee (IACUC) of the *Institut national de la recherche scientifique* (INRS) and conform to the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Animal care and used protocols numbers 1304-02 and 1205-03 were issued by the IACUC of INRS for the animal experiments described herein. All the experiments with both wild type and mutant viruses (S protein with a potential gain-of-function) were approved by the institutional biosafety committee (IBC) at INRS (certificate 2013-07) as all BSL2 safety level measures were applied to prevent infection of all laboratory workers and potential spread of viruses.

Viruses and cell lines

The recombinant HCoV-OC43 virus (rOC/ATCC) (St-Jean et al., 2006b) harbors the same sequence as the reference virus HCoV-OC43 (VR-759) obtained in the 1980s from the American Type Culture Collection (ATCC). HCoV-OC43 rOC/S₁₈₃₋₂₄₁ and rOC/S G758R were previously described (Favreau et al., 2009, Le Coupanec et al., 2015, Meessen-Pinard et al., 2016). Virus stocks were generated by transfecting each cDNA clone in BHK-21 cells, amplified by two passages in the HRT-18 cell line, and sequenced to confirm that no mutations were introduced during the process. The human ileocecal colorectal adenocarcinoma HRT-18 cell line (a gift from the late David Brian, University of Tennessee) was cultured in minimal essential medium alpha (MEM-alpha; Life Technologies) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; Multicell) and was used to produce viral stocks and perform experiments. The human neuroblastoma LA-N-5 cell line (a kind gift of Stephan Ladisch, George Washington University School of Medicine) was maintained in RPMI medium supplemented with 15% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 100 µM non-essential amino acids (Gibconvitrogen). LA-N-5 cells were differentiated into human neurons as previously described (Hill et al., 1998). Briefly, 1.25x10⁴ LA-N-5 cells were seeded in RPMI supplemented with 20% (vol/vol) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 100 µM non-essential amino acids on 24-wells glass coverslips coated beforehand with 1/20 Matrigel matrix basement membrane (Corning) following manufacturer's procedures. The next day and every 2 days for 8 days, the medium was replaced with fresh DMEM supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 100 µM non-essential amino acids, 50 µg/ml

gentamycin (Wisent) and 10 μ M all-trans retinoic acid (Sigma-Aldrich). Mixed primary cultures of mouse CNS cells were prepared as previously described (Le Coupanec *et al.*, 2015). Briefly, the cortex and hippocampus from 14-16 day-old embryonic CD1 pup brains were harvested. The tissues were dissociated in HBSS+-trypsin-EDTA 0.5% (ratio 10:1 respectively) for 15 min at 37°C, then by gentle up and down pipetting. Debris were decanted and supernatants transferred in neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 1 mM GlutaMAX-I (Life Technologies), 10 mM HEPES buffer, 1 mM sodium pyruvate, 2% (vol/vol) B27 supplement (Life Technologies), 50 μ g/mI gentamycin and 10% (vol/vol) of Horse serum (Life Technologies). Cells were then seeded at 2x10⁵ cells/cm² and grown on poly-D-lysine (final concentration at 50 μ g/mL)-treated glass coverslips in the same medium. From the next day until ready for infection (6-7 days), media was replaced every 2 days for fresh neurobasal medium without horse medium.

Evaluation of neuroinvasiveness

15-days-old mice were subjected to intra-nasal (injection of 5 µl in each nostril), intralingual (single injection of 10 µl using a Hamilton syringe laterally at the center of the tongue) or intra-cranial (as previously described, (Jacomy et al., 2010)) inoculation of rOC/ATCC using 10^{6.25}TCID₅₀ (50% tissue culture infective doses) per mL. Sham-infected mice received PBS. To block neuroinvasion, 5 µlof ZnSO4 (0.17M) was instilled in both nostrils of mice 3 days before intranasal infection of virus. Intra-lingual and intra-cerebral inoculations were performed under peritoneal anesthesia of ketamine-xylamine (ketamine at 200 mg/kg and xylamine at 10 mg/kg (Jacomy et al., 2003). Infected brain, liver and blood were harvested 5 days later from peritoneally anesthetized mice (ketamine at 200 mg/kg and xylamine at 10 mg/kg) and frozen at -80°C. Whole brain tissue was shredded/lysed by extensive agitation in 1 ml QIAzol-lysis reagent (Qiagen) supplemented with shredding beads. Total brain RNA was extracted by a QIAzol/chloroform/propanol manufacturer's procedure, dosed using a ND1000 spectrophotometer (Nanodrop) and frozen at -80°C. Virus RNA copy number were quantified in triplicate by real-time RT-PCR using the TaqMan RNA-toC[™] 1-Step Kit (Applied Biosystems/Life Technologies) in a 20 µl reaction mixture with 10 µl 2x TaqMan RT-PCR Mix (containing ROX as a passive reference dye), 900 nM forward and reverse primers targeting a 68 bp region of HCoV-OC43 M gene(Vijgen et al., 2005) (forward primer OC43-FP 5'-ATGTTAGGCCGATAATTGAGGACTAT-3', nt 433 to 458; and reverse primer OC43-RP (5'-AATGTAAAGATGGCCGCGTATT-3', nt 479 to 500), 200 nM FAM BHQ1-TP probe (OC43-TP (FAM-5'-CATACTCTGACGGTCACAAT-3', nt 459 to 478), 0.5 µl 40x TaqMan RT Enzyme Mix and 800 ng extracted brain RNA. Serially diluted cRNA standards were used for

the generation of a standard curve. Amplification and detection were performed in a StepOnePlus Realtime PCR system apparatus and analyzed with StepOne software version 2.3 (Applied Biosystems). The limit of detection was defined as the average signal obtained in corresponding negative controls for each organ.

Infection of cell lines and primary mouse CNS cultures

The HRT-18, LA-N-5 cells and primary mouse neuronal cell cultures (PMNCs) were infected with the indicated recombinant HCoV-OC43 virus at the indicated multiplicity of infection (MOI) for 2h in MEM-alpha supplemented with 1% (vol/vol) FBS (HRT-18), neurobasal medium with B27-GlutaMAX-I (PMNCs) or DMEM supplemented with 1% (vol/vol) FBS (LA-N-5 cells). The inoculum was then discarded and replaced for fresh MEM-alpha supplemented with 1% (vol/vol) FBS (LA-N-5 cells). The inoculum was then discarded and replaced for fresh MEM-alpha supplemented with 1% (vol/vol) FBS (HRT-18 cells), fresh neurobasal medium with B27-GlutaMAX-I (PMNCs) or fresh DMEM medium supplemented with 2.5% (vol/vol) FBS (LA-N-5 cells) and incubated for up to 72h, as indicated. During infection and further incubation, LA-N-5 and PMNSs were kept at 37°C and HRT-18 at 33°C.

Titration of infectious particles

Virus titers from cell culture supernatants were determined by an indirect immunoperoxidase assay (IPA) on HRT-18 cells, as previously described. Briefly, HRT-18 were infected from serially diluted virus-containing supernatants for 2h and incubated for 96h. Cells were MeOH-fixed and incubated with the mouse primary antibody 4.3E4 (dilution 1/50) that detects the S protein of HCoV-OC43. Immunocomplexes were detected by incubating with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin antibody diluted 1/500 (Kirkegaard & Perry Laboratories) and revealing with 0.025% (wt/vol) 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) and 0.01% (vol/vol) hydrogen peroxide in PBS 1X. Infectious virus titers were calculated by the Karber method (Lambert *et al.*, 2008).

Immunofluorescence

Confocal immunofluorescence was performed either after intracerebral infection of 22-days-old mice, for which perfusion with 4% (wt/vol) PFA was performed 5 days post-infection or after intranasal infection on 15 day-old mice, for which perfusion was performed

every day for a 4 day period. For intracerebral infection, brain sections were sagitally sliced in 60 µm thick sections with a Lancer Vibratome and for intranasal infection, heads were harvested and fur, skin and lower jaw were removed. Whole heads were decalcified in 6% EDTA pH 8 at 4oC for 5 days then transferred to 30% sucrose solution being processed 3 days later. Serial sections were collected in PBS, treated 10 min H₂O₂ to disrupt erythrocytes, wash twice 5 min in PBS and permeabilized for 2h in PBS supplemented with 0.1% triton (vol/vol). Sections were further incubated for 1h in 0.1% triton/PBS supplemented 1% horse serum (vol/vol), then overnight at 4°C in 0.05% triton/PBS containing 1% horse serum and OC43-crossreacting ascetic anti-HEV N (1/500) (Le Coupanec et al., 2015), ßIII-tubulin (1/1000, Abcam) and/or a polyclonal anti-OC43 spike serum (1/250) generated from rabbit immunization with a fragment of the spike glycoprotein encompassing amino acids 16-334. Sections were washes 3 times (15 minutes each) in 0.05% triton/PBS, incubated for 2h in 0.05% triton /PBS supplemented with 1% horse serum and 1/500 adequate Alexafluor 488 or 568-coupled secondary antibodies (Life Technologies). Immunostained sections were washed twice (5 minutes each) in 0.05% triton /PBS, counterstained for nuclei with 10 µg/ml Hoechst (Invitrogen), then washed again 4 times (15 minutes each) in 0.05% triton /PBS. Sections were then mounted in Prolong® Diamond Antifade mounting media (Molecular Probes) on glass slide and imaged on a Zeiss LSM780 confocal microscope equipped with a 30 mW 405 nM diode laser, 25 mW 458/488/514 argon multiline laser, 20 mM DPSS 561 nm laser mounted on a Zeiss Axio Observer at 630X (Carl Zeiss Microimaging). All immunostaining steps were carried out at room temperature while agitating unless otherwise stipulated.

Virus propagation assay

For propagation assays, cells were always seeded on glass coverslips, coated or not following seeding procedues (see above). Immediately after infection of HRT-18, LA-N-5 cells or PMNCs (as described above), inoculums were substituted for propagation media. Propagation media was prepared as following: 2X DMEM (Multicell) was supplemented with 2 mM GlutaMAX-I, 20 mM HEPES buffer, 100 μ g/ml gentamycin, 2 mM sodium pyruvate and 200 μ M (vol/vol) non-essential amino acids. FBS at 2%, 5% (vol/vol), or 4% (vol/vol) B27 + cobalamin at 0.013698 mg/ml was also respectively added for HRT-18, LA-N-5 and PMNCs. Supplemented 2x DMEM media was then diluted 1/2 in either 4% (wt/vol) methylcellulose (semifluid media) or H₂O (fluid media). Cells were overlaid with semifluid or fluid media and incubated at 37°C for the indicated time periods after witch supernatants were discarded and cells directly fixed for 15 min in 4% PFA. Where specified following compounds were also

added to fluid and semifluid media (final concentration indicated): 2-250 nM vinblastine or paclitaxel (Sigma-Aldrich); 1/10 hybridoma supernatant containing anti-OC43 spike nonneutralizing 3-2B.2 and neutralizing 4-3E.4 monoclonal antibodies (Desforges et al., 2013a); 10 µg/ml lectin SNA-I (from Sambucus nigra), WGA (from Triticum vulgare), CCA (from Cancer antennarius), MAA (from, Maackia amurensis) (EY laboratories), LCA (from Lens culinaris), Jacalin (from Artocarpus integrifolia) and UEA-I (from Ulex europaeus) (Vector Laboratories); 10 µg/ml HE and HE S40T recombinant protein following a previously described procedure (Z. Li et al., 2013). To quantify virus propagation in HRT-18 or LA-N-5 at indicated time points, fixed cells were washed once in PBS and permeabilized in chilled 100% methanol for 5 min -20°C. Samples were rehydrated 5 min in PBS and stained 2h at 37°C using 1/2 dilution of mixed hybridoma supernatants containing equivolumes of 4E11.3 anti-HEV N protein and 4-3E.4 anti-OC43 spike monoclonal antibodies. Cells were washed twice 5 min in PBS, then probed with for 45 min at room temperature with anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary fluorescent antibodies (1/500; Life Technologies) along with 2 µg/ml Hoechst to counterstain nuclei. Following 3 PBS washes, coverslips were either directly imaged at 100x on our Zeiss LSM780 confocal microscope using the 30 mW 405 nM diode laser and 25 mW 458/488/514 argon multiline laser or mounted with Immunomount (Fisher Scientific) on glass slides to analyze later on. For each sample, $\geq 6.4x4$ tiles of full fields were taken and exported from Zen black software (Carl Zeiss Microimaging) and quantified using the cell image analysis software CellProfiler (www.cellprofiler.org/). Minor modifications to this protocol were applied to assess propagation in PMNCs. For instance, methanolpermabilized cells were incubated for 1h at RT with 2% (wt/vol)/PBS then 1h at 37°C in the 1/2 dilution of our mixed hybridoma supernatants supplemented with 0.1% triton. Cells were incubated with the secondary antibodies for 1h at room temperature.

Confocal microscopy and live cell imaging

The presence of spike plateforms on LA-N-5 axons was evaluated by fixing the cells on ice using 4% PFA (Electron Microscopy Sciences). Fixed cells were washed with PBS and then incubated with 1/200 polyclonal anti-OC43 spike for 1h at 37°C, washed twice, re-incubated 45 min at room temperature with adequate 1/500 Alexa Fluor 568 antibody. Following 3 PBS washes, surface stained cells were permeabilized 5 min with 0.1% triton/PBS and sequentially stained 1h at room temperature for total βIII-tubulin using specific antibodies (1/1000; Abcam) and appropriate 1/500 Alexa Fluor 488 secondary antibody along with 2 µg/ml Hoechst. For PMNCs, surface staining was conducted at 37°C for 15 in 2% FBS/neurobasal supplemented with 1/200 anti-OC43 spike polyclonal serum, washed

twice 2 min in media then fixed 5 min with 4% PFA. Fixed cells were incubated for 30 min at room temperature with the appropriate Alexa Fluor 568 diluted 1/1000 in PBS. Cell were washed twice, fixed again for 5 min and permeabilized with 0.1% triton/PBS for 5 min at room temperature. Cells were then stained for total ßIII-tubulin 1h at 37°C in 0.1% triton/PBS (vol/vol), washed twice in PBS, and incubated 1h at room temperature with appropriate 1/1000 Alexa Fluor 488 antibody and 2 µg/ml Hoechst. To assess co-localization of surface HCoV-OC43 spike glycoprotein with other virus structural proteins, infected LA-N-5 cells were incubated at 37°C for 15 min with either 1/200 polyclonal anti-OC43 spike serum (generated from rabbit immunization with a fragment of the spike glycoprotein encompassing amino acids 16-334), 1/2 monoclonal 43E.4 anti-OC43 spike antibody and/or 1/200 monoclonal KD9-40 anti-BCoV HE protein antibody (kindly provided by Sylvia van Drunen Littel-van den Hurk, University of Saskatchewan, Saskatchewan, Canada, reportedly recognizing OC43 HE (Desforges et al., 2013a)) in 2.5% FBS/DMEM. Cells were washed twice 2 min in media, then re-incubated 15 min at room temperature in 2.5% FBS/DMEM supplemented with 1/500 Alexa Fluor 568 secondary antibody. Cells were fixed in 4% PFA after 3 x 2 min washes in media. Where total co-staining were needed, surface stained cells were next permeabilized in 0.1% triton/PBS (vol/vol) for 5 min at room temperature and incubated for 2h at 37°C in 5% FBS/PBS (vol/vol) supplemented with 1/500 polyclonal anti-OC43-E protein, 1/2 monoclonal 4E11.3 anti-HEV N protein hybridoma supernatant, 1/2 4-3E.4 anti-OC43 spike hybridoma supernatant or 1/500 polyclonal anti-OC4 spike serum. Cells were then washed twice and re-incubated with adequate Alexa Fluor 488 antibodies diluted 1/500 in PBS. Nuclei were counterstained with 2 µg/ml Hoechst. Immunostained cells (LA-N-5 or PMNCs) were all mounted on glass slides with Prolong® Diamond Antifade mounting media after 3 final PBS washed. The images shown in the figures are nonoverlapping maximal projections generated by the ImageJ software from single Z-stacks exported from Zen black software (Carl Zeiss Microimaging). LA-N-5 cells and PMNCs were seeded on matrigel or collagen/poly-D-lysine-coated live-cell imaging dish (MatTek Laboratories), differentiated and infected as indicated above. Real-time imaging was performed by live surface staining at 37°C of spike platforms as indicated above and immediately imaged at 37°C for up to 35 min at ≈0.125 frame/sec using Zen 2.1 software. Presented images and videos are thick acquisitions from a maximal pinhole aperture obtained and processed using Zen black software (Carl Zeiss Microimaging). All images and videos were acquired with a Zeiss LSM780 confocal microscope equipped with a 30 mW 405 nM diode laser, 25 mW 458/488/514 argon multiline laser, 20 mM DPSS 561 nm laser mounted on a Zeiss Axio Observer at 630X (Carl Zeiss Microimaging). For real time imaging, the Axio Observer was further equipped with a temperature, humidity, CO₂-controling stage top incubators. For ratiometric measurements, 20h-infected LA-N-5 cells were initially

surface stained live as described above first using the polyclonal anti-spike serum and Alexa Fluor 568 antibodies. Cells were then chased (or not) up to 3h at 37°C before being subjected to a similar second surface staining using instead the monoclonal 4-3E.4 spike antibody and Alexa Fluor 488 antibodies. To account for the loss of immunocomplexes during the biologically permissive chase period, parallel samples were fixed with 4% PFA prior to the initial staining. The exact same acquisition settings were used for all samples. Images were exported, axons and bodies separated in distinct files using Photoshop CS5.1 (Adobe) and quantification from maximal Z-stacks projections generated by ImageJ. Brightness and contrast values remained unchanged through the process to avoid biased quantification.

Statistical tests

For propagation and platform dynamism kinetics, statistical analyses were conducted by two-ways analysis of variance (ANOVA) followed by a Sidak test. Statistics for other propagation assays were assessed using ratio paired Student t-test when comparing fluid and semifluid media, and unpaired Student t-test for mutant comparisons. The statistical validation of the effect of paclitaxel on axonal spike association was done using an unpaired Student t-test. Statistical significance, designed by *, was defined at p < 0.05 and by **, was defined at p < 0.01.

Acknowledgments

This work was supported by Grant No. MT-9203 from the CIHR's Institute of infection and Immunity (III) to Pierre J. Talbot, who is the holder of the Tier-1 (Senior) Canada Research Chair in Neuroimmunovirology award. Alain Le Coupanec acknowledges a doctoral studentship from *Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS*. Mathieu Dubé is grateful for a postdoctoral fellowship, also from the *Fonds de recherche Québec-Santé*. We thank Jessie Tremblay for excellent technical assistance.

REFERENCES

- 1. Talbot P, Desforges M (2008) Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus.: 313–324.
- 2. Freymuth F, Vabret A, Dina J, Cuvillon-Nimal D, Lubin C, et al. (2010) [Bronchiolitis viruses]. Arch Pediatr 17: 1192-1201.
- 3. Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F (2009) [Human coronaviruses]. Pathol Biol (Paris) 57: 149-160.
- Forgie S, Marrie TJ (2009) Healthcare-associated atypical pneumonia. Semin Respir Crit Care Med 30: 67-85.
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA (2012) Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med 367: 1814-1820.
- Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, et al. (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science 300: 1394-1399.
- Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, et al. (2003) Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet 362: 263-270.
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, et al. (2003) Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med 348: 1967-1976.
- 9. Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ (2000) Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. J Virol 74: 8913-8921.
- 10. Stewart JN, Mounir S, Talbot PJ (1992) Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. Virology 191: 502-505.

- 11. Gu J, Gong E, Zhang B, Zheng J, Gao Z, et al. (2005) Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. J Exp Med 202: 415-424.
- 12. Morfopoulou S, Brown JR, Davies EG, Anderson G, Virasami A, et al. (2016) Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal Encephalitis. N Engl J Med 375: 497-498.
- 13. Turgay C, Emine T, Ozlem K, Muhammet SP, Haydar AT (2015) A rare cause of acute flaccid paralysis: Human coronaviruses. J Pediatr Neurosci 10: 280-281.
- Li Y, Li H, Fan R, Wen B, Zhang J, et al. (2016) Coronavirus Infections in the Central Nervous System and Respiratory Tract Show Distinct Features in Hospitalized Children. Intervirology 59: 163-169.
- Algahtani H, Subahi A, Shirah B (2016) Neurological Complications of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: A Report of Two Cases and Review of the Literature. Case Rep Neurol Med 2016: 3502683.
- Arabi YM, Harthi A, Hussein J, Bouchama A, Johani S, et al. (2015) Severe neurologic syndrome associated with Middle East respiratory syndrome corona virus (MERS-CoV). Infection 43: 495-501.
- Principi N, Bosis S, Esposito S (2010) Effects of coronavirus infections in children. Emerg Infect Dis 16: 183-188.
- 18. Gu J, Korteweg C (2007) Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. Am J Pathol 170: 1136-1147.
- 19. Tsai LK, Hsieh ST, Chang YC (2005) Neurological manifestations in severe acute respiratory syndrome. Acta Neurol Taiwan 14: 113-119.
- Yeh EA, Collins A, Cohen ME, Duffner PK, Faden H (2004) Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. Pediatrics 113: e73-76.
- 21. Lau KK, Yu WC, Chu CM, Lau ST, Sheng B, et al. (2004) Possible central nervous system infection by SARS coronavirus. Emerg Infect Dis 10: 342-344.

- 22. Cristallo A, Gambaro F, Biamonti G, Ferrante P, Battaglia M, et al. (1997) Human coronavirus polyadenylated RNA sequences in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. New Microbiol 20: 105-114.
- Jacomy H, St-Jean JR, Brison E, Marceau G, Desforges M, et al. (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.
- 24. Jacomy H, Fragoso G, Almazan G, Mushynski WE, Talbot PJ (2006) Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. Virology 349: 335-346.
- 25. St-Jean JR, Desforges M, Talbot PJ (2006) Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. Adv Exp Med Biol 581: 499-502.
- Arbour N, Cote G, Lachance C, Tardieu M, Cashman NR, et al. (1999) Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. J Virol 73: 3338-3350.
- 27. Fazzini E, Fleming J, Fahn S (1992) Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease. Mov Disord 7: 153-158.
- Sibley WA, Bamford CR, Clark K (1985) Clinical viral infections and multiple sclerosis. Lancet 1: 1313-1315.
- 29. Johnson-Lussenburg CM, Zheng Q (1987) Coronavirus and multiple sclerosis: results of a case/control longitudinal serological study. Adv Exp Med Biol 218: 421-429.
- Do Carmo S, Jacomy H, Talbot PJ, Rassart E (2008) Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. J Neurosci 28: 10330-10338.
- 31. Brison E, Jacomy H, Desforges M, Talbot PJ (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.

- Brison E, Jacomy H, Desforges M, Talbot PJ (2014) Novel treatment with neuroprotective and antiviral properties against a neuroinvasive human respiratory virus. J Virol 88: 1548-1563.
- 33. Le Coupanec A, Desforges M, Meessen-Pinard M, Dube M, Day R, et al. (2015) Cleavage of a Neuroinvasive Human Respiratory Virus Spike Glycoprotein by Proprotein Convertases Modulates Neurovirulence and Virus Spread within the Central Nervous System. PLoS Pathog 11: e1005261.
- 34. Perlman S, Jacobsen G, Afifi A (1989) Spread of a neurotropic murine coronavirus into the CNS via the trigeminal and olfactory nerves. Virology 170: 556-560.
- 35. 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.
- 36. Barnett EM, Perlman S (1993) The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. Virology 194: 185-191.
- 37. van Riel D, Verdijk R, Kuiken T (2015) The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. J Pathol 235: 277-287.
- Mori I (2015) Transolfactory neuroinvasion by viruses threatens the human brain. Acta Virol 59: 338-349.
- Jacomy H, Talbot PJ (2003) Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. Virology 315: 20-33.
- 40. Jean A, Quach C, Yung A, Semret M (2013) Severity and outcome associated with human coronavirus OC43 infections among children. Pediatr Infect Dis J 32: 325-329.
- Lee J, Storch GA (2014) Characterization of human coronavirus OC43 and human coronavirus NL63 infections among hospitalized children <5 years of age. Pediatr Infect Dis J 33: 814-820.
- 42. Charles PC, Walters E, Margolis F, Johnston RE (1995) Mechanism of neuroinvasion of Venezuelan equine encephalitis virus in the mouse. Virology 208: 662-671.

- 43. Rochel S, Margolis FL (1980) The response of ornithine decarboxylase during neuronal degeneration and regeneration in olfactory epithelium. J Neurochem 35: 850-860.
- 44. St-Jean JR, Jacomy H, Desforges M, Vabret A, Freymuth F, et al. (2004) Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. J Virol 78: 8824-8834.
- 45. Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mork SJ (2003) Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. J Child Neurol 18: 851-866; discussion 867.
- 46. Favreau DJ, Desforges M, St-Jean JR, Talbot PJ (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.
- 47. Hill DP, Robertson KA (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.
- Bosch BJ, de Haan CA, Rottier PJ (2004) Coronavirus spike glycoprotein, extended at the carboxy terminus with green fluorescent protein, is assembly competent. J Virol 78: 7369-7378.
- 49. Verheije MH, Hagemeijer MC, Ulasli M, Reggiori F, Rottier PJ, et al. (2010) The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. J Virol 84: 11575-11579.
- 50. Sims AC, Baric RS, Yount B, Burkett SE, Collins PL, et al. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. J Virol 79: 15511-15524.
- 51. Sola I, Alonso S, Zuniga S, Balasch M, Plana-Duran J, et al. (2003) Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. J Virol 77: 4357-4369.

- 52. Das Sarma J, Scheen E, Seo SH, Koval M, Weiss SR (2002) Enhanced green fluorescent protein expression may be used to monitor murine coronavirus spread in vitro and in the mouse central nervous system. J Neurovirol 8: 381-391.
- 53. Desforges M, Desjardins J, Zhang C, Talbot PJ (2013) The acetyl-esterase activity of the hemagglutinin-esterase protein of human coronavirus OC43 strongly enhances the production of infectious virus. J Virol 87: 3097-3107.
- Mounir S, Talbot PJ (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.
- 55. Alfson KJ, Avena LE, Beadles MW, Staples H, Nunneley JW, et al. (2015) Particle-to-PFU ratio of Ebola virus influences disease course and survival in cynomolgus macaques. J Virol 89: 6773-6781.
- 56. Zurbach KA, Moghbeli T, Snyder CM (2014) Resolving the titer of murine cytomegalovirus by plaque assay using the M2-10B4 cell line and a low viscosity overlay. Virol J 11: 71.
- 57. Juarez D, Long KC, Aguilar P, Kochel TJ, Halsey ES (2013) Assessment of plaque assay methods for alphaviruses. J Virol Methods 187: 185-189.
- 58. Watanabe T, Horikawa Y, Sato K, Saito H (1982) Methylcellulose media for plaque assay of murine leukemia virus. J Clin Microbiol 16: 542-544.
- 59. Frana MF, Behnke JN, Sturman LS, Holmes KV (1985) Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. J Virol 56: 912-920.
- 60. Taguchi F (1993) Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. J Virol 67: 1195-1202.
- Follis KE, York J, Nunberg JH (2006) Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. Virology 350: 358-369.

- 62. de Haan CA, Haijema BJ, Schellen P, Wichgers Schreur P, te Lintelo E, et al. (2008) Cleavage of group 1 coronavirus spike proteins: how furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation. J Virol 82: 6078-6083.
- 63. Biswas K, Das Sarma J (2014) Effect of microtubule disruption on neuronal spread and replication of demyelinating and nondemyelinating strains of mouse hepatitis virus in vitro. J Virol 88: 3043-3047.
- 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.
- 65. Krempl C, Schultze B, Herrler G (1995) Analysis of cellular receptors for human coronavirus OC43. Adv Exp Med Biol 380: 371-374.
- Vlasak R, Luytjes W, Spaan W, Palese P (1988) Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 4526-4529.
- Wentworth DE, Holmes KV (2001) Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): influence of N-linked glycosylation. J Virol 75: 9741-9752.
- 68. de Groot RJ (2006) Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. Glycoconj J 23: 59-72.
- 69. Smits SL, Gerwig GJ, van Vliet AL, Lissenberg A, Briza P, et al. (2005) Nidovirus sialate-O-acetylesterases: evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes. J Biol Chem 280: 6933-6941.
- 70. Rottier PJ (1990) Background paper. Coronavirus M and HE: two peculiar glycoproteins. Adv Exp Med Biol 276: 91-94.
- Vlasak R, Luytjes W, Leider J, Spaan W, Palese P (1988) The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylesterase activity. J Virol 62: 4686-4690.

- 72. Meessen-Pinard M, Le Coupanec A, Desforges M, Talbot PJ (2016) Pivotal role of RIP1 and MLKL in neuronal cell death induced by the human neuroinvasive coronavirus OC43. J Virol.
- Taylor MP, Enquist LW (2015) Axonal spread of neuroinvasive viral infections. Trends Microbiol 23: 283-288.
- 74. Pasick JM, Kalicharran K, Dales S (1994) Distribution and trafficking of JHM coronavirus structural proteins and virions in primary neurons and the OBL-21 neuronal cell line. J Virol 68: 2915-2928.
- 75. Taylor MP, Kramer T, Lyman MG, Kratchmarov R, Enquist LW (2012) Visualization of an alphaherpesvirus membrane protein that is essential for anterograde axonal spread of infection in neurons. MBio 3.
- Saksena MM, Wakisaka H, Tijono B, Boadle RA, Rixon F, et al. (2006) Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons. J Virol 80: 3592-3606.
- 77. Howard PW, Wright CC, Howard T, Johnson DC (2014) Herpes simplex virus gE/gI extracellular domains promote axonal transport and spread from neurons to epithelial cells. J Virol 88: 11178-11186.
- Bauer A, Nolden T, Schroter J, Romer-Oberdorfer A, Gluska S, et al. (2014) Anterograde glycoprotein-dependent transport of newly generated rabies virus in dorsal root ganglion neurons. J Virol 88: 14172-14183.
- 79. De Regge N, Nauwynck HJ, Geenen K, Krummenacher C, Cohen GH, et al. (2006) Alpha-herpesvirus glycoprotein D interaction with sensory neurons triggers formation of varicosities that serve as virus exit sites. J Cell Biol 174: 267-275.
- 80. Sattentau QJ (2011) The direct passage of animal viruses between cells. Curr Opin Virol 1: 396-402.
- Bender SJ, Phillips JM, Scott EP, Weiss SR (2010) Murine coronavirus receptors are differentially expressed in the central nervous system and play virus strain-dependent roles in neuronal spread. J Virol 84: 11030-11044.

- 82. Vijgen L, Keyaerts E, Moes E, Maes P, Duson G, et al. (2005) Development of onestep, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. J Clin Microbiol 43: 5452-5456.
- 83. Lambert F, Jacomy H, Marceau G, Talbot PJ (2008) Titration of human coronaviruses using an immunoperoxidase assay. J Vis Exp.
- Li Z, Michael IP, Zhou D, Nagy A, Rini JM (2013) Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 5004-5009.

Publication n°4

Coronavirus respiratoires humains neurotropes: une relation ambigüe entre neurovirulence et clivage protéique

Pierre Talbot, Marc Desforges, Mathieu Dubé, Alain Le Coupanec

Les auteurs ont tous contribué à l'écriture de cet article qui était basée presque exclusivement sur les résultats du projet de recherche d'Alain Le Coupanec

Le système nerveux central (SNC) est un système biologique complexe responsable de la coordination des interactions avec l'environnement extérieur et de la communication rapide entre les différentes parties du corps afin d'assurer le maintien de l'homéostasie. Bien qu'il soit très bien protégé par divers mécanismes, le SNC n'est toutefois pas à l'abri d'infections microbiennes (aiguës ou persistantes), en particulier d'origine virale. Parmi ces virus qui atteignent le SNC où ils peuvent infecter diverses cellules et participer au développement ou à l'exacerbation de maladies neurologiques, les coronavirus humains (HCoV) sont particulièrement intéressants.

Les Coronavirus : pathogènes respiratoires opportunistes

Parmi les divers virus respiratoires, les HCoV sont ubiquitaires et circulent constamment dans différentes régions du monde. Aujourd'hui, quatre souches différentes ont été identifiées : HCoV-OC43, -229E, -NL63 et HKU1 et sont reconnues comme des pathogènes des voies respiratoires supérieures associés au développement de rhinites, laryngites et otites. Dans certaines situations, ces virus adoptent un comportement opportuniste et peuvent infecter les voies respiratoires inférieures causant bronchites, bronchiolites ou pneumopathies diverses, incluant l'exacerbation d'asthme et la pneumonie, principalement chez les nouveau-nés, les jeunes enfants, les personnes âgées et les individus immunodéprimés (Vabret *et al.*, 2009a). Deux autres coronavirus émergents peuvent aussi infecter l'humain et causer des syndromes de détresse respiratoire graves : le SARS-CoV, agent étiologique du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) ayant causé la première épidémie du 21^e siècle en 2002-2003, et le MERS-CoV, découvert en septembre 2012 dans la péninsule arabique (Desforges *et al.*, 2014b).

Des virus respiratoires neuroinvasifs et neurotropes à potentiel neurovirulent

Les HCoV ne sont pas confinés qu'aux voies respiratoires et peuvent atteindre le SNC (Arbour et al., 2000), possiblement via l'exploitation de nerfs connectant les voies respiratoires à l'encéphale, comme le nerf olfactif. En effet, suite à une infection par la voie intranasale utilisant un modèle murin, nous avons pu mettre en évidence que la souche HCoV-OC43 atteint l'encéphale où il se dissémine, d'abord au niveau du bulbe olfactif puis dans plusieurs régions du cerveau et de la moelle épinière (Le Coupanec et al., 2015) (Figure 1). L'association directe entre les HCoV et les neuropathologies n'est pas établie à grande échelle mais de récents cas d'encéphalites soulignent ce potentiel pour HCoV-OC43 (S. Morfopoulou, J.R. Brown, E.G. Davies, G. Anderson, A. Virasami, W. Qasim, W.K. Chong, M. Hubank, V. Plagnol, M. Desforges, T.S. Jacques, P.J. Talbot, J. Breuer 2016, Yeh et al., 2004), l'une des souches les plus prévalentes étant à l'origine du tiers des infections des voies respiratoires supérieures. De plus, la détection de l'ARN viral des souches -OC43 et -229E, (OC43 de facon plus significative chez les personnes atteintes de sclérose en plaques comparées aux témoins) et de virus infectieux du SARS-CoV dans les cerveaux humains confirme hors de tout doute les capacités neuroinvasives naturelles des HCoV (Desforges et al., 2013b, Gu et al., 2005a).

Figure 1: Modèle de neuroinvasion par le nerf olfactif et dissémination dans le système nerveux central. Après injection intranasale dans des souris susceptibles, les deux virus sont capables de se rendre dans le cerveau par l'intermédiaire des neurones récepteurs olfactifs, et donc du nerf olfactif formé par les axones de ces derniers (en rouge). C'est dans les glomérules (cercles verts), que les terminaisons axonales des neurones récepteurs olfactifs font synapses avec les dendrites d'autres neurones allant directement jusqu'au système limbique (rectangle rouge), constitué de différentes structures, dont l'hippocampe. Les premières étapes de la propagation virale sont identiques entre les deux virus. En effet, après passage par le nerf olfactif, les virus vont jusqu'au système limbique et envahissent par la suite différentes régions du cerveau, avant de se propager vers et dans la moelle épinière. A ce stade, le virus de référence (trajet en bleu) se rend efficacement à la moelle épinière où il se réplique alors que l'efficacité d'infection de la moelle épinière par le virus G758 (trajet en marron) est altérée et dépend de la voie d'injection.



La glycoprotéine S : un facteur de neurovirulence

La glycoprotéine S, l'un des acteurs principaux de l'entrée des coronavirus, est aussi un facteur de neurovirulence important chez ces virus et en particulier pour HCoV-OC43 (P. J. Talbot *et al.*, 2011). Il est donc plausible que des mutations dans certains domaines importants de cette protéine influencent l'interaction du virus avec son hôte. Nous avons d'ailleurs déjà montré que l'infection persistante de lignées neurales humaines par la souche OC43 mène à l'acquisition de mutations dans cette glycoprotéine, provoquant un changement de neuropathologies chez la souris (Desforges *et al.*, 2014b).

Toutes les études menées sur HCoV-OC43 en laboratoire utilisent une souche virale de référence amplifiée à partir d'un isolat datant des années 1960, nommé ATCC. L'étude sur la variabilité génétique de ce virus au niveau de la protéine S sur plus de 60 isolats cliniques nous a permis d'identifier des différences prépondérantes au niveau du gène correspondant à cette protéine. Bien qu'une multitude de mutations aient été trouvées, seules quelques-unes se sont avérées conservées parmi les échantillons cliniques et une en particulier, la substitution d'une glycine pour une arginine (G758R), a attiré notre attention de par la création d'un site potentiel optimal de clivage par des protéases cellulaires importantes durant l'infection par certains coronavirus (Le Coupanec *et al.*, 2015, Millet *et al.*, 2015). En utilisant un clone moléculaire infectieux, nous avons montré qu'un virus portant cette mutation dans la protéine S envahit l'encéphale murin tout comme le virus ATCC de référence. Néanmoins, la mutation G758R atténue le virus possiblement parce qu'il atteint la moelle épinière moins efficacement (Figure 1). Cette réduction de neurovirulence représente vraisemblablement une adaptation permettant une survie accrue de l'hôte.

Clivage protéolytique de la glycoprotéine S

Le site de clivage optimal créé par la mutation G758R se situe à la jonction des deux sous-unités S1 et S2 de la protéine S. Le clivage protéolytique par des protéases cellulaires comme les proprotéines convertases (PC) est un processus d'activation typique des protéines de fusion de type I comme la protéine S qui permet l'exposition rapide du peptide hydrophobe dans des compartiments cellulaires propices à la fusion des membranes virales et cellulaires. Plusieurs études portant sur les coronavirus suggèrent d'ailleurs que les PC (ou d'autres protéases telles les cathepsines ou les *cell surface transmembrane protease/serine*; TMPRSS) sont importantes pour l'entrée du virus dans les cellules hôtes et/ou pour le transport des virions nouvellement assemblés via la voie sécrétoire de la cellule infectée (Millet *et al.*, 2015). Notre étude basée sur la séquence de la glycoprotéine S des isolats cliniques démontre que le variant G758R est clivé plus efficacement que le virus ATCC et que cette simple substitution d'une glycine par une arginine à la position 758 suffit à
activer le site de clivage sous-optimal présent chez le virus ATCC. Malgré l'implication de cette protéine dans l'entrée virale, l'altération de la morphologie de la couronne des virions que nous avons observée (Figure 2), probablement associée au clivage de la protéine S, ne module pas l'infectivité du virus. De plus, bien que nous ayons pu mettre en évidence une corrélation inusitée entre l'atténuation de la neurovirulence et l'introduction d'un site de clivage protéolytique optimal, cette mutation n'affecte en rien les capacités neuroinvasives du virus. Cette corrélation a déjà été suggérée pour un coronavirus félin, mais il s'agit d'une première dans le cas d'un coronavirus humain. Cette découverte est d'autant plus importante qu'habituellement, ce type de clivage de la protéine S chez les coronavirus, est généralement associé à une virulence exacerbée associée à une propagation plus efficace du virus chez l'hôte infecté.

Conclusion

Bien qu'étant des pathogènes respiratoires, nous savons depuis plus d'une décennie maintenant que les coronavirus humains sont naturellement neuroinvasifs et neurotropes. Nos plus récents résultats mettent en lumière que le HCoV-OC43, une des souches circulantes les plus prévalentes, possède également un potentiel neurovirulent associé, au moins en partie, à la conformation de la glycoprotéine virale S qui peut ou non subir un clivage protéolytique. Toutefois, il appert que le clivage de cette protéine représente une adaptation avantageuse pour le HCoV-OC43 puisqu'elle limite les conséquences néfastes de l'infection au niveau du SNC. En effet, ce virus moins "agressif" induit peu de symptômes neurologiques et n'a que peu d'impact sur la survie à court terme des souris et il est donc possible que cette adaptation favorise l'établissement d'une infection virale persistante au niveau du SNC. Les souris chroniquement infectées par OC43 développent couramment des neuropathologies à long terme. On peut donc penser que la diminution de la virulence à court terme de la souche OC43 en particulier et des coronavirus humains en général, en cours d'évolution, pourrait survenir au prix de l'augmentation collatérale de son potentiel neurodégénératif sur une longue période. Par conséquent, au vu des capacités neuroinvasives des HCoV chez l'humain, il est plausible de penser qu'un virus respiratoire apparemment inoffensif et circulant bon an mal an à travers le monde entier, pourrait s'établir et persister au niveau du SNC humain en étant potentiellement associées au développement ou à l'aggravation de maladies neurologiques comme la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, ou encore des encéphalites récurrentes. Des études approfondies permettant à la fois de mieux comprendre les processus adaptatifs des coronavirus humains neuroinvasifs et leur potentielle association à diverses conséquences neurologiques sont plus que jamais justifiées et nécessaires.

Figure 2: Modèle d'infection de cellule neuronale et de production de nouvelles particules virales par le coronavirus humain OC43. Lors d'une infection de cellule neuronale par la souche de référence (A) ou par le virus G758R (B), plusieurs étapes sont nécessaires à la création de nouveaux virions infectieux. 1) Tout d'abord, il y a reconnaissance de facteurs d'attachements/récepteur sur la cellule. 2) Par la suite, le virus pénètre dans la cellule par endocytose, ou par fusion directe à la membrane plasmique. 3) Après libération du matériel génomique dans le cytoplasme, la réplication commence et 4) l'assemblage des virions a lieu au sein du réticulum endoplasmique, puis de l'appareil de Golgi et 5) les nouvelles particules virales formées sont libérées dans le milieu extracellulaire par exocytose. Selon ce modèle (adapté à partir de la référence 10), le clivage de la glycoprotéine S du virus G758R a lieu à l'étape 5. Plusieurs protéases pourraient cliver cette glycoprotéine. La furine (ou autres PC) (ciseaux noirs) et les sérines protéases transmenbranaire (TMPRSS : ciseaux verts) cliveraient plutôt la protéine au moment de l'exocytose. La trypsine (ciseaux rouges), présente dans le milieu extracellulaire, pourrait cliver la protéine S une fois le virus excrété de la cellule. Les panneaux C (« forme longue » de la protéine S non clivée) et D (« forme courte » de la protéine clivée) correspondent à des images de microscopie électronique à transmission du virus de référence et du virus G758R respectivement.



Références

1. Vabret A, Dina J, Brison E, *et al.* [Human coronaviruses]. *Pathol Biol (Paris)* 2009; 57: 149-60.

2. Desforges M, Le Coupanec A, Stodola JK, *et al.* Human coronaviruses: viral and cellular factors involved in neuroinvasiveness and neuropathogenesis. *Virus Res* 2014; 194: 145-58.

3. Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J Virol* 2000; 74: 8913-21.

4. Le Coupanec A, Desforges M, Meessen-Pinard M, *et al.* Cleavage of a Neuroinvasive Human Respiratory Virus Spike Glycoprotein by Proprotein Convertases Modulates Neurovirulence and Virus Spread within the Central Nervous System. *PLoS Pathog* 2015;
11: e1005261.

5. Morfopoulou S, J.R. Brown, E.G. Davies, G. Anderson, A. Virasami, W. Qasim, W.K. Chong, M. Hubank, V. Plagnol, M. Desforges, T.S. Jacques, P.J. Talbot, J. Breuer Coronavirus HCoV-OC43 associated with fatal encephalitis. *New England Journal of Medicine* 2016.

6. Yeh EA, Collins A, Cohen ME, *et al.* Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* 2004; 113: e73-6.

7. Desforges M, Favreau DJ, Brison E, *et al.* Human Coronaviruses. Respiratory Pathogens Revisited as Infectious Neuroinvasive, Neurtropic, and Neurovirulent Agents. In: Singh S.K. RD, ed. *Neuroviral Infections RNA Viruses and Retroviruses*. Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis, 2013: 93-121.

8. Gu J, Gong E, Zhang B, *et al.* Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med* 2005; 202: 415-24.

9. Talbot PJ, Desforges M, Brison E, Jacomy H. Coronaviruses as Encephalitis-inducing infectious agents. In: Tkachev S, ed. *Non-flavirus Encephalitis*: In-Tech, 2011: 185-202.

10. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* 2015; 202: 120-34.

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE

Le système nerveux (SN) est spécialisé dans la conduction, la transmission et le traitement des informations. Présent dans toutes les régions du corps humain, il représente le plus important moyen de communication de l'organisme. En conditions physiologiques normales, le SNC est un système très hermétique aux différents pathogènes. Par conséquent, les pathogènes seront très limités dans leur capacité à atteindre le SNC directement à moins d'un traumatisme lésionnel, d'un acte chirurgical ou dans le contexte d'une immunosuppression (Pulzova *et al.*, 2009). Les microorganismes ont donc dû s'adapter en élaborant des stratégies pour pouvoir entrer dans le SNC (McGavern *et al.*, 2011, Shrestha *et al.*, 2013). Certains virus peuvent entrer dans le SNC via l'épithélium des capillaires du cerveau, ou en utilisant la stratégie dite du "cheval de Troie", tandis que d'autres pourront entrer via le plexus choroïde, ou par les nerfs périphériques.

Il existe de nombreux pathogènes, qui, après avoir atteint le SNC, engendreront des conséquences très différentes selon l'hôte et la région infectée. Différents facteurs vont contribuer à l'augmentation de la sévérité de la maladie. Le virus lui-même est le principal acteur du type de maladie engendrée. En effet, ces derniers peuvent être impliqués dans des maladies neurologiques chez l'humain, soit comme point de départ dans l'induction de ces maladies ou comme facteur aggravant. Ces maladies provoquent généralement une détérioration du fonctionnement des cellules nerveuses, pouvant conduire à leur mort. D'autres facteurs comme la voie de l'infection, la capacité à persister et à se répliquer et la génétique de l'hôte vont influencer les neuropathologies.

Un des virus pouvant envahir naturellement le SNC humain est le HCoV-OC43, virus étudié durant cette thèse. Ce virus, appartenant au genre des β -coronavirus, a été isolé en 1967 (McIntosh *et al.*, 1967). Connue pour induire des infections respiratoires chez l'homme (S. H. Myint, 1995), HCoV-OC43 représente l'une des quatre souches de HCoV qui sont responsables d'environ 20% des rhumes annuels (S.H. Myint, 1994, Vabret *et al.*, 2005). (Gagneur *et al.*, 2002, Gerna *et al.*, 2006, Sizun *et al.*, 1993, Sizun *et al.*, 1995, Woo *et al.*, 2005). Bien que cette souche soit reconnue comme un virus respiratoire, c'est sa capacité à atteindre le SNC, à s'y répliquer, à s'y disséminer et à causer des pathologies au sein de ce système complexe qui ont attisé l'intérêt de notre laboratoire. En effet, ayant des propriétés neuroinvasives, neurotropes et neurovirulentes chez la souris, ce virus est reconnu comme étant un agent étiologique potentiel de différentes maladies neurologiques du SNC (Brison *et al.*, 2014, P. J. Talbot *et al.*, 2001).

Parmi les protéines structurales du virus, la glycoprotéine S est la protéine la plus étudiée et la mieux définie chez ce virus. Cette protéine transmembranaire de type I possède une multitude de rôles et fonctions au niveau de la structure du virion, du tropisme cellulaire et d'organe, ainsi que dans la pathogenèse (Dalziel et al., 1986, Fleming et al., 1987, Gallagher et al., 1990, Matsubara et al., 1991, Taguchi, 1995, F. I. Wang et al., 1992). De plus, elle est responsable de la liaison au récepteur (Dveksler et al., 1991, Yokomori et al., 1992) ainsi que de la fusion entre les membranes de cellules (fusion cellules-cellules) ou entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire (virus-cellules). Étant donné que la protéine S est impliquée dans une multitude de fonctions, des mutations acquises dans cette protéine pourraient avoir un rôle dans la neuroinvasion, le neurotropisme et la neurovirulence du HCoV-OC43, mais également dans la réponse immunitaire de l'hôte, favorisant ainsi le développement de maladies neurologiques chez l'humain. Par conséquent, nous nous sommes intéressés à cette glycoprotéine de surface S dans cette thèse.

Il a été démontré au sein du laboratoire du Dr Pierre Talbot, que la souche OC43 pouvait persister dans des lignées neurales humaines représentatives du SNC. Plusieurs mutations situées dans la glycoprotéine S ont été répertoriées suite à ces infections (St-Jean et al., 2006b). Parmi toutes les mutations ponctuelles acquises dans la glycoprotéine, quatre d'entre elles se sont avérées prépondérantes et ont été conservées à travers les passages cellulaires (St-Jean et al., 2006b). Ces mutations, D24Y, S83T, H183R et Y241H, ont été introduites dans un clone moléculaire infectieux (pBAC) afin de pouvoir étudier leur rôle dans la biologie du virus (St-Jean et al., 2006b). Ainsi, il a été mis en évidence que, en comparaison avec le virus de référence de HCoV-OC43 qui cause une encéphalite chez la souris ainsi qu'une inflammation et une dégénérescence neuronale (Jacomy et al., 2006, Jacomy et al., 2003), le virus mutant arborant les quatre mutations induit une encéphalite mais également une paralysie des membres postérieurs avec des lésions de démyélinisation dans la moelle épinière, et une accentuation de la mortalité des souris infectées (Jacomy et al., 2006, Jacomy et al., 2010, Jacomy et al., 2003). Ces mutations sont également à l'origine d'une dissémination accrue, d'une réplication virale augmentée et d'une neuroinflammation plus importante au sein du SNC (Jacomy et al., 2010). Néanmoins, ces mutations n'affectent pas le tropisme cellulaire du virus, et le neurone reste la cible principale (Jacomy et al., 2010).

Afin d'identifier les d'acides aminés dans la glycoprotéine S impliqués dans la propagation du virus vers et dans le SNC, nous avons comparé la séquence du gène codant pour la protéine S virale de la souche de référence du laboratoire HCoV-OC43 (ATCC VR-759) avec des séquences du gène S de virus détectés dans des isolats cliniques d'expectorations des voies respiratoires supérieures et inférieures de sept enfants, âgés de 3

à 36 mois, admis au CHU de Caen, France, en 2003 (Vabret *et al.*, 2006), ainsi qu'avec toutes les séquences de la protéine S trouvées dans la banque de données NCBI. Cette caractérisation a conduit à l'identification de mutations prédominantes, dont une se situe au niveau de l'acide aminé Gly758, qui introduit un site de clivage putatif de type furine RRSR↓R758 dans la protéine S virale au niveau de S1/S2. Toutefois, aucune mutation n'a pu être observée en comparaison au virus de référence de laboratoire au niveau du site de clivage putatif S2', dont la séquence KASSRS (site de clivage monobasique) représente un second site de clivage par les protéases cellulaires présent juste en amont d'un domaine de type « peptide de fusion » dans la protéine S.

Les protéases jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en activant ou désactivant des protéines par protéolyse. Une grande proportion de pathogènes incluant des virus humains ont évolué pour détourner l'activité des protéases cellulaires pour leur propre besoin. Les virus enveloppés dépendent du clivage de leur glycoprotéine pour leur fusion dans la cellule. Les protéases sont donc un déterminant important dans le type d'hôte, le tropisme cellulaire et tissulaire, et le potentiel pathogène de ces virus. Chez les coronavirus, la relation entre le clivage de la protéine S et la capacité à entrer dans la cellule est bien établie. Le clivage de la protéine S joue un rôle important dans la fusion, mais le lien entre la fusion virus-cellule et la pathogénicité n'est pas encore très clair. Comme préalablement mentionné, une des particularités de la protéine S des coronavirus est qu'elle contient plus d'un site de clivage (Masters, 2003). Le premier site de clivage identifié est localisé entre la partie S1 et S2 de la protéine S (appelé S1/S2) (Millet et al., 2015). Ce clivage, effectué par différentes protéases cellulaires comme les proprotéines-convertases (comme la furine), les cathepsines et les protéases à sérines transmembranaires (Transmembrane Serine Protease : TMPRSS), se produit chez la plupart des coronavirus tel que MHV, BCoV, SARS-CoV, MERS-CoV, IBV, HCoV-HKU1 et HCoV-229E (Belouzard et al., 2010, Bertram et al., 2013, Hasoksuz et al., 2002, Le Coupanec et al., 2015, Millet et al., 2015, Qian et al., 2013, Siu et al., 2014, Walls et al., 2016a). Plus récemment, un autre site de clivage a été caractérisé au niveau de la partie S2 du gène S (appelé S2'), en amont du peptide de fusion (Belouzard et al., 2009). Le clivage de ce site se fera généralement pendant les premières étapes d'infection (entrée virale). Il pourra être effectué par différentes protéases cellulaires comme pour le site S1/S2 (Millet et al., 2015). En fonction du coronavirus et de la cellule qu'il infecte, le clivage à ces différents sites peut se produire à différents stades du cycle réplicatif, par exemple, lors de l'entrée ou de la sortie des virions.

En ce qui concerne le HCoV-OC43, nous avons pu mettre en évidence différents niveaux de clivage de sa glycoprotéine S. Afin d'étudier le rôle de ces deux sites de clivages

putatifs (S1/S2 et S2'), nous avons réintroduit la mutation G758R, provenant des isolats cliniques, dans un clone infectieux pour former le virus mutant rOC/S_{G758R}, et nous avons introduit une mutation au niveau du site S2' (formant ainsi le virus mutant rOC/S_{R903A}), afin de bloquer son potentiel clivage. Nous avons pu observer qu'en culture de cellules neuronales, la glycoprotéine S du virus mutant rOC/S_{G758R} est clivée au niveau S1/S2 de manière beaucoup plus significative comparativement au virus de référence. Ce clivage est plus facilement détecté dans le virus présent dans le surnageant cellulaire, mais est à peine détectable dans la portion associée aux cellules. Ceci suggère que le clivage à S1/S2 pourrait se produire au cours des derniers stades de l'infection, probablement pendant l'assemblage ou la sortie des particules virales, comme cela a été déjà démontré pour les virus du MERS-CoV (Millet et al., 2014a) et MHV (Frana et al., 1985). Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence le clivage de la protéine S du virus mutant rOC/S_{R903A}, dû au fait que l'infection de cellule par ce mutant ne produit que très peu de particules virales infectieuses, et donc très peu de protéines S, nous avons pu observer que le virus de référence produisait une bande de taille intermédiaire de la protéine S, correspondant possiblement au site S2'. Ce site de clivage potentiel à S2', précédemment prédit (Millet et al., 2015, Simmons et al., 2005), pourrait être utilisé par d'autres protéases cellulaires, dont la trypsine, les TMPRSS et les cathepsines(Belouzard et al., 2012, Heald-Sargent et al., 2012, Millet et al., 2014a, Seidah et al., 2012), comme pour d'autres coronavirus.

Le clivage de la glycoprotéine S a également été démontré pour d'autres coronavirus. La glycoprotéine S du virus du SARS-CoV est la plus étudiée et sert de modèle pour étudier le clivage de plusieurs coronavirus ainsi que les différentes protéases impliquées dans ce processus. Il a été montré que de nombreuses protéases cellulaires pouvaient permettre l'entrée médiée par la glycoprotéine S et que la plupart agissent sur le virus en dehors de la cellule. Il est important de noter que pour le SARS-CoV, le clivage se fait de manière séquentielle. En effet, le clivage de S1/S2 se produirait en premier, permettant ainsi le clivage subséquent à S2'. Ce deuxième clivage est considéré comme crucial pour l'activation de la glycoprotéine S. Le MERS-CoV, un virus récemment émergé du Moyen-Orient, est associé à une pneumonie sévère avec un taux élevé de létalité. Il est un autre exemple d'un coronavirus dont la glycoprotéine S peut être activée par une multitude de protéases. Les TMPRSS ainsi que les cathepsines endosomales ont la capacité d'activer la glycoproteine S pour la fusion virus-cellule (Cho *et al.*, 2013). L'entrée de ce virus médiée par les TMPRSS serait 100 fois plus efficace que l'entrée impliquant la voie endosomale, comme montrée pour le virus SARS-CoV (Shirato *et al.*, 2013).

Par la suite, nous avons tenté de déterminer le type de protéases qui pourraient cliver cette glycoprotéine, au niveau des sites S1/S2 et S2'. En utilisant des peptides synthétiques contenant les différentes séquences des sites de clivages, ainsi que des inhibiteurs

chimiques dirigés contre les proprotéines-convertases, nous avons pu mettre en évidence que la furine était capable de cliver très efficacement le site S1/S2 du virus mutant rOC/S_{G758R}, mais pas celui du virus de référence. D'autres proprotéines-convertases additionnelles, comme PACE4 et PC5/6, peuvent cliver cette protéine S mutante mais moins efficacement que la furine. Bien que les cathepsine B et L sont capables de cliver le site S2', la cathepsine L pourrait être la protéase privilégiée pour ce site puisque cette dernière clive moins efficacement le peptide contenant le site S2' mutant (KASSAS) que le peptide contenant le site S2' mutant de cette cathepsine lors d'une infection par la souche OC43.

Le clivage des glycoprotéines d'enveloppe est une caractéristique commune des protéines de classe I comme la glycoprotéine S des coronavirus. Dépendamment du lieu et du type de clivage, ce processus va régir la facon dont le coronavirus va entrer dans la cellule. En effet, l'entrée virale repose sur l'interaction entre le virus et la cellule hôte et celle des virus enveloppés peut se faire via deux mécanismes distincts: soit par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule cible (fusion virus-cellule), ou par la fusion des membranes plasmiques entre des cellules adjacentes (fusion cellule-cellule). Certains virus comme HSV, le virus de sendai et le VIH sont capables de délivrer leur génome dans le cytoplasme de la cellule par fusion directe à la membrane plasmique (Fuller et al., 1987, Okada, 1969, Permanyer et al., 2010). En revanche, d'autres virus comme le RSV et le virus d'Ebola, requièrent un processus protéolytique pour réaliser leur fusion en dehors des endosomes (Krzyzaniak et al., 2013, Zimmer et al., 2001). En effet, la fusion de la membrane virale avec la membrane des endosomes est déclenchée par des changements conformationnels de leurs glycoprotéines. Ces changements peuvent être initiés par un abaissement du pH et/ou une activation protéolytique. Les coronavirus ont des mécanismes d'entrée assez complexes qui diffèrent selon les souches. Il a d'abord été démontré que l'entrée du SARS-CoV dans la cellule pouvait se faire par une fusion directement à la membrane plasmique de la cellule (Ng et al., 2003, Qinfen et al., 2004, Simmons et al., 2004). Plusieurs études ont également mis en évidence que ce virus pouvait utiliser la variation du pH endosomale (Yang et al., 2004), ainsi que certaines protéases comme la cathepsines L (I. C. Huang et al., 2006b, Simmons et al., 2005) pour entrer dans la cellule, ce qui tend à démontrer que ce virus pourrait utiliser la voie d'endocytose. Comme pour le SARS-CoV, le MERS-CoV est un virus zoonotique transmis de l'animal à l'humain (Hemida et al., 2017). Il entre dans la cellule via les deux voies distinctes : soit par endocytose en utilisant la cathepsine L et un abaissement du pH, soit par fusion à la membrane plasmique (Qian et al., 2013, Shirato et al., 2013). Le SARS-CoV, tout comme le MERS-CoV et le HCoV-229E, est capable de fusionner directement à la surface cellulaire en

présence de certaines protéases. Cette voie d'entrée est plus efficace que la voie endosomale (Matsuyama *et al.*, 2005).

Le nombre et la morphologie des molécules de glycoprotéine S des virions peuvent moduler l'infectivité de différents virus à ARN ayant une glycoprotéine de fusion de classe I (Finzi et al., 2010, McKeating et al., 1991, Peeples et al., 1984, Shulla et al., 2009). Dans le cas de la souche OC43, nous avons pu mettre en évidence que le clivage au niveau de S1/S2 pouvait altérer la couronne du virus formée de sa glycoprotéine S. Par conséquent, sachant que cette protéine est impliquée dans la liaison au récepteur et dans l'entrée virale, un clivage au niveau de S1/S2 et S2' pourrait moduler l'infectivité de ce virus. Dans notre cas, un clivage à S1/S2 ou à S2', ne semble pas moduler l'infectivité de OC43 à l'inverse du virus de MERS-CoV (Gierer et al., 2015). Les coronavirus utilisent différentes protéases pour entrer dans la cellule, ainsi qu'une acidification endosomale, ainsi que l'utilisation de différentes protéases comme les cathepsines présentes dans les endosomes tardifs (Belouzard et al., 2009, Gierer et al., 2013, I. C. Huang et al., 2006b, Kawase et al., 2009, Qian et al., 2013, Qiu et al., 2006, Regan et al., 2008, Simmons et al., 2011, Simmons et al., 2005), la furine dans les endosomes précoces (Burkard et al., 2014, Yamada et al., 2009b) et les TMPRSS (Bertram et al., 2013, Gierer et al., 2013, Glowacka et al., 2011, Kawase et al., 2009, Shulla et al., 2011) pour entrer en fusionnant à la membrane plasmique de la cellule. Par conséquent, un clivage de la protéine S pourrait moduler la voie d'entrée du virus, ainsi que ses conséquences au niveau de SNC. Des études sur l'entrée virale nous suggèrent qu'un site S1/S2 non clivé et un site S2' clivé serait la meilleure combinaison pour permettre au HCoV-OC43 de rentrer efficacement dans la cellule. En effet, bien que tous les virus soient capables d'entrer dans la cellule en utilisant la voie endosomale, seuls les virus non clivés au site S1/S2 semblent pouvoir entrer efficacement par fusion à la membrane plasmique de la cellule. De telles différences dans les voies d'entrées peuvent avoir plusieurs conséquences majeures sur l'infection du SNC en modulant la neuroinvasion, le neurotropisme et la neurovirulence induite par le virus.

Il est maintenant connu que l'état de clivage de la glycoprotéine S des coronavirus va moduler l'infection au niveau cellulaire. De plus, la présence de certaines protéases pourrait permettre au virus d'élargir son tropisme cellulaire initial. En effet, il a été suggéré pour le coronavirus IBV que le clivage au site S2' pourrait probablement permettre à la souche Beaudette d'élargir son tropisme tissulaire et cellulaire (Millet *et al.*, 2015). De ce fait, nous avons voulu étudier l'effet du/des clivages de la glycoprotéine S dans un modèle murin. Nous avons déjà démontré au laboratoire que le modèle murin est un modèle permettant d'étudier les conséquences neurologiques du coronavirus OC43 (Brison *et al.*, 2011, Jacomy *et al.*, 2010, Le Coupanec *et al.*, 2015). De ce fait, nous avons dans un premier temps regardé

l'effet des clivages de S dans la neuroinvasion chez la souris, qui se caractérise par la capacité d'un pathogène à envahir le SNC à partir de la périphérie (voir chapitre 1.5.1 de cette thèse). Nous connaissons déjà le caractère neuroinvasif de la souche OC43. Les principales démonstrations de sa neuroinvasion chez l'humain proviennent de la détection de son ARN dans des cerveaux post-mortem (Arbour *et al.*, 2000), et d'anticorps dans le LCR (Fazzini *et al.*, 1992). L'utilisation d'un modèle murin a permis de mieux définir son mécanisme de neuroinvasion (Dubé *et al*, soumis). En effet, lorsqu'il est injecté par voie intranasale chez la souris, le virus va atteindre le SNC dans lequel il va se propager (Desforges *et al.*, 2013a, Jacomy *et al.*, 2003, Le Coupanec *et al.*, 2015).

Nous avons pu démontrer que les clivages ne modulaient pas le pourcentage de neuroinvasion comparativement au virus de référence suggérant que l'état de clivage de cette protéine n'est pas essentiel à l'atteinte du SNC. En revanche, il est important de noter que le niveau d'ARN viral quantifié dans les cerveaux n'est pas identique entre les virus. Une plus grande quantité de copies d'ARN viral est détectée pour le virus de référence que pour le mutant rOC/S_{G758R}, et significative pour le mutant rOC/S_{R903A}. Cette différence pourrait être due à une modulation de la vitesse d'atteinte du SNC par le clivage au niveau S2'. Le virus de référence pourrait atteindre plus rapidement le SNC que le mutant rOC/S_{G758R}, qui serait lui-même plus rapide que le mutant rOC/S_{R903A}. Cette différence pourrait également résulter d'un défaut de réplication et de propagation dans le cerveau des souris observé suite à l'infection par voie intracérébrale, et interviendrait donc après l'atteinte du SNC. Nous avons pu montrer que les trois virus peuvent atteindre le SNC après avoir infecté les neurones olfactifs sensoriels (OSN) et passer à travers le nerf olfactif, indiquant que le clivage au niveau S1/S2 ou S2' ne modifie pas le tropisme cellulaire, même s'il a été suggéré que le MERS-CoV était capable d'infecter différentes cellules respiratoires exprimant diverses protéases qui activeraient la protéine S au niveau du site S2' (Millet et al., 2014). D'autre part, la diminution de l'efficacité de l'infection par OSN peut indiquer un problème d'entrée virale dans les cellules sensibles pour les virus mutants S1/S2 et S2 '. En effet, il se pourrait que les cellules olfactives sensorielles activent des voies d'apoptose pour empêcher le virus de passer par le nerf olfactif et d'atteindre le SNC. Ce genre de phénomène a pu être observé pour le virus de l'influenza. Après infection par la souche R404BP hautement pathogène, l'infection des OSN a permis une expression à la hausse des molécules de ligand FAS, activant les voies d'apoptose (I. Mori et al., 2002).

La principale voie de neuroinvasion pour atteindre le SNC implique les nerfs périphériques, comme le nerf olfactif (Debby van Riel, 2017, I Mori, 2015a), qui fait le lien entre l'épithélium olfactif (par les neurones sensoriels olfactifs) et le bulbe olfactif au niveau de l'encéphale, et représente le chemin le plus court par lequel un virus peut atteindre le SNC. Il se pourrait que le virus de référence emprunte d'autres nerfs, comme le nerf

voméronasal, impliqué dans la détection des phéromones, de même que les nerfs lingual et trijumeau, qui pourraient servir d'accès au virus pour aller jusqu'au SNC, comme le font les virus HSV-1 (Flowerdew *et al.*, 2013), VZV (Gilden *et al.*, 2015), VSV (Detje *et al.*, 2009), influenza A (C. H. Park *et al.*, 2002) ainsi que le virus de la maladie Borna (I. Mori *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré au laboratoire que le virus de référence HCoV-OC43 pouvait infecter les cellules épithéliales respiratoires dans un modèle murin (données non publiées de Marc Desforges). Bien que les clivages de la protéine S ne changent pas le tropisme viral au niveau des cellules sensorielles olfactives, il se pourrait qu'ils soient à l'origine d'un changement de tropisme cellulaire au niveau de l'épithélium respiratoire, permettant ainsi au virus d'infecter les OSN et d'envahir le SNC plus ou moins rapidement.

Les pathogènes peuvent également entrer dans le SNC par la voie hématogène en utilisant des cellules comme véhicule. En effet, le HCoV-229E et le SARS-CoV ont la capacité d'infecter des monocytes en culture, ce qui pourrait leur conférer un moyen d'entrer au SNC (Collins, 2002, Law *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que le HCoV-OC43 n'a pas la capacité d'infecter les monocytes et qu'il n'utiliserait donc pas cette voie (Desforges *et al.*, 2007). Cependant, aucune expérience n'a été faite avec les mutants S1/S2 et S2'. Enfin, une étude a montré que l'état de glycosylation de la protéine d'enveloppe du virus du Nil Occidental influence la neuroinvasion chez la souris (Beasley *et al.*, 2005). Il a été montré que les capacités neuroinvasives du virus étaient dépendantes, entre autres, de l'état de glycosylation de la glycoprotéine d'enveloppe, et qu'une altération de cette glycosylation affectait la stabilité du virus (Beasley *et al.*, 2005, Shirato *et al.*, 2004). La glycoprotéine S de HCoV-OC43 est une protéine hautement glycosylée (Mounir et al., 1992), et on peut donc penser que l'acquisition de cette protéine et moduler le potentiel neuroinvasif du virus.

Nos résultats suggèrent que les clivages de la glycoprotéine S à S1/S2 et S2' peuvent moduler les types d'entrée dans la cellule, mais également l'efficacité de la neuroinvasion dans un modèle murin. De plus, nous avons également observé que la morphologie modifiée du mutant rOC/S_{G758R} (contrairement au mutant rOC/S_{R903A}), associée au clivage du au site S1/S2, était corrélée à une diminution de la propagation virale du SNC chez les souris sensibles. En effet, les virus mutants rOC/S_{G758R} et rOC/S_{R903A} se propagent dans le cerveau, mais avec un retard comparativement au virus de référence. Bien que ce retard soit plus important pour le virus mutant rOC/S_{R903A}, les deux virus mutants ont de la difficulté à se propager efficacement jusque dans la moelle épinière contrairement au virus de référence. Malgré une libération plus efficace des particules infectieuses du virus mutant rOC/S_{G758R} dans le milieu de culture cellulaire par rapport au virus de référence rOC/ATCC, ce retard de propagation a également été observé dans des cultures primaires murines de

même que dans la lignée neuronale humaine LA-N-5. Il s'agit ici d'une relation qui peut sembler contre-intuitive mais qui rappelle le mode de propagation de cellule à cellule qui prévaut pour une liste croissante de virus (Q. Sattentau, 2008). En effet, le mode de transmission de cellule à cellule a été adopté par une multitude de famille de virus telle que les flaviviridae, les herpesviridae, les paramyxoviridae, les poxviridae, les rhabdoviridae et les retroviridae (Q. J. Sattentau, 2011). Ce type de transmission confère des avantages au virus, comme une propagation virale plus rapide, ainsi qu'un échappement à l'immunité humorale. Dès qu'une infection initiale est survenue, ce mode de propagation permet de contrecarrer les étapes limitantes de la propagation par virus libre en permettant une protection envers le virus, que se soit au niveau stérique, mais également cinétique (Q. Sattentau, 2008). Plusieurs types de transmission de cellule à cellule ont été mis en évidence lors d'infection virale. Le premier mécanisme de propagation, appelé la synapse virologique, se fait par des contacts spécialisés et polarisés entre la cellule infectée et la cellule cible, à l'intérieur desquels des virus tels que HIV, HTLV et HSV peuvent se propager (Q. J. Sattentau, 2011). Le deuxième mécanisme se défini comme un biofilm viral. Il s'agit d'un transfert d'une structure adhésive sur laquelle s'accumulent les virions. Cette structure adhésive est enrichie en protéine de la matrice extracellulaire et en protéine de d'adhésion de la cellule hôte. Les virions vont être concentrés à la surface de la cellule infectée, et vont pouvoir se transmettre à une cellule saine lors d'un contact cellulaire. Ce type de transmission, observé pour HTLV-1 et HIV-1, confère une protection physique et protège partiellement les virus des anticorps neutralisants (Pais-Correia et al., 2010). Enfin, le troisième mécanisme se caractérise par des extensions de la membrane des cellules infectées qui forment des conduits intercellulaires, permettant ainsi le transfert de protéines virales aux cellules cibles. Ces structures sont formées à partir de la membrane plasmique grâce à la polymération de protéine qui forme des ponts entre la cellule infectée et la cellule saine, permettant entre autres la stabilisation des contacts entre cellules. Tous comme les deux autres types de transmissions, ce dernier permet le contrôle de la réponse immunitaire envers le virus. Les virus HTLV-1 et HIV sont capables d'utiliser ce mécanisme de propagation (Q. J. Sattentau, 2011).

À l'aide de modèles de cellules neuronales en culture, nous avons caractérisé un peu mieux le mode propagation de cellule à cellule de la souche HCoV-OC43, qui semble se faire à l'aide de synapse virologique. En effet, la mise en évidence de plateformes virales immobiles le long des axones suggère des structures virales polarisées impliquées dans la transmission virale vers la cellule voisine. Ce type de transmission pourrait, en association avec l'état de clivage de la glycoprotéine S, expliquer en partie les différences d'entrée/propagation observées pour les virus de référence, rOC/S_{G758R} et rOC/S_{R903A}. En effet, bien que nos résultats suggèrent un retard dans l'entrée virale des deux variants

comparativement à la souche de référence, nous avons également pu mettre en évidence un défaut dans la propagation de cellule à cellule pour le virus rOC/S_{G758R} par rapport au virus de référence dans des cellules neuronales. Il est tentant de supposer que le clivage de la protéine S du HCoV-OC43 au site S1/S2 au niveau de la membrane plasmique, en liens avec les différents types de protéases présents dans la cellule, limite la quantité de particules virales disponibles pour un transfert de cellule à cellule vers des neurones non infectés adjacents. Ceci peut expliquer la différence de cinétique de dissémination entre les deux virus et la difficulté pour le mutant rOC/S_{G758R} d'atteindre la moelle épinière même s'il se dissémine dans tout le cerveau. La propagation limitée du mutant rOC/S_{R903A} dans le SNC murin comparativement aux virus mutant rOC/S_{G758R} et au virus de référence est probablement due au fait que le site S2' est très important dans les premières étapes d'entrée du virus dans la cellule. Il est également logique de penser que ce type de clivage pourrait moduler l'efficacité de propagation de cellule à cellule dans un contexte neuronal.

Au sein d'un neurone, trois modèles de transport axonaux sont proposés. Le premier consiste en un transport de particules virales non infectieuses dans l'axone. Ces derniers pourront maturer en sortant le long de l'axone. Le deuxième modèle consiste en un transport axonal rapide de structures virales, dont l'assemblage final se fera dans les terminaisons axonales. Enfin, le troisième modèle consiste en un transport rapide de structure virale le long de l'axone. À l'inverse du deuxième modèle, dans ce 3^e type de transport, les virus pourront s'assembler au niveau de certains points le long de l'axone, ainsi que dans les terminaisons axonales. L'utilisation de molécules chimiques (Vinblastine et Paclitaxel) permettant la stabilisation ou la déstabilisation des microtubules et altérant par conséquent le transport à l'intérieur de l'axone, nous permet de suggérer un transport axonal selon le troisième modèle proposé ci-dessus. En effet, en utilisant ces molécules, le nombre de plateformes virales immobiles observées le long de l'axone diminue, ce qui tend à penser que des structures virales pourraient se propager le long de l'axone, et maturer/sortir le long des "boutons en passant", le long de ces axones, comme suggéré pour les alphaherpesvirus (Tomishima et al., 2002). Ces "boutons en passant" ou varicosités, sont des boutons synaptiques présents le long de l'axone, ayant le même rôle que ceux présents à l'extrémité terminale de l'axone. Par extrapolation, il est tentant de suggérer que le clivage de la glycoprotéine S au niveau de S1/S2 diminuerait l'efficacité du transport de cette glycoprotéine au sein de l'axone, diminuant ainsi la propagation de cellule à cellule du virus mutant rOC/S_{G758R}. A l'inverse, pour une propagation virale le long de l'axone et une entrée efficace, la glycoprotéine S devra être clivée au site S2', telle que nous suggère les résultats pour le mutant non clivé rOC/S_{R903A}.

Bien que les virus mutants se propagent moins efficacement que le virus de référence, le neurotropisme entre les différents virus ne change pas. Le neurotropisme définit l'habileté d'un pathogène à infecter des cellules du système nerveux central ou périphérique. Nous savons que la protéine S des coronavirus, et particulièrement la sousunité S1, est le principal déterminant du tropisme (Taguchi, 1995) et permet donc au virus de reconnaitre un récepteur cellulaire spécifique, de le lier et d'initier une cascade de réactions qui mèneront ultimement à la pénétration du virus chez la cellule cible (Cullen, 2001, Gallagher et al., 2001, Hofmann et al., 2004). Le récepteur cellulaire de HCoV-OC43 n'est pas encore identifié à ce jour, mais nous avons montré que le neurone est la cible principale de l'infection par HCoV-OC43 chez la souris et en culture primaire mixte murine du SNC (Desforges. M et al., 2013, Jacomy et al., 2003), ainsi qu'en culture d'astrocytes primaires humaines seules et en co-culture avec des cellules NT2 humaine (Desforges. M et al., 2013, Jacomy et al., 2006). Chez la souris, HCoV-OC43 est détectable dans différentes structures du cerveau. Il a également été démontré dans le laboratoire que des mutations ponctuelles localisées dans le site potentiel de liaison au récepteur, et acquises suite à l'infection persistante de lignées de cellules neurales humaines représentatives du SNC, ne modulent pas le neurotropisme de HCoV-OC43 (Jacomy et al., 2010, Le Coupanec et al., 2015, Meessen-Pinard et al., 2017).

Concernant nos virus mutants rOC/S_{G758R} et rOC/S_{R903A}, aucun changement de tropisme apparent n'a pu être détecté, alors que le neurone demeure la cible principale, et sont capables de passer par le nerf olfactif pour envahir le SNC au même titre que la souche de référence. Afin de pouvoir expliquer les différences dans la neuropropagation entre les trois virus, nous nous sommes demandé si le virus de référence pouvait emprunter une seconde voie pour atteindre la moelle épinière plus rapidement. Cette voie pourrait être par l'intermédiaire du LCR, en lien avec le système glymphatique, qui est un système de nettoyage qui utilise un système unique de canaux périvasculaires, formés par des cellules astrogliales, pour faire le pont entre le LCR et le liquide interstitiel dans le cerveau et favorise ainsi l'élimination des protéines solubles et des métabolites du SNC (Jessen et al., 2015). Il a été proposé que ce système pouvait participer à la neuropropagation de virus comme le virus chikungunya (Couderc et al., 2008) et le SRAS-CoV (Netland et al., 2008). Bien que le HCoV-OC43 de référence infecte très efficacement les cellules épendymaires comparativement aux virus mutants, tous les virus sont retrouvés dans le LCR. La présence de virus dans le LCR est caractéristique d'une infection du SNC et a été suggérée comme une voie potentielle de dissémination vers la moelle épinière pour d'autres virus incluant le virus Sendai, le virus de la chorioméningite lymphocytaire et le virus de la stomatite vésiculaire (Plakhov et al., 1995). La présence des 3 variants du HCoV-OC43 dans le LCR peut impliquer une propagation du cerveau vers la moelle épinière. Cependant, comme il n'y

a pas de différence dans la quantité relative d'ARN, cette voie ne semble pas expliquer les différences de propagation vers la moelle épinière. Bien que le mutant rOC/S_{G758R} ait un petit retard dans sa propagation comme nous l'avons rapporté précédemment (Le Coupanec *et al.*, 2015), le clivage au site S2' est beaucoup plus important pour une diffusion efficace en culture cellulaire et chez la souris. Ces observations suggèrent que le clivage au niveau de S2' est une condition préalable absolue pour une propagation cellulaire efficace, mais quel que soit le site de clivage, il semble plutôt moduler la neuropropagation et non le neurotropisme pour le HCoV-OC43.

En outre, les clivages de la glycoprotéine HCoV-OC43 S a également un impact sur la pathologie, car il diminue la neurovirulence. La neurovirulence désigne le caractère pathogène, nocif et violent d'un microorganisme, c'est-à-dire sa capacité à causer une pathologie au SNC détectable par des observations histologiques et/ou cliniques, voire la mort de l'hôte (A.L. Notkins, and M.B. Oldstone., 1986). Il est très intéressant de noter que cette association entre la diminution de la virulence et le clivage de la glycoprotéine S du coronavirus n'a été suggérée que pour le FCoV (Licitra *et al.*, 2013). En effet, pour d'autres coronavirus, dont le coronavirus murin (MHV) et le coronavirus bovin (BCoV), aucune association claire n'a été établie entre le clivage de S et la virulence (Hingley *et al.*, 2002, X. M. Zhang *et al.*, 1991).

De nombreux résultats obtenus au laboratoire de Pierre Talbot suggèrent que l'atteinte de la moelle épinière pourrait être en relation avec la sévérité de la maladie induite par le HCoV-OC43. En effet, tel que précédemment mentionné dans cette thèse, la glycoprotéine S joue un rôle dans la pathogenèse induite par les coronavirus (Gallagher et al., 2001). La plupart des connaissances sur le rôle de la glycoprotéine S dans la neuropathogenèse ont été obtenues à partir d'études sur le coronavirus murin MHV où le remplacement la protéine S de MHV-A59 (neurovirulence modérée) par celle de MHV-JHM (neurovirulence importante) mène à la production d'une souche recombinante de MHV-A59 possédant une neurovirulence accrue (Phillips et al., 1999) ainsi qu'une dissémination au SNC plus importante (Phillips et al., 2002). Il existe au laboratoire plusieurs mutants de HCoV-OC43, obtenu à partir d'infection persistante de lignée neurale. Il a été montré que l'infection de souris par le coronavirus portant quatre mutations ponctuelles dans la protéine S (D24Y, S83T, H183R, Y241H; nommé rOC/U_{S24-241}) induit une pathologie paralysante des membres postérieurs chez la souris, accompagnée d'un taux de mortalité de 80% comparé au virus de référence qui induit une encéphalite avec 10-15% de mortalité (Jacomy et al., 2010). Ce mutant se dissémine plus rapidement, se réplique de façon plus importante dans la moelle épinière et induit une inflammation plus importante comparée au virus de référence (Jacomy et al., 2010).

En ce qui concerne les mutants S1/S2 et S2' présentés dans cette thèse, nous avons pu faire une corrélation entre le degré d'atteinte et le niveau de réplication des mutants dans la moelle épinière et le degré de neurovirulence. En effet, bien que le clivage au niveau de S1/S2 ne change pas la réplication du virus dans le cerveau, il va diminuer sa réplication ainsi que sa propagation dans la moelle épinière, probablement associée au fait que ce virus n'induit que très peu de symptômes neurologiques et de mortalité chez la souris. Dans le même sens, une inhibition du clivage au niveau de S2' va, en plus de retarder la propagation du virus dans le cerveau. Ces données sont également associées au fait que ce virus mutant ne provoque aucun symptôme neurologique ni de mortalité chez la souris. Par conséquent, il est plausible de penser que l'atteinte de la moelle épinière pourrait être un facteur pour le développement de neuropathologies chez la souris. En conclusion, des changements dans le génome de HCoV-OC43, en particulier au sein de la protéine S, pourrait réguler de nombreux facteurs, comme la modulation de la dissémination et de la réplication virale, qui peuvent conduire à une modification de la neuropathologie viro-induite chez la souris.

Plusieurs autres facteurs peuvent influencer ou contrôler la réplication et la propagation virale ainsi que la neurovirulence associée. Il s'agit de la capacité qu'ont les virus à moduler l'activation du système immunitaire. Il est connu qu'un stress au RE suite à l'infection par le SARS-CoV induit une régulation à la baisse du récepteur de l'IFN de type I qui a un rôle antiviral (Minakshi et al., 2009). Des mutations au sein de la protéine S de HCoV-OC43 menant à une accumulation accrue de cette protéine et de virions infectieux à l'intérieur des cellules infectées (possiblement au RE (Favreau et al., 2009)), pourraient donc moduler la réponse inflammatoire via un stress au RE. Une étude récente conduite sur le coronavirus porcin PEDV, où une délétion de 5 acides aminés accompagnée d'une mutation d'un autre acide aminé dans le domaine transmembranaire de la protéine E ont été observée après plusieurs passages de ce virus en culture cellulaire (M. Sun et al., 2017). Cette adaptation est responsable d'une augmentation de la réponse au stress du RE, de la réponse inflammatoire, et de l'apoptose des cellules infectées pouvant jouer sur la pathologie. Nous savons que la glycoprotéine S est fortement reconnue par le système immunitaire. Elle induit une production d'anticorps neutralisants et l'activation de lymphocytes T cytotoxiques, ce qui lui confère un rôle important au niveau de la pathogenèse virale (D.E. Wentworth, and K.V. Holmes, 2007). Des mutations dans cette protéine pourraient moduler sa reconnaissance par l'hôte et engendrer une réponse immunitaire exacerbée, qui, si elle est non contrôlée, pourrait engendrer des effets secondaires néfastes au SNC. Nous avons déjà démontré au laboratoire qu'une infection du SNC murin, en particulier de la moelle épinière par le virus portant les quatre mutations

rOC/US24-241 est accompagnée d'une plus grande expression de la cytokine proinflammatoire IL-6 et de la chimiokine MCP-1 (CCL2) et est associée avec une augmentation significative de l'infiltration de lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans le SNC par rapport au virus de référence (Jacomy *et al.*, 2010). Cette activation accrue du système immunitaire est en relation avec le fait que ce virus mutant possède une neuropropagation et une neurovirulence accrue comparativement au virus de référence. Il n'est toutefois pas prouvé que cette plus importante réponse immunitaire soit en cause dans la pathologie.

Il est également connu que des mutations dans les protéines virales de surface peuvent permettre au virus d'échapper à la reconnaissance par les anticorps. Le virus Influenza par exemple mute continuellement, ce qui lui permet d'échapper à la reconnaissance par les anticorps (van de Sandt *et al.*, 2012). Il en est de même pour la protéine gp120 du VIH, qui, par variation antigénique peut échapper à une reconnaissance par le système immunitaire (Evans *et al.*, 2001). De plus, une étude a montré un rôle des sucres impliqués dans la glycosylation dans l'échappement au système immunitaire du VIH (Reitter *et al.*, 1998). Des mutations dans la protéine S de HCoV-OC43 pourraient avoir un rôle si des mutations se retrouvaient dans des sites de glycosylation, dans le fait que le virus puisse échapper au système immunitaire, dans l'induction d'une infection latente, où il pourrait se réactiver et se répliquer occasionnellement suite à un stress ou à un état affaibli de l'hôte.

Après une infection par le virus mutant S1/S2, nous avons pu observer que lorsque les virus se sont propagés dans toutes les régions du cerveau, la réponse immunitaire innée est bien établie. En effet, nous avons pu voir une augmentation du nombre d'astrocytes, ainsi que des microglies après l'infection (Jacomy et al., 2006, Jacomy et al., 2010). Ces augmentations, se définissant comme une astrogliose et une microgliose, sont plus importantes après infection par le virus de référence que par le virus mutant S1/S2. Ce type d'activation cellulaire peut être liée à une propagation plus rapide dans l'ensemble du SNC du virus de référence par rapport au virus mutant (Jacomy et al., 2010). La neurovirulence différentielle et la dissémination pourraient certainement être la conséquence de la mutation G758R de la protéine S, qui introduit un site de reconnaissance à la furine (de Haan et al., 2008, Licitra et al., 2013), reconnu par les proprotéines-convertases cellulaires (PCs). Il se pourrait que lors du clivage de la protéine S, une partie de celle-ci soit libérée dans le milieu extracellulaire et pourrait alors exercer un effet toxique qui pourrait mener à l'activation du système immunitaire ou à l'activation de voies métaboliques cellulaire en réponse à un stress. Ce genre de clivage pourrait se faire par des protéases comme les TMPRSS. En effet, il a également été suggéré que le clivage induit par les TMPRSS pourrait entraîner l'excrétion (shedding) de fragments de la protéine S du SARS-CoV qui interfèrerait avec la neutralisation médiée par les anticorps (Regan et al., 2008).

Les protéines IFITM sont présentes dans la plupart des cellules de l'organisme à un niveau basal, mais leur expression peut être fortement induite après stimulation par l'IFN de type I grâce à un élément ISRE (*interferon stimulated responsive element*) présent dans le promoteur des gènes correspondants. Les protéines IFITM sont des molécules effectrices induites par l'IFN, qui jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection par l'influenza aviaire (FLUAV) (Millet *et al.*, 2016, Shulla *et al.*, 2011), RSV (Shirato *et al.*, 2013) et potentiellement d'autres virus respiratoires. Il a été démontré récemment que l'IFITM3, une protéine transmembranaire de type II (Shulla *et al.*, 2011), peut potentiellement interagir avec les enveloppes virales. Concernant la souche OC43, les IFITM n'affectent ni la liaison au récepteur cellulaire ni la faible dépendance au pH lors de l'entrée de HCoV-OC43, mais favorisent la fusion membranaire à faible pH entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale (X. Zhao *et al.*, 2014). En effet, les domaines C-terminaux des protéines IFITM participe à une interaction avec le récepteur du HCoV-OC43 et/ou d'autres facteurs de l'hôte pour favoriser la fusion virale (X. Zhao *et al.*, 2014).

L'immunité innée joue un rôle central dans la protection du SNC contre divers virus neurotropes (Carty *et al.*, 2014). À l'intérieur du bulbe olfactif, les mécanismes antiviraux comme l'interféron de type 1 (α/β) inhibent efficacement la propagation virale et servent de barrière contre les virus neuroinvasifs et neurotropes (Kalinke *et al.*, 2011). L'expression du récepteur Toll-like 3 (TLR3) est significativement augmentée dans le bulbe olfactif des souris après traitement intranasal avec de l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly IC), un agoniste du TLR3, et confère une protection contre une infection par HSV-1 (Boivin *et al.*, 2008). L'activation de TLR3 par l'ARNdb (synthétique ou dérivé d'un virus) déclenche des signaux en aval qui conduisent à l'activation du promoteur IFN- β . Ensemble, ces données pourraient expliquer la différence de neuroinvasion entre nos virus. En effet, en envahissant le SNC plus rapidement, le virus de référence pourrait contrecarrer le système immunitaire, notamment en libérant une partie de la protéine S (*Shedding*) pour inhiber les anticorps neutralisants, ou encore en utilisant les IFITM pour augmenter sa propagation virale. De ce fait, il pourra atteindre plus rapidement certaines régions du cerveau pour s'y répliquer efficacement et se propager jusque dans la moelle épinière.

Néanmoins, d'autres protéines peuvent être impliquées dans la virulence et la propagation virale de HCoV-OC43. Le génome des coronavirus possède des cadres de lectures (ORFs) qui codent pour des protéines accessoires. Le maintien de leurs séquences dans le génome viral suggère qu'elles sont pertinentes *in vivo*. En effet, parmi les α-coronavirus, les gènes codant pour les protéines accessoires qui jouent un rôle dans la virulence ont été mis en évidence chez les coronavirus FCoV (Haijema *et al.*, 2004), TGEV (McGoldrick *et al.*, 1999), PHEV et HCoV-229E (D. X. Liu *et al.*, 2014). Dans le cas de FIPV,

la protéine 7a est nécessaire à la réplication en culture cellulaire, et participe comme antagoniste aux IFN de type I (Dedeurwaerder et al., 2014). De plus, chez les coronavirus, plusieurs protéines accessoires ont été identifiées et leurs fonctions varient d'antagonistes à la production d'IFN ou de l'activation des ISRE notamment pour le SARS-CoV et le MERS-CoV (D. X. Liu et al., 2014). Les génomes des virus BCoV, MHV et HCoV-OC43 (Goldstein et al., 2017) encodent également la protéine ns2 qui est un inhibiteur de l'endonucléase cellulaire RNAse L, responsable de la dégradation d'ARN double brin en lien avec la voie de réponse à l'IFN de type 1 (Thornbrough et al., 2016, L. Zhao et al., 2012). Par conséquent, lors d'une infection, le domaine phosphodiestérase de la protéine ns2 va bloquer l'activation du système 2',5'-oligoadenylate synthétase (OAS)/RNase L lié à la voie de réponse à l'IFN de type I, empêchant ainsi la dégradation de l'ARN viral (Goldstein et al., 2017, L. Zhao et al., 2012). De plus, nous avons également démontré dans le laboratoire que la protéine ns2 pouvait moduler la propagation virale. En effet, en délétant cette protéine, nous avons pu observer une augmentation de la propagation de la souche OC43 dans des cellules neuronales humaines (Dubé et al, soumis) et on peut penser que des changements dans cette protéine pourrait affecter la neuropropagation, ainsi que la neurovirulence associée à une infection par OC43 dans un modèle murin.

La protéine de nucléocapside N est une protéine multifonctionnelle qui forme un complexe avec l'ARN génomique. Elle interagit avec la protéine de membrane virale pendant l'assemblage du virion et joue un rôle important dans l'efficacité de la transcription. Il a été démontré pour le coronavirus murin que cette protéine était impliquée dans la neurovirulence (Cowley et al., 2010). En effet, en exprimant la nucléocapside de la souche neurovirulente JHM dans le génome de la souche hépatotrope A59, les auteurs ont pu observer une mortalité accrue et une propagation virale plus grande dans le système nerveux central de la souris par rapport à la souche parentale A59. Une autre protéine virale, la protéine E, a fait l'objet de plusieurs études. Elle est maintenant reconnue comme un autre facteur de virulence important, étant impliquée dans la formation et la maturation des virions, dans la modification de la voie de sécrétion ainsi que dans la modulation de la pathologie induite (DeDiego et al., 2014). Cette grande variété de fonctions s'expliquerait par la présence de deux domaines fonctionnels dans la protéine E ayant des rôles distincts: un domaine transmembranaire et un motif PBM d'interaction protéine-protéine. En effet, la protéine E du SARS-CoV a été associée au tropisme neural alors que son absence empêche la réplication du virus dans le SNC de souris (Dediego et al., 2008). Elle a également été associée à la morphogenèse avec un degré d'importance variable en fonction de l'espèce coronavirale (DeDiego et al., 2014), et à la pathogenèse, où la délétion de la protéine E induit un phénotype atténué chez les souris infectées (DeDiego et al., 2007). Enfin, la protéine

hémagglutinine-estérase HE, qui est une protéine transmembranaire de type I, est impliquée dans l'interaction du virus avec un récepteur ayant les acides sialiques 4- ou 9-O-acétylé (Bakkers *et al.*, 2017). Il a été suggéré que a protéine HE peut être impliquée dans la fixation du virion aux cellules hôtes ou lors de la relâche virale (Rottier, 1990). Nous avons pu mettre en évidence au laboratoire que la fonction acétyl-estérase de la protéine HE influence la virulence en augmentant la production de particules infectieuses ou en facilitant la relâche des nouveaux virions à la fin du cycle de réplication (Desforges *et al.*, 2013a). Il en est de même pour le coronavirus murin (Kazi *et al.*, 2005). Cet ensemble de rôles, qui reste à bien définir, montre que certaines protéines structurales des coronavirus, comme la protéine N, E et HE peuvent être impliquées dans la modulation de la neurovirulence et de la neuropropagation dans le SNC murin. En effet, il a été démontré au laboratoire que des changements dans les domaines PBM et transmembranaire de la protéine E pouvait moduler la neuroinvasion, en plus d'être associés à des changements au niveau de la neuropropagation et de la neurovirulence associées à différents symptômes neurologiques dans le SNC murin (Stodola *et al* soumis).

Par conséquent, outre la glycoprotéine S, il existe plusieurs autres protéines structurales étant ou pouvant être impliquées dans une modulation de la neurovirulence, associée à un changement dans la neuroinvaison et la neuropropagation du virus en souris. En faisant varier certaines régions de ces protéines structurales, les coronavirus ont trouvé un moyen efficace pour pouvoir infecter et persister dans leur hôte.

CONCLUSION

En conclusion, le coronavirus humain OC43 est, en plus d'être un virus respiratoire, un virus neurotrope et neuroinvasif possédant des propriétés neurovirulentes chez la souris, et potentiellement chez l'homme. L'infection du SNC permet probablement au virus d'atteindre un environnement susceptible de lui assurer une survie plus efficace. L'apparition de symptômes s'apparentant à une encéphalite virale de même qu'un taux non négligeable de mortalité est fort probablement issu de nombreux dommages au SNC ainsi qu'à une perte neuronale.

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent dans un premier temps l'importance de l'état de clivage de la glycoprotéine S dans la neuroinvasion, la neuropropagation, le neurotropisme et la neurovirulence. Ils indiquent que HCoV-OC43 est clairement capable d'infecter les cellules neuronales et de se propager avec ou sans la nécessité d'un clivage de la protéine S par la furine au niveau du site S1/S2. La différence de propagation virale dans le SNC, associée à l'augmentation des particules virales infectieuses dans le milieu extracellulaire du virus hébergeant la mutation G758R, présente dans tous les isolats cliniques connus, suggère fortement que le clivage de la protéine S de HCoV-OC43 au niveau de S1/S2 joue un rôle plus important lors de la sortie et du bourgeonnement des cellules infectées, ce qui pourrait influencer le mode de transmission virale entre les cellules du SNC.

Dans un second temps, cette thèse illustre le fait que pour pouvoir infecter et se propager de manière optimale, le HCoV OC43 doit avoir sa protéine S clivée au niveau du site S2'. La différence de propagation virale dans le SNC, associée à la diminution de la production de particules virales infectieuses du virus hébergeant la mutation R903A, suggère fortement que le site S2' de la protéine S joue un rôle majeur lors de l'entrée virale (associée à un clivage potentiel par la cathepsine L), qui pourrait influencer le mode de transmission virale entre les cellules du SNC.

Enfin, même si le mécanisme sous-jacent n'est pas complètement défini pour l'instant, la mise en évidence d'un mode de propagation de cellule à cellule pour le HCoV-OC43 nous à permis de mieux comprendre l'efficacité de propagation de ce virus au sein du SNC. Bien que seules les particules virales non matures semblent pouvoir se propager dans l'axone, le virus pourrait s'assembler et sortir le long des "boutons en passant" présentes le long des axones pour pouvoir par la suite infecter d'autres cellules au niveau de synapses virologiques. En effet, à l'inverse des synapses neurologiques qui prennent naissances au niveau des terminaisons axonales, et dont la fonction sont la conduction d'une information nerveuse d'une cellule à l'autre, les synapses virologiques correspondent à des contacts spécialisés et polarisés entre la cellule infectée et la cellule cible, et peuvent prendre

naissances à tous les niveaux de la cellule. La différence d'efficacité de propagation de neurone à neurone observée entre le virus référence et les virus mutants pourrait expliquer la faible proportion des virus mutants capables d'atteindre la moelle épinière chez la souris infectée et par conséquent, les différences de neurovirulence.

L'observation que les HCoV sont naturellement neuroinvasifs chez les souris et les humains souligne la nécessité de caractériser davantage les déterminants viraux et cellulaires associés à ces propriétés neuroinvasives. Comprendre les mécanismes de l'infection du SNC, de l'entrée virale dans la cellule neuronale jusqu'à la propagation aux neurones voisins est essentiel pour mieux concevoir des stratégies thérapeutiques. Nos données pointent vers l'importance d'un clivage différentiel de la protéine S par diverses protéases cellulaires. Permettre ou même renforcer le clivage à S1/S2 et l'inhiber à S2', semble représenter une cible thérapeutique intéressante pour potentiellement prévenir la neuroinvasion et la propagation éventuelle de l'infection par HCoV-OC43 dans le SNC.

PERSPECTIVES

En perspectives, il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie les clivages de la glycoprotéine S. Dans un premier temps, il serait important de réussir à localiser dans la cellule où se produisent les clivages S1/S2 et S2'. Nous pensons actuellement que le clivage à S1/S2 se ferait pendant les étapes de bourgeonnements ou à l'extérieur de la cellule, tandis que le clivage au niveau S2' se ferait dans les premières étapes de l'infection au moment de l'entrée virale. Comprendre les mécanismes d'entrée liés aux clivages pourrait nous aider à mieux cerner les différences de propagation et de réplication dans le SNC.

De ce fait, identifier plus précisément la ou les protéases impliquées dans le processus de clivage de la glycoprotéine S serait également un point important dans la compréhension de l'infection par les HCoV-OC43. En effet, sachant que certaines protéases ne sont pas exprimées de manière ubiquitaire, identifier les protéases impliquées pourraient nous renseigner sur le neurotropisme associé aux clivages et donc nous aider à mieux comprendre certaines différences observées dans la neuropropagation, et dans la neurovirulence dans le modèle murin. Pour ce faire, nous pourrions augmenter de façon ectopique ou diminuer l'expression de certaines protéases (comme l'expression des TMPRSS, ou l'inhibition de cathepsines) dans des cellules neuronales (LA-N-5). Ceci nous permettrait de pouvoir identifier avec plus de précision les protéases réellement impliquées dans l'activation de la glycoprotéine S de HCoV-OC43 et donc dans l'infection.

Suivant ceci, nous pourrions utiliser certains modèles murins dépourvus de protéases. Certains modèles murins sont dépourvus de proprotéines-convertases telle que PC2, PC7. L'utilisation d'un modèle animal tel que la souris, et qui est dépourvu de certaines protéases, devrait nous permettre de confirmer leurs effets sur la glycoprotéine S dans un modèle vivant.

Ensuite, l'inflammation, défense immunitaire initiée suite à divers stimuli, peut être bénéfique ou néfaste. Certaines molécules pro-inflammatoires peuvent avoir de multiples rôles quant à l'expression d'une multitude de protéines essentielles au bon fonctionnement du SNC. Il serait nécessaire d'investiguer plus en détail la neuroinflammation suite à l'infection par HCoV-OC43 (virus de référence et variants S1/S2 et S2'), incluant la réponse immunitaire innée. Il a déja été démontré que des protéines transmembranaires inductibles par l'interferon (IFITMs) pouvait améliorer l'efficacité d'infection de HCoV-OC43. De ce fait, nous pourrions investiguer de manière plus approfondie, le rôle des IFITMs dans une infection par HCoV-OC43, et pouvoir ainsi déterminer si les clivages différentiels de la protéine S pourraient moduler ce type d'immunité. En effet, essayer de déterminer si le

HCoV-OC43 peut manipuler les IFITMs, afin de permettre au virus de mieux se répliquer et se propager serait une étape importante dans la compréhension de l'implication de l'immunité dans une infection par le HCoV-OC43. Nous pourrions également utiliser des modèles animaux dépourvus de certaines portions de l'immunité innée comme l'IFN. Nous savons que l'IFN de type 1 joue un rôle important dans l'immunité antivirale. Par conséquent, étudier son effet lors d'une infection par nos trois variants du HCoV-OC43 pourrait nous aider à mieux caractériser et comprendre des différences de propagation observées entre les virus mutants S1/S2 et S2' et le virus de référence. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des souris dépourvues du récepteur à l'IFN (IFNAR KO) disponibles dans notre laboratoire. De plus, puisqu'il a été démontré que le système OAS/RNase L peut être modulé par la protéine ns2 du HCoV-OC43, il serait intéressant de voir de quelle façon l'infection et la pathogenèse seraient modulées en utilisant des souris dépourvues de la RNase L (RNase L KO).

Enfin, des expériences plus approfondies sur la caractérisation de la propagation de cellule à cellule de HCoV-OC43 représenteraient un point important pour la suite de cette étude. En effet, l'utilisation de divers outils comme les chambres compartimentées (chambre de Campenot ou de chambres microfuidiques par exemple) qui permettent de bien séparer le corps cellulaire de l'axone, nous permettra de mieux comprendre le/les mécanisme(s) de transport de notre virus au sein d'une cellule, et d'une cellule à une autre. Ceci pourrait être important considérant la rapidité de propagation du virus au sein du SNC. Ces résultats pourraient nous orienter sur de possible site thérapeutique contre une infection par un coronavirus dans le SNC.

Une connaissance accrue de la biologie du virus ainsi que de son interaction avec le SNC tant au niveau de la neuroinvasion qu'à celui de la propagation à travers ce système aidera à mieux comprendre certaines pathologies neurologiques à potentielle étiologie virale et, ce faisant, pourrait aider au développement de nouvelles stratégies antivirales efficaces.

BIBLIOGRAPHIE

- Abendroth A, Simmons A, Efstathiou S & Pereira RA (2000) Infection with an H2 recombinant herpes simplex virus vector results in expression of MHC class I antigens on the surfaces of human neuroblastoma cells in vitro and mouse sensory neurons in vivo. *The Journal of general virology* 81(Pt 10):2375-2383.
- Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Rohl I, Hopfner KP, Ludwig J & Hornung V (2013) cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 498(7454):380-384.
- Afonso PV, Ozden S, Cumont MC, Seilhean D, Cartier L, Rezaie P, Mason S, Lambert S, Huerre M, Gessain A, Couraud PO, Pique C, Ceccaldi PE & Romero IA (2008) Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS pathogens* 4(11):e1000205.
- Agrawal AS, Garron T, Tao X, Peng BH, Wakamiya M, Chan TS, Couch RB & Tseng CT (2015) Generation of a transgenic mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease. *Journal of virology* 89(7):3659-3670.
- Al-Tawfiq JA & Memish ZA (2014) Middle East respiratory syndrome coronavirus: transmission and phylogenetic evolution. *Trends in microbiology* 22(10):573-579.
- Alexaki A & Wigdahl B (2008) HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. *PLoS pathogens* 4(12):e1000215.
- Alfson KJ, Avena LE, Beadles MW, Staples H, Nunneley JW, Ticer A, Dick EJ, Jr., Owston MA, Reed C, Patterson JL, Carrion R, Jr. & Griffiths A (2015) Particle-to-PFU ratio of Ebola virus influences disease course and survival in cynomolgus macaques. *Journal of virology* 89(13):6773-6781.
- Algahtani H, Subahi A & Shirah B (2016) Neurological Complications of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: A Report of Two Cases and Review of the Literature. *Case reports in neurological medicine* 2016:3502683.
- Almazan F, DeDiego ML, Sola I, Zuniga S, Nieto-Torres JL, Marquez-Jurado S, Andres G & Enjuanes L (2013) Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio* 4(5):e00650-00613.
- Almeida JD & Tyrrell DA (1967) The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *The Journal of general virology* 1(2):175-178.
- Alvarez JI, Cayrol R & Prat A (2011) Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochimica et biophysica acta* 1812(2):252-264.
- Amor S, Puentes F, Baker D & van der Valk P (2010) Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129(2):154-169.
- Ancuta P, Wang J & Gabuzda D (2006) CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *Journal of leukocyte biology* 80(5):1156-1164.
- Anderson ED, VanSlyke JK, Thulin CD, Jean F & Thomas G (1997) Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *The EMBO journal* 16(7):1508-1518.

- Antalis TM, Bugge TH & Wu Q (2011) Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Progress in molecular biology and translational science* 99:1-50.
- Antar AA, Konopka JL, Campbell JA, Henry RA, Perdigoto AL, Carter BD, Pozzi A, Abel TW & Dermody TS (2009) Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell host & microbe* 5(1):59-71.
- Anthea Maton & Jean Hopkins CWM, Susan Johnson, Maryanna Quon Warner, David LaHart, Jill D. Wright (1993) Human Biology and Health, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, Prentice Hall, (ISBN 0-13-981176-1), p. 132–144).
- Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S & Ishii KJ (2011) Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Current opinion in virology* 1(4):226-232.
- Arabi YM, Harthi A, Hussein J, Bouchama A, Johani S, Hajeer AH, Saeed BT, Wahbi A, Saedy A, AlDabbagh T, Okaili R, Sadat M & Balkhy H (2015) Severe neurologic syndrome associated with Middle East respiratory syndrome corona virus (MERS-CoV). *Infection* 43(4):495-501.
- Arbour N, Cote G, Lachance C, Tardieu M, Cashman NR & Talbot PJ (1999a) Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *Journal of virology* 73(4):3338-3350.
- Arbour N, Day R, Newcombe J & Talbot PJ (2000) Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *Journal of virology* 74(19):8913-8921.
- Arbour N, Ekande S, Cote G, Lachance C, Chagnon F, Tardieu M, Cashman NR & Talbot PJ (1999b) Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. *Journal of virology* 73(4):3326-3337.
- Arbour N & Talbot PJ (1998) Persistent infection of neural cell lines by human coronaviruses. *Advances in experimental medicine and biology* 440:575-581.
- Bailey OT, Pappenheimer AM, Cheever FS & Daniels JB (1949) A Murine Virus (Jhm) Causing Disseminated Encephalomyelitis with Extensive Destruction of Myelin : li. Pathology. *The Journal of experimental medicine* 90(3):195-212.
- Bakkers MJ, Lang Y, Feitsma LJ, Hulswit RJ, de Poot SA, van Vliet AL, Margine I, de Groot-Mijnes JD, van Kuppeveld FJ, Langereis MA, Huizinga EG & de Groot RJ (2017) Betacoronavirus Adaptation to Humans Involved Progressive Loss of Hemagglutinin-Esterase Lectin Activity. *Cell host & microbe* 21(3):356-366.
- Ballabh P, Braun A & Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease* 16(1):1-13.
- Baric RS, Nelson GW, Fleming JO, Deans RJ, Keck JG, Casteel N & Stohlman SA (1988) Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. *Journal of virology* 62(11):4280-4287.
- Barnett EM & Perlman S (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):185-191.
- Bataveljic D, Milosevic M, Radenovic L & Andjus P (2014) Novel molecular biomarkers at the blood-brain barrier in ALS. *BioMed research international* 2014:907545.
- Bauer A, Nolden T, Schroter J, Romer-Oberdorfer A, Gluska S, Perlson E & Finke S (2014) Anterograde glycoprotein-dependent transport of newly generated rabies virus in dorsal root ganglion neurons. *Journal of virology* 88(24):14172-14183.

- Beasley DW, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY, Schneider BS, Smith DR, Gromowski GD, Higgs S, Kinney RM & Barrett AD (2005) Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *Journal of virology* 79(13):8339-8347.
- Belanger M, Allaman I & Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell metabolism* 14(6):724-738.
- Belouzard S, Chu VC & Whittaker GR (2009) Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(14):5871-5876.
- Belouzard S, Madu I & Whittaker GR (2010) Elastase-mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites within the S2 domain. *The Journal of biological chemistry* 285(30):22758-22763.
- Belouzard S, Millet JK, Licitra BN & Whittaker GR (2012) Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4(6):1011-1033.
- Bender SJ, Phillips JM, Scott EP & Weiss SR (2010a) Murine coronavirus receptors are differentially expressed in the central nervous system and play virus strain-dependent roles in neuronal spread. *Journal of virology* 84(21):11030-11044.
- Bender SJ & Weiss SR (2010b) Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 5(3):336-354.
- Beniac DR, Andonov A, Grudeski E & Booth TF (2006) Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nature structural & molecular biology* 13(8):751-752.
- Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, Asselin MC, Hamelin J, Varret M, Allard D, Trillard M, Abifadel M, Tebon A, Attie AD, Rader DJ, Boileau C, Brissette L, Chretien M, Prat A & Seidah NG (2004) NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *The Journal of biological chemistry* 279(47):48865-48875.
- Bergereau E (2010) Rôle des LT-CD8+ dans l'auto-immunité du SNC : influence des autres effecteurs de l'immunité adaptative [Internet] [Thèse de doctorat]. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier; [cité 21 mai 2015]. Disponible sur: http://thesesups.ups-tlse.fr/1108/.
- Bergeron E, Vincent MJ, Wickham L, Hamelin J, Basak A, Nichol ST, Chretien M & Seidah NG (2005) Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Biochemical and biophysical research communications* 326(3):554-563.
- Bergmann CC, Lane TE & Stohlman SA (2006) Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nature reviews. Microbiology* 4(2):121-132.
- Bergmann CC, Yao Q, Lin M & Stohlman SA (1996) The JHM strain of mouse hepatitis virus induces a spike protein-specific Db-restricted cytotoxic T cell response. *The Journal of general virology* 77 (Pt 2):315-325.
- Bertram S, Dijkman R, Habjan M, Heurich A, Gierer S, Glowacka I, Welsch K, Winkler M, Schneider H, Hofmann-Winkler H, Thiel V & Pohlmann S (2013) TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *Journal of virology* 87(11):6150-6160.

- Bertram S, Glowacka I, Muller MA, Lavender H, Gnirss K, Nehlmeier I, Niemeyer D, He Y, Simmons G, Drosten C, Soilleux EJ, Jahn O, Steffen I & Pohlmann S (2011) Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human airway trypsin-like protease. *Journal of virology* 85(24):13363-13372.
- Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Kuhl A & Pohlmann S (2010) Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Reviews in medical virology* 20(5):298-310.
- Beth N. Licitra KLS, Donald W. Lee and Gary R.Whittaker (2016) Feline coronaviruses associated with feline infectious peritonitis have modifications to spike protein activation sites at two discrete positions.
- Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, Ter Meulen V & Schneider-Schaulies S (2002) Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *Journal of virology* 76(17):8729-8736.
- Bissonnette L, Charest G, Longpre JM, Lavigne P & Leduc R (2004) Identification of furin pro-region determinants involved in folding and activation. *The Biochemical journal* 379(Pt 3):757-763.
- Biswas K & Das Sarma J (2014) Effect of microtubule disruption on neuronal spread and replication of demyelinating and nondemyelinating strains of mouse hepatitis virus in vitro. *Journal of virology* 88(5):3043-3047.
- Blau DM & Holmes KV (2001) Human coronavirus HCoV-229E enters susceptible cells via the endocytic pathway. *Advances in experimental medicine and biology* 494:193-198.
- Bleau C, Filliol A, Samson M & Lamontagne L (2015) Brain Invasion by Mouse Hepatitis Virus Depends on Impairment of Tight Junctions and Beta Interferon Production in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Journal of virology* 89(19):9896-9908.
- Boivin N, Sergerie Y, Rivest S & Boivin G (2008) Effect of pretreatment with toll-like receptor agonists in a mouse model of herpes simplex virus type 1 encephalitis. *The Journal of infectious diseases* 198(5):664-672.
- Bonavia A, Arbour N, Yong VW & Talbot PJ (1997) Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *Journal of virology* 71(1):800-806.
- Bosch BJ, Bartelink W & Rottier PJ (2008) Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide. *Journal of virology* 82(17):8887-8890.
- Bosch BJ, de Haan CA & Rottier PJ (2004) Coronavirus spike glycoprotein, extended at the carboxy terminus with green fluorescent protein, is assembly competent. *Journal of virology* 78(14):7369-7378.
- Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA & Rottier PJ (2003) The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of virology* 77(16):8801-8811.
- Bosch V & Pawlita M (1990) Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. *Journal of virology* 64(5):2337-2344.
- Bottcher-Friebertshauser E, Freuer C, Sielaff F, Schmidt S, Eickmann M, Uhlendorff J, Steinmetzer T, Klenk HD & Garten W (2010) Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular

localization and susceptibility to protease inhibitors. *Journal of virology* 84(11):5605-5614.

- Bottcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W & Matrosovich M (2006) Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *Journal of virology* 80(19):9896-9898.
- Boucher A, Desforges M, Duquette P & Talbot PJ (2007) Long-term human coronavirusmyelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 123(3):258-267.
- Bowie AG & Haga IR (2005) The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Molecular immunology* 42(8):859-867.
- Brian DA & Baric RS (2005) Coronavirus genome structure and replication. *Current topics in microbiology and immunology* 287:1-30.
- Brison E, Jacomy H, Desforges M & Talbot PJ (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):12464-12473.
- Brison E, Jacomy H, Desforges M & Talbot PJ (2014) Novel treatment with neuroprotective and antiviral properties against a neuroinvasive human respiratory virus. *Journal of virology* 88(3):1548-1563.
- Britton P & C, 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.
- Bruni JE, Del Bigio MR & Clattenburg RE (1985) Ependyma: normal and pathological. A review of the literature. *Brain research* 356(1):1-19.
- Burkard C, Verheije MH, Wicht O, van Kasteren SI, van Kuppeveld FJ, Haagmans BL, Pelkmans L, Rottier PJ, Bosch BJ & de Haan CA (2014) Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS pathogens* 10(11):e1004502.
- Callow KA (1985) Effect of specific humoral immunity and some non-specific factors on resistance of volunteers to respiratory coronavirus infection. *The Journal of hygiene* 95(1):173-189.
- Carthew P & Sparrow S (1981) Murine coronaviruses: the histopathology of disease induced by intranasal inoculation. *Research in veterinary science* 30(3):270-273.
- Carty M, Reinert L, Paludan SR & Bowie AG (2014) Innate antiviral signalling in the central nervous system. *Trends in immunology* 35(2):79-87.
- Casiraghi C, Dorovini-Zis K & Horwitz MS (2011) Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 230(1-2):173-177.
- Castro RF & Perlman S (1995) CD8+ T-cell epitopes within the surface glycoprotein of a neurotropic coronavirus and correlation with pathogenicity. *Journal of virology* 69(12):8127-8131.
- CDC CfDCap (2003) Severe acute respiratory syndrome--Singapore, 2003. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 52(18):405-411.
- Chakraborty S, Nazmi A, Dutta K & Basu A (2010) Neurons under viral attack: victims or warriors? *Neurochemistry international* 56(6-7):727-735.

- Chan JF, Lau SK, To KK, Cheng VC, Woo PC & Yuen KY (2015) Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clinical microbiology reviews* 28(2):465-522.
- Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK & Perlman S (2016) Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell host & microbe* 19(2):181-193.
- Chapagain ML & Nerurkar VR (2010) Human polyomavirus JC (JCV) infection of human B lymphocytes: a possible mechanism for JCV transmigration across the blood-brain barrier. *The Journal of infectious diseases* 202(2):184-191.
- Chapagain ML, Verma S, Mercier F, Yanagihara R & Nerurkar VR (2007) Polyomavirus JC infects human brain microvascular endothelial cells independent of serotonin receptor 2A. *Virology* 364(1):55-63.
- Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. The Journal of allergy and clinical immunology 125(2 Suppl 2):S3-23.
- Charles PC, Walters E, Margolis F & Johnston RE (1995) Mechanism of neuroinvasion of Venezuelan equine encephalitis virus in the mouse. *Virology* 208(2):662-671.
- Cheever FS, Daniels JB & et al. (1949) A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *The Journal of experimental medicine* 90(3):181-210.
- Chen J, Lau YF, Lamirande EW, Paddock CD, Bartlett JH, Zaki SR & Subbarao K (2010) Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4+ T cells are important in control of SARS-CoV infection. *Journal of virology* 84(3):1289-1301.
- Cheng VC, Chan JF, To KK & Yuen KY (2013) Clinical management and infection control of SARS: lessons learned. *Antiviral research* 100(2):407-419.
- Cho H, Proll SC, Szretter KJ, Katze MG, Gale M, Jr. & Diamond MS (2013) Differential innate immune response programs in neuronal subtypes determine susceptibility to infection in the brain by positive-stranded RNA viruses. *Nature medicine* 19(4):458-464.
- Choe Y, Leonetti F, Greenbaum DC, Lecaille F, Bogyo M, Bromme D, Ellman JA & Craik CS (2006) Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *The Journal of biological chemistry* 281(18):12824-12832.
- Choi SY, Bertram S, Glowacka I, Park YW & Pohlmann S (2009) Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections. *Trends in molecular medicine* 15(7):303-312.
- Chong SY, Rosenberg SS, Fancy SP, Zhao C, Shen YA, Hahn AT, McGee AW, Xu X, Zheng B, Zhang LI, Rowitch DH, Franklin RJ, Lu QR & Chan JR (2012) Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(4):1299-1304.
- Chu H, Zhou J, Wong BH, Li C, Cheng ZS, Lin X, Poon VK, Sun T, Lau CC, Chan JF, To KK, Chan KH, Lu L, Zheng BJ & Yuen KY (2014) Productive replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus in monocyte-derived dendritic cells modulates innate immune response. *Virology* 454-455:197-205.

- Chu VC, McElroy LJ, Chu V, Bauman BE & Whittaker GR (2006) The avian coronavirus infectious bronchitis virus undergoes direct low-pH-dependent fusion activation during entry into host cells. *Journal of virology* 80(7):3180-3188.
- Collins AR (2002) In vitro detection of apoptosis in monocytes/macrophages infected with human coronavirus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9(6):1392-1395.
- Collins AR, Knobler RL, Powell H & Buchmeier MJ (1982) Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell--cell fusion. *Virology* 119(2):358-371.
- Copin JC & Gasche Y (2003) [Morphology and physiology of the blood-brain barrier]. Annales francaises d'anesthesie et de reanimation 22(3):202-214.
- Corman VM, Albarrak AM, Omrani AS, Albarrak MM, Farah ME, Almasri M, Muth D, Sieberg A, Meyer B, Assiri AM, Binger T, Steinhagen K, Lattwein E, Al-Tawfiq J, Muller MA, Drosten C & Memish ZA (2016) Viral Shedding and Antibody Response in 37 Patients With Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 62(4):477-483.
- Couderc T, Chretien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, Touret Y, Barau G, Cayet N, Schuffenecker I, Despres P, Arenzana-Seisdedos F, Michault A, Albert ML & Lecuit M (2008) A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS pathogens* 4(2):e29.
- Couture F, D'Anjou F & Day R (2011) On the cutting edge of proprotein convertase pharmacology: from molecular concepts to clinical applications. *Biomolecular concepts* 2(5):421-438.
- Cowley TJ, Long SY & Weiss SR (2010) The murine coronavirus nucleocapsid gene is a determinant of virulence. *Journal of virology* 84(4):1752-1763.
- Coyne CB, Kim KS & Bergelson JM (2007) Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *The EMBO journal* 26(17):4016-4028.
- Creemers JW, Groot Kormelink PJ, Roebroek AJ, Nakayama K & Van de Ven WJ (1993) Proprotein processing activity and cleavage site selectivity of the Kex2-like endoprotease PACE4. *FEBS letters* 336(1):65-69.
- Cristallo A, Gambaro F, Biamonti G, Ferrante P, Battaglia M & Cereda PM (1997) Human coronavirus polyadenylated RNA sequences in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *The new microbiologica* 20(2):105-114.
- Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, McCandless EE, Patel JR, Luker GD, Littman DR, Russell JH & Klein RS (2011) CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 208(2):327-339.
- Cruz JL, Becares M, Sola I, Oliveros JC, Enjuanes L & Zuniga S (2013) Alphacoronavirus protein 7 modulates host innate immune response. *Journal of virology* 87(17):9754-9767.
- Cullen BR (2001) Journey to the center of the cell. Cell 105(6):697-700.
- Curtis KM, Yount B & Baric RS (2002) Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles. *Journal of virology* 76(3):1422-1434.

- Dales S (1995) Factors controlling coronavirus infections and disease of the central nervous system. A review. *Advances in experimental medicine and biology* 380:13-22.
- Dalziel RG, Lampert PW, Talbot PJ & Buchmeier MJ (1986) Site-specific alteration of murine hepatitis virus type 4 peplomer glycoprotein E2 results in reduced neurovirulence. *Journal of virology* 59(2):463-471.

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. Progress in neurobiology 65(1):1-105.

- Daniel C, Anderson R, Buchmeier MJ, Fleming JO, Spaan WJ, Wege H & Talbot PJ (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. *Journal of virology* 67(3):1185-1194.
- Das S, Ghosh D & Basu A (2009) Japanese encephalitis virus induce immuno-competency in neural stem/progenitor cells. *PloS one* 4(12):e8134.
- Das Sarma J, Fu L, Tsai JC, Weiss SR & Lavi E (2000) Demyelination determinants map to the spike glycoprotein gene of coronavirus mouse hepatitis virus. *Journal of virology* 74(19):9206-9213.
- Das Sarma J, Scheen E, Seo SH, Koval M & Weiss SR (2002) Enhanced green fluorescent protein expression may be used to monitor murine coronavirus spread in vitro and in the mouse central nervous system. *Journal of neurovirology* 8(5):381-391.
- Davies HA & Macnaughton MR (1979) Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Archives of virology* 59(1-2):25-33.
- de Groot RJ (2006) Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconjugate journal* 23(1-2):59-72.
- de Groot RJ & S.C. Baker RSB, C.S. Brown, C. Drosten, L. Enjuanes, R.A. Fouchier, M. Galiano, A.E. Gorbalenya, Z.A. Memish, S. Perlman, L.L. Poon, E.J. Snijder, G.M. Stephens, P.C. Woo, A.M.Zaki, M. Zambon, and J. Ziebuhr. (2013) Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. J. Virol., 87:7790-7792.
- de Groot RJ & S.C. Baker RSB, L. Enjuanes, K.V. Holmes, S. Perlman, L. Poon, P.J.M. Rottier, P.J. Talbot, P.C.Y. Woo, and J. Ziebuhr. (2012) In Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed.: King, A. M. Q., Adams M. J., Lefkowitz, E. Elsevier, pp 783-1196.
- de Haan CA, Haijema BJ, Schellen P, Wichgers Schreur P, te Lintelo E, Vennema H & Rottier PJ (2008) Cleavage of group 1 coronavirus spike proteins: how furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation. *Journal of virology* 82(12):6078-6083.
- de Haan CA, Li Z, te Lintelo E, Bosch BJ, Haijema BJ & Rottier PJ (2005) Murine coronavirus with an extended host range uses heparan sulfate as an entry receptor. *Journal of virology* 79(22):14451-14456.
- de Haan CA, Smeets M, Vernooij F, Vennema H & Rottier PJ (1999) Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *Journal of virology* 73(9):7441-7452.
- de Haan CA, Stadler K, Godeke GJ, Bosch BJ & Rottier PJ (2004) Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. *Journal of virology* 78(11):6048-6054.
- de Haan CA, Volders H, Koetzner CA, Masters PS & Rottier PJ (2002) Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *Journal of virology* 76(24):12491-12502.
- de Monasterio-Schrader P, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP, Patzig J & Werner HB (2012) Systematic approaches to central nervous system myelin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(17):2879-2894.
- De Regge N, Nauwynck HJ, Geenen K, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Mettenleiter TC & Favoreel HW (2006) Alpha-herpesvirus glycoprotein D interaction with sensory neurons triggers formation of varicosities that serve as virus exit sites. *The Journal of cell biology* 174(2):267-275.
- Deane R & Zlokovic BV (2007) Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 4(2):191-197.
- Debby van Riel RV, Thijs Kuiken (2017) The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system.
- Decroly E, Vandenbranden M, Ruysschaert JM, Cogniaux J, Jacob GS, Howard SC, Marshall G, Kompelli A, Basak A, Jean F & et al. (1994) The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-I TM). *The Journal of biological chemistry* 269(16):12240-12247.
- Dedeurwaerder A, Olyslaegers DA, Desmarets LM, Roukaerts ID, Theuns S & Nauwynck HJ (2014) ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN-alpha-induced antiviral response. *The Journal of general virology* 95(Pt 2):393-402.
- DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K & Enjuanes L (2007) A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *Journal of virology* 81(4):1701-1713.
- DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Jimenez-Guardeno JM, Regla-Nava JA, Castano-Rodriguez C, Fernandez-Delgado R, Usera F & Enjuanes L (2014) Coronavirus virulence genes with main focus on SARS-CoV envelope gene. *Virus research* 194:124-137.
- Dediego ML, Pewe L, Alvarez E, Rejas MT, Perlman S & Enjuanes L (2008) Pathogenicity of severe acute respiratory coronavirus deletion mutants in hACE-2 transgenic mice. *Virology* 376(2):379-389.
- Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjostrom H, Noren O & Laude H (1992) Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357(6377):417-420.
- den Boon JA, Kleijnen MF, Spaan WJ & Snijder EJ (1996) Equine arteritis virus subgenomic mRNA synthesis: analysis of leader-body junctions and replicativeform RNAs. *Journal of virology* 70(7):4291-4298.
- Denison MR, Spaan WJ, van der Meer Y, Gibson CA, Sims AC, Prentice E & Lu XT (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. *Journal of virology* 73(8):6862-6871.
- Desforges M, Desjardins J, Zhang C & Talbot PJ (2013a) The acetyl-esterase activity of the hemagglutinin-esterase protein of human coronavirus OC43 strongly enhances the production of infectious virus. *Journal of virology* 87(6):3097-3107.

- Desforges M, Favreau DJ, Brison E, Desjardins J, Meessen-Pinard M, Jacomy H & Talbot PJ (2013b) Human Coronaviruses. Respiratory Pathogens Revisited as Infectious Neuroinvasive, Neurtropic, and Neurovirulent Agents. *Neuroviral Infections. RNA Viruses and Retroviruses*, Singh S.K. RD (Édit.) CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton. p 93-121.
- Desforges M, Le Coupanec A, Brison E, Meessen-Pinard M & Talbot PJ (2014a) Neuroinvasive and neurotropic human respiratory coronaviruses: potential neurovirulent agents in humans. *Advances in experimental medicine and biology* 807:75-96.
- Desforges M, Le Coupanec A, Stodola JK, Meessen-Pinard M & Talbot PJ (2014b) Human coronaviruses: viral and cellular factors involved in neuroinvasiveness and neuropathogenesis. *Virus Res* 194:145-158.
- Desforges M, Miletti TC, Gagnon M & Talbot PJ (2007) Activation of human monocytes after infection by human coronavirus 229E. *Virus research* 130(1-2):228-240.
- Desforges. M & D.J. Favreau EB, J. desjardins, M. Meessen-Pinard, H. Jacomy, P.J. Talbot (2013) Human coronaviruses: respiratory pathogens revisited as infectious neuroinvasive, neurotropic and neurovirulent agents.
- Detje CN, Meyer T, Schmidt H, Kreuz D, Rose JK, Bechmann I, Prinz M & Kalinke U (2009) Local type I IFN receptor signaling protects against virus spread within the central nervous system. *J Immunol* 182(4):2297-2304.
- Diederich S, Thiel L & Maisner A (2008) Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry. *Virology* 375(2):391-400.
- Divito S, Cherpes TL & Hendricks RL (2006) A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunologic research* 36(1-3):119-126.
- Do Carmo S, Jacomy H, Talbot PJ & Rassart E (2008) Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(41):10330-10338.
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H & Doerr HW (2003) Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England journal of medicine* 348(20):1967-1976.
- Dubay JW, Dubay SR, Shin HJ & Hunter E (1995) Analysis of the cleavage site of the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein: requirement of precursor cleavage for glycoprotein incorporation. *Journal of virology* 69(8):4675-4682.
- Duffy S, Shackelton LA & Holmes EC (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature reviews. Genetics* 9(4):267-276.
- Dveksler GS, Pensiero MN, Cardellichio CB, Williams RK, Jiang GS, Holmes KV & Dieffenbach CW (1991) Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *Journal of virology* 65(12):6881-6891.
- Eifart P, Ludwig K, Bottcher C, de Haan CA, Rottier PJ, Korte T & Herrmann A (2007) Role of endocytosis and low pH in murine hepatitis virus strain A59 cell entry. *Journal of virology* 81(19):10758-10768.

- Elagoz A, Benjannet S, Mammarbassi A, Wickham L & Seidah NG (2002) Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *The Journal of biological chemistry* 277(13):11265-11275.
- Enjuanes L, Almazan F, Sola I, Zuniga S, Alvarez E, Reguera J & Capiscol C (2006) Biochemical aspects of coronavirus replication. *Advances in experimental medicine and biology* 581:13-24.
- Evans DT & Desrosiers RC (2001) Immune evasion strategies of the primate lentiviruses. Immunological reviews 183:141-158.
- Farina C, Aloisi F & Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology* 28(3):138-145.
- Favreau DJ, Desforges M, St-Jean JR & Talbot PJ (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):255-267.
- Fazakerley JK & Buchmeier MJ (1993) Pathogenesis of virus-induced demyelination. *Advances in virus research* 42:249-324.
- Fazzini E, Fleming J & Fahn S (1992) Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 7(2):153-158.
- Fenouillet E & Gluckman JC (1992) Immunological analysis of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein proteolytic cleavage. *Virology* 187(2):825-828.
- Finzi A, Xiang SH, Pacheco B, Wang L, Haight J, Kassa A, Danek B, Pancera M, Kwong PD & Sodroski J (2010) Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Molecular cell* 37(5):656-667.
- Fleming JO, Trousdale MD, Bradbury J, Stohlman SA & Weiner LP (1987) Experimental demyelination induced by coronavirus JHM (MHV-4): molecular identification of a viral determinant of paralytic disease. *Microbial pathogenesis* 3(1):9-20.
- Flowerdew SE, Wick D, Himmelein S, Horn AK, Sinicina I, Strupp M, Brandt T, Theil D & Hufner K (2013) Characterization of neuronal populations in the human trigeminal ganglion and their association with latent herpes simplex virus-1 infection. *PloS one* 8(12):e83603.
- Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, Poland A & Pedersen NC (1998) Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *Journal of veterinary internal medicine* 12(6):415-423.
- Foley JE, Rand C & Leutenegger C (2003) Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. *Journal of feline medicine and surgery* 5(6):313-322.
- Follis KE, York J & Nunberg JH (2006) Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology* 350(2):358-369.
- Forgie S & Marrie TJ (2009) Healthcare-associated atypical pneumonia. Seminars in respiratory and critical care medicine 30(1):67-85.
- Forni D, Cagliani R, Clerici M & Sironi M (2017) Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in microbiology* 25(1):35-48.

- Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M, van Amerongen G, van Doornum GJ, van den Hoogen BG, Peiris M, Lim W, Stohr K & Osterhaus AD (2003) Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423(6937):240.
- Frana MF, Behnke JN, Sturman LS & Holmes KV (1985) Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. *Journal of virology* 56(3):912-920.
- Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG & Gale M, Jr. (2008) Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *Journal of virology* 82(2):609-616.
- Freeman MR (2010) Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* 330(6005):774-778.
- Freymuth F, Vabret A, Dina J, Cuvillon-Nimal D, Lubin C, Vaudecrane A, Guillois B, Gouarin S, Petitjean J, Lafaix-Delaire F & Brouard J (2010) [Bronchiolitis viruses]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 17(8):1192-1201.
- Frieman M, Yount B, Heise M, Kopecky-Bromberg SA, Palese P & Baric RS (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *Journal of virology* 81(18):9812-9824.
- Frost JL & Schafer DP (2016) Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends in cell biology* 26(8):587-597.
- Fu L, Gonzales DM, 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. *Journal of neurovirology* 10(1):41-51.
- Fuller AO & Spear PG (1987) Anti-glycoprotein D antibodies that permit adsorption but block infection by herpes simplex virus 1 prevent virion-cell fusion at the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(15):5454-5458.
- Furr SR, Chauhan VS, Sterka D, Jr., Grdzelishvili V & Marriott I (2008) Characterization of retinoic acid-inducible gene-I expression in primary murine glia following exposure to vesicular stomatitis virus. *Journal of neurovirology* 14(6):503-513.
- Gagneur A, Sizun J, Vallet S, Legr MC, Picard B & Talbot PJ (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.
- Gallagher TM & Buchmeier MJ (2001) Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* 279(2):371-374.
- Gallagher TM, Buchmeier MJ & Perlman S (1992) Cell receptor-independent infection by a neurotropic murine coronavirus. *Virology* 191(1):517-522.
- Gallagher TM, Parker SE & Buchmeier MJ (1990) Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. *Journal of virology* 64(2):731-741.
- Galluzzi L, Kepp O, Morselli E, Vitale I, Senovilla L, Pinti M, Zitvogel L & Kroemer G (2010) Viral strategies for the evasion of immunogenic cell death. *Journal of internal medicine* 267(5):526-542.
- Gao D, Wu J, Wu YT, Du F, Aroh C, Yan N, Sun L & Chen ZJ (2013) Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* 341(6148):903-906.

- Gao W, Zhao K, Zhao C, Du C, Ren W, Song D, Lu H, Chen K, Li Z, Lan Y, Xie S, He W & Gao F (2011) Vomiting and wasting disease associated with hemagglutinating encephalomyelitis viruses infection in piglets in Jilin, China. *Virology journal* 8:130.
- Geijtenbeek TB & Gringhuis SI (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature reviews. Immunology* 9(7):465-479.
- Gelinas AM, Boutin M, Sasseville AM & Dea S (2001) Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. *Virus research* 76(1):43-57.
- 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. *Journal of medical virology* 78(7):938-949.
- Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, Kramer-Kuhl A, Welsch K, Winkler M, Meyer B, Drosten C, Dittmer U, von Hahn T, Simmons G, Hofmann H & Pohlmann S (2013) The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *Journal of virology* 87(10):5502-5511.
- Gierer S, Muller MA, Heurich A, Ritz D, Springstein BL, Karsten CB, Schendzielorz A, Gnirss K, Drosten C & Pohlmann S (2015) Inhibition of proprotein convertases abrogates processing of the middle eastern respiratory syndrome coronavirus spike protein in infected cells but does not reduce viral infectivity. *The Journal of infectious diseases* 211(6):889-897.
- Gilden D, Nagel M, Cohrs R, Mahalingam R & Baird N (2015) Varicella Zoster Virus in the Nervous System. *F1000Research* 4.
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D & Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:45.
- Giraudon P & Bernard A (2009) Chronic viral infections of the central nervous system: Aspects specific to multiple sclerosis. *Revue neurologique* 165(10):789-795.
- Giulian D (1999) Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *American journal of human genetics* 65(1):13-18.
- Glass WG, Chen BP, Liu MT & Lane TE (2002) Mouse hepatitis virus infection of the central nervous system: chemokine-mediated regulation of host defense and disease. *Viral immunology* 15(2):261-272.
- Glowacka I, Bertram S, Muller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, Steffen I, Tsegaye TS, He Y, Gnirss K, Niemeyer D, Schneider H, Drosten C & Pohlmann S (2011) Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *Journal of virology* 85(9):4122-4134.
- Gogate N, Swoveland P, Yamabe T, Verma L, Woyciechowska J, Tarnowska-Dziduszko E, Dymecki J & Dhib-Jalbut S (1996) Major histocompatibility complex class I expression on neurons in subacute sclerosing panencephalitis and experimental subacute measles encephalitis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55(4):435-443.
- Goldstein SA, Thornbrough JM, Zhang R, Jha BK, Li Y, Elliott R, Quiroz-Figueroa K, Chen AI, Silverman RH & Weiss SR (2017) Lineage A Betacoronavirus NS2 Proteins and the Homologous Torovirus Berne pp1a Carboxy-Terminal Domain Are

Phosphodiesterases That Antagonize Activation of RNase L. *Journal of virology* 91(5).

- Gombold JL, Sutherland RM, Lavi E, Paterson Y & Weiss SR (1995) Mouse hepatitis virus A59-induced demyelination can occur in the absence of CD8+ T cells. *Microbial pathogenesis* 18(3):211-221.
- Gomes MT, Oliva ML, Lopes MT & Salas CE (2011) Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. *Current protein & peptide science* 12(5):417-436.
- Gonzales-Scarano F (2002) Viral persistence. In Viral pathogenesis and immunity. Ed.: Nathanson N., pp 114-129.
- Gonzalez-Reyes L, Ruiz-Arguello MB, Garcia-Barreno B, Calder L, Lopez JA, Albar JP, Skehel JJ, Wiley DC & Melero JA (2001) Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(17):9859-9864.
- Gotoh B, Ohnishi Y, Inocencio NM, Esaki E, Nakayama K, Barr PJ, Thomas G & Nagai Y (1992) Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. *Journal of virology* 66(11):6391-6397.
- Graham RL, Donaldson EF & Baric RS (2013) A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology* 11(12):836-848.
- Gralinski LE, Ashley SL, Dixon SD & Spindler KR (2009) Mouse adenovirus type 1-induced breakdown of the blood-brain barrier. *Journal of virology* 83(18):9398-9410.
- Greig AS, Mitchell D, Corner AH, Bannister GL, Meads EB & Julian RJ (1962) A Hemagglutinating Virus Producing Encephalomyelitis in Baby Pigs. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science* 26(3):49-56.
- 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 VM & Leong AS (2005a) Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. J Exp Med 202(3):415-424.
- 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 VM & Leong AS (2005b) Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *The Journal of experimental medicine* 202(3):415-424.
- Gu J & Korteweg C (2007) Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *The American journal of pathology* 170(4):1136-1147.
- Guyton AC (1989) Anatomie et physiologie du système nerveux.Traduction er adaptation de l'anglais. Quebec: Décarie éditeur inc., 423 pp.
- Haagmans BL, Kuiken T, Martina BE, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, de Jong T, Itamura S, Chan KH, Tashiro M & Osterhaus AD (2004) Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nature medicine* 10(3):290-293.
- Haijema BJ, Volders H & Rottier PJ (2004) Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *Journal of virology* 78(8):3863-3871.

- Halfon S & Baird T, Craik, C (2004) Trypsin. In: Barrett, Rawlings, Woessner (Eds.),Handbook of Proteolytic Enzymes, vol. 2, second ed. Elsevier, Amsterdam, pp.1483–1488 (2 vols).
- Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD & Garten W (1992) Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360(6402):358-361.
- Hamilton BS, Sun X, Chung C & Whittaker GR (2012) Acquisition of a novel eleven amino acid insertion directly N-terminal to a tetrabasic cleavage site confers intracellular cleavage of an H7N7 influenza virus hemagglutinin. *Virology* 434(1):88-95.
- Hamre D & Procknow JJ (1966) A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 121(1):190-193.
- Haring J & Perlman S (2001) Mouse hepatitis virus. *Current opinion in microbiology* 4(4):462-466.
- Hasoksuz M, Sreevatsan S, Cho KO, Hoet AE & Saif LJ (2002) Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus research* 84(1-2):101-109.
- Hawkins BT & Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews* 57(2):173-185.
- Heald-Sargent T & Gallagher T (2012) Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses* 4(4):557-580.
- Hedstrom L (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews* 102(12):4501-4524.
- Hegyi A & Kolb AF (1998) Characterization of determinants involved in the feline infectious peritonitis virus receptor function of feline aminopeptidase N. *The Journal of general virology* 79 (Pt 6):1387-1391.
- Hemida MG, Elmoslemany A, Al-Hizab F, Alnaeem A, Almathen F, Faye B, Chu DK, Perera RA & Peiris M (2017) Dromedary Camels and the Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). *Transboundary and emerging diseases* 64(2):344-353.
- Hemmila E, Turbide C, Olson M, Jothy S, Holmes KV & Beauchemin N (2004) Ceacam1a-/- mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *Journal of virology* 78(18):10156-10165.
- Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hovelmeyer N, Waisman A, Rulicke T, Prinz M, Priller J, Becher B & Aguzzi A (2005) Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nature medicine* 11(2):146-152.
- Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ & de Groot RJ (1998) Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *Journal of virology* 72(5):4508-4514.
- Hill DP & Robertson KA (1998) Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain research. Brain research protocols* 2(3):183-190.
- Hingley ST, Leparc-Goffart I, Seo SH, Tsai JC & Weiss SR (2002) The virulence of mouse hepatitis virus strain A59 is not dependent on efficient spike protein cleavage and cell-to-cell fusion. *Journal of neurovirology* 8(5):400-410.

- Hirano N, Nomura R, Tawara T & Tohyama K (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.
- Hockfield S (1996) Central Nervous System. In: Extracellular matrix (Comper WD,ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Hofmann H & Pohlmann S (2004) Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends in microbiology* 12(10):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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(22):7988-7993.
- Homberger FR, Zhang L & Barthold SW (1998) Prevalence of enterotropic and polytropic mouse hepatitis virus in enzootically infected mouse colonies. *Laboratory animal science* 48(1):50-54.
- Homma M & Ouchi M (1973) Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. 3. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *Journal of virology* 12(6):1457-1465.
- Horvath CM, Paterson RG, Shaughnessy MA, Wood R & Lamb RA (1992) Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: factors influencing formation of syncytia. *Journal of virology* 66(7):4564-4569.
- Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, Watanabe T, Hatsuzawa K, Ikemizu J, Murakami K & Nakayama K (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 266(19):12127-12130.
- Houff SA, Major EO, Katz DA, Kufta CV, Sever JL, Pittaluga S, Roberts JR, Gitt J, Saini N & Lux W (1988) Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *The New England journal of medicine* 318(5):301-305.
- Houtman JJ & Fleming JO (1996a) Dissociation of demyelination and viral clearance in congenitally immunodeficient mice infected with murine coronavirus JHM. *Journal of neurovirology* 2(2):101-110.
- Houtman JJ & Fleming JO (1996b) Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *Journal of neurovirology* 2(6):361-376.
- Hoving JC, Wilson GJ & Brown GD (2014) Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cellular microbiology* 16(2):185-194.
- Howard PW, Wright CC, Howard T & Johnson DC (2014) Herpes simplex virus gE/gI extracellular domains promote axonal transport and spread from neurons to epithelial cells. *Journal of virology* 88(19):11178-11186.
- Hu X, Yuan Y, Wang D & Su Z (2016) Heterogeneous astrocytes: Active players in CNS. *Brain research bulletin* 125:1-18.
- Huang HI & Shih SR (2015a) Neurotropic Enterovirus Infections in the Central Nervous System. *Viruses* 7(11):6051-6066.
- Huang IC, Bosch BJ, Li F, Li W, Lee KH, Ghiran S, Vasilieva N, Dermody TS, Harrison SC, Dormitzer PR, Farzan M, Rottier PJ & Choe H (2006a) SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *The Journal of biological chemistry* 281(6):3198-3203.

- Huang IC, Bosch BJ, Li W, Farzan M, Rottier PM & Choe H (2006b) SARS-CoV, but not HCoV-NL63, utilizes cathepsins to infect cells: viral entry. *Advances in experimental medicine and biology* 581:335-338.
- Huang X, Dong W, Milewska A, Golda A, Qi Y, Zhu QK, Marasco WA, Baric RS, Sims AC, Pyrc K, Li W & Sui J (2015b) Human Coronavirus HKU1 Spike Protein Uses O-Acetylated Sialic Acid as an Attachment Receptor Determinant and Employs Hemagglutinin-Esterase Protein as a Receptor-Destroying Enzyme. *Journal of virology* 89(14):7202-7213.
- Huber JD, Egleton RD & Davis TP (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in neurosciences* 24(12):719-725.
- Hulswit RJ, de Haan CA & Bosch BJ (2016) Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. Advances in virus research 96:29-57.
- Hurst KR, Kuo L, Koetzner CA, Ye R, Hsue B & Masters PS (2005) A major determinant for membrane protein interaction localizes to the carboxy-terminal domain of the mouse coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of virology* 79(21):13285-13297.
- lacono KT, Kazi L & Weiss SR (2006) Both spike and background genes contribute to murine coronavirus neurovirulence. *Journal of virology* 80(14):6834-6843.
- Iborra S, Izquierdo HM, Martinez-Lopez M, Blanco-Menendez N, Reis e Sousa C & Sancho D (2012) The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *The Journal of clinical investigation* 122(5):1628-1643.
- Imamura F & Hasegawa-Ishii S (2016) Environmental Toxicants-Induced Immune Responses in the Olfactory Mucosa. *Frontiers in immunology* 7:475.
- Irwin DJ, Wunner WH, Ertl HC & Jackson AC (1999) Basis of rabies virus neurovirulence in mice: expression of major histocompatibility complex class I and class II mRNAs. *Journal of neurovirology* 5(5):485-494.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A & Antel JP (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175(7):4320-4330.
- Jacobse-Geels HE & Horzinek MC (1983) Expression of feline infectious peritonitis coronavirus antigens on the surface of feline macrophage-like cells. *The Journal of general virology* 64 (Pt 9):1859-1866.
- Jacomy H, Fragoso G, Almazan G, Mushynski WE & Talbot PJ (2006) Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. *Virology* 349(2):335-346.
- Jacomy H, St-Jean JR, Brison E, Marceau G, Desforges M & Talbot PJ (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):279-293.
- Jacomy H & Talbot PJ (2003) Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* 315(1):20-33.
- James F (2012) Board Review Series Neuroanatomy, Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 4e éd., 480 p. (ISBN 978-0781772457), p. 177.
- Jan YN & Jan LY (2010) Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nature reviews. Neuroscience* 11(5):316-328.

- Jean-Francois Camps & Daniel Eugène MG, Yves Gioanni (2013) Neurosciences tout le cours en fiches.
- Jean A, Quach C, Yung A & Semret M (2013) Severity and outcome associated with human coronavirus OC43 infections among children. *The Pediatric infectious disease journal* 32(4):325-329.
- Jeffers SA, Tusell SM, Gillim-Ross L, Hemmila EM, Achenbach JE, Babcock GJ, Thomas WD, Jr., Thackray LB, Young MD, Mason RJ, Ambrosino DM, Wentworth DE, Demartini JC & Holmes KV (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):15748-15753.
- Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG & Holmes EC (2002) Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of molecular evolution* 54(2):156-165.
- Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I & Nedergaard M (2015) The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochemical research* 40(12):2583-2599.
- Jimenez-Guardeno JM, Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Castano-Rodriguez C & Enjuanes L (2014) The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS pathogens* 10(8):e1004320.
- Johnson-Lussenburg CM & Zheng Q (1987) Coronavirus and multiple sclerosis: results of a case/control longitudinal serological study. *Advances in experimental medicine and biology* 218:421-429.
- Johnston SL & PKP, G. Sanderson, S. Smith, F. Lampe, L. Josephs, P.Symington, S. O'Toole, S. H. Myint, D. A. Tyrrell (1995) Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. BMJ 31 0 (6989): 1225-9.
- Juarez D, Long KC, Aguilar P, Kochel TJ & Halsey ES (2013) Assessment of plaque assay methods for alphaviruses. *Journal of virological methods* 187(1):185-189.
- Jung K, Hu H & Saif LJ (2016) Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis. *Virus research* 226:50-59.
- Kalinke U, Bechmann I & Detje CN (2011) Host strategies against virus entry via the olfactory system. *Virulence* 2(4):367-370.
- Kam YW, Okumura Y, Kido H, Ng LF, Bruzzone R & Altmeyer R (2009) Cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein by airway proteases enhances virus entry into human bronchial epithelial cells in vitro. *PloS one* 4(11):e7870.
- Kandel ER & J.H. Schwartz aTMJ (2000) Principles of neural science, 4th Edition.McGraw-Hill New York, 1760 p.
- Karim S, Mirza Z, Kamal MA, Abuzenadah AM, Azhar EI, Al-Qahtani MH, Damanhouri GA, Ahmad F, Gan SH & Sohrab SS (2014) The role of viruses in neurodegenerative and neurobehavioral diseases. *CNS & neurological disorders drug targets* 13(7):1213-1223.
- Katsetos CD, Legido A, Perentes E & Mork SJ (2003) Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *Journal of child neurology* 18(12):851-866; discussion 867.
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH & Ling EA (2001) Origin of microglia. *Microscopy research and technique* 54(1):2-9.

- Kawase M, Shirato K, Matsuyama S & Taguchi F (2009) Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *Journal of virology* 83(2):712-721.
- Kawase M, Shirato K, van der Hoek L, Taguchi F & Matsuyama S (2012) Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Journal of virology* 86(12):6537-6545.
- Kazi L, Lissenberg A, Watson R, de Groot RJ & Weiss SR (2005) Expression of hemagglutinin esterase protein from recombinant mouse hepatitis virus enhances neurovirulence. *Journal of virology* 79(24):15064-15073.
- Keidar S, Kaplan M & Gamliel-Lazarovich A (2007) ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovascular research* 73(3):463-469.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M & Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiological reviews* 91(2):461-553.
- Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG & Keane RW (2014) Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental neurology* 258:5-16.
- Kipar A & Meli ML (2014) Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Veterinary pathology* 51(2):505-526.
- Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, Bowker LJ & Lutz H (2010) Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *The Journal of general virology* 91(Pt 7):1698-1707.
- Kirschke H, Wiederanders B, Bromme D & Rinne A (1989) Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *The Biochemical journal* 264(2):467-473.
- Klenk HD & Garten W (1994) Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends in microbiology* 2(2):39-43.
- Klumperman J, Locker JK, Meijer A, Horzinek MC, Geuze HJ & Rottier PJ (1994) Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *Journal of virology* 68(10):6523-6534.
- Knoops K, Kikkert M, Worm SH, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM & Snijder EJ (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS biology* 6(9):e226.
- Koch C & Zador A (1993) The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13(2):413-422.
- Koistinen H, Koistinen R, Zhang WM, Valmu L & Stenman UH (2009) Nexin-1 inhibits the activity of human brain trypsin. *Neuroscience* 160(1):97-102.
- Kong SL, Chui P, Lim B & Salto-Tellez M (2009) Elucidating the molecular physiopathology of acute respiratory distress syndrome in severe acute respiratory syndrome patients. *Virus research* 145(2):260-269.
- Kopecky-Bromberg SA, Martinez-Sobrido L, Frieman M, Baric RA & Palese P (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *Journal of virology* 81(2):548-557.
- Koyuncu OO, Hogue IB & Enquist LW (2013) Virus infections in the nervous system. *Cell host & microbe* 13(4):379-393.

- Krempl C, Schultze B & Herrler G (1995) Analysis of cellular receptors for human coronavirus OC43. Advances in experimental medicine and biology 380:371-374.
- Krueger DK, Kelly SM, Lewicki DN, Ruffolo R & Gallagher TM (2001) Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation of membrane fusion. *Journal of virology* 75(6):2792-2802.
- Krzyzaniak MA, Zumstein MT, Gerez JA, Picotti P & Helenius A (2013) Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS pathogens* 9(4):e1003309.
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ & Anderson LJ (2003) A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *The New England journal of medicine* 348(20):1953-1966.
- Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, Laman JD, de Jong T, van Doornum G, Lim W, Ling AE, Chan PK, Tam JS, Zambon MC, Gopal R, Drosten C, van der Werf S, Escriou N, Manuguerra JC, Stohr K, Peiris JS & Osterhaus AD (2003) Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 362(9380):263-270.
- Kunkel F & Herrler G (1993) Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* 195(1):195-202.
- 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. Archives of virology 141(6):1123-1131.
- Kuo L, Hurst KR & Masters PS (2007) Exceptional flexibility in the sequence requirements for coronavirus small envelope protein function. *Journal of virology* 81(5):2249-2262.
- Kuo L & Masters PS (2003) The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *Journal of virology* 77(8):4597-4608.
- Kwiatkowska A, Couture F, Levesque C, Ly K, Desjardins R, Beauchemin S, Prahl A, Lammek B, Neugebauer W, Dory YL & Day R (2014) Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of a potent PACE4 inhibitor. *Journal of medicinal chemistry* 57(1):98-109.
- Lachance C, Arbour N, Cashman NR & Talbot PJ (1998) Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by human coronavirus 229E. *Journal of virology* 72(8):6511-6519.
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I & Finsen B (2005) Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain research. Brain research reviews* 48(2):196-206.
- Lafaille FG, Pessach IM, Zhang SY, Ciancanelli MJ, Herman M, Abhyankar A, Ying SW, Keros S, Goldstein PA, Mostoslavsky G, Ordovas-Montanes J, Jouanguy E, Plancoulaine S, Tu E, Elkabetz Y, Al-Muhsen S, Tardieu M, Schlaeger TM, Daley GQ, Abel L, Casanova JL, Studer L & Notarangelo LD (2012) Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. *Nature* 491(7426):769-773.
- Lafon M, Megret F, Lafage M & Prehaud C (2006) The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. *Journal of molecular neuroscience : MN* 29(3):185-194.

- Lafon M, Megret F, Meuth SG, Simon O, Velandia Romero ML, Lafage M, Chen L, Alexopoulou L, Flavell RA, Prehaud C & Wiendl H (2008) Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to rabies virus encephalitis. *J Immunol* 180(11):7506-7515.
- Lai AL LY, Tamm LK (2005) in Protein–Lipid Interactions, ed Tamm LK (Wiley-VCH, Weinheim, Germany), pp 279–303.
- Lai MM, and D. Cavanagh (1997) The molecular biology of coronaviruses. Adv. Virus Res., 48: 1-100.
- Lamb RA, Kolakofsky, D (2001) Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology. Lippincott Williams &

Wilkins, Philadelphia.

- Lambert F, Jacomy H, Marceau G & Talbot PJ (2008) Titration of human coronaviruses using an immunoperoxidase assay. *Journal of visualized experiments : JoVE* 10.3791/751(14).
- Lampert PW, Sims JK & Kniazeff AJ (1973) Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies. *Acta neuropathologica* 24(1):76-85.
- Larson HE, Reed SE & Tyrrell DA (1980) Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults. *Journal of medical virology* 5(3):221-229.
- Lau KK, Yu WC, Chu CM, Lau ST, Sheng B & Yuen KY (2004) Possible central nervous system infection by SARS coronavirus. *Emerging infectious diseases* 10(2):342-344.
- Lauring AS & Andino R (2010) Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS pathogens* 6(7):e1001005.
- Lauvau G & Soudja SM (2015) Mechanisms of Memory T Cell Activation and Effective Immunity. Advances in experimental medicine and biology 850:73-80.
- Lavi E, Gilden DH, Wroblewska Z, Rorke LB & Weiss SR (1984) Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus. *Neurology* 34(5):597-603.
- Laviada MD, Videgain SP, Moreno L, Alonso F, Enjuanes L & Escribano JM (1990) Expression of swine transmissible gastroenteritis virus envelope antigens on the surface of infected cells: epitopes externally exposed. *Virus research* 16(3):247-254.
- Law HK, Cheung CY, Ng HY, Sia SF, Chan YO, Luk W, Nicholls JM, Peiris JS & Lau YL (2005) Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 106(7):2366-2374.
- Le Coupanec A, Desforges M, Meessen-Pinard M, Dube M, Day R, Seidah NG & Talbot PJ (2015) Cleavage of a Neuroinvasive Human Respiratory Virus Spike Glycoprotein by Proprotein Convertases Modulates Neurovirulence and Virus Spread within the Central Nervous System. *PLoS pathogens* 11(11):e1005261.
- Lecaille F, Bromme D & Lalmanach G (2008) Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* 90(2):208-226.
- Leduc R, Molloy SS, Thorne BA & Thomas G (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *The Journal of biological chemistry* 267(20):14304-14308.

- Lee J & Storch GA (2014) Characterization of human coronavirus OC43 and human coronavirus NL63 infections among hospitalized children <5 years of age. *The Pediatric infectious disease journal* 33(8):814-820.
- Legendre AM & Whitenack DL (1975) Feline infectious peritonitis with spinal cord involvement in two cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 167(10):31-32.
- Leparc-Goffart I, Hingley ST, Chua MM, Jiang X, Lavi E & Weiss SR (1997) Altered pathogenesis of a mutant of the murine coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in the spike protein. *Virology* 239(1):1-10.
- Lepoutre V, Jain P, Quann K, Wigdahl B & Khan ZK (2009) Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Front Biosci* (Landmark Ed) 14:1152-1168.
- Li F, Berardi M, Li W, Farzan M, Dormitzer PR & Harrison SC (2006) Conformational states of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein ectodomain. *Journal of virology* 80(14):6794-6800.
- Li FQ, Tam JP & Liu DX (2007) Cell cycle arrest and apoptosis induced by the coronavirus infectious bronchitis virus in the absence of p53. *Virology* 365(2):435-445.
- Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J & Rossmann MG (2008) The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science* 319(5871):1830-1834.
- Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S & Wang LF (2005) Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310(5748):676-679.
- Li Y, Li H, Fan R, Wen B, Zhang J, Cao X, Wang C, Song Z, Li S, Li X, Lv X, Qu X, Huang R & Liu W (2016) Coronavirus Infections in the Central Nervous System and Respiratory Tract Show Distinct Features in Hospitalized Children. *Intervirology* 59(3):163-169.
- Li Z, Michael IP, Zhou D, Nagy A & Rini JM (2013) Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(13):5004-5009.
- Liao Y, Tam JP & Liu DX (2006) Viroporin activity of SARS-CoV E protein. Advances in experimental medicine and biology 581:199-202.
- Licitra BN, Millet JK, Regan AD, Hamilton BS, Rinaldi VD, Duhamel GE & Whittaker GR (2013) Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerging infectious diseases* 19(7):1066-1073.
- Liddelow SA (2011) Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids and barriers of the CNS* 8(1):2.
- Lim KP & Liu DX (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. *The Journal of biological chemistry* 276(20):17515-17523.
- Lin MT, Hinton DR, Marten NW, Bergmann CC & Stohlman SA (1999) Antibody prevents virus reactivation within the central nervous system. *J Immunol* 162(12):7358-7368.
- Lindberg I (1994) Evidence for cleavage of the PC1/PC3 pro-segment in the endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular neurosciences* 5(3):263-268.

- Lindenbach BD & Thiel HJ, Rice, C.M., (2007) Field's Virology. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Lipton H & Gilden aD (1996) Viral diseases of the central nervous system: persistent infections. Viral pathogenesis. Ed.: N. Nathanson, P. Lippincott-Raven, pp 853-867.
- Lipton HL (1975) Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. *Infection and immunity* 11(5):1147-1155.
- Liu DX, Fung TS, Chong KK, Shukla A & Hilgenfeld R (2014) Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral research* 109:97-109.
- Liu L & Duff K (2008) A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *Journal of visualized experiments : JoVE* 10.3791/960(21).
- Lokugamage KG, Narayanan K, Nakagawa K, Terasaki K, Ramirez SI, Tseng CT & Makino S (2015) Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp1 Inhibits Host Gene Expression by Selectively Targeting mRNAs Transcribed in the Nucleus while Sparing mRNAs of Cytoplasmic Origin. *Journal of virology* 89(21):10970-10981.
- Long KM, Whitmore AC, Ferris MT, Sempowski GD, McGee C, Trollinger B, Gunn B & Heise MT (2013) Dendritic cell immunoreceptor regulates Chikungunya virus pathogenesis in mice. *Journal of virology* 87(10):5697-5706.
- Lu H, Hu J, Li J, Pang W, Hu Y, Yang H, Li W, Huang C, Zhang M & Jiang Y (2013) Optimal dose of zinc supplementation for preventing aluminum-induced neurotoxicity in rats. *Neural regeneration research* 8(29):2754-2762.
- Luo W, Wang Y & Reiser G (2007) Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain research reviews* 56(2):331-345.
- Luytjes W, Sturman LS, Bredenbeek PJ, Charite J, van der Zeijst BA, Horzinek MC & Spaan WJ (1987) Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. *Virology* 161(2):479-487.
- Ma Z & Damania B (2016) The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses. *Cell host & microbe* 19(2):150-158.
- Ma Z, Jacobs SR, West JA, Stopford C, Zhang Z, Davis Z, Barber GN, Glaunsinger BA, Dittmer DP & Damania B (2015) Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(31):E4306-4315.
- MacNamara KC, Chua MM, Nelson PT, Shen H & Weiss SR (2005) Increased epitopespecific CD8+ T cells prevent murine coronavirus spread to the spinal cord and subsequent demyelination. *Journal of virology* 79(6):3370-3381.
- Macnaughton MR, Hasony HJ, Madge MH & Reed SE (1981) Antibody to virus components in volunteers experimentally infected with human coronavirus 229E group viruses. *Infection and immunity* 31(3):845-849.
- Madan V, Garcia Mde J, Sanz MA & Carrasco L (2005) Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. *FEBS letters* 579(17):3607-3612.
- Mader SS (2008) Biologie humaine. Chenelière éducation.
- Marc Desforges & Talbot MM-PaPJ (2016) MODULATING REGULATED CELL DEATH: THE VIRUS WAY TO INFLUENCE CELL FATE, SURVIVE AND PERSIST. In: Programmed Cell Death in Plants and Animals ISBN: 978-1-63484-505-2.

- Marten NW, Stohlman SA, Atkinson RD, Hinton DR, Fleming JO & Bergmann CC (2000) Contributions of CD8+ T cells and viral spread to demyelinating disease. *J Immunol* 164(8):4080-4088.
- Martinon F, Burns K & Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of prolL-beta. *Molecular cell* 10(2):417-426.
- Masters P (2003) Coronaviridae. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), FieldsVirology, vol. 1, sixth ed. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp.825–858 (2 vols).
- Masters P (2013) Coronaviridae. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), FieldsVirology, vol. 1, sixth ed. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp.825–858 (2 vols).
- Matsubara Y, Watanabe R & Taguchi F (1991) Neurovirulence of six different murine coronavirus JHMV variants for rats. *Virus research* 20(1):45-58.
- Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M & Taguchi F (2010) Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *Journal of virology* 84(24):12658-12664.
- Matsuyama S & Taguchi F (2002) Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *Journal of virology* 76(23):11819-11826.
- Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M & Taguchi F (2005) Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(35):12543-12547.
- McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR & Weissman IL (1988) Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53(1):55-67.
- McGavern DB & Kang SS (2011) Illuminating viral infections in the nervous system. *Nature reviews. Immunology* 11(5):318-329.
- McGoldrick A, Lowings JP & Paton DJ (1999) Characterisation of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a. *Archives of virology* 144(4):763-770.
- McKeating JA, McKnight A & Moore JP (1991) Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization. *Journal of virology* 65(2):852-860.
- McIntosh K & Dees JH, 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. Sei.* USA 57, 933-940.
- Meessen-Pinard M, Le Coupanec A, Desforges M & Talbot PJ (2016) Pivotal role of RIP1 and MLKL in neuronal cell death induced by the human neuroinvasive coronavirus OC43. *Journal of virology* 10.1128/JVI.01513-16.
- Meessen-Pinard M, Le Coupanec A, Desforges M & Talbot PJ (2017) Pivotal Role of Receptor-Interacting Protein Kinase 1 and Mixed Lineage Kinase Domain-Like in Neuronal Cell Death Induced by the Human Neuroinvasive Coronavirus OC43. *Journal of virology* 91(1).
- Mekhail M, Almazan G & Tabrizian M (2012) Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: a review. *Progress in neurobiology* 96(3):322-339.
- Menachery VD, Eisfeld AJ, Schafer A, Josset L, Sims AC, Proll S, Fan S, Li C, Neumann G, Tilton SC, Chang J, Gralinski LE, Long C, Green R, Williams CM, Weiss J,

Matzke MM, Webb-Robertson BJ, Schepmoes AA, Shukla AK, Metz TO, Smith RD, Waters KM, Katze MG, Kawaoka Y & Baric RS (2014) Pathogenic influenza viruses and coronaviruses utilize similar and contrasting approaches to control interferon-stimulated gene responses. *mBio* 5(3):e01174-01114.

- Meurs EF, Watanabe Y, Kadereit S, Barber GN, Katze MG, Chong K, Williams BR & Hovanessian AG (1992) Constitutive expression of human double-stranded RNAactivated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *Journal of virology* 66(10):5805-5814.
- Mielech AM, Kilianski A, Baez-Santos YM, Mesecar AD & Baker SC (2014) MERS-CoV papain-like protease has delSGylating and deubiquitinating activities. *Virology* 450-451:64-70.
- Miller DC (1995) Post-polio syndrome spinal cord pathology. Case report with immunopathology. Annals of the New York Academy of Sciences 753:186-193.
- Millet JK, Goldstein ME, Labitt RN, Hsu HL, Daniel S & Whittaker GR (2016) A camelderived MERS-CoV with a variant spike protein cleavage site and distinct fusion activation properties. *Emerging microbes & infections* 5(12):e126.
- Millet JK & Whittaker GR (2014a) Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(42):15214-15219.
- Millet JK & Whittaker GR (2014b) Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus research* 10.1016/j.virusres.2014.11.021.
- Millet JK & Whittaker GR (2015) Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus research* 202:120-134.
- Minakshi R, Padhan K, Rani M, Khan N, Ahmad F & Jameel S (2009) The SARS Coronavirus 3a protein causes endoplasmic reticulum stress and induces ligandindependent downregulation of the type 1 interferon receptor. *PloS one* 4(12):e8342.
- Mink JW, Blumenschine RJ & Adams DB (1981) Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *The American journal of physiology* 241(3):R203-212.
- Morfopoulou S, Brown JR, Davies EG, Anderson G, Virasami A, Qasim W, Chong WK, Hubank M, Plagnol V, Desforges M, Jacques TS, Talbot PJ & Breuer J (2016) Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal Encephalitis. *The New England journal of medicine* 375(5):497-498.
- Morfopoulou S, J.R. Brown, E.G. Davies, G. Anderson, A. Virasami, W. Qasim, W.K. Chong, M. Hubank, V. Plagnol, M. Desforges, T.S. Jacques, P.J. Talbot, J. Breuer (2016) Coronavirus HCoV-OC43 associated with fatal encephalitis. *New England Journal of Medicine* (In Press).
- Mori I (2015a) Transolfactory neuroinvasion by viruses threatens the human brain.
- Mori I (2015b) Transolfactory neuroinvasion by viruses threatens the human brain. *Acta virologica* 59(4):338-349.
- Mori I, Goshima F, Imai Y, Kohsaka S, Sugiyama T, Yoshida T, Yokochi T, Nishiyama Y & Kimura Y (2002) Olfactory receptor neurons prevent dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by undergoing virus-induced apoptosis. *The Journal of general virology* 83(Pt 9):2109-2116.

- Mori I, Nishiyama Y, Yokochi T & Kimura Y (2005) Olfactory transmission of neurotropic viruses. *Journal of neurovirology* 11(2):129-137.
- Morrison TG (2003) Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochimica et biophysica acta* 1614(1):73-84.
- Mort (2004) Cathepsin B. In: Barrett, Rawlings, Woessner (Eds.), Handbook of Pro-teolytic Enzymes, vol. 2, second ed. Elsevier, pp. 1079–1086 (2 vols).
- Mounir S & Talbot PJ (1992) Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. *The Journal of general virology* 73 (Pt 10):2731-2736.
- Mukherjee P, Winkler CW, Taylor KG, Woods TA, Nair V, Khan BA & Peterson KE (2015) SARM1, Not MyD88, Mediates TLR7/TLR9-Induced Apoptosis in Neurons. *J Immunol* 195(10):4913-4921.
- Myint SH (1994) Human coronaviruses: a brief review. Rev. Med. Virol. 4, 35-46.
- Myint SH (1995) Human Coronavirus Infections. In The Coronaviridae, edited by S. G. Siddell. 389-401. New York: Plenum Press.
- Nag S (2011) Morphology and properties of astrocytes. Methods Mol Biol 686:69-100.
- Nair S & Diamond MS (2015) Innate immune interactions within the central nervous system modulate pathogenesis of viral infections. *Current opinion in immunology* 36:47-53.
- Nakanishi M, Niidome T, Matsuda S, Akaike A, Kihara T & Sugimoto H (2007) Microgliaderived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *The European journal of neuroscience* 25(3):649-658.
- Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, Kam J, Staropoli I, Crescenzo-Chaigne B, Escriou N, van der Werf S, Yuen KY & Altmeyer R (2005) Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *The Journal of general virology* 86(Pt 5):1423-1434.
- Namy O, Moran SJ, Stuart DI, Gilbert RJ & Brierley I (2006) A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* 441(7090):244-247.
- Narayanan K, Kim KH & Makino S (2003) Characterization of N protein self-association in coronavirus ribonucleoprotein complexes. *Virus research* 98(2):131-140.
- Narayanan K, Maeda A, Maeda J & Makino S (2000) Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *Journal of virology* 74(17):8127-8134.
- Narayanan K, Ramirez SI, Lokugamage KG & Makino S (2015) Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus research* 202:89-100.
- Nash TC & Buchmeier MJ (1997) Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways. *Virology* 233(1):1-8.
- Navas-Martin S, Hingley ST & Weiss SR (2005) Murine coronavirus evolution in vivo: functional compensation of a detrimental amino acid substitution in the receptor binding domain of the spike glycoprotein. *Journal of virology* 79(12):7629-7640.
- Navas S, Seo SH, Chua MM, Das Sarma J, Lavi E, Hingley ST & Weiss SR (2001) Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in the liver and cause hepatitis. *Journal of virology* 75(5):2452-2457.

- Navas S & Weiss SR (2003) Murine coronavirus-induced hepatitis: JHM genetic background eliminates A59 spike-determined hepatotropism. *Journal of virology* 77(8):4972-4978.
- Nave KA (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468(7321):244-252.
- Netland J, Meyerholz DK, 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. *Journal of virology* 82(15):7264-7275.
- Netzel-Arnett S, Hooper JD, Szabo R, Madison EL, Quigley JP, Bugge TH & Antalis TM (2003) Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer metastasis reviews* 22(2-3):237-258.
- Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE & Ling AE (2003) Early events of SARS coronavirus infection in vero cells. *Journal of medical virology* 71(3):323-331.
- Nguyen LT & Ohashi PS (2015) Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nature reviews. Immunology* 15(1):45-56.
- Nicholas RS, Wing MG & Compston A (2001) Nonactivated microglia promote oligodendrocyte precursor survival and maturation through the transcription factor NF-kappa B. *The European journal of neuroscience* 13(5):959-967.
- Nicholson C (1995) Extracellular space as the pathway for neuron-glial cell interaction. In: Neuroglia (Ransom HKB, ed). New York: Oxford University Press.
- Nicoll MP, Proenca JT & Efstathiou S (2012) The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS microbiology reviews* 36(3):684-705.
- Nieto-Torres JL, Verdia-Baguena C, Jimenez-Guardeno JM, Regla-Nava JA, Castano-Rodriguez C, Fernandez-Delgado R, Torres J, Aguilella VM & Enjuanes L (2015) Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* 485:330-339.
- Notkins AL, and M.B. Oldstone. (1986) Concepts in viral pathogenesis II. New York, NY; Springer-Verlag New York Inc., United States. 420 pp.
- Notkins AL & Oldstone. aMB (1986) Concepts in viral pathogenesis II. New York, NY; Springer-Verlag New York Inc., United States. 420 pp.
- O'Brien J (2014) The ever-changing electrical synapse. *Current opinion in neurobiology* 29:64-72.
- O'Kusky J & Ye P (2012) Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Frontiers in neuroendocrinology* 33(3):230-251.
- Okada Y (1969) Factors in fusion of cells by HVJ. Current topics in microbiology and immunology 48:102-128.
- Okumura Y, Takahashi E, Yano M, Ohuchi M, Daidoji T, Nakaya T, Bottcher E, Garten W, Klenk HD & Kido H (2010) Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *Journal of virology* 84(10):5089-5096.
- Olson JK & Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173(6):3916-3924.

- Ontiveros E, Kim TS, Gallagher TM & 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. *Journal of virology* 77(19):10260-10269.
- Ortego J, Ceriani JE, Patino C, Plana J & Enjuanes L (2007) Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* 368(2):296-308.
- 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. *Journal of virology* 76(22):11518-11529.
- Owen J & Punt J SS (2014) Immunologie 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision. Dunod.
- Ozden S, Lucas-Hourani M, Ceccaldi PE, Basak A, Valentine M, Benjannet S, Hamelin J, Jacob Y, Mamchaoui K, Mouly V, Despres P, Gessain A, Butler-Browne G, Chretien M, Tangy F, Vidalain PO & Seidah NG (2008) Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *The Journal of biological chemistry* 283(32):21899-21908.
- Pager CT, Craft WW, Jr., Patch J & Dutch RE (2006) A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L. *Virology* 346(2):251-257.
- Pager CT & Dutch RE (2005) Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein. *Journal of virology* 79(20):12714-12720.
- Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A & Thoulouze MI (2010) Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature medicine* 16(1):83-89.
- Palm NW & Medzhitov R (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews* 227(1):221-233.
- Park CH, Ishinaka M, Takada A, Kida H, Kimura T, Ochiai K & Umemura T (2002) The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. *Archives of virology* 147(7):1425-1436.
- Park JE, Cruz DJ & Shin HJ (2011) Receptor-bound porcine epidemic diarrhea virus spike protein cleaved by trypsin induces membrane fusion. *Archives of virology* 156(10):1749-1756.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR & Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155(7):1596-1609.
- Parkin J & Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357(9270):1777-1789.
- Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A & Bessis A (2012) Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(4):E197-205.

- Pasick JM, Kalicharran K & Dales S (1994) Distribution and trafficking of JHM coronavirus structural proteins and virions in primary neurons and the OBL-21 neuronal cell line. *Journal of virology* 68(5):2915-2928.
- Pasternak AO, Spaan WJ & Snijder EJ (2006) Nidovirus transcription: how to make sense...? *The Journal of general virology* 87(Pt 6):1403-1421.
- Paul S, Ricour C, Sommereyns C, Sorgeloos F & Michiels T (2007) Type I interferon response in the central nervous system. *Biochimie* 89(6-7):770-778.
- Peeples ME & Bratt MA (1984) Mutation in the matrix protein of Newcastle disease virus can result in decreased fusion glycoprotein incorporation into particles and decreased infectivity. *Journal of virology* 51(1):81-90.
- Peiris JS, Guan Y & Yuen KY (2004) Severe acute respiratory syndrome. *Nature medicine* 10(12 Suppl):S88-97.
- Peltier DC, Simms A, Farmer JR & Miller DJ (2010) Human neuronal cells possess functional cytoplasmic and TLR-mediated innate immune pathways influenced by phosphatidylinositol-3 kinase signaling. *J Immunol* 184(12):7010-7021.
- Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK & Pakkenberg B (2008) Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of aging* 29(11):1754-1762.
- Pereda AE (2014) Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature reviews. Neuroscience* 15(4):250-263.
- Perlman S, Evans G & Afifi A (1990) Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. *The Journal of experimental medicine* 172(4):1127-1132.
- Perlman S, Jacobsen G & Afifi A (1989) Spread of a neurotropic murine coronavirus into the CNS via the trigeminal and olfactory nerves. *Virology* 170(2):556-560.
- Permanyer M, Ballana E & Este JA (2010) Endocytosis of HIV: anything goes. *Trends in microbiology* 18(12):543-551.
- Petito CK, Kerza-Kwiatecki AP, Gendelman HE, McCarthy M, Nath A, Podack ER, Shapshak P & Wiley CA (1999) Review: neuronal injury in HIV infection. *Journal of neurovirology* 5(4):327-341.
- Phillips JJ, Chua MM, Lavi E & Weiss SR (1999) Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence. *Journal of virology* 73(9):7752-7760.
- Phillips JJ, Chua MM, Rall GF & Weiss SR (2002) Murine coronavirus spike glycoprotein mediates degree of viral spread, inflammation, and virus-induced immunopathology in the central nervous system. *Virology* 301(1):109-120.
- Phillips JJ & Weiss SR (2001) MHV neuropathogenesis: the study of chimeric S genes and mutations in the hypervariable region. *Advances in experimental medicine and biology* 494:115-119.
- Pichlmair A & Reis e Sousa C (2007) Innate recognition of viruses. *Immunity* 27(3):370-383.
- Plaimauer B, Mohr G, Wernhart W, Himmelspach M, Dorner F & Schlokat U (2001) 'Shed' furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus. *The Biochemical journal* 354(Pt 3):689-695.

- Plakhov IV, Arlund EE, Aoki C & Reiss CS (1995) The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. *Virology* 209(1):257-262.
- Pohlmann S, Gramberg T, Wegele A, Pyrc K, van der Hoek L, Berkhout B & Hofmann H (2006) Interaction between the spike protein of human coronavirus NL63 and its cellular receptor ACE2. *Advances in experimental medicine and biology* 581:281-284.
- Polgár L (1989) Cysteine Proteases B. Cathepsins, Mechanisms of Protease Action.CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 125–128.
- Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K & Dittel BN (2005) Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *Journal of neuroscience research* 81(3):374-389.
- Poon LL, Guan Y, Nicholls JM, Yuen KY & Peiris JS (2004) The aetiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet. Infectious diseases* 4(11):663-671.
- Principi N, Bosis S & Esposito S (2010) Effects of coronavirus infections in children. Emerging infectious diseases 16(2):183-188.
- Puente XS, Sanchez LM, Overall CM & Lopez-Otin C (2003) Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature reviews. Genetics* 4(7):544-558.
- Pulzova L, Bhide MR & Andrej K (2009) Pathogen translocation across the blood-brain barrier. *FEMS immunology and medical microbiology* 57(3):203-213.
- Qian Z, Dominguez SR & Holmes KV (2013) Role of the spike glycoprotein of human Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in virus entry and syncytia formation. *PloS one* 8(10):e76469.
- Qinfen Z, Jinming C, Xiaojun H, Huanying Z, Jicheng H, Ling F, Kunpeng L & Jingqiang Z (2004) The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *Journal of medical virology* 73(3):332-337.
- Qiu Z, Hingley ST, Simmons G, Yu C, Das Sarma J, Bates P & Weiss SR (2006) Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. *Journal of virology* 80(12):5768-5776.
- Quaegebeur A, Lange C & Carmeliet P (2011) The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71(3):406-424.
- Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Muller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JA, Zaki A, Fouchier RA, Thiel V, Drosten C, Rottier PJ, Osterhaus AD, Bosch BJ & Haagmans BL (2013) Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495(7440):251-254.
- Ramakrishna C, Atkinson RA, Stohlman SA & Bergmann CC (2006) Vaccine-induced memory CD8+ T cells cannot prevent central nervous system virus reactivation. J Immunol 176(5):3062-3069.
- Ramakrishna C, Stohlman SA, Atkinson RA, Hinton DR & Bergmann CC (2004) Differential regulation of primary and secondary CD8+ T cells in the central nervous system. *J Immunol* 173(10):6265-6273.
- Ramakrishna C, Stohlman SA, Atkinson RD, Shlomchik MJ & Bergmann CC (2002) Mechanisms of central nervous system viral persistence: the critical role of antibody and B cells. *J Immunol* 168(3):1204-1211.

- Ramsay AJ, Quesada V, Sanchez M, Garabaya C, Sarda MP, Baiget M, Remacha A, Velasco G & Lopez-Otin C (2009) Matriptase-2 mutations in iron-refractory iron deficiency anemia patients provide new insights into protease activation mechanisms. *Human molecular genetics* 18(19):3673-3683.
- Rangel-Gomez M & Meeter M (2016) Neurotransmitters and Novelty: A Systematic Review. *J Psychopharmacol* 30(1):3-12.
- Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R & Ross SR (2002) Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(4):2281-2286.
- Rawlings & Barrett (2004) Introduction: the clans and families of cysteine peptidases.In: Barrett, Rawlings, Woessner (Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes, vol. 2,second ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 1051–1071 (2 vols).
- Rawlings ND & Barrett AJ (1993) Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical journal* 290 (Pt 1):205-218.
- Rawlings ND, Barrett AJ & Bateman A (2012) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research* 40(Database issue):D343-350.
- Regan AD, Shraybman R, Cohen RD & Whittaker GR (2008) Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses. *Veterinary microbiology* 132(3-4):235-248.
- Reinert LS, Harder L, Holm CK, Iversen MB, Horan KA, Dagnaes-Hansen F, Ulhoi BP, Holm TH, Mogensen TH, Owens T, Nyengaard JR, Thomsen AR & Paludan SR (2012) TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. *The Journal of clinical investigation* 122(4):1368-1376.
- Reitter JN, Means RE & Desrosiers RC (1998) A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nature medicine* 4(6):679-684.
- Remacle AG, Shiryaev SA, Oh ES, Cieplak P, Srinivasan A, Wei G, Liddington RC, Ratnikov BI, Parent A, Desjardins R, Day R, Smith JW, Lebl M & Strongin AY (2008) Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases. A comparative study. *The Journal of biological chemistry* 283(30):20897-20906.
- Reusken CB, Raj VS, Koopmans MP & Haagmans BL (2016) Cross host transmission in the emergence of MERS coronavirus. *Current opinion in virology* 16:55-62.
- Ricard CS & Sturman LS (1985) Isolation of the subunits of the coronavirus envelope glycoprotein E2 by hydroxyapatite high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 326:191-197.
- Riski H & Hovi T (1980) Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. *Journal of medical virology* 6(3):259-265.
- Rochel S & Margolis FL (1980) The response of ornithine decarboxylase during neuronal degeneration and regeneration in olfactory epithelium. *Journal of neurochemistry* 35(4):850-860.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR & Peterson PK (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical microbiology reviews* 17(4):942-964, table of contents.
- Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J & Smit JM (2010) Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS pathogens* 6(1):e1000718.

- Rossi D (2015) Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Progress in neurobiology* 130:86-120.
- Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus AD, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ & Bellini WJ (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300(5624):1394-1399.
- Roth-Cross JK, Stokes H, Chang G, Chua MM, Thiel V, Weiss SR, Gorbalenya AE & Siddell SG (2009) Organ-specific attenuation of murine hepatitis virus strain A59 by replacement of catalytic residues in the putative viral cyclic phosphodiesterase ns2. *Journal of virology* 83(8):3743-3753.
- Rottier PJ (1990) Background paper. Coronavirus M and HE: two peculiar glycoproteins. Advances in experimental medicine and biology 276:91-94.
- Rousselet E, Benjannet S, Hamelin J, Canuel M & Seidah NG (2011) The proprotein convertase PC7: unique zymogen activation and trafficking pathways. *The Journal of biological chemistry* 286(4):2728-2738.
- Rowe CL, Baker SC, Nathan MJ & Fleming JO (1997) Evolution of mouse hepatitis virus: detection and characterization of spike deletion variants during persistent infection. *Journal of virology* 71(4):2959-2969.
- Russo MV & McGavern DB (2015) Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury. *Trends in immunology* 36(10):637-650.
- Saeki K, Ohtsuka N & Taguchi F (1997) Identification of spike protein residues of murine coronavirus responsible for receptor-binding activity by use of soluble receptor-resistant mutants. *Journal of virology* 71(12):9024-9031.
- Sakka L, Coll G & Chazal J (2011) Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases* 128(6):309-316.
- Saksena MM, Wakisaka H, Tijono B, Boadle RA, Rixon F, Takahashi H & Cunningham AL (2006) Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons. *Journal of virology* 80(7):3592-3606.
- Samuel MA, Whitby K, Keller BC, Marri A, Barchet W, Williams BR, Silverman RH, Gale M, Jr. & Diamond MS (2006) PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *Journal of virology* 80(14):7009-7019.
- Sato S & Kiyono H (2012) The mucosal immune system of the respiratory tract. *Current* opinion in virology 2(3):225-232.
- Sato T, Takeyama N, Katsumata A, Tuchiya K, Kodama T & Kusanagi K (2011) Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo. *Virus genes* 43(1):72-78.
- Sattentau Q (2008) Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nature reviews. Microbiology* 6(11):815-826.
- Sattentau QJ (2011) The direct passage of animal viruses between cells. *Current opinion in virology* 1(5):396-402.
- Sawicki SG, Sawicki DL & Siddell SG (2007) A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of virology* 81(1):20-29.

- Schechter I & Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications* 27(2):157-162.
- Scheid A & Choppin PW (1974) Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57(2):475-490.
- Scherrmann JM (2002) Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. Vascular pharmacology 38(6):349-354.
- Schneider WM, Chevillotte MD & Rice CM (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology* 32:513-545.
- Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, Gainey MD, Shrestha B, Eitson JL, Mar KB, Richardson RB, Ratushny AV, Litvak V, Dabelic R, Manicassamy B, Aitchison JD, Aderem A, Elliott RM, Garcia-Sastre A, Racaniello V, Snijder EJ, Yokoyama WM, Diamond MS, Virgin HW & Rice CM (2014) Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* 505(7485):691-695.
- Schonberger K, Ludwig MS, Wildner M & Weissbrich B (2013) Epidemiology of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in Germany from 2003 to 2009: a risk estimation. *PloS one* 8(7):e68909.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T & Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* 75(2):163-189.
- Schwegmann-Wessels C & Herrler G (2006) Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconjugate journal* 23(1-2):51-58.
- Seidah NG (2011) The proprotein convertases, 20 years later. *Methods Mol Biol* 768:23-57.
- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A & Chretien M (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosisregulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(3):928-933.
- Seidah NG & Chretien M (1992) Proprotein and prohormone convertases of the subtilisin family Recent developments and future perspectives. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 3(4):133-140.
- Seidah NG & Chretien M (1999a) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain research* 848(1-2):45-62.
- Seidah NG, Khatib AM & Prat A (2006) The proprotein convertases and their implication in sterol and/or lipid metabolism. *Biological chemistry* 387(7):871-877.
- Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, Poirier S, Essalmani R & Prat A (2008) The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(6-7):1111-1125.
- Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, Mamarbachi AM, Benjannet S, Toure BB, Basak A, Munzer JS, Marcinkiewicz J, Zhong M, Barale JC, Lazure C, Murphy RA, Chretien M & Marcinkiewicz M (1999b) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* of America 96(4):1321-1326.
- Seidah NG & Prat A (2012) The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature reviews. Drug discovery* 11(5):367-383.

- Semaan W, Desbiens L, Houde M, Labonte J, Gagnon H, Yamamoto D, Takai S, Laidlaw T, Bkaily G, Schwertani A, Pejler G, Levesque C, Desjardins R, Day R & D'Orleans-Juste P (2015) Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1-31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase. *Biochemical pharmacology* 94(2):91-100.
- Shapiro J, Sciaky N, Lee J, Bosshart H, Angeletti RH & Bonifacino JS (1997) Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 45(1):3-12.
- Shayakhmetov DM (2010) Virus infection recognition and early innate responses to nonenveloped viral vectors. *Viruses* 2(1):244-261.
- Shen LW, Mao HJ, Wu YL, Tanaka Y & Zhang W (2017) TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections. *Biochimie* 142:1-10.
- Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y & Sato K (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34(6):2231-2243.
- Shirato K, Kanou K, Kawase M & Matsuyama S (2017) Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *Journal of virology* 91(1).
- Shirato K, Kawase M & Matsuyama S (2013) Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. *Journal of virology* 87(23):12552-12561.
- Shirato K, Matsuyama S, Ujike M & Taguchi F (2011) Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *Journal of virology* 85(15):7872-7880.
- Shirato K, Miyoshi H, Goto A, Ako Y, Ueki T, Kariwa H & Takashima I (2004) Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. *The Journal of general virology* 85(Pt 12):3637-3645.
- Shrestha R, Millington O, Brewer J & Bushell T (2013) Is central nervous system an immune-privileged site? *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 11(41):102-107.
- Shulla A & Gallagher T (2009) Role of spike protein endodomains in regulating coronavirus entry. *The Journal of biological chemistry* 284(47):32725-32734.
- Shulla A, Heald-Sargent T, Subramanya G, Zhao J, Perlman S & Gallagher T (2011) A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *Journal of virology* 85(2):873-882.
- Sibley WA, Bamford CR & Clark K (1985) Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1(8441):1313-1315.
- Siddell S & Z, 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 SG (1995) The Coronaviridae. Plenum, New York, NY.
- Siezen RJ & Leunissen JA (1997) Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein science : a publication of the Protein Society* 6(3):501-523.
- Silverman RH (2007) Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *Journal of virology* 81(23):12720-12729.

- Simard M & Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129(4):877-896.
- Simmons G, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Chaipan C, Agudelo J, Lu K, Rennekamp AJ, Hofmann H, Bates P & Pohlmann S (2011) Different host cell proteases activate the SARS-coronavirus spike-protein for cell-cell and virus-cell fusion. *Virology* 413(2):265-274.
- Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL & Bates P (2005) Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(33):11876-11881.
- Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ & Bates P (2004) Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(12):4240-4245.
- Simmons G, Zmora P, Gierer S, Heurich A & Pohlmann S (2013) Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral research* 100(3):605-614.
- Sims AC, Baric RS, Yount B, Burkett SE, Collins PL & Pickles RJ (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. *Journal of virology* 79(24):15511-15524.
- Siu KL, Chan CP, Kok KH, Woo PC & Jin DY (2014) Comparative analysis of the activation of unfolded protein response by spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus HKU1. *Cell & bioscience* 4(1):3.
- Sizun J, Soupre D, Giroux JD, Alix D, De P, Legrand MC, Demazure M & Chastel C (1993) Nasal colonization with coronavirus and apnea of the premature newborn. *Acta Paediatr* 82(3):238.
- Sizun J, Soupre D, Legrand MC, Giroux JD, Rubio S, Cauvin JM, 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(6):617-620.
- Skehel JJ & Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry* 69:531-569.
- Slauson DO & Finn JP (1972) Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 160(5):729-734.
- Small D & Burden RS, C. (2011) The Emerging Relevance of the Cysteine Protease Cathepsin
- S in Disease. Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism 9, 122–132.
- Smith EC, Blanc H, Surdel MC, Vignuzzi M & Denison MR (2013a) Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS pathogens* 9(8):e1003565.
- Smith EC & Denison MR (2013b) Coronaviruses as DNA wannabes: a new model for the regulation of RNA virus replication fidelity. *PLoS pathogens* 9(12):e1003760.
- Smith MK, Tusell S, Travanty EA, Berkhout B, van der Hoek L & Holmes KV (2006) Human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a receptor for human respiratory coronavirus NL63. Advances in experimental medicine and biology 581:285-288.

- Smits SL, Gerwig GJ, van Vliet AL, Lissenberg A, Briza P, Kamerling JP, Vlasak R & de Groot RJ (2005) Nidovirus sialate-O-acetylesterases: evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes. *The Journal of biological chemistry* 280(8):6933-6941.
- Sofroniew MV & Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119(1):7-35.
- Sola I, Alonso S, Zuniga S, Balasch M, Plana-Duran J & Enjuanes L (2003) Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *Journal of virology* 77(7):4357-4369.
- Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, Chen QX, Gao YW, Zhou HQ, Xiang H, Zheng HJ, Chern SW, Cheng F, Pan CM, Xuan H, Chen SJ, Luo HM, Zhou DH, Liu YF, He JF, Qin PZ, Li LH, Ren YQ, Liang WJ, Yu YD, Anderson L, Wang M, Xu RH, Wu XW, Zheng HY, Chen JD, Liang G, Gao Y, Liao M, Fang L, Jiang LY, Li H, Chen F, Di B, He LJ, Lin JY, Tong S, Kong X, Du L, Hao P, Tang H, Bernini A, Yu XJ, Spiga O, Guo ZM, Pan HY, He WZ, Manuguerra JC, Fontanet A, Danchin A, Niccolai N, Li YX, Wu CI & Zhao GP (2005) Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(7):2430-2435.
- St-Jean JR, Desforges M, Almazan F, Jacomy H, Enjuanes L & Talbot PJ (2006a) Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *Journal of virology* 80(7):3670-3674.
- St-Jean JR, Desforges M & Talbot PJ (2006b) Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. *Advances in experimental medicine and biology* 581:499-502.
- St-Jean JR, Jacomy H, Desforges M, Vabret A, Freymuth F & Talbot PJ (2004) Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. *Journal of virology* 78(16):8824-8834.
- Stadler K, Masignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD & Rappuoli R (2003) SARS--beginning to understand a new virus. *Nature reviews. Microbiology* 1(3):209-218.
- Steinhauer DA (1999) Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258(1):1-20.
- Stewart JN, Mounir S & Talbot PJ (1992) Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* 191(1):502-505.
- Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD & Garten W (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *The EMBO journal* 11(7):2407-2414.
- Stohlman SA, Brayton PR, Fleming JO, Weiner LP & Lai MM (1982) Murine coronaviruses: isolation and characterization of two plaque morphology variants of the JHM neurotropic strain. *The Journal of general virology* 63(2):265-275.
- Stoll G, Jander S & Schroeter M (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in neurobiology* 56(2):149-171.
- Strazza M, Pirrone V, Wigdahl B & Nonnemacher MR (2011) Breaking down the barrier: the effects of HIV-1 on the blood-brain barrier. *Brain research* 1399:96-115.
- Sturman LS, Ricard CS & Holmes KV (1985) Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and

separation of two different 90K cleavage fragments. *Journal of virology* 56(3):904-911.

- Sturman LS, Ricard CS & Holmes KV (1990) Conformational change of the coronavirus peplomer glycoprotein at pH 8.0 and 37 degrees C correlates with virus aggregation and virus-induced cell fusion. *Journal of virology* 64(6):3042-3050.
- Sun L, Wu J, Du F, Chen X & Chen ZJ (2013) Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339(6121):786-791.
- Sun M, Ma J, Yu Z, Pan Z, Lu C & Yao H (2017) Identification of two mutation sites in spike and envelope proteins mediating optimal cellular infection of porcine epidemic diarrhea virus from different pathways. *Veterinary research* 48(1):44.
- Supekar VM, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(52):17958-17963.
- Surya W, Li Y, Verdia-Baguena C, Aguilella VM & Torres J (2015) MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. *Virus research* 201:61-66.
- Sussman MA, Shubin RA, Kyuwa S & Stohlman SA (1989) T-cell-mediated clearance of mouse hepatitis virus strain JHM from the central nervous system. *Journal of virology* 63(7):3051-3056.
- Szabo R & Bugge TH (2008) Type II transmembrane serine proteases in development and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(6-7):1297-1316.
- Szabo R & Bugge TH (2011) Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. *Annual review of cell and developmental biology* 27:213-235.
- Taguchi F (1993) Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. *Journal of virology* 67(3):1195-1202.
- Taguchi F (1995) The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding. *Journal of virology* 69(11):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(1):67-74.
- Tahara SM, Dietlin TA, Bergmann CC, Nelson GW, Kyuwa S, Anthony RP & Stohlman SA (1994) Coronavirus translational regulation: leader affects mRNA efficiency. *Virology* 202(2):621-630.
- Takano T, Xu C, Funahashi Y, Namba T & Kaibuchi K (2015) Neuronal polarization. *Development* 142(12):2088-2093.
- Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y & Taniguchi T (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448(7152):501-505.
- Talbot P & Desforges M (2008) Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus.:313–324.
- Talbot PJ & Jacomy H DM (2008) Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus. 313–324.

- Talbot PJ, Arnold D & Antel JP (2001) Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. *Current topics in microbiology and immunology* 253:247-271.
- Talbot PJ, Desforges M, Brison E & Jacomy H (2011) Coronaviruses as Encephalitisinducing infectious agents. *Non-flavirus Encephalitis*, Tkachev S (Édit.) In-Tech, Tkachev, S. Ed. p 185-202.
- Talbot PJ, Desforges M, Dube M & Le Coupanec A (2016) [Human respiratory neurotropic coronaviruses: an ambiguous relationship between neurovirulence and protein cleavage]. *Medecine sciences : M/S* 32(8-9):696-699.
- Talbot PJ, Salmi AA, Knobler RL & Buchmeier MJ (1984) Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. *Virology* 132(2):250-260.
- Taylor MP & Enquist LW (2015) Axonal spread of neuroinvasive viral infections. *Trends in microbiology* 23(5):283-288.
- Taylor MP, Kramer T, Lyman MG, Kratchmarov R & Enquist LW (2012) Visualization of an alphaherpesvirus membrane protein that is essential for anterograde axonal spread of infection in neurons. *mBio* 3(2).
- Thomas G (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3(10):753-766.
- Thornbrough JM, Jha BK, Yount B, Goldstein SA, Li Y, Elliott R, Sims AC, Baric RS, Silverman RH & Weiss SR (2016) Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus NS4b Protein Inhibits Host RNase L Activation. *mBio* 7(2):e00258.
- Tischer BK, Smith GA & Osterrieder N (2010) En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol* 634:421-430.
- Tomishima MJ & Enquist LW (2002) In vivo egress of an alphaherpesvirus from axons. *Journal of virology* 76(16):8310-8317.
- Toth J, Siklodi E, Medveczky P, Gallatz K, Nemeth P, Szilagyi L, Graf L & Palkovits M (2007) Regional distribution of human trypsinogen 4 in human brain at mRNA and protein level. *Neurochemical research* 32(9):1423-1433.
- Truong P, Heydari S, Garidou L & McGavern DB (2009) Persistent viral infection elevates central nervous system MHC class I through chronic production of interferons. *J Immunol* 183(6):3895-3905.
- Tsai LK, Hsieh ST & Chang YC (2005) Neurological manifestations in severe acute respiratory syndrome. *Acta neurologica Taiwanica* 14(3):113-119.
- Tseng YT, Chang CH, Wang SM, Huang KJ & Wang CT (2013) Identifying SARS-CoV membrane protein amino acid residues linked to virus-like particle assembly. *PloS one* 8(5):e64013.
- Tsunoda I & Fujinami RS (2002) Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. *Springer seminars in immunopathology* 24(2):105-125.
- Tuomanen E (1996) Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS microbiology reviews* 18(4):289-299.
- Turgay C, Emine T, Ozlem K, Muhammet SP & Haydar AT (2015) A rare cause of acute flaccid paralysis: Human coronaviruses. *Journal of pediatric neurosciences* 10(3):280-281.

- Turk B, Bieth JG, Bjork I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, Kos J, Colic A, Stoka V & Turk V (1995) Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 376(4):225-230.
- Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 9(11):799-809.
- Tyler KL, and N. Nathanson (2001) Pathogenesis of viral infection. In Fundamental virology. D.M. Ed.:Knipe. pp 199-243.
- Tynell J, Westenius V, Ronkko E, Munster VJ, Melen K, Osterlund P & Julkunen I (2016) Middle East respiratory syndrome coronavirus shows poor replication but significant induction of antiviral responses in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *The Journal of general virology* 97(2):344-355.
- Tyrrell DA, Cohen S & Schlarb JE (1993) Signs and symptoms in common colds. *Epidemiology and infection* 111(1):143-156.
- Ujike M & Taguchi F (2015) Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses* 7(4):1700-1725.
- Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J & Freymuth F (2009a) [Human coronaviruses]. *Pathol Biol (Paris)* 57(2):149-160.
- Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J & Freymuth F (2009b) [Human coronaviruses]. *Pathologie-biologie* 57(2):149-160.
- Vabret A, Dina J, Mourez T, Gouarin S, Petitjean J, van der Werf S & Freymuth F (2006) Inter- and intra-variant genetic heterogeneity of human coronavirus OC43 strains in France. *The Journal of general virology* 87(Pt 11):3349-3353.
- Vabret A, Mourez T, Dina J, van der Hoek L, Gouarin S, Petitjean J, Brouard J & Freymuth F (2005) Human coronavirus NL63, France. *Emerging infectious diseases* 11(8):1225-1229.
- Valarcher JF, Furze J, Wyld SG, Cook R, Zimmer G, Herrler G & Taylor G (2006) Bovine respiratory syncytial virus lacking the virokinin or with a mutation in furin cleavage site RA(R/K)R109 induces less pulmonary inflammation without impeding the induction of protective immunity in calves. *The Journal of general virology* 87(Pt 6):1659-1667.
- van de Sandt CE, Kreijtz JH & Rimmelzwaan GF (2012) Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses* 4(9):1438-1476.
- van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J & Berkhout B (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nature medicine* 10(4):368-373.
- van der Meer Y, Snijder EJ, Dobbe JC, Schleich S, Denison MR, Spaan WJ & Locker JK (1999) Localization of mouse hepatitis virus nonstructural proteins and RNA synthesis indicates a role for late endosomes in viral replication. *Journal of virology* 73(9):7641-7657.
- van Riel D, Verdijk R & Kuiken T (2015) The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *The Journal of pathology* 235(2):277-287.
- Verheije MH, Hagemeijer MC, Ulasli M, Reggiori F, Rottier PJ, Masters PS & de Haan CA (2010) The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. *Journal of virology* 84(21):11575-11579.

- Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S & Nerurkar VR (2010) Reversal of West Nile virusinduced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* 397(1):130-138.
- Vijgen L, Keyaerts E, Moes E, Maes P, Duson G & Van Ranst M (2005) Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. *Journal of clinical microbiology* 43(11):5452-5456.
- Vilhardt F (2005) Microglia: phagocyte and glia cell. The international journal of biochemistry & cell biology 37(1):17-21.
- Vlasak R, Luytjes W, Leider J, Spaan W & Palese P (1988a) The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylesterase activity. *Journal of virology* 62(12):4686-4690.
- Vlasak R, Luytjes W, Spaan W & Palese P (1988b) Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(12):4526-4529.
- Voss D, Kern A, Traggiai E, Eickmann M, Stadler K, Lanzavecchia A & Becker S (2006) Characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus membrane protein. FEBS letters 580(3):968-973.
- Wake H, Moorhouse AJ & Nabekura J (2011) Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron glia biology* 7(1):47-53.
- Walls AC, Tortorici MA, Bosch BJ, Frenz B, Rottier PJ, DiMaio F, Rey FA & Veesler D (2016a) Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature* 531(7592):114-117.
- Walls AC, Tortorici MA, Frenz B, Snijder J, Li W, Rey FA, DiMaio F, Bosch BJ & Veesler D (2016b) Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nature structural & molecular biology* 23(10):899-905.
- Wang FI, Fleming JO & Lai MM (1992) Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: study of genetic sites affecting neuropathogenicity. *Virology* 186(2):742-749.
- Wang JX, Fukunaga-Kalabis M & Herlyn M (2016) Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *Journal of cell communication and signaling* 10(3):191-196.
- Wang Y, Luo W & Reiser G (2008) Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65(2):237-252.
- Watanabe R, Wege H & ter Meulen V (1983) Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Nature* 305(5930):150-153.
- Watanabe T, Horikawa Y, Sato K & Saito H (1982) Methylcellulose media for plaque assay of murine leukemia virus. *Journal of clinical microbiology* 16(3):542-544.
- Weber F, Goldmann C, Kramer M, Kaup FJ, Pickhardt M, Young P, Petry H, Weber T & Luke W (2001) Cellular and humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Annals of neurology* 49(5):636-642.
- Weber J (2001) The pathogenesis of HIV-1 infection. British medical bulletin 58:61-72.

- Weiner LP (1973) Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis. *Archives* of neurology 28(5):298-303.
- Wentao Li OW, Frank J. M. van Kuppeveld, Qigai He, Peter J. M. Rottier, Berend-Jan Bosch (2005) A Single Point Mutation Creating a Furin Cleavage Site in the Spike Protein Renders Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Trypsin Independent for Cell Entry and Fusion. *Journal of virology*.
- Wentworth DE, and K.V. Holmes (2007) Coronavirus binding and entry. Coronaviruses: molecular and cellular biology. Ed.: V. Thiel. Caister Academic Press, pp 3-32.
- Wentworth DE & Holmes KV (2001) Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): influence of N-linked glycosylation. *Journal of virology* 75(20):9741-9752.
- Wicht O, Burkard C, de Haan CA, van Kuppeveld FJ, Rottier PJ & Bosch BJ (2014) Identification and characterization of a proteolytically primed form of the murine coronavirus spike proteins after fusion with the target cell. *Journal of virology* 88(9):4943-4952.
- Wiegand U, Corbach S, Minn A, Kang J & Muller-Hill B (1993) Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene* 136(1-2):167-175.
- Wilkins A, Majed H, Layfield R, Compston A & Chandran S (2003) Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(12):4967-4974.
- Williams RK, Jiang GS & Holmes KV (1991) Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(13):5533-5536.
- Wilson L, McKinlay C, Gage P & Ewart G (2004) SARS coronavirus E protein forms cationselective ion channels. *Virology* 330(1):322-331.
- Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS & Yuen KY (2005) Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of virology* 79(2):884-895.
- Woo PC, Lau SK, Huang Y & Yuen KY (2009) Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)* 234(10):1117-1127.
- Woo PC, Lau SK, Yip CC, Huang Y, Tsoi HW, Chan KH & Yuen KY (2006a) Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. *Journal of virology* 80(14):7136-7145.
- Woo PC, Lau SK & Yuen KY (2006b) Infectious diseases emerging from Chinese wetmarkets: zoonotic origins of severe respiratory viral infections. *Current opinion in infectious diseases* 19(5):401-407.
- Wu GF, Dandekar AA, Pewe L & Perlman S (2000) CD4 and CD8 T cells have redundant but not identical roles in virus-induced demyelination. *J Immunol* 165(4):2278-2286.
- Wu GF & Perlman S (1999) Macrophage infiltration, but not apoptosis, is correlated with immune-mediated demyelination following murine infection with a neurotropic coronavirus. *Journal of virology* 73(10):8771-8780.

- Xu Y, Liu Y, Lou Z, Qin L, Li X, Bai Z, Pang H, Tien P, Gao GF & Rao Z (2004) Structural basis for coronavirus-mediated membrane fusion. Crystal structure of mouse hepatitis virus spike protein fusion core. *The Journal of biological chemistry* 279(29):30514-30522.
- Yamada Y & Liu DX (2009a) Proteolytic activation of the spike protein at a novel RRRR/S motif is implicated in furin-dependent entry, syncytium formation, and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells. *Journal of virology* 83(17):8744-8758.
- Yamada Y, Liu XB, Fang SG, Tay FP & Liu DX (2009b) Acquisition of cell-cell fusion activity by amino acid substitutions in spike protein determines the infectivity of a coronavirus in cultured cells. *PloS one* 4(7):e6130.
- Yamamoto T, Lu C & Ryan RO (2011) A two-step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor. *The Journal of biological chemistry* 286(7):5464-5470.
- Yang ZY, Huang Y, Ganesh L, Leung K, Kong WP, Schwartz O, Subbarao K & Nabel GJ (2004) pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *Journal of virology* 78(11):5642-5650.
- Ye Y, Hauns K, Langland JO, Jacobs BL & Hogue BG (2007) Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *Journal of virology* 81(6):2554-2563.
- Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT & Holmes KV (1992) Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357(6377):420-422.
- Yeh EA, Collins A, Cohen ME, Duffner PK & Faden H (2004) Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* 113(1 Pt 1):e73-76.
- Yokomori K & Lai MM (1992) Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *Journal of virology* 66(10):6194-6199.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG & Chen J (2008) Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319(5871):1834-1837.
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD & Fouchier RA (2012) Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England journal of medicine* 367(19):1814-1820.
- Zelenay S, Keller AM, Whitney PG, Schraml BU, Deddouche S, Rogers NC, Schulz O, Sancho D & Reis e Sousa C (2012) The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virusinfected mice. *The Journal of clinical investigation* 122(5):1615-1627.
- Zelus BD, Schickli JH, Blau DM, Weiss SR & Holmes KV (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. *Journal of virology* 77(2):830-840.
- Zeng W, Sun L, Jiang X, Chen X, Hou F, Adhikari A, Xu M & Chen ZJ (2010) Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* 141(2):315-330.

- Zhang XM, Kousoulas KG & Storz J (1991) Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses. *Virology* 183(1):397-404.
- Zhang Z, Ohto U & Shimizu T (2017) Towards a structural understanding of nucleic acidsensing Toll-like receptors in the innate immune system. *FEBS letters* 10.1002/1873-3468.12749.
- Zhao L, Jha BK, Wu A, Elliott R, Ziebuhr J, Gorbalenya AE, Silverman RH & Weiss SR (2012) Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell host & microbe* 11(6):607-616.
- Zhao X, Guo F, Liu F, Cuconati A, Chang J, Block TM & Guo JT (2014) Interferon induction of IFITM proteins promotes infection by human coronavirus OC43. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(18):6756-6761.
- Zhou A, Webb G, Zhu X & Steiner DF (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 274(30):20745-20748.
- Zhou J, Chu H, Chan JF & Yuen KY (2015) Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: virus-host cell interactions and implications on pathogenesis. *Virology journal* 12:218.
- Zhou J, Chu H, Li C, Wong BH, Cheng ZS, Poon VK, Sun T, Lau CC, Wong KK, Chan JY, Chan JF, To KK, Chan KH, Zheng BJ & Yuen KY (2014) Active replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines in human macrophages: implications for pathogenesis. *The Journal of infectious diseases* 209(9):1331-1342.
- Zhou Y, Ye L, Wan Q, Zhou L, Wang X, Li J, Hu S, Zhou D & Ho W (2009) Activation of Toll-like receptors inhibits herpes simplex virus-1 infection of human neuronal cells. *Journal of neuroscience research* 87(13):2916-2925.
- Ziebuhr J, Snijder EJ & Gorbalenya AE (2000) Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *The Journal of general virology* 81(Pt 4):853-879.
- Zimmer G, Budz L & Herrler G (2001) Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *The Journal of biological chemistry* 276(34):31642-31650.
- Zimmer G, Rohn M, McGregor GP, Schemann M, Conzelmann KK & Herrler G (2003) Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *The Journal of biological chemistry* 278(47):46854-46861.
- Zumla A, Hui DS & Perlman S (2015) Middle East respiratory syndrome. *Lancet* 386(9997):995-1007.
- Zuniga S, Cruz JL, Sola I, Mateos-Gomez PA, Palacio L & Enjuanes L (2010) Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *Journal of virology* 84(4):2169-2175.
- Zurbach KA, Moghbeli T & Snyder CM (2014) Resolving the titer of murine cytomegalovirus by plaque assay using the M2-10B4 cell line and a low viscosity overlay. *Virology journal* 11:71.
- Zust R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, Maier R, Neuman BW, Ziebuhr J, Szretter KJ, Baker SC, Barchet W, Diamond MS, Siddell SG, Ludewig B & Thiel V (2011) Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self

and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nature immunology* 12(2):137-143.