

INRS – Institut Armand-Frappier  
Université du Québec

**Rôle des protéines accessoires du coronavirus humain OC43**

Par  
Jessica Desjardins

Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)  
en virologie et immunologie

**Jury d'évaluation**

Président du jury et examinateur interne	Angela Pearson
Examineur externe	Carl A. Gagnon
Directeur de recherche	Pierre Talbot
Codirecteur de recherche	Marc Desforges

## RÉSUMÉ

Le coronavirus respiratoire humain OC43 possède la capacité d'envahir et d'infecter le système nerveux central (SNC) humain et de provoquer une maladie neurologique dans un modèle animal murin. Parmi les possibles déterminants viraux de la neurovirulence, son génome contient notamment des gènes encodant des protéines accessoires, aussi appelées « groupe-spécifiques », dont le rôle dans l'infection demeure méconnu, mais semble, au moins en partie, associé à la relation hôte-virus: une protéine structurale, l'hémagglutinine-estérase (HE) et deux protéines non-structurales, ns2 et ns12.9. L'objectif de ce projet était de déterminer le rôle de ces protéines en délétant, inactivant ou mutant les gènes correspondant par génétique inverse à l'aide d'un clone infectieux d'ADNc du virus produit au laboratoire. Leur implication dans la neurovirulence a été étudiée lors de l'infection des cellules du SNC à l'aide d'une lignée cellulaire neuronale, les cellules LA-N-5, et grâce à un modèle murin d'infection intracérébrale. L'absence de la protéine HE ou de son activité acétylestérase a rendu impossible la production de virus recombinant infectieux, suggérant que la protéine HE pourrait être essentielle à la réplication virale. D'autre part, les virus recombinants dont les gènes ns2 ou ns12.9 ont été inactivés ont montré une cinétique de réplication semblable à celle du virus sauvage en culture cellulaire. Ces protéines non-structurales ne sembleraient donc pas avoir de rôle essentiel dans la réplication virale *in vitro*. Toutefois, des essais d'infection du SNC de souris ont démontré que l'absence de la protéine ns2 provoquait un délai dans l'apparition de la neurovirulence et de la mortalité, associé à une élimination moins rapide du virus au SNC. Dans le cas de l'absence de la protéine ns12.9, ces essais d'infection *in vivo* ont même démontré une atténuation complète de la neurovirulence, possiblement associée à une diminution de la réplication du virus qui était éliminé plus rapidement du SNC. Ces résultats suggèrent que la protéine accessoire HE est essentielle à l'infection de cellules cibles, alors que le rôle des protéines ns2 et ns12.9 serait plutôt associé à la relation virus-hôte possiblement par l'entremise d'une interaction avec le système immunitaire.



Jessica Desjardins



Pierre Talbot, Directeur de recherche



Marc Desforges, Co-directeur de recherche

## **REMERCIEMENTS**

Tout au long de mes études à l'INRS-Institut Armand-Frappier, j'ai eu la chance de rencontrer et de côtoyer de nombreuses personnes qui ont joué un rôle important dans l'accomplissement de ma maîtrise en virologie et immunologie.

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Pierre Talbot, qui m'a fait découvrir le monde de la recherche scientifique en me permettant d'effectuer un stage de recherche dans son laboratoire à mes tous débuts à l'été 2005. La rencontre avec le domaine de la virologie ainsi que l'expérience acquise au sein d'une équipe exceptionnelle m'ont donné le goût de revenir y faire mes études graduées. Merci Pierre pour ta confiance en mes capacités, pour ton expérience et pour ton humour parfois déstabilisant!

Je voudrais aussi souligner l'apport de mon co-directeur de recherche, Marc Desforges, qui fut une importante référence scientifique pour mes travaux en biologie moléculaire. Son encadrement m'a donné la liberté d'apprendre par moi-même tout en me soutenant et en me guidant dans les périodes plus difficiles de mon projet de maîtrise. Merci Marc pour ton sens critique, pour ton encadrement et pour tes folies passagères!

J'aimerais aussi remercier Hélène Jacomy et Élodie Brison pour leur expertise du modèle murin et le temps qu'elles ont consacré à m'apprendre. Merci Hélène et Élodie pour votre générosité, votre écoute attentive et votre apport français au laboratoire!

Merci à Dominique Favreau pour ta précieuse amitié, tes conseils, ton soutien et ton expertise avec les fichiers Excel!

Merci à mes voisins de bureau, les étudiants passés et présents des laboratoires Talbot et Lamarre, pour les échanges scientifiques, mais surtout pour le placotage et les rires qui ont souvent rendu les journées moins pénibles!

Merci aussi à mes parents pour leur soutien moral et financier sans qui la poursuite et la réussite de mes études, dont le sujet reste encore nébuleux pour eux, auraient été impossible!

Et finalement, merci à l'homme de ma vie, Marc Charron, pour son amour et son appui indéfectible. Pour la patience et la compréhension dont il a fait preuve dans la réalisation de nos projets communs, pour me permettre d'atteindre mes objectifs professionnels. Merci de donner un sens à ma vie et de faire de moi une meilleure personne. Je t'aime!

**MERCI!!!**

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé .....	II
Remerciements .....	III
Table des matières .....	IV
Liste des figures .....	VIII
Liste des abréviations .....	IX
Introduction .....	1
État des connaissances .....	3
1. Coronavirus .....	3
1.1 Généralités .....	3
1.2 Classification .....	3
1.3 Génome .....	6
1.4 Composition protéique .....	6
1.4.1 Réplicase .....	7
1.4.2 Protéines structurales .....	9
1.4.2.1 Protéine de surface .....	9
1.4.2.2 Protéine de l'enveloppe .....	11
1.4.2.3 Protéine de la membrane .....	11
1.4.2.4 Protéine de la nucléocapside .....	12
1.4.3 Protéines accessoires .....	12
1.4.3.1 Protéines accessoires des membres du genre <i>Alphacoronavirus</i> .....	13
1.4.3.2 Protéines accessoires des membres du genre <i>Betacoronavirus</i> .....	15
1.4.3.3 Protéines accessoires de l'espèce <i>SARS-related Coronavirus</i> .....	18
1.4.3.4 Protéines accessoires des membres du genre <i>Gammacoronavirus</i> .....	20
1.5 Réplication .....	21
1.6 Système de génétique inverse .....	23
2. Coronavirus humains .....	26
2.1 Généralités .....	26
2.2 Pathologies respiratoires .....	27
2.3 Pathologies entériques .....	29
2.4 Pathologies neurologiques .....	29

2.4.1 Neuroinvasion.....	30
2.4.2 Neurotropisme .....	30
2.4.3 Neurovirulence .....	31
3. Déterminants viraux de la pathologie.....	32
3.1 Généralités.....	32
3.2 Réplicase .....	33
3.3 Protéines structurales.....	33
3.3.1 Protéine de surface (S).....	33
3.3.2 Protéine de l'enveloppe (E).....	35
3.3.3 Protéine de la membrane (M).....	35
3.3.4 Protéine de la nucléocapside.....	36
3.4 Protéines accessoires .....	37
3.4.1 Protéines accessoires des membres du genre <i>Betacoronavirus</i> .....	37
3.4.1.1 ORF2a : Protéine non structurale 2 (ns2).....	38
3.4.1.2 ORF2b : Hémagglutinine estérase (HE).....	39
3.4.1.3 ORF4 : Protéine non-structurale 12.9 (ns12.9).....	40
Problématique et Objectifs.....	42
Matériels et Méthodes .....	43
1. Lignées cellulaires.....	43
1.1 Culture.....	43
1.2 Différenciation des cellules LA-N-5 .....	43
2. Production des virus recombinants mutés .....	43
2.1 Introduction de mutations dans le clone infectieux d'ADNc pBAC-OC43 .....	43
2.1.1 PCR de chevauchement à partir du fragment intermédiaire D .....	44
2.1.2 Mutagenèse dirigée sur les fragments intermédiaires.....	46
2.1.3 Insertion des fragments intermédiaires mutés dans le clone infectieux d'ADNc pBAC-OC43 .....	47
2.2 Transfection du clone infectieux .....	47
2.3 Amplification du virus recombinant produit .....	47
2.4 Extraction d'ARN à la suite de la production des virus recombinants pour confirmer la présence des mutations dans les gènes des protéines accessoires .....	48

2.5 Titration par immunoperoxydase indirecte .....	50
2.6 Transfection stable des cellules BHK-21 avec un vecteur d'expression de la protéine HE .....	50
3. Étude en culture cellulaire .....	51
3.1 Infection cellulaire.....	51
3.2 Immunofluorescence .....	52
4. Étude en modèles murins.....	52
4.1 Infection intracérébrale.....	52
4.2 Immunohistochimie.....	53
4.3 Extraction de l'ARN du cerveau des souris infectées .....	54
Résultats .....	55
1. Hémagglutinine estérase (HE).....	55
1.1 Obtention des clones infectieux d'ADNc.....	55
1.2 Production des virus recombinants.....	57
1.3 Détection des protéines virales à l'intérieur des cellules transfectées.....	61
1.4 Complémentation de la production de virus recombinant par l'expression constitutive de la protéine HE dans les cellules BHK-21 .....	61
2. Protéine non-structurale 2 (ns2) .....	63
2.1 Obtention des clones infectieux d'ADNc.....	63
2.2 Détection de la protéine ns2 à l'intérieur des cellules infectées.....	65
2.3 Cinétique de répllication des virus n'exprimant pas ns2 .....	67
2.4 Courbe de survie des souris infectées par les virus n'exprimant pas ns2 .....	69
2.5 Réplication dans le SNC des virus n'exprimant pas ns2 .....	71
2.6 Dissémination dans le SNC des virus n'exprimant pas ns2 .....	71
3. Protéine non-structurale ns12.9.....	74
3.1 Obtention du clone infectieux d'ADNc.....	74
3.2 Conservation de la mutation inactivatrice du gène ns12.9 .....	74
3.3 Cinétique de répllication du virus n'exprimant pas ns12.9 .....	77
3.4 Courbe de survie des souris infectées par le virus n'exprimant pas ns12.9 .....	79
3.5 Réplication dans le SNC du virus n'exprimant pas ns12.9 .....	81
Discussion .....	84
1. Hémagglutinine estérase (HE).....	84
1.1 Obtention des clones infectieux d'ADNc.....	84
1.2 Production infructueuse des virus recombinants infectieux.....	86
1.3 Détection des protéines virales à l'intérieur des cellules transfectées.....	87

1.4 Complémentation de la production de virus recombinant et autres perspectives.....	89
2. Protéine non-structurale ns2 .....	91
2.1 Obtention des clones infectieux d'ADNc .....	92
2.2 Détection de la protéine ns2 à l'intérieur des cellules infectées .....	93
2.3 Cinétique de réplication des virus n'exprimant pas ns2 .....	94
2.4 Études du rôle de la protéine ns2 dans un modèle murin d'infection du SNC .....	94
3. Protéine non-structurale ns12.9 .....	98
3.1 Obtention du clone infectieux d'ADNc n'exprimant pas ns12.9 et conservation de la mutation inactivatrice .....	98
3.2 Cinétique de réplication du virus n'exprimant pas ns12.9 .....	99
3.3 Études du rôle de la protéine ns12.9 dans un modèle murin d'infection du SNC .....	99
Conclusions et perspectives.....	103
Liste des références .....	106
Annexe 1 : Contributions Scientifiques.....	128

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Nouvelle classification des Coronavirus.....	5
Figure 2 : Organisation génomique et composition protéique des coronavirus .....	8
Figure 3 : Protéines accessoires des différents membres de la sous-famille <i>Coronavirinae</i> .....	14
Figure 4 : Cycle de réplication des coronavirus .....	22
Figure 5 : PCR de chevauchement pour la délétion complète du gène HE.....	45
Figure 6 : Production du virus recombinant par la transfection du clone infectieux d'ADNc (pBAC-HCoV-OC43) dans les cellules BHK-21 (P0) suivi de deux amplifications (P1 et P2) dans les cellules HRT-18.....	49
Figure 7 : Obtention des clones infectieux d'ADNc n'exprimant pas HE ou dont l'activité acétyl estérase a été inactivée .....	56
Figure 8 : Production de virus recombinants sans protéine HE ou avec la protéine HE sans activité acétyl estérase.....	58
Figure 9 : Réversion de HEstop-A #1 .....	60
Figure 10 : Détection de protéines virales à l'intérieur des cellules transfectées.....	62
Figure 11 : Obtention des clones infectieux n'exprimant pas ns2.....	64
Figure 12 : Détection de la protéine ns2 dans les cellules infectées.....	66
Figure 13 : Cinétique de réplication des virus recombinants n'exprimant pas ns2 dans les cellules LA-N-5 comparée à celle du virus de référence rOC/ATCC. ....	68
Figure 14 : Courbe de survie et de variation du poids des souris infectées par ns2stopdel comparée à rOC/ATCC (ou référence) et rOC/ns2stop.....	70
Figure 15 : Réplication du virus rOC/ns2stopdel dans le SNC de souris BALB/c comparée à celle du virus de référence .....	72
Figure 16 : Dissémination du virus rOC/ns2stopdel au SNC de souris BALB/c comparée au virus de référence (rOC/ATCC).....	73
Figure 17 : Obtention des clones infectieux n'exprimant pas la protéine ns12.9.....	75
Figure 18 : Conservation de la mutation inactivatrice dans l'ORF ns12.9 5 jours post-infection au niveau du SNC de souris BALB/c.....	76
Figure 19 : Réplication du virus n'exprimant pas ns12.9 en neurone comparée au virus de référence (rOC/ATCC).....	78
Figure 20 : Courbe de survie des souris infectées par le virus n'exprimant pas la protéine ns12.9 comparée au virus de référence .....	80
Figure 21 : Réplication dans le cerveau des souris infectées du virus n'exprimant pas la protéine ns12.9 comparée au virus de référence.....	82



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- 2H-CPD ou 2H-phosphoestérase : Phosphodiesterase cyclique à deux histidines  
3CLpro : Protéase 3C-like  
a.a. : acides aminés  
AAALAC : *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International* ou Association Internationale pour l'évaluation et l'accréditation du traitement des animaux de laboratoire  
ACE-2 : *Angiotensin converting enzyme 2*  
ADEM : *Acute disseminated encephalomyelitis* ou encéphalomyélite aiguë disséminée  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNdb : ARN double-brin ou bicaténaire  
ARNm : ARN messenger  
sgARNm: ARN messenger sous-génomique  
ARNt: ARN de transfert  
ATCC: *American type culture collection*, provenance du virus de référence  
ATRA : *All-trans retinoic acid* ou Acide rétinolique  
BAC : *Bacterial artificial chromosome* ou Chromosome artificiel de bactérie  
BCoV : *Bovine coronavirus* ou Coronavirus bovin  
BHK-21 : *Baby hamster kidney-21*  
CCoV : *Canine coronavirus* ou Coronavirus canin  
CD13 : Aminopeptidase N  
CEACAM1 : *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*  
CCPA : Comité Canadien de Protection des Animaux  
CIPA : Comité Institutionnel de Protection des Animaux de l'INRS-Institut Armand-Frappier  
Complexe R/T : Complexe de réplication/transcription  
CoV : Coronavirus  
CMV : Cytomégalovirus  
CPD : Phosphodiesterase cyclique, voir aussi 2H-CPD  
CSF : *Cerebrospinal fluid* ou Liquide céphalo-rachidien  
DAB : Diaminobenzidine  
DAPI : Coloration fluorescente par le 4',6-diamidino-2-phenylindole qui se lie à l'ADN via les régions riche en adénosine et en thymidine  
DEPC : Diethylpyrocarbonate, l'eau est traitée au DEPC pour inactiver les enzymes RNase  
DICT<sub>50</sub> : Dose infectieuse en culture de tissu à 50%  
DFP : diisopropylfluorophosphate, inhibiteur chimique de l'activité acétyl estérase  
E : Protéine de l'enveloppe

eIF2alpha : *eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*  
 ERGIC: Compartiment intermédiaire RE-Golgi  
 Fig : Figure  
 FIPV : *Feline infectious peritonitis virus* ou Virus de la péritonite infectieuse féline  
 G418 : Aussi appelé Généticine, agent de sélection des cellules transfectées, vendu par Invitrogen  
 GFP : *Green fluorescent protein* ou Protéine fluorescente verte  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène  
 HA : Protéine Hémagglutinine du virus Influenza  
 HCoV : *Human coronavirus* ou Coronavirus humain  
 HE : Hémagglutinine estérase  
 HEdel : Délétion complète du gène de la protéine HE  
 HEstop : Codon stop inséré au début du gène de la protéine HE  
 HE-F211A : Mutation d'inhibition de la liaison aux acides sialiques, phénylalanine 211 changée en alanine  
 HE-S40T : Mutation d'inhibition de l'activité acétyl estérase de la protéine HE, sérine 40 changée en thréonine  
 HEF : Protéine Hémagglutinine-estérase-fusion du virus Influenza  
 HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
 HIV-1 : *Human immunodeficiency virus-1* ou Virus de l'immunodéficience humaine de type 1  
 HR1 et HR2 : *Heptad repeat 1 et 2*  
 HRP : *Horse Radish Peroxydase*  
 HRT-18 : *Human rectal tumor-18*  
 I : Protéine interne des *Betacoronavirus*  
 IBV : *Infectious bronchitis virus* ou Virus de la bronchite infectieuse  
 IC : Intracérébrale  
 IFN: Interféron  
 IRES : *Internal ribosome entry site* ou Site interne d'entrée du ribosome  
 ISG: *IFN-stimulated genes* ou Gènes stimulés par l'IFN  
 kb : kilobases  
 kDa : kiloDaltons  
 LA-N-5 : *Human neuroblastoma cell line*  
 M : Protéine de la membrane  
 MEM : *Minimum Essential Medium* ou milieu minimum essentiel (vendu par Invitrogen)  
 MHV : *Murine hepatitis virus* ou Virus de l'hépatite murine  
 fMHV : Virus chimère MHV avec protéine S de FIPV  
 MOI : *Multiplicity of Infection* ou Multiplicité d'infection  
 MTS/PMS : Test colorimétrique où le MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), en présence de PMS (Phénazine Méthosulfate) est réduit en formazan par les cellules possédant une activité métabolique

MuCoV : *Murine coronavirus* ou Coronavirus murin  
 N : Protéine de la nucléocapside  
 NA : Protéine Neuraminidase du virus Influenza  
 Nef : Protéine accessoire du VIH  
 NeuAc : Acide *N*-acétylneuraminique  
 Neu5Ac : Acide 5-*N*-acétylneuraminique  
 Neu5,9Ac2 : Acide 5-*N*-acétyl-9-*O*-acétylneuraminique  
 Neu4,5Ac2 : Acide 5-*N*-acétyl-4-*O*-acétylneuraminique  
 NeuGc : Acide glycolylneuraminique  
 ns : non-structurale (protéine)  
 NS1 : Protéine accessoire non-structurale du virus Influenza A  
 ns12.9 : Protéine non-structurale de 12.9 kDa  
 ns12.9stop : Codon stop inséré au début du gène de la protéine ns12.9  
 ns2 : Protéine non-structurale codée par l'ORF2a  
 ns2stop : Codon stop inséré au début du gène de la protéine ns2  
 ns2stopdel : Codon stop au début du gène et délétion partielle du gène de la protéine ns2  
 nsp : Protéine non-structurale codée par l'ORF1ab  
 nt : nucléotides  
 OAS : Oligoadénylate synthétase  
 OC : *organ culture*  
 ORF : *Open reading frame* ou Cadre de lecture ouvert  
 P0, P1 et P2 : Passage 0, Passage 1 et Passage 2 correspondants aux étapes de production de virus recombinant. P0 correspond à la transfection du clone infectieux dans les cellules BHK-21 alors que P1 et P2 correspondent à deux amplification du virus recombinants produits sur les cellules HRT-18  
 PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern* ou Motif moléculaire associé aux pathogènes  
 PBS : *Phosphate buffered saline* ou Tampon phosphate salin  
 PCR : *Polymerase chain reaction* ou Réaction en chaîne de la polymérase  
 PHEV : *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus* ou Virus hémagglutinant de l'encéphalite porcine  
 poly(A): Polyadénosine  
 PKR : Protéine kinase R  
 ppl1a et ppl1ab : Polyprotéines codées par l'ORF1a et l'ORF1ab  
 RDE : *Receptor destroying enzyme* ou Enzyme destructeur de récepteur  
 RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante  
 RE : Réticulum endoplasmique  
 RER : Réticulum endoplasmique rugueux  
 rOC : Virus recombinant HCoV-OC43 provenant de la production à partir des clones infectieux d'ADNc

RPMI : Milieu de culture « *Roswell Park Memorial Institute* », vendu par Invitrogen  
RSV ou hRSV: *human Respiratory syncytial virus* ou Virus respiratoire syncytial humain  
RT : *Reverse transcription* ou Transcription inverse  
S : Protéine de surface  
SARS : *Severe acute respiratory syndrome* ou SRAS pour Syndrome respiratoire aigu sévère  
SARSr-CoV : *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* ou Coronavirus associés au syndrome respiratoire aigu sévère  
*Sham* : Souris non-infectée  
SNC : système nerveux central  
STAT1 : *Signal transducer and activator of transcription factor 1*  
SVF: Sérum de veau fœtal  
TGEV : *Transmissible gastroenteritis virus* ou Virus de la gastro-entérite transmissible porcine  
TNF- $\alpha$  : *Tumor necrosis factor – alpha*  
TRIzol : Composé chimique (phénol) de la compagnie Invitrogen utilisé pour une extraction d'ARN Phénol-Chloroforme  
TRS : *Transcription regulating sequence* ou Séquence régulatrice de la transcription  
UPR : *Unfolded protein response* ou Réponse aux protéines mal-reliées  
UTR : *Untranslated region* ou Région non-traduite  
Vif : Protéine accessoire de VIH  
VIH : Virus de l'immunodéficience humain, voir aussi HIV-1  
VLP : Pseudoparticule virale ou *virus-like particle*  
Vpu : Protéine accessoire de VIH  
Vpr : Protéine accessoire de VIH  
v/v ou p/v : Concentration volume / volume ou poids / volume

## INTRODUCTION

L'intérêt d'étudier les virus de l'ordre *Nidovirales* en général et de la famille *Coronaviridae* en particulier est en partie lié à leur abondance dans l'environnement. La sous-famille *Coronavirinae*, représentant l'une des deux sous-familles comprises dans la famille *Coronaviridae*, sont séparés en trois genres différents : *Alpha-*, *Beta-* et *Gammacoronavirus* ([http://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_official\\_taxonomy\\_updates\\_since\\_the\\_8th\\_report/m/vertebrate-2008/1230.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-2008/1230.aspx)). Les membres du genre *Gammacoronavirus* sont principalement aviaires, alors que ceux des genres *Alpha-* et *Betacoronavirus* infectent plusieurs mammifères, incluant l'humain.

Infectant une grande quantité d'animaux différents, les virus de la sous-famille *Coronavirinae* ont une importance vétérinaire et économique due aux pathologies graves auxquelles ils sont associés. Infectant l'humain, chez qui ils peuvent aussi causer des maladies, leur intérêt scientifique et clinique est d'autant plus grandissant depuis la survenue en 2002-2003 du coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). Les coronavirus humains, qui sont des pathogènes respiratoires ayant longtemps été associés à des maladies bénignes comme le rhume saisonnier, montrent de plus en plus d'implications possibles dans des pathologies plus graves au niveau respiratoire et potentiellement dans d'autres types de maladies.

Les capacités neuroinvasives et neutropes du coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43), sujet de la présente étude et faisant partie du genre *Betacoronavirus*, ont clairement été démontrées en cultures primaires, en lignées cellulaires représentatives du système nerveux central (SNC) humain ainsi que dans les cerveaux humains post-mortem (Arbour *et al.*, 1999; Arbour *et al.*, 2000; Bonavia *et al.*, 1997) de même qu'en modèle animal murin (Jacomy *et al.*, 2006; Jacomy *et al.*, 2010; Jacomy et Talbot, 2003). Ces capacités associées à HCoV-OC43 permettent donc de suggérer une implication dans le développement de maladies neurodégénératives chez l'humain.

L'association possible du coronavirus humain OC43 avec des maladies neurodégénératives apporte de nouveaux questionnements au sujet des facteurs impliqués dans l'apparition et le développement de la pathologie. Parmi les déterminants viraux pouvant être associés à la neurovirulence, la présente étude s'intéresse aux protéines accessoires. Ces protéines accessoires étaient autrefois appelées protéines « groupes-spécifiques », puisque des homologues de ces protéines se retrouvent dans les coronavirus de même genre sans posséder aucune similarité avec celles des genres différents. Elles sont maintenant appelées « accessoires » puisque la majorité des études les concernant chez les différents coronavirus, indiquent qu'elles ne sont pas

essentielles à la réplication du virus en culture cellulaire, mais qu'elles semblent plutôt être associées à la relation hôte-virus. Les protéines accessoires du coronavirus humain OC43 sont l'hémagglutinine-estérase (HE), une protéine structurale, et deux protéines non-structurales, ns2 et ns12.9.

La protéine HE possède, tout comme la protéine de surface (S) responsable de l'attachement et l'entrée des virions dans la cellule cible, la capacité de lier les acides sialiques, ce qui pourrait associer la protéine HE à un rôle dans l'attachement comme récepteur secondaire. Toutefois, la protéine HE possède aussi une activité acétyl estérase qui hydrolyse le groupement acétyl se trouvant à l'extrémité des acides sialiques (Hogue *et al.*, 1989). Cette activité enzymatique peut ainsi être caractérisée de « destructrice de récepteur » et être impliquée dans le bourgeonnement et le relargage des virions nouvellement assemblés ainsi que dans la dissémination des particules virales (de Groot, 2006). Par ailleurs, l'abolition de l'expression de cette protéine structurale semble diminuer les capacités de neurovirulence et de dissémination au SNC du coronavirus murin (MHV) (Kazi *et al.*, 2005).

Les protéines ns2 et ns12.9 sont des protéines non-structurales pour lesquelles aucune activité enzymatique n'a été démontrée. La protéine ns2 possède toutefois un domaine d'homologie avec la superfamille des phosphodiéstérases cyclique (CPD) à deux histidines pouvant être impliqué dans l'addition de la coiffe sur les ARN viraux (Mazumder *et al.*, 2002). Chez le coronavirus murin (MHV) faisant aussi partie du genre *Betacoronavirus*, la mutagenèse des histidines du site actif supposé de cette activité CPD (Roth-Cross *et al.*, 2009) ainsi que la délétion complète du gène de la protéine ns2 (de Haan *et al.*, 2002a) mène à une atténuation de la virulence lors de l'infection en modèle murin. Peu d'études sont disponibles à propos du rôle de la protéine non-structurale ns12.9. Toutefois, l'homologue murin de la protéine ns12.9 semble être associé à un rôle d'antagoniste à la réponse interféron (Koetzner *et al.*, 2010).

Les protéines accessoires de HCoV-OC43 semblent donc être associées à la relation hôte-virus et pourraient ainsi être des déterminants de la neurovirulence. L'objectif de cette présente étude est donc de déterminer le rôle des protéines accessoires du coronavirus humain OC43 lors de l'infection du système nerveux central en utilisant un modèle *in vitro* de lignée cellulaire neuronale et un modèle murin d'infection *in vivo*.

Les gènes codant les différentes protéines accessoires ont donc été tour à tour délétés, inactivés ou mutés au moyen d'un système de génétique inverse à l'aide d'un clone infectieux d'ADNc et l'impact de ces différentes mutations a été déterminé lors de l'infection du SNC *in vitro* et *in vivo*.

## ÉTAT DES CONNAISSANCES

### 1. Coronavirus

#### 1.1 Généralités

La sous-famille *Coronavirinae* fait partie de la famille *Coronaviridae* et de l'ordre des *Nidovirales*. Ce sont des virus enveloppés possédant un génome non-segmenté d'ARN à polarité positive d'environ 30 000 bases. Le terme « coronavirus » provient de leur aspect en couronne en microscopie électronique dû à la présence de trimères de la protéine de surface (S) dans l'enveloppe virale (Davies et Macnaughton, 1979).

L'intérêt de l'étude des virus du genre *Coronavirus* est en partie lié à leur abondance dans l'environnement. Infectant une grande quantité d'animaux différents, ils ont une importance vétérinaire et économique due aux pathologies graves auxquelles ils sont associés. Infectant l'humain chez qui ils peuvent aussi causer des maladies, leur intérêt scientifique est d'autant plus grandissant depuis la survenue en 2002-2003 du coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS ou SARS pour *severe acute respiratory syndrome*). Les coronavirus humains, longtemps associés à des maladies bénignes comme le rhume saisonnier, montrent de plus en plus d'implications possibles dans des pathologies plus graves.

#### 1.2 Classification

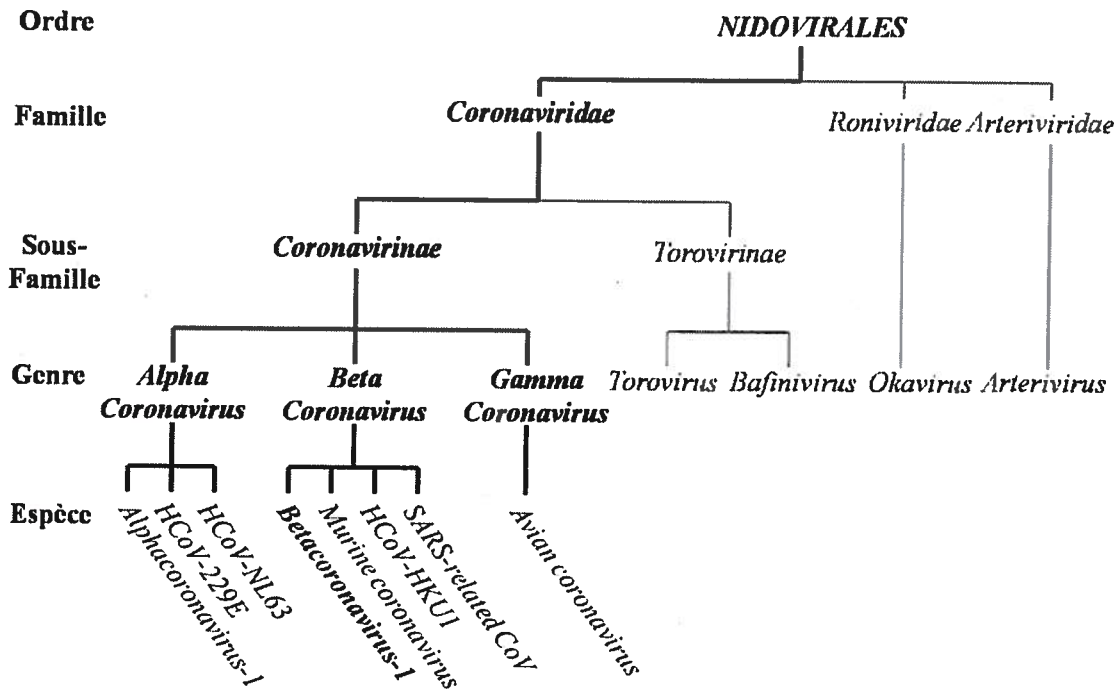
Les premiers coronavirus ont été identifiés dans les années 1930 (Schalk et Hawn, 1931), mais la classification qui les regroupe a été créée en 1967 (Almeida et Tyrrell, 1967). Le genre « coronavirus » identifiait à cette époque des virus animaux comme le virus aviaire de la bronchite infectieuse (IBV pour *infectious bronchitis virus*), le virus de l'hépatite murine (MHV pour *murine hepatitis virus*), le virus de la gastroentérite porcine (TGEV pour *transmissible gastroenteritis virus*) ainsi que des virus alors récemment identifiés chez l'homme (dont les souches 229E et OC43) (Almeida et Tyrrell, 1967; Hamre et Procknow, 1966; McIntosh *et al.*, 1967). Cette classification était uniquement basée sur des caractéristiques morphologiques, soit l'aspect en couronne.

Puis, en 1996, l'ordre des *Nidovirales* a été créé, regroupant trois familles de virus ayant tous en commun leur organisation génomique et la réplication de leur génome à partir d'ARN sous-génomique mais différant de par leur structure, leur morphologie et la taille de leur génome (Cavanagh, 1997; Pringle, 1996). À ce moment, les coronavirus ont été divisés en trois groupes,

nommés 1, 2 et 3, sur la base de leurs relations phylogénétiques et de leur organisation génomique (Gorbalenya, 2008).

Parmi l'ordre *Nidovirales*, la famille *Coronaviridae*, est la seule qui comprend des virus humains (Cavanagh, 1997; Lodha *et al.*, 2005). Le nombre grandissant de coronavirus nouvellement identifiés et la confusion entourant leur classification nécessitait une nouvelle mise au point et depuis 2009, une nouvelle taxonomie est en vigueur (voir [http://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_official\\_taxonomy\\_updates\\_since\\_the\\_8th\\_report/m/vertebrate-2008/1230.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-2008/1230.aspx)) qui définit les phylogroupes 1 à 3 comme étant des genres différents de la nouvelle sous-famille *Coronavirinae* (Fig.1). Ainsi, les phylogroupes 1, 2 et 3 sont devenus respectivement les genres désignés *Alpha-*, *Beta-* et *Gammacoronavirus*. La nouvelle classification est, bien entendue, basée sur la relation phylogénétique et l'identité de séquence existant entre les virus au niveau du gène de la réplicase mais aussi au niveau des protéines structurales. Chacun des coronavirus se retrouvant au sein d'une même espèce partage au moins 90% d'identité de séquence en acides aminés. Ce critère permet de séparer les différents nouveaux genres en espèces et permettra de classer plus facilement les coronavirus qui seront éventuellement découverts. Ainsi, dans le groupe *Alphacoronavirus*, nous retrouvons l'espèce *Alphacoronavirus-1*, qui regroupe différents virus partageant tous au moins 90% d'identité de séquence : le virus de la gastroentérite porcine ou TGEV, le virus de la péritonite infectieuse du félin ou FIPV ainsi que le coronavirus canin ou CCoV (*canine coronavirus*). Les coronavirus humains 229E et NL63 (HCoV-229E et HCoV-NL63) sont exclus de cette espèce puisqu'ils sont phylogénétiquement trop séparés. Ils sont donc les représentants de leur propre espèce. L'ancien phylogroupe 2 était auparavant séparé en 2a, dans lequel se trouvaient les coronavirus murins, bovins et deux coronavirus humains et en 2b, qui regroupait les coronavirus associés au SRAS. Le nouveau genre *Betacoronavirus* quant à lui, est composé de l'espèce *Betacoronavirus-1* dans laquelle nous retrouvons les coronavirus bovins (BCoV et BCoV-like), le coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43) et le virus hémagglutinant de l'encéphalite du porc ou PHEV (*porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus*) qui partagent une très grande identité de séquence en acides aminés (plus de 96% selon le document concernant la nouvelle taxonomie [http://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_official\\_taxonomy\\_updates\\_since\\_the\\_8th\\_report/m/vertebrate-2008/1230.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-2008/1230.aspx)). Par contre, les coronavirus murins qui partagent environ 60% d'identité de séquence avec les membres de l'espèce *Betacoronavirus-1* se retrouvent maintenant dans une





**Figure 1 : Nouvelle classification des Coronavirus**

La famille *Coronaviridae* est maintenant séparée en deux sous-familles : *Torovirinae* et *Coronavirinae*. Les anciens phylogroupes 1, 2 et 3 sont représentés par les genres *Alpha-*, *Beta-* et *Gammacoronavirus* dans lesquels nous retrouvons les différentes espèces énumérées dans la section 1.2. Le coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43) faisant l'objet du présent mémoire fait partie de l'espèce *Betacoronavirus-1* (espèce identifiée en gras), dans le genre *Betacoronavirus*.

espèce à part : *Murine coronavirus* (MuCoV). Finalement, le groupe 2b est maintenant devenu l'espèce des coronavirus associée au SRAS : les *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (SARSr-CoV).

Dans le dernier nouveau genre créé, *Gammacoronavirus*, nous retrouvons entre autres l'espèce des coronavirus aviaires (*Avian coronavirus*) dont le coronavirus type est le virus aviaire de la bronchite infectieuse ou IBV. Toutes les informations sont regroupées dans la figure 1.

Dans les prochaines sections, nous allons voir la composition de base du génome des virus de la sous-famille *Coronavirinae* ainsi que les étapes de répllication conservées chez ses membres.

### 1.3 Génome

Le génome des coronavirus est composé d'un ARN monocaténaire non-segmenté à polarité positive. Une des particularités de ce génome est sa grande taille allant de 27 000 à 32 000 nucléotides (Siddell et Snijder, 2008). Cela en fait le plus grand ARN viral connu. Sa polarité positive lui permet, comme pour tous les ARN messagers (ARNm), d'être directement traduit par les ribosomes cellulaires dans le cytoplasme. Aussi, comme les ARNm, le génome des coronavirus possède une coiffe en 5' et une queue polyadénylée (poly(A)) en 3'. (Gorbalenya *et al.*, 2006). De plus, comme il s'agit d'un ARN à polarité positive, le génome des coronavirus est infectieux lorsque transfecté dans des cellules permissives (Wege *et al.*, 1978). Cette caractéristique très importante rendra plus facile le développement de différents systèmes de génétique inverse qui seront abordés plus tard dans cet état des connaissances.

Les deux extrémités du génome sont pourvues de régions non-traduites (UTR pour *untranslated regions*) qui jouent un rôle important dans la répllication du génome et la synthèse des ARN sous-génomiques. Ces séquences possédant entre 200 et 800 nucléotides ont la capacité de se replier et de former des structures secondaires (Liu *et al.*, 2007b). De plus, la UTR en 5' possède aussi une séquence dite *leader* qui permet d'initier la production des ARN sous-génomiques (Zuniga *et al.*, 2004).

### 1.4 Composition protéique

Même si l'ordre des cadres de lecture ouverts (*Open reading frame*, ORF) se trouvant sur le génome des coronavirus ne semble pas avoir d'importance pour permettre au virus de se répliquer (de Haan *et al.*, 2002b), celui-ci est identique pour tous les coronavirus. Les deux premiers tiers, environ 20 000 bases en 5', sont occupés par les cadres de lecture 1a et 1b (ORF1a et 1b) qui

forment le gène de la réplicase. Le dernier tiers est quant à lui occupé par les gènes codant pour les protéines structurales présents chez tous les coronavirus. L'ordre non changeant de ces gènes est celui-ci : 5'– Réplicase – S – E – M – N – 3'. Toutefois, dépendamment du genre auquel le coronavirus appartient, on pourra aussi retrouver parmi ces gènes ceux codant différentes protéines accessoires (Fig. 2A).

Les protéines encodées par les différents gènes viraux seront vues en détail à l'intérieur de cette section dans l'ordre dans lequel on les retrouve à l'intérieur du génome.

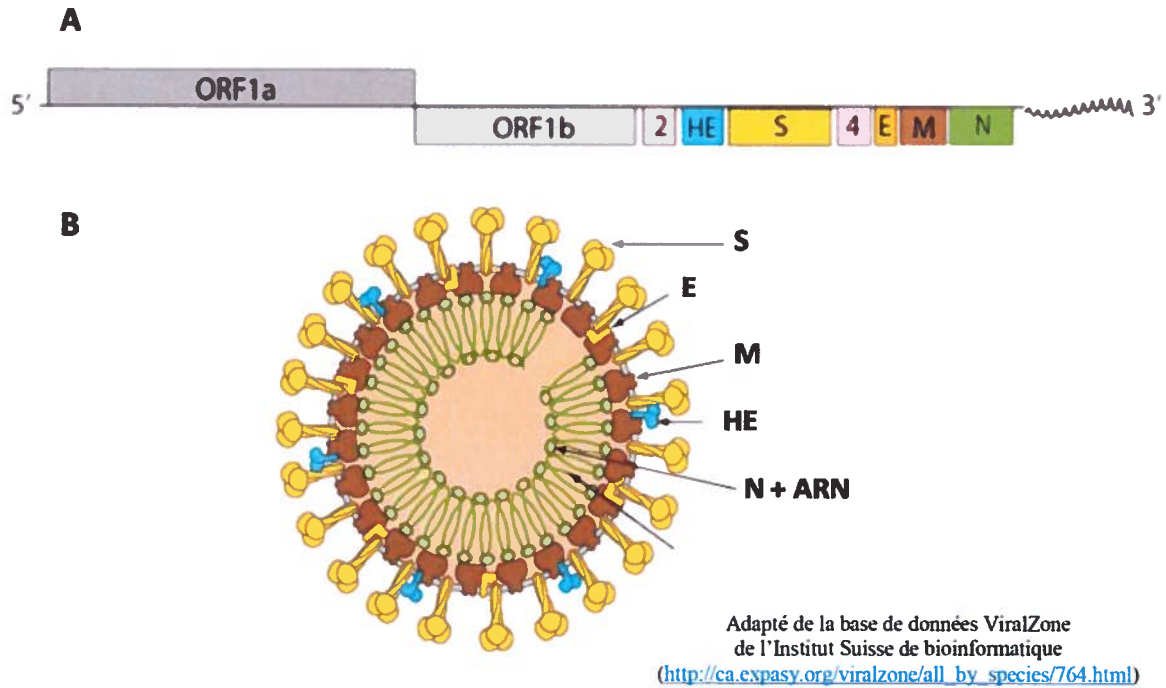
#### 1.4.1 Réplicase

Les cadres de lectures 1a et 1b (ORF1a et 1b), qui occupent les deux premiers tiers en 5' du génome, codent deux précurseurs polyprotéiques appelés pp1a et pp1ab qui sont clivés en une quinzaine de protéines, nommées protéines non-structurales (nsp), toutes impliquées dans le complexe de réplication (Gonzalez *et al.*, 2003; Gorbalenya *et al.*, 2006; Lai et Cavanagh, 1997; Thiel *et al.*, 2003).

L'expression des deux polyprotéines est régulée de façon traductionnelle et post-traductionnelle. En effet, pour l'expression de l'ORF1b, les ribosomes cellulaires doivent effectuer un saut de cadre de lecture d'un nucléotide en amont (décalage de -1) mieux connu sous le terme *ribosomal frame shift* (Brierley *et al.*, 1987; Namy *et al.*, 2006). La nécessité de ce changement de cadre, fait en sorte que les protéines nsp comprises dans l'ORF1b sont produites en plus faible quantité que celles comprises dans l'ORF1a. De plus, la conservation de ce mécanisme chez les nidovirus suggère l'importance d'une expression différentielle (Ziebuhr, 2008). La traduction produit donc deux polyprotéines : une provenant de l'ORF1a (pp1a) et une prolongée de l'ORF1a et 1b (pp1ab).

Les différentes protéines issues de ces deux premiers cadres de lecture sont aussi régulées de façon post-traductionnelle par un processus de clivage grâce à la présence de protéases virales (la protéase *3C-like* ou 3CL<sup>pro</sup> codée par nsp5 et la protéase *papain-like* ou PL<sup>pro</sup> codée par nsp3) (St-Jean *et al.*, 2004; Ziebuhr et Siddell, 1999). La principale, 3CL<sup>pro</sup> joue un rôle important puisqu'elle participe au relargage de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp, nsp12) et de l'hélicase virale (nsp13) (Thiel *et al.*, 2003).

Finalement, le rôle de plusieurs produits de clivage des deux polyprotéines pp1a et pp1ab est encore souvent inconnu, mais on y retrouve entre autres des protéines impliquées dans la réparation et la maturation des ARN viraux (Ivanov *et al.*, 2004; Ziebuhr, 2004).



**Figure 2 : Organisation génomique et composition protéique des coronavirus**

Illustrations basées sur le coronavirus humain OC43 démontrant (en A) l'ordre génomique non changeant de la réplicase, codée par les ORF1a et -1b (en gris), et des gènes codant pour les différentes protéines structurales S (en jaune), E (en orange), M (en brun) et N (en vert). Les coronavirus possèdent aussi, dans le dernier tiers de leur génome, des gènes codant des protéines accessoires non-structurales (en rose) ou structurales (en bleu). L'illustration B montre l'assemblage protéique d'une particule virale avec les trimères de la protéine S (spicules jaunes), la présence des protéines E (en orange) et M (en brun) dans l'enveloppe virale et l'association de la protéine N (en vert) au génome d'ARN du coronavirus. Certains virus possèdent aussi des protéines accessoires présentes dans la particule infectieuse, comme c'est le cas du coronavirus humain OC43 avec la protéine HE (en bleu), mais celle-ci n'est pas présente chez tous les coronavirus.

## 1.4.2 Protéines structurales

Le dernier tiers du génome varie beaucoup d'un coronavirus à l'autre en fonction du genre auquel il appartient mais contient toujours les protéines dites structurales qui sont présentes dans la composition des particules virales. Parmi celles-ci nous retrouvons, selon leur ordre d'apparition 5'-3' dans le génome, tel qu'indiqué sur la figure 2, la protéine de surface (S), de l'enveloppe (E), de la membrane (M) et de la nucléocapside (N).

### 1.4.2.1 Protéine de surface

La protéine de surface (S) forme un large spicule exposé à la surface de l'enveloppe virale (voir figure 2) lui conférant ainsi son apparence de couronne en microscopie électronique (Davies et Macnaughton, 1979). Cette protéine est responsable de la liaison au récepteur à la surface cellulaire et de la fusion des membranes virale et cellulaire permettant ainsi l'entrée du virus dans la cellule hôte (Cavanagh, 1995; Gallagher et Buchmeier, 2001).

Plus précisément, il s'agit d'une protéine glycosylée transmembranaire de type I dont la majeure partie en N-terminal se retrouve à l'extérieur de l'enveloppe virale et s'assemble pour former des homotrimères (Delmas et Laude, 1990; Doms *et al.*, 1993; Hogue et Machamer, 2008). La protéine S possède deux sous-unités, S1 et S2, pouvant être clivées ou non selon les différents types de coronavirus (Taguchi, 1993).

La partie S1, de forme globulaire, se retrouve à l'extrémité N-terminale et contient le site de liaison au récepteur qui permet l'attachement à la cellule cible (Taguchi *et al.*, 1995). La localisation ainsi que la spécificité de ce site de liaison diffèrent selon les coronavirus. En effet, chez certains membres du genre *Alphacoronavirus*, dont FIPV, TGEV et 229E, le récepteur est l'aminopeptidase N ou le CD13 (Delmas *et al.*, 1992; Kolb *et al.*, 1998; Lachance *et al.*, 1998; Yeager *et al.*, 1992), tandis que pour le coronavirus humain NL63 faisant aussi partie du genre *Alphacoronavirus*, ainsi que pour le SARS-CoV faisant partie du genre *Betacoronavirus*, le récepteur principal est identifié comme étant l'*Angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) (Hofmann *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007), alors que le récepteur cellulaire utilisé par les membres de l'espèce *Murine coronavirus* est le *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1) (Williams *et al.*, 1991). Les membres de l'espèce *Betacoronavirus-1*, et plus particulièrement le coronavirus bovin (BCoV) et le coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43), se lient à leur cellule cible via certains types particuliers d'acides sialiques (Schwegmann-Wessels et Herrler, 2006).

Les acides sialiques sont une famille de glycoconjugués dérivés de l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) ou plus précisément de l'acide 5-N-acétylneuraminique (Neu5Ac). Plusieurs variétés d'acides sialiques sont le résultat d'une acétylation en *O* sur différents carbones de la molécule parentale. Ainsi, la protéine S de BCoV et de HCoV-OC43 possède la capacité de se lier au Neu5Ac acétylé en *O* sur le 9<sup>e</sup> carbone, c'est-à-dire l'acide 5-N-acétyl-9-*O*-acétylneuraminique (Neu5,9Ac2). La liaison aux acides sialiques n'est pas exclusive à BCoV et à HCoV-OC43. En effet, MHV, qui appartient au même genre, possède aussi cette capacité d'attachement, avec une spécificité envers les acides sialiques acétylés en *O* sur le 4<sup>e</sup> carbone, les Neu4,5Ac2. Toutefois, dans ce dernier cas, il semblerait que cette liaison soit plutôt due à une autre protéine de MHV, l'hémagglutinine estérase (HE) et non à la protéine S (Langereis *et al.*, 2010). L'implication de cette liaison est plus ou moins connue pour l'instant, mais il semblerait que l'acide sialique pourrait agir comme récepteur secondaire. Parmi les autres genres de coronavirus, la protéine S de TGEV, du genre *Alphacoronavirus*, peut aussi s'attacher aux acides glycolylneuraminiques (NeuGc), en plus de lier l'aminopeptidase N. Cette liaison augmenterait le taux d'attachement du TGEV aux cellules cibles en agissant comme un récepteur secondaire mais, cette liaison ne mène pas toujours à l'infection (Schwegmann-Wessels *et al.*, 2003). Ainsi, il reste encore à déterminer si le Neu5,9Ac2 est le récepteur principal de BCoV et HCoV-OC43, s'il agit comme facteur initial d'attachement, si cet acide sialique doit être conjugué à une protéine en particulier ou si, tout comme MHV et TGEV, cela agit comme récepteur secondaire.

Suite à la liaison du coronavirus à la cellule, il se produit un changement conformationnel de la protéine S impliquant ou non son clivage. Généralement, la protéine S des virus des genres *Alpha-* et *Gammacoronavirus* n'est pas clivée (Breslin *et al.*, 2003) alors que celle du genre *Betacoronavirus* l'est avec quelques exceptions, notamment HCoV-OC43 qui ne possède pas de site de clivage (Kunkel et Herrler, 1996) et certaines souches de MHV, comme le MHV-2 (Hingley *et al.*, 2002). Ce clivage, s'il survient, permet la libération de la sous-unité S2 qui possède les domaines nécessaires à la fusion (Yoo *et al.*, 1991). Il semblerait toutefois que le clivage ne soit pas requis pour la fusion des membranes (Bos *et al.*, 1995; Hingley *et al.*, 1998; Stauber *et al.*, 1993; Taguchi *et al.*, 1993).

La sous-unité S2 contient deux domaines nommés *heptad repeat* 1 et 2 (HR1 et HR2) qui sont en fait des hélices alpha contenant des répétitions d'acides aminés (a.a.) qui s'associent de façon antiparallèle pour former une structure constituée de six hélices (de Groot *et al.*, 1987). Cette structure permet de rapprocher le peptide de fusion à proximité des membranes de façon à initier la fusion (Bosch *et al.*, 2003; Matsuyama et Taguchi, 2002a, b, 2009). La présence des domaines

HR ainsi que de la structure à 6 hélices est typique des protéines de fusion de classe I. Le mécanisme de fusion de la protéine S se rapproche donc de celui des protéines gp41 du HIV-1 et de l'Hémagglutinine (HA) du virus Influenza (Ingallinella *et al.*, 2004).

#### 1.4.2.2 Protéine de l'enveloppe

La protéine de l'enveloppe (E) est la plus petite protéine structurale des coronavirus avec une masse moléculaire d'environ 9.5 kilodaltons (kDa). Il y a peu de similarités de séquence entre les différentes protéines E de la sous-famille *Coronavirinae*, mais toutes semblent conserver certaines propriétés biochimiques : une petite région hydrophile en N-terminal suivie d'un long domaine hydrophobe transmembranaire, de quelques cystéines et d'une queue hydrophile en C-terminal à l'intérieur du virion (Liu *et al.*, 2007a). L'association de la protéine E à la protéine M semble être nécessaire et suffisante à la production de pseudoparticules virales (Vennema *et al.*, 1996). Par contre, une étude a démontré que la présence de la protéine E seule pouvait mener à la production de pseudoparticules virales (VLP) (Maeda *et al.*, 1999). Ainsi, la fonction précise de la protéine E dans l'assemblage des particules virales n'est pas complètement élucidée, mais E pourrait être impliquée dans l'induction de la courbure de la membrane (Liu *et al.*, 2007a).

La protéine E semble aussi avoir la capacité de former des homo-oligomères (Torres *et al.*, 2005). Cette propriété pourrait être associée à la formation de canal à ions comme il a été observé pour la protéine E du SARS-CoV (Wilson *et al.*, 2004), de MHV, de IBV et du coronavirus humain 229E (Wilson *et al.*, 2006). La protéine de l'enveloppe pourrait ainsi agir à titre de viroporine comme la protéine M2 du virus influenza ou la protéine Vpu du VIH (Gonzalez et Carrasco, 2003) en altérant la perméabilité membranaire de cellules (Liao *et al.*, 2004; Madan *et al.*, 2005). De plus, cette activité de canal à ions semblerait jouer un rôle important dans la réplication du virus (Wilson *et al.*, 2006). Bien que le rôle exact de la protéine E reste nébuleux, il est possible que sa propriété de viroporine pourrait jouer un rôle dans la décapsidation ou le relargage des particules virales (Liu *et al.*, 2007a) comme cela est le cas pour la protéine M2 du virus Influenza (Gonzalez et Carrasco, 2003).

#### 1.4.2.3 Protéine de la membrane

La protéine de la membrane (M) est la plus abondante des protéines de l'enveloppe virale (Hogue et Brian, 1986; Sturman *et al.*, 1980). Elle possède trois domaines transmembranaires et sa portion N-terminale est exposée à la surface du virion (Armstrong *et al.*, 1984; Rottier *et al.*, 1986). Cette protéine dont la taille varie entre 220 et 262 a.a. est glycosylée à l'extrémité N-terminale. La protéine M des virus des genres *Alpha-* et *Gammacoronavirus* ainsi que celle du

SARS-CoV est glycosylée en *N* alors que celle des virus du genre *Betacoronavirus* est glycosylée en *O* (Hogue et Machamer, 2008).

La protéine M a un rôle majeur dans l'assemblage des virions puisqu'elle a la capacité d'interagir avec elle-même (de Haan *et al.*, 2000) ainsi qu'avec les autres protéines structurales. En effet, il semblerait que l'interaction avec la protéine M soit entre autres nécessaire à l'incorporation de la protéine S dans les virions (Bosch *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2004). Il a aussi été démontré que M était associée à la protéine de la nucléocapside (N) qui, elle-même, est associée à l'ARN viral (Narayanan *et al.*, 2000). Cette interaction pourrait ainsi permettre l'encapsulation de l'ARN viral à l'intérieur du virion (Hogue et Machamer, 2008). Finalement, bien que la protéine M ait un rôle important dans l'assemblage des virions, la seule présence de M n'est pas suffisante pour mener à la production de pseudoparticules virales. En effet, comme mentionné dans la section précédente, il semblerait que la protéine de l'enveloppe (E) soit aussi requise (Vennema *et al.*, 1996).

#### **1.4.2.4 Protéine de la nucléocapside**

Le dernier gène encodant une protéine structurale se trouvant à l'extrémité de la région 3' du génome viral juste avant la région UTR est le gène de la nucléocapside (N) (voir figure 2). La fonction principale de la protéine correspondante est d'encapsider le génome viral (Macneughton et Davies, 1978). Elle est donc capable de reconnaître et de lier l'ARN viral (Zuniga *et al.*, 2007) et de s'associer en oligomères pour former la ribonucléoprotéine (Narayanan *et al.*, 2003; Narayanan et Makino, 2001a; Surjit *et al.*, 2004a; Surjit *et al.*, 2004b). De plus, sa fonction de chaperonne d'ARN (Zuniga *et al.*, 2007) pourrait favoriser et même être nécessaire à la transcription du génome viral en favorisant le changement de modèle d'élongation lors de la transcription discontinue (Li *et al.*, 2005b; Zuniga *et al.*, 2010).

Le rôle de la protéine N dans ces différents mécanismes viraux reste encore à être défini, mais l'importance de la nucléocapside s'étend clairement au-delà d'une fonction de protection du génome viral.

#### **1.4.3 Protéines accessoires**

En addition aux gènes codant pour les protéines structurales, le dernier tiers du génome viral contient aussi plusieurs autres gènes possédant des versions homologues à l'intérieur du génome des coronavirus membres d'un même genre, mais n'ayant aucune similarité avec ceux appartenant à des genres différents. Ces gènes codent des protéines dites accessoires (préalablement appelées « groupe-spécifique »), pouvant être intégrées ou non dans les particules

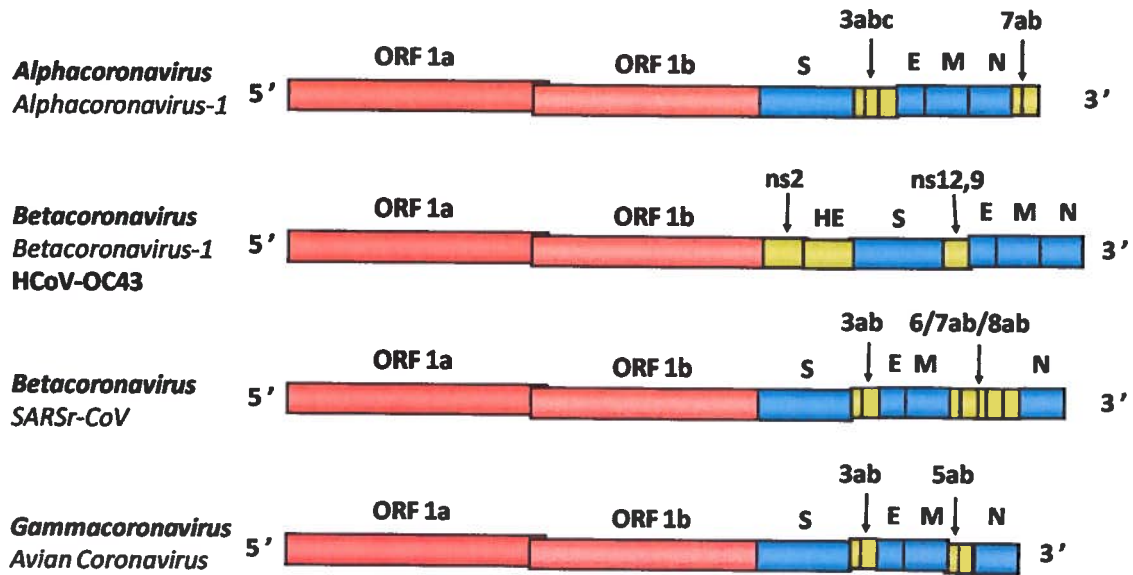


virales et leur nombre et leur localisation à l'intérieur du génome viral varient selon les virus (figure 3). Leur fonction dans le cycle viral n'est pas encore clairement établie à ce jour, mais elles sont nommées protéines accessoires parce qu'elles ne sont pas présentes dans le génome de tous les membres de la sous-famille *Coronavirinae* et qu'elles ne semblent pas, pour la plupart des virus, requises à la croissance en culture cellulaire. En effet, plusieurs études de génétique inverse ont démontré que les protéines associées à ces gènes n'étaient pas requises pour la réplication virale *in vitro*, mais qu'elles pourraient être importantes pour la réplication et la virulence à l'intérieur de l'hôte (Narayanan *et al.*, 2008b).

#### 1.4.3.1 Protéines accessoires des membres du genre *Alphacoronavirus*

Les virus du genre *Alphacoronavirus* possèdent deux ou trois protéines accessoires dont les cadres de lecture (ORF) se situent entre les gènes des protéines S et E et deux autres ORF accessoires (ORF7a et -7b) en aval du gène de la protéine N complètement à l'extrémité 3' du génome viral (Fig. 3). Le virus porcin TGEV possède les ORF3a et -3b entre les gènes des protéines S et E, alors que le virus félin FIPV en possède trois au même endroit : ORF3a, -3b et -3c. Les séquences d'acides aminés montrent une grande homologie entre les ORF3a et -3b du TGEV et les ORF3a et -3c du FIPV, respectivement. Le coronavirus humain 229E, qui fait aussi partie du genre *Alphacoronavirus*, possède un gène accessoire homologue à l'ORF3b du TGEV (Jouvenne *et al.*, 1992; Narayanan *et al.*, 2008b; Raabe et Siddell, 1989).

Les ORF3a et -3b du virus porcin TGEV ne semblent pas être nécessaires à la réplication du virus. En effet, en 1999, une souche de TGEV dont l'ORF3a était supprimé a été isolée en Angleterre. Depuis, des virus recombinants n'exprimant pas l'ORF3a ont été fabriqués par génétique inverse et se sont avérés viables (Curtis *et al.*, 2002; Yount *et al.*, 2000). De plus, les ORF3a et -3b ont été remplacés par le gène codant pour la protéine fluorescente verte ou GFP (*green fluorescent protein*) sans qu'aucun effet ne soit observé sur la réplication du virus en culture cellulaire et avec une réduction marginale de la virulence chez le porc (Sola *et al.*, 2003). Toutefois, la délétion par génétique inverse des ORF3a, -3b et -3c du virus félin FIPV n'affecte pas la croissance du virus en culture cellulaire même si le virus recombinant associé a une virulence sévèrement atténuée chez le chat qui ne montre pas de signe clinique de la maladie alors que le virus de type sauvage induit une mortalité. Les gènes 3abc chez FIPV semblent donc être importants dans la pathogenèse (Haijema *et al.*, 2004).



**Figure 3 : Protéines accessoires des différents membres de la sous-famille *Coronavirinae***

La sous-famille *Coronavirinae* comprend trois genres différents: *Alpha-*, *Beta-* et *Gammacoronavirus*. Les espèces faisant partie du genre *Betacoronavirus* peuvent posséder deux organisations génomiques différentes, celle représentée par les espèces *Betacoronavirus-1* et *MuCoV* et celle représentée par l'espèce *SARSr-CoV*.

L'ORF7, quand à lui, semble coder une petite protéine d'environ 9 kDa qui est associée aux membranes nucléaires, cytoplasmiques et du réticulum endoplasmique ce qui suggère un rôle de la protéine 7 dans l'assemblage du virus (Garwes *et al.*, 1989; Tung *et al.*, 1992). Sa délétion chez TGEV ne semble pas affecter la réplication en culture cellulaire, mais diminue l'efficacité de réplication dans les organes cibles chez le porc de 100 fois par rapport au virus de type sauvage (Ortego *et al.*, 2003). Des résultats semblables ont été obtenus chez le coronavirus FIPV dont les gènes 7a et 7b ont été inactivés par génétique inverse. Ces mutations résultaient en un virus recombinant qui se répliquait aussi bien en culture cellulaire mais dont le phénotype était atténué chez le chat : une infection à une dose considérée comme étant fatale avec le virus de type sauvage ne causait pas de signe clinique de la maladie chez le chat (Haijema *et al.*, 2004).

Ainsi, le rôle précis des protéines accessoires des membres du genre *Alphacoronavirus* est encore méconnu, mais leur importance, qui varie selon les virus, semblerait être associée à la virulence ou la pathogénèse dans l'hôte naturel.

#### **1.4.3.2 Protéines accessoires des membres du genre *Betacoronavirus***

Parmi les virus du genre *Betacoronavirus* se retrouvent les espèces *Betacoronavirus-1*, *Murine coronavirus* et *SARS-related Coronavirus*. Comme les protéines accessoires de cette dernière espèce sont nettement différentes de celles des autres membres du genre *Betacoronavirus*, les coronavirus associés au SRAS seront traités dans une section à part. De plus, comme le coronavirus humain auquel s'intéresse les travaux présentés dans ce mémoire de maîtrise est classé à l'intérieur du genre *Betacoronavirus* et pour éviter les répétitions, les protéines accessoires de ce groupe, auparavant appelé phylogroupe 2a, seront ici brièvement présentées puis leur rôle possible dans la virulence sera décrit avec plus de détails dans le troisième chapitre de cet état des connaissances.

Les virus du genre *Betacoronavirus*, plus précisément des espèces *Betacoronavirus-1* et *Murine Coronavirus* possèdent deux ORF accessoires localisés entre l'ORF1b et le gène de la protéine S : le gène 2a et le gène 2b. Ils possèdent aussi deux autres protéines accessoires codées par les ORF4 et -5a (pas toujours présents) se situant entre les gènes des protéines S et E (Fig. 3). Quelques membres du genre *Betacoronavirus*, comme BCoV et certaines souches de MHV, possèdent aussi un gène accessoire à l'intérieur du gène de la protéine N, nommé I pour interne (Fischer *et al.*, 1997).

L'ORF2a code une protéine non-structurale d'environ 30 kDa appelée ns2, pour protéine non-structurale codée par le gène 2. Ns2 est exprimée dans le cytoplasme des cellules infectées par

MHV, BCoV et HCoV-OC43 (Bredenbeek *et al.*, 1990; Cox *et al.*, 1991; Labonte *et al.*, 1995; Zoltick *et al.*, 1990). Il s'agit d'une protéine phosphorylée mais l'implication de cette phosphorylation est toujours inconnue (Cox *et al.*, 1991). Il a aussi été déterminé par analyse de séquence que la protéine ns2 posséderait un domaine s'apparentant à la superfamille des phosphodiesterases cycliques à deux histidines (2H-phosphoestérase) (Mazumder *et al.*, 2002). En plus de sa présence chez certains virus du genre *Betacoronavirus*, ce type d'activité apparaît aussi dans une autre famille de l'ordre *Nidovirales*. En effet, les membres de la sous-famille *Torovirinae* possèdent un homologue de ce gène à l'intérieur de la réplicase (Snijder *et al.*, 1991). Une activité de phosphodiesterase cyclique pourrait être associée à différents événements liés à la maturation des ARN, tel que l'ajout de coiffe ou le métabolisme des ARN de transferts (ARNt). Ainsi, la présence d'une telle activité enzymatique associée à la protéine ns2 dans le génome des coronavirus pourrait être reliée à l'ajout de la coiffe et à la maturation des ARN viraux. En effet, l'ajout de la coiffe sur les ARN messagers cellulaires (ARNm) se fait habituellement dans le noyau suite à la transcription, mais comme les coronavirus se répliquent dans le cytoplasme, la présence d'une activité phosphodiesterase pourrait permettre l'ajout d'une coiffe sur les ARN viraux de façon à permettre leur traduction en protéines (Mazumder *et al.*, 2002). Par ailleurs, il a été déterminé que la protéine VP3 du Rotavirus possédait aussi le même type de site catalytique de 2H-phosphoestérase et il a été suggéré que cette protéine du rotavirus pouvait être associée à la génération de la coiffe des ARNm (Chen *et al.*, 1999). Malgré ces informations, cette activité catalytique présumée chez ns2 n'a pas été démontrée expérimentalement. De plus, la protéine non-structurale 2 est présente seulement chez certains coronavirus de l'espèce *Betacoronavirus-1* (Sawicki *et al.*, 2007). Il est donc possible qu'existent, chez les coronavirus, d'autres méthodes d'ajout de la coiffe aux ARN viraux qui n'impliquent pas la protéine ns2.

L'ORF2b code une protéine structurale d'environ 60 à 70 kDa nommée hémagglutinine estérase ou HE. La protéine HE est sans doute la mieux caractérisée des protéines accessoires des virus du genre *Betacoronavirus*. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type I dont l'extrémité N-terminale est exposée à la surface des virions des coronavirus MHV, BCoV, HCoV-OC43 et le coronavirus humain HKU1 (HCoV-HKU1) (Brian *et al.*, 1995; Kazi *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2005a). Cette protéine N-glycosylée forme des homodimères et possède une activité d'hémagglutination, reliée à la capacité de lier certains acides sialiques, et une activité acétyl estérase, c'est-à-dire l'hydrolyse du groupement acétyl se trouvant à l'extrémité de l'acide sialique (Hogue *et al.*, 1989). Même si pour la majorité des membres de l'espèce *Betacoronavirus-1*, la liaison à l'acide sialique est médiée en premier lieu par la protéine S

(Kunkel et Herrler, 1993; Schultze *et al.*, 1991; Wurzer *et al.*, 2002a), HE possède aussi la capacité de lier les acides sialiques. Pour l'espèce *Murine coronavirus*, il semblerait, selon une étude récente, que la protéine responsable de la liaison aux acides sialiques serait HE et non la protéine S comme c'est le cas pour l'espèce *Betacoronavirus-1* (Langereis *et al.*, 2010). Dans un cas comme dans l'autre, l'activité acétyl estérase est spécifique au type d'acide sialique lié par les protéines HE et/ou S. En effet, la protéine HE de BCoV et de HCoV-OC43 qui lie les Neu5,9Ac<sub>2</sub>, possèdent une activité sialate-9-O-acétyl estérase, alors que MHV qui lie les Neu4,5Ac<sub>2</sub> possède une activité sialate-4-O-acétyl estérase (Wurzer *et al.*, 2002a). La protéine HE peut donc, en partie, être caractérisée comme un destructeur de récepteurs.

En général, l'attachement à un récepteur permet une certaine sélectivité pour s'assurer que les cellules auxquelles s'attache le virus soient permissives à l'infection. Dans le cas des acides sialiques, leur différentes acétylation ainsi que la façon dont le groupement est attaché ( $\alpha$ 2-3 ou  $\alpha$ 2-6) au dernier sucre à l'extrémité de la chaîne glycosylée permet aux virus de sélectionner certains tissus ou certaines cellules. Par contre, les acides sialiques étant très abondants, ils peuvent aussi être présents sur des molécules solubles dans les fluides extracellulaires, sur la surface de cellules non-permissives ou dans le mucus. L'attachement des virions à ces récepteurs « pièges » résulte en une perte de l'infectivité. De plus, une perte d'infectivité peut aussi résulter de l'agrégation des virions à la surface de la cellule infectée suite à la complétion du cycle de réplication ou encore de l'attachement des virus entre eux (de Groot, 2006). Certains virus à ARN ont ainsi trouvé un moyen d'évasion en codant pour un enzyme destructeur de récepteur (RDE pour *receptor-destroying enzyme*).

Cette activité de destructeurs de récepteurs se retrouve aussi chez les membres de la famille des orthomyxovirus. En effet, les virus Influenza A et B possèdent une neuraminidase (NA) qui catalyse l'enlèvement de Neu5Ac. L'équilibre entre l'activité de NA et de l'hémagglutinine (HA) qui lie l'acide sialique et médie la fusion des membranes cellulaire et virale, permet une entrée efficace à l'intérieur de la cellule cible (Wagner *et al.*, 2002). Le virus Influenza C quant à lui possède une protéine de fusion hémagglutinine-estérase (HEF) possédant 30% d'identité avec la protéine HE des membres de l'espèce *Betacoronavirus-1* et qui possède les trois fonctions : liaison aux acides sialiques, destruction du récepteur et activité de fusion (Herrler *et al.*, 1988; Vlasak *et al.*, 1987; Vlasak *et al.*, 1988; Vlasak *et al.*, 1989). Une protéine HE est aussi retrouvée chez tous les membres de la sous-famille *Torovirinae*, une autre branche de la famille *Coronaviridae*, mais sa fonction est aussi méconnue que celle des coronavirus de groupe 2a.

Entre les gènes S et E, se situent les cadres de lecture accessoires probablement les moins bien caractérisés des virus du genre *Betacoronavirus*. Chez HCoV-OC43, nous ne retrouvons qu'un seul gène accessoire : l'ORF4 (St-Jean *et al.*, 2004), tout comme chez PHEV (Pyrce *et al.*, 2010) et HCoV-HKU1 (Pyrce *et al.*, 2010). Tandis que chez les membres de l'espèce *Murine coronavirus* et chez BCoV, il y a deux ORF accessoires : l'ORF4 ou l'ORF4ab chez BCoV et l'ORF5a, qui correspond à l'ORF4 de HCoV-OC43, -HKU1 et PHEV. Ainsi, l'ORF4 chez HCoV-OC43 et PHEV et l'ORF5a chez MHV et BCoV code une protéine non-structurale (ns) d'environ 15 kDa (Ebner *et al.*, 1988; Skinner *et al.*, 1985; Skinner et Siddell, 1985; Weiss *et al.*, 1993) nommée chez les différents virus en fonction de sa taille en kilodaltons (kDa). Plus précisément, chez HCoV-OC43, cette protéine de 12.9 kDa est nommée ns12.9 (St-Jean *et al.*, 2004), chez PHEV, elle s'appelle ns12.8 (Vieler 1997), chez MHV, il s'agit de ns13.1 et chez BCoV, elle est nommée ns12.7 (Mounir et Talbot, 1993; Skinner *et al.*, 1985; Skinner et Siddell, 1985; Vijgen *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 1993; Yokomori et Lai, 1991). Pour ce qui est de l'ORF4 de MHV et BCoV, il semble coder une ou deux petites protéines dont l'expression n'a pas encore été démontrée dans les cellules infectées. Nous ne savons donc pas s'il s'agit seulement d'un «pseudogène» ou s'il possède un rôle quelconque.

Comme mentionné plus tôt, certains virus du genre *Betacoronavirus*, dont BCoV et certaines souches de MHV, possèdent un gène accessoire se situant à l'intérieur du gène N, nommé I pour interne (Fischer *et al.*, 1997). Un mutant de MHV n'exprimant pas la protéine I a été créé par recombinaison ciblée et est viable en culture cellulaire et cette mutation n'a aucun effet sur la réplication en culture cellulaire. Le titre infectieux de ce mutant dans le cerveau et le foie des souris infectées est comparable à celui du virus de type sauvage. La fonction biologique de la protéine I de MHV reste donc inconnue (Fischer *et al.*, 1997).

#### 1.4.3.3 Protéines accessoires de l'espèce *SARS-related Coronavirus*

Le premier membre d'importance de l'espèce *SARSr-CoV* et probablement le plus étudié de tous les coronavirus est le coronavirus associé au SRAS (SARS-CoV). Il possède huit gènes accessoires : les gènes 3a et 3b situés entre S et E, les gènes 6, 7a, 7b, 8a et 8b situés entre M et N et le gène 9b situé à l'intérieur du gène de la protéine N (Fig.3).

Bien que l'espèce *SARSr-CoV* fassent aussi partie du genre *Betacoronavirus*, l'identité de séquence entre cette espèce et les autres membres de ce genre est peu élevée. En effet, il n'existe aucune similarité de séquence entre les protéines encodées par les gènes accessoires de SARS-CoV et toute autre protéine virale connue (Narayanan *et al.*, 2008b).

Les rôles des protéines accessoires du SARS-CoV ont principalement été étudiés en exprimant chacune des protéines individuellement en culture cellulaire. Il n'est donc pas évident de déterminer si ce rôle représente réellement celui joué dans un contexte d'infection (Narayanan *et al.*, 2008b). Par contre, il est clairement démontré que ces protéines sont bel et bien exprimées à l'intérieur des cellules infectées. En effet, la présence des protéines 3a, 3b, 6, 7a et 9b a été observée dans les cellules infectées ainsi que dans les tissus des patients atteints du SRAS (Chan *et al.*, 2005; Fielding *et al.*, 2004; Geng *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2004). Les protéines 7b et 8a semblent aussi être produites lors de l'infection puisqu'on détecte des anticorps spécifiques à celles-ci dans le sérum des patients infectés (Guo *et al.*, 2004).

Une étude de délétion des gènes 3a, 3b, 6, 7a et 7b par génétique inverse a montré que les protéines accessoires du SARS-CoV ne sont pas nécessaires à la réplication du virus en culture cellulaire (Yount *et al.*, 2005). Il est difficile de déterminer le rôle exact de ces protéines dans la pathogenèse puisqu'il n'existe pas de modèle animal idéal pour l'étude des signes cliniques causés par SARS-CoV (Subbarao et Roberts, 2006). En effet, chez la souris par exemple, le virus inoculé de façon intranasale va se répliquer dans les poumons mais les souris infectées ne montrent pas de signes cliniques (Subbarao *et al.*, 2004). De nouveaux modèles de souris adaptés à SARS-CoV ont été élaborés plus récemment (Day *et al.*, 2009), mais il n'existe pas d'étude sur le rôle des protéines accessoires dans ces modèles. Il semblerait par contre que des mutants n'exprimant pas certaines protéines accessoires se répliquent de façon semblable au virus de type sauvage dans les poumons des souris infectées. Fait intéressant : un mutant de MHV portant dans son génome le gène de la protéine accessoire 6 de SARS-CoV se réplique à un taux plus élevé que le virus MHV de type sauvage et augmente aussi la virulence chez la souris infectée (Pewe *et al.*, 2005), ce qui n'est pas le cas pour les autres protéines accessoires de SARS-CoV.

Même si les protéines accessoires 3a et 7a ne sont pas nécessaires à la réplication du virus en culture cellulaire (Yount *et al.*, 2005), il s'agit de protéines structurales se retrouvant à l'intérieur des particules virales (Huang *et al.*, 2006a; Tan *et al.*, 2006). En effet, en plus d'interagir l'une avec l'autre, les protéines 3a et 7a pourraient aussi se lier à d'autres protéines virales dont M, E et S (Tan *et al.*, 2006). De plus, la protéine 3a se localise au réticulum endoplasmique (RE) et semble pouvoir y induire un stress dans les cellules transfectées menant à l'activation de la réponse aux protéines mal-repliées (*unfolded protein response* ou UPR) (Minakshi *et al.*, 2009). Ainsi, la protéine 3a semble être associée à la réponse proapoptotique par l'intermédiaire de la UPR (Minakshi *et al.*, 2009) ou par sa capacité à promouvoir la fragmentation du Golgi et

l'accumulation de vésicules intracellulaires (Freundt *et al.*, 2010). De plus, il semblerait que la protéine 3a puisse être relarguée dans le milieu extracellulaire par les cellules infectées. Cela pourrait ainsi affecter les cellules avoisinantes et contribuer à la pathogenèse (Huang *et al.*, 2006b).

La protéine 6 du SARS-CoV posséderait la capacité de s'associer à la membrane du RE et du Golgi et ainsi d'être colocalisée avec le complexe de réplication de façon à augmenter la réplication du virus (Zhou *et al.*, 2010). Elle participerait aussi à l'échappement du virus de la réponse immunitaire innée en inhibant la translocation au noyau du facteur de transcription STAT1 (*signal transducer and activator of transcription factor 1*) (Frieman *et al.*, 2007). Il est donc possible que les protéines accessoires du SARS-CoV possèdent plus d'un rôle lors de l'infection.

#### **1.4.3.4 Protéines accessoires des membres du genre *Gammacoronavirus***

Chez le virus de la bronchite infectieuse (IBV), qui fait partie du genre *Gammacoronavirus*, deux groupes de gènes accessoires existent: l'ORF3ab et l'ORF5ab (Bourisnell *et al.*, 1987) (Fig. 3). Ces cadres de lecture, conservés chez les autres membres du genre *Gammacoronavirus* (Cavanagh *et al.*, 2002), codent quatre petites protéines présentes à l'intérieur des cellules infectées (Liu et Inglis, 1991; Pendleton et Machamer, 2005; Shen *et al.*, 2003) mais qui ne sembleraient pas essentielles à la réplication du virus en culture cellulaire. En effet, un mutant apparu suite à plusieurs passages en cellules possédant une délétion partielle de la protéine 3b se réplique à un taux comparable au virus de type sauvage en culture cellulaire. Ceci démontre que la partie C-terminale de la protéine 3b n'est pas essentielle à la réplication du virus (Shen *et al.*, 2003). Une étude faite à l'aide d'un virus recombinant n'exprimant pas 3a et 3b a aussi démontré que ces protéines ne semblent pas essentielles à la réplication du virus en culture cellulaire. Par contre, le virus semble être éliminé plus rapidement que celui de type sauvage en cultures primaires de cellules de trachée de poulet (Hodgson *et al.*, 2006). Finalement, la réplication du virus en culture cellulaire ou en culture d'organe ne semble pas nécessiter la présence des ORF5a et 5b (Casais *et al.*, 2005; Youn *et al.*, 2005).

Tout comme pour les autres membres de la sous-famille *Coronavirinae*, la fonction biologique des protéines accessoires des membres du genre *Gammacoronavirus* et leur rôle dans la pathogenèse virale restent à être élucidés.

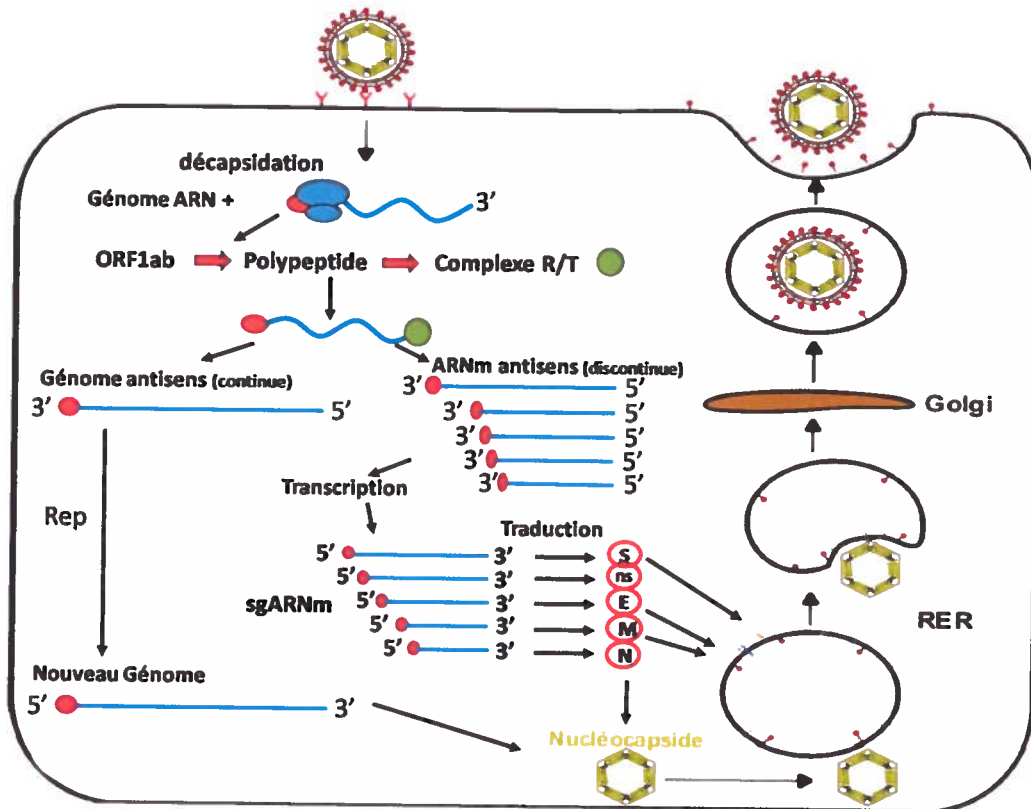


## 1.5 Réplication

De façon générale, l'infection par un coronavirus débute par l'attachement du virion à la surface cellulaire via le récepteur spécifique à la protéine S. Il s'en suit une série d'événements menant à la fusion des membranes cellulaire et virale et à la livraison de la nucléocapside à l'intérieur du cytoplasme où le génome devient ensuite disponible pour la traduction (Fig. 4).

Le génome viral de polarité positive agit en fait comme un ARNm et est traduit par la machinerie cellulaire en deux polyprotéines codées par les ORF1a et 1b. Ces polyprotéines sont par la suite clivées grâce aux protéases virales et permettent la libération des protéines nécessaires à la réplication du génome. La polymérase à ARN dépendante de l'ARN (RdRp) utilise en effet le génome comme une matrice qui mène à la synthèse d'intermédiaires d'ARN à polarité négative, pour la réplication du génome complet et pour la synthèse des ARNm sous-génomiques (sgARNm) (Masters, 2006). Les mécanismes de production des sgARNm impliquent des séquences présentes sur l'ARN viral, comme les séquences *leader* et les régions non-traduites qui possèdent la capacité de former des structures secondaires (Lai *et al.*, 1983); (Sawicki *et al.*, 2007). Ces structures permettent au génome de se replier et à la polymérase d'effectuer des « sauts » de la séquence leader de départ jusqu'à la séquence régulatrice (transcription regulating sequence ou TRS) se trouvant en amont de chacun des gènes. Le « saut » de la polymérase se fait habituellement lors de la synthèse du brin de polarité négative (Sawicki et Sawicki, 1995; Sawicki *et al.*, 2007). Toutefois, il est aussi possible que les plus longs sgARNm servent de modèle pour la production et ainsi l'amplification de sgARNm plus courts (Wu et Brian, 2010). Chaque gène exprimé possède donc son propre sgARNm et chaque sgARNm possède la séquence leader de départ et les UTR en 5' et en 3' (Sawicki *et al.*, 2007).

À l'instar de tous les virus à ARN à polarité positive, la réplication du génome ainsi que la transcription des ARNm viraux prennent place à l'intérieur d'un « complexe de réplication » attaché aux membranes cellulaires, comme celles du RE, des endosomes ou du réseau trans-Golgi. L'association de protéines virales et cellulaires à ces membranes permet la création d'un microenvironnement protégé des nucléases où se regroupent les protéines nécessaires à la synthèse des ARN viraux (Brockway *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2002; Snijder *et al.*, 2006; Ziebuhr, 2005).



Adapté de cours de Luis Enjuanes disponible au : <http://virologie.free.fr/documents/virologie/34-Coronaviridae/coronaviridae.htm>  
Et du cours de Marc Desforges (Les Coronavirus, UQTR)

**Figure 4 : Cycle de réplication des coronavirus**

Suite à l'attachement du virion à la surface de la cellule et à la fusion des membranes virale et cellulaire, le génome d'ARN à polarité positive des coronavirus est décapsidé et traduit par les ribosomes cellulaires pour mener à la production des protéines de la réplicase et du complexe de réplication/transcription (complexe R/T). Le génome est transcrit de façon discontinue pour mener à la synthèse des sgARNm, via un intermédiaire à polarité négative. Ces sgARNm sont à leur tour traduits pour mener à la production des différentes protéines structurales et accessoires se trouvant dans la région 3' du génome. Le génome des coronavirus est parallèlement répliqué puis s'assemble avec la protéine N pour former la nucléocapside ou ribonucléoprotéine. L'assemblage et la maturation des virions se font via le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et le Golgi. Puis les virions sont transportés à l'intérieur de vésicules jusqu'à la membrane cellulaire de laquelle ils bourgeonnent.

Ainsi, les différents ARNm sous-génomiques produits seront à leur tour traduits par la machinerie cellulaire pour exprimer les différentes protéines structurales et accessoires (Fig. 4).

La suite du cheminement du génome et des protéines virales qui mène au bourgeonnement des virions est encore à ce jour plus ou moins bien déterminée. Il est connu que les protéines structurales membranaires se retrouvent à l'intérieur du réticulum endoplasmique et transitent par le compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC). Nous savons aussi que le génome répliqué sera encapsidé par la protéine N qui possède la capacité de se lier à d'autres protéines structurales, comme la protéine M via la signal d'encapsidation (*Packaging signal*) se trouvant dans l'ORF1b du génome (Narayanan et Makino, 2001b). L'association entre les protéines membranaires et la capsidation a donc lieu à la membrane interne du ERGIC (Klumperman *et al.*, 1994; Tooze *et al.*, 1984). Il est probable que le processus d'exportation à la membrane cytoplasmique suit la voie conventionnelle d'exocytose à la sortie du réseau trans-Golgi (Tooze *et al.*, 1987) (Fig.4). De plus, il semblerait que les particules virales soient soumises à un processus de maturation lors du transport des vésicules à la membrane cytoplasmique (Salanueva *et al.*, 1999). Toutefois, il reste encore de nombreuses questions sans réponse à propos du transport à l'intérieur de vésicules, de la maturation des virions et du bourgeonnement de la progéniture virale.

### 1.6 Système de génétique inverse

Puisque le génome des coronavirus consiste en un long ARN monocaténaire d'environ 32 kb, il est difficilement manipulable et l'étude du rôle des différents gènes n'aurait pas pu être possible sans l'utilisation de système de génétique inverse.

Le premier système de génétique inverse utilisé pour les coronavirus fut la recombinaison ciblée de l'ARN (Masters, 1999). La recombinaison de l'ARN est un processus bien connu chez les virus à ARN (Lai, 1992). Ce mécanisme d'échange génétique se produit lors de la réplication de l'ARN viral. De façon générale, la polymérase se dissocie de sa matrice d'ARN avec un brin nouvellement synthétisé attaché à elle. Puis, elle poursuit l'élongation du brin d'ARN après s'être liée ailleurs sur le même brin ou sur un autre modèle. La recombinaison d'ARN homologues se produit quand il y a un échange de matrices entre deux régions de haute homologie. Ce type de recombinaison se produit à un taux très élevé chez les coronavirus (Lai, 1992). Leur très grand génome ainsi que leur mode de transcription discontinue et la présence d'ARN sous-génomiques pourraient favoriser le changement de matrice de la polymérase (Lai, 1995; Masters et Rottier, 2005).

Le mécanisme de la recombinaison ciblée est assez simple et permet d'introduire des changements spécifiques à l'intérieur du virus « récepteur » en utilisant un ARN synthétique « donneur » qui contient ces changements produit à partir d'un vecteur d'ADN complémentaire (ADNc). C'est la découverte en 1987 d'un mutant thermosensible du coronavirus murin qui a permis l'établissement de ce processus de génétique inverse (Sturman *et al.*, 1987). En effet, le mutant, MHV Alb4, possède une sensibilité à la température à laquelle est associée la formation de plage de lyse atypique, plus petite que le virus de type sauvage, à 39°C et une diminution des titres infectieux de 100 à 1000 fois à une température de 24°C (Sturman *et al.*, 1987). Ainsi, la recombinaison se produit dans les cellules infectées en présence de l'ARN « donneur » et les virus possédant les changements désirés sont sélectionnés grâce à leur phénotype différent du virus « receveur », dans ce cas-ci les virus n'étant plus thermosensibles (Koetzner *et al.*, 1992; Masters et Rottier, 2005).

Suite à l'obtention de ce mutant thermosensible, il y a eu de nombreuses améliorations au niveau du virus « receveur » et au niveau de l'ARN « donneur ». Ainsi, depuis plus d'une dizaine d'année, la sélection du virus recombinant se fait grâce à une sélection par l'hôte à l'aide d'un mutant chimérique de MHV dans lequel la protéine S est remplacée par celle de FIPV. Ce virus « receveur » nommé fMHV (pour *feline coronavirus*) possède la capacité de se répliquer dans les cellules félines tandis que l'ARN « donneur », en restaurant la protéine S de MHV, permet au virus recombinant de croître dans les cellules murines (de Haan *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2000).

Le système de recombinaison d'ARN s'est avéré très utile depuis plus de vingt ans pour l'étude par génétique inverse du dernier tiers du génome du coronavirus. Par contre, cette technique ne permet pas l'étude de l'ORF1ab occupant les deux premiers tiers du génome. En effet, la très grande taille du gène de la réplicase ne permet pas la construction d'un vecteur d'ADNc de l'ARN « donneur » (Masters et Rottier, 2005).

Heureusement, depuis le début des années 2000, des clones infectieux d'ADNc pour les génomes du TGEV (Almazan *et al.*, 2000; Yount *et al.*, 2000), de HCoV 229E (Thiel *et al.*, 2001), du Gammacoronavirus IBV (Casais *et al.*, 2001), de MHV (Yount *et al.*, 2002), du coronavirus associé au SRAS (Yount *et al.*, 2003), du coronavirus humain OC43 (St-Jean *et al.*, 2006) et de HCoV-NL63 (Donaldson *et al.*, 2008) ont vu le jour. Ces nouveaux outils permettent l'étude de tout le génome des coronavirus sans être limité à la partie 3' comme c'est le cas pour la recombinaison ciblée d'ARN. Bien entendu, ce système possède aussi ces limitations, la plus importante étant associée à la manipulation de ces gros génomes. Deux méthodes sont

principalement utilisées pour l'obtention d'un clone infectieux : une à l'aide d'un chromosome artificiel de bactérie ou BAC (*Bacterial Artificial chromosome*) et l'autre, à l'aide du virus de la vaccine (Enjuanes *et al.*, 2005)

Dans le premier cas, l'utilisation d'un chromosome artificiel de bactérie augmente la stabilité de l'ADNc à l'intérieur de la bactérie de façon à permettre son amplification (Almazan *et al.*, 2008). L'assemblage d'un clone infectieux dans un chromosome artificiel de bactérie se fait en deux étapes. Lors de la première étape, des sous-fragments du très grand génome d'ARN du virus sont transformés en ADNc et amplifiés par PCR. Il est ensuite possible de reconstituer l'équivalent du génome du coronavirus en ADNc par ligation des sous-fragments intermédiaires. L'ADNc infectieux peut être directement transcrit *in vitro* et, une fois transfectés à l'intérieur des cellules, ces transcrits mènent à la production de virus recombinants (Yount *et al.*, 2000). Toutefois, pour assurer plus de stabilité au clone infectieux, les différents sous-fragments peuvent être clonés dans un vecteur intermédiaire avant d'être assemblés à l'intérieur du BAC, en prenant soin d'intégrer les régions UTR aux deux extrémités et la queue polyadénosine en 3' pour s'assurer d'une traduction adéquate. Le clone moléculaire infectieux d'ADNc est transfecté dans des cellules et le génome viral, qui se trouve sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV), est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire. L'ARNm correspondant au génome complet du coronavirus se retrouve dans le cytoplasme où il est répliqué, transcrit et traduit comme lors d'une infection standard (voir figure 4). La deuxième étape est donc achevée par la récupération des virus recombinants qui bourgeonnent des cellules transfectées (Almazan *et al.*, 2008). Il est parfois nécessaire d'amplifier la quantité de virus récupérés de façon à obtenir un titre infectieux suffisant pour les expérimentations. Le clone infectieux d'ADNc est un système utilisé entre autre pour TGEV, qui a été le premier clone infectieux à être construit par l'équipe du Dr Luis Enjuanes à Madrid en Espagne (Almazan *et al.*, 2000), mais aussi pour HCoV-OC43, fabriqué par un ancien étudiant du laboratoire en collaboration avec le groupe du Dr Luis Enjuanes (St-Jean *et al.*, 2006).

Une autre façon d'augmenter la stabilité de l'ADNc, utilise le génome du virus de la vaccine (Thiel *et al.*, 2001). Le virus de la vaccine possède un génome d'ADN d'environ 200kb et peut accepter la présence d'une séquence supplémentaire de la taille du génome des coronavirus (environ 30kb). Tout comme pour le BAC, le clonage se fait à l'aide de fragments intermédiaires. Ceux-ci sont assemblés à l'intérieur du génome du virus de la vaccine avec une queue poly(A) et la transcription se retrouve sous le contrôle du promoteur de la polymérase à ARN du bactériophage T7. Le génome du virus de la vaccine contenant le génome du coronavirus est

ensuite transfecté dans des cellules de mammifères ayant été précédemment infectées avec le virus *Fowlpox* qui exprime la polymérase T7 permettant ainsi une amplification du clone d'ADNc. Ensuite, pour la production de virus recombinant une réaction de transcription est effectuée *in vitro* et les transcrits sont par la suite transfectés dans des cellules permissives à l'infection par le coronavirus. La transcription peut aussi être directement effectuée à l'intérieur de cellules exprimant la polymérase T7 suite à la transfection de l'ADNc correspondant au génome du coronavirus extrait par digestion du génome du virus de la vaccine. Ceci permet donc la transcription du génome viral et ainsi la production de virus recombinant. La réaction de transcription peut aussi être effectuée *in vitro*, les transcrits doivent, par la suite être transfectés dans des cellules permissives à l'infection par le coronavirus (Thiel et Siddell, 2005). Ce système a été utilisé en premier pour le coronavirus humain 229E (Thiel *et al.*, 2001).

Pour résumer, depuis l'apparition des systèmes de génétique inverse, il est maintenant possible de modifier génétiquement le génome des coronavirus selon nos intérêts. En effet, l'utilisation de système de génétique inverse permet de produire des virus recombinants dont certains gènes sont inactivés, délétés ou mutés et ceux-ci peuvent être utilisés pour étudier le rôle de certaines protéines dans la réplication virale ou dans la pathogenèse. Il s'agit donc d'outils versatiles et très puissants qui nous permettent d'étudier les liens entre la structure et la fonction des protéines virales.

## **2. Coronavirus humains**

### **2.1 Généralités**

C'est en 1965 qu'a été isolé le premier coronavirus humain, nommé B814, à partir d'un patient souffrant d'une maladie respiratoire (Tyrrell et Bynoe, 1965). Puis, l'année suivante, une autre équipe a découvert et isolé, à partir du tractus respiratoire, le coronavirus humain 229E (Hamre et Procknow, 1966). Au même moment, un groupe utilisait la culture d'organe (OC pour *organ culture*) pour isoler différents virus respiratoires qui croîtront par la suite dans le cerveau de souris nouveau-nés, lesquelles développeront une encéphalite suite l'inoculation (McIntosh *et al.*, 1967). De toutes ces souches de coronavirus humains, seules 229E et OC43 ont été maintenues en laboratoire et étudiées. Ces virus nouvellement isolés possédaient, tout comme IBV, déjà découvert depuis les années 1930, une apparence de couronne, corona en latin, en microscopie électronique. C'est donc ce qui a mené à la création du genre « Coronavirus » et de la famille « *Coronaviridae* » (Almeida et Tyrrell, 1967; Tyrrell *et al.*, 1975). Les coronavirus humains 229E et OC43 sont maintenant nommés les coronavirus « classiques », par opposition aux

« nouveaux » coronavirus découverts suite à la recrudescence de la recherche sur ces virus respiratoires, occasionnée par l'apparition du coronavirus associé au SRAS en 2002-2003 (Drosten *et al.*, 2003; Fouchier *et al.*, 2003a; Fouchier *et al.*, 2003b; Ksiazek *et al.*, 2003). Ainsi, la recherche sur les coronavirus a permis la découverte, l'isolement et l'identification de deux autres souches : NL63 (van der Hoek *et al.*, 2004) et HKU1 (Woo *et al.*, 2005b).

Il existe une polémique à savoir si le coronavirus associé au SRAS est un virus humain. Il semblerait qu'il s'agisse en fait d'un virus dont le réservoir est la chauve-souris (Lau *et al.*, 2005) et qui aurait franchi la barrière inter-espèce via une amplification dans la civette (Guan *et al.*, 2003). Toutefois, sa capacité à infecter l'humain et à y causer une pathologie respiratoire grave est établie, c'est pourquoi le SARS-CoV sera traité dans ce chapitre, mais l'emphase sera mise sur les descriptions des coronavirus humains « non-SARS ».

Les coronavirus humains « non-SARS » ont une distribution internationale et sont des pathogènes reconnus du tractus respiratoire supérieur et inférieur (Talbot *et al.*, 2008). De plus, des études ont suggéré une association possible entre la présence des coronavirus humains et l'établissement ou l'exacerbation de maladies neurologiques ou entériques, même si aucune association directe n'a encore été faite à ce jour. Nous passerons donc à travers ces différentes associations dans les chapitres suivants.

## **2.2 Pathologies respiratoires**

Il n'est pas toujours évident pour les virus de satisfaire aux postulats de Koch pour établir la responsabilité d'un agent infectieux dans le cadre d'une pathologie. En effet, la présence seule du virus dans les tissus montrant des signes de pathologie n'est pas suffisante à prouver son implication dans une pathologie. De plus, le développement d'une pathologie peut impliquer des facteurs génétiques et environnementaux qui font en sorte que la maladie ne se développe que dans un certain pourcentage des cas, le virus pouvant donc se retrouver dans des patients sains. Toutefois, d'autres preuves directes ou indirectes ont pu être apportées pour démontrer que les coronavirus humains causent des maladies respiratoires. Il y a même une étude en 1967 où HCoV-229E a été inoculé chez des humains volontaires de façon à établir sa capacité à causer une infection des voies respiratoires supérieures (Bradburne *et al.*, 1967). Chez les « nouveaux » coronavirus, cette association a été faite par l'observation d'anticorps contre HCoV-HKU1 chez les patients atteints de pneumonie (Woo *et al.*, 2005a), par la détection du génome viral de HCoV-NL63 chez plusieurs patients atteints d'infections respiratoires (van der Hoek *et al.*, 2004)

et par inoculation expérimentale à l'animal pour le virus associé au SRAS (Fouchier *et al.*, 2003b).

Il est maintenant établi que les coronavirus humains «non-SARS» se retrouvent en quatrième ou cinquième position d'importance pour les pathogènes respiratoires avec un taux de détection moléculaire dans les prélèvements allant de 3 à 11% (Esposito *et al.*, 2006; Gerna *et al.*, 2007; Kuypers *et al.*, 2007; Vabret *et al.*, 2008), c'est-à-dire après le virus respiratoire syncytial (RSV), le métapneumovirus humain et virus de l'Influenza et à égalité avec le virus du Parainfluenza (Vabret *et al.*, 2009).

Les coronavirus humains «non-SARS» sont surtout responsables d'infection des voies respiratoires supérieures à évolution bénigne, communément appelée «rhume». En effet, dans la population générale, ces infections ne se distinguent pas cliniquement des autres infections respiratoires comme celle du rhinovirus, par exemple. D'ailleurs, le taux d'infection est uniforme dans tous les groupes d'âge. En effet, même si la première infection a lieu dans les premières années de vie, les réinfections sont fréquentes tout au long de la vie et sont symptomatiques dans 45% des cas (Vabret *et al.*, 2009). Les coronavirus «classiques» seraient responsables de 10 à 35% des rhumes et le pic d'infection se situerait entre janvier et mai (Myint, 1995).

Même s'ils sont surtout associés à des infections bénignes, les coronavirus peuvent aussi être responsables de pathologies ou de complications associées aux voies respiratoires inférieures. En effet, des associations ont été faites entre les coronavirus humains «non SARS» et des exacerbations d'asthme chez les enfants (Johnston *et al.*, 1995), mais aussi chez les adultes (Nicholson *et al.*, 1993). Ils peuvent aussi être responsables de détresse respiratoire chez les nouveau-nés (Sizun *et al.*, 1993; Sizun *et al.*, 1995) et de pneumonie chez les patients immunocompromis, les personnes âgées ou les enfants (Gerna *et al.*, 2006). Bien entendu, le coronavirus infectant l'humain causant la pathologie la plus grave est le SARS-CoV. Les premières manifestations cliniques de l'infection ressemblent à un syndrome pseudogrippal relativement banal marqué par de la fièvre, des frissons, des courbatures et de la toux et est accompagné dans 30% des cas par des symptômes digestifs. Par contre, chez un patient sur cinq, l'évolution de la maladie est défavorable et on observe l'apparition d'une détresse respiratoire grave nécessitant une ventilation assistée (Vabret *et al.*, 2009).

Ainsi, l'association entre les coronavirus humains et les pathologies du tractus respiratoire supérieur et inférieur est bien établie. Par contre, des particules infectieuses peuvent être



retrouvées dans d'autres tissus du corps humain, ce qui peut suggérer que ces virus sont associés à d'autres types de pathologies.

### **2.3 Pathologies entériques**

Des particules du même aspect en « couronne » que les coronavirus ont été détectées dans les fèces de nourrissons atteints d'entéocolites nécrosantes dans les années 1980 (Chany *et al.*, 1982; Rousset *et al.*, 1984). Ces particules virales ont alors été identifiées comme étant des coronavirus entériques (Resta *et al.*, 1985). Hors, il semblerait que ce coronavirus entérique possède une ressemblance antigénique avec HCoV-OC43 (Gerna *et al.*, 1985). De plus, l'ARN des coronavirus est détectable dans les selles de patients présentant des infections respiratoires par HCoV-HKU1 accompagnées de signes digestifs (Vabret *et al.*, 2006). Par contre, une étude récente n'a pas réussi à mettre en évidence la présence d'ARN coronaviral dans les fèces d'un groupe de près de 500 patients atteints de symptômes gastro-intestinaux, suggérant que cette association serait peu commune (Esper *et al.*, 2010). Ainsi, chez l'humain, contrairement aux coronavirus bovins et porcins, aucune association directe n'a été faite jusqu'à aujourd'hui entre la présence de coronavirus dans le système digestif ou dans les fèces et des symptômes entériques.

### **2.4 Pathologies neurologiques**

Alors que le système nerveux central (SNC) a longtemps été considéré comme un site immunoprivilégié, le concept de flore virale au cerveau est de plus en plus accepté (Campbell et Buchmeier, 2001). Cependant, il reste parfois difficile de prouver une association entre un virus et une maladie neurologique humaine. L'étude de cerveaux humains post-mortem peut nous permettre la détection de particules, d'ARN ou de protéines virales, mais cela ne nous permet pas de déterminer la relation entre l'apparition de la maladie et l'infection virale. Par contre, il en est tout autrement des coronavirus infectant les animaux comme le virus hémagglutinant de l'encéphalite porcine (PHEV) ou le coronavirus murin (MHV) faisant tous deux partie du genre *Betacoronavirus*. Dans le cas de MHV, il est depuis longtemps établi que ce virus possède la capacité d'infecter le SNC via le nerf olfactif (Barnett et Perlman, 1993) et d'y induire une maladie démyélinisante s'apparentant à la sclérose en plaques (Buchmeier *et al.*, 1988). Comme HCoV-OC43 est l'homologue humain de ce virus neurovirulent, il est possible de spéculer sur une implication des coronavirus humains dans des maladies neurodégénératives.

Ainsi, même si aucune association directe n'a été faite entre une neuropathologie humaine et les coronavirus humains, il a clairement été démontré que HCoV-OC43 et HCoV-229E possèdent

des capacités neuroinvasives et neurotropes qui seront décrites dans les prochaines sections. Cet état des connaissances se concentrera principalement sur les coronavirus dits « classiques » puisque plusieurs études sont disponibles à leur sujet, et plus précisément sur le coronavirus humain OC43 puisque c'est celui qui fait l'objet du présent projet de recherche.

#### **2.4.1 Neuroinvasion**

Tout d'abord, il est établi que les coronavirus humains possèdent des propriétés neuroinvasives, c'est-à-dire la capacité d'envahir le système nerveux central à partir de la périphérie. Cela a été démontré par la détection, dans le liquide céphalo-rachidien (CSF), d'anticorps contre HCoV-229E et HCoV-OC43 chez des patients souffrant de la maladie Parkinson (Fazzini *et al.*, 1992) et aussi, par la détection d'ARN viral chez des personnes atteintes de sclérose en plaques (Cristallo *et al.*, 1997). De plus, la méthode d'hybridation *in situ* et la puissance du RT-PCR a permis de mettre en évidence la présence d'ARN viral à l'intérieur de cerveaux humains post-mortem de patients atteints de sclérose en plaques et de patients sains (Arbour *et al.*, 2000). Malgré cette relation ténue entre la présence de coronavirus et leur responsabilité dans le développement de ces maladies, il reste que les capacités neuroinvasives des coronavirus humains ont bien été démontrées.

#### **2.4.2 Neurotropisme**

La capacité des coronavirus humains OC43 et 229E à infecter les cellules du système nerveux central après l'avoir envahi a été démontré grâce à l'utilisation de cultures primaires d'astrocytes et de microglies humains (Bonavia *et al.*, 1997). Une infection persistante a aussi été observée dans des lignées cellulaires représentatives du SNC (Arbour *et al.*, 1999).

Les propriétés neuroinvasives et neurotropes du coronavirus humain OC43 ont aussi été démontrées à l'aide d'un modèle murin d'infection. En effet, l'inoculation intranasale de HCoV-OC43 mène à la mort des souris âgées de sept jours et, malgré le fait qu'aucun signe clinique ne soit observé suite à ce type d'inoculation chez les souris plus âgées, de l'ARN viral peut tout de même être détecté au cerveau par RT-PCR (Jacomy et Talbot, 2003). Suite à la démonstration de ces capacités neuroinvasives, les injections intracérébrales ont permis, tout en s'assurant une certaine reproductibilité, de caractériser l'infection qui mène au développement d'une encéphalite aiguë (Jacomy et Talbot, 2003). Il a par la suite été déterminé, toujours grâce au modèle murin, que la cible principale de l'infection était le neurone (Jacomy *et al.*, 2006). Ainsi, il est possible que l'infection mène à une dégénérescence neuronale et donc que le coronavirus humain OC43 soit associé à des maladies neurodégénératives.

### 2.4.3 Neurovirulence

Comme mentionné précédemment, le potentiel neurovirulent, c'est-à-dire la capacité à causer une pathologie au système nerveux central, des coronavirus humains n'est pas facile à démontrer chez des sujets humains. En effet, il y a quelques études où on rapporte la présence de coronavirus préférentiellement dans le liquide céphalo-rachidien ou le cerveau de patients atteints de maladie neurogénéralives, mais aussi dans celui de patients sains (Arbour *et al.*, 2000; Salmi *et al.*, 1982) et un plus récent article où HCoV-OC43 a été détecté dans le SNC d'un adolescent atteint d'encéphalomyélite aiguë disséminée (ADEM *Acute disseminated encephalomyelitis*) (Yeh *et al.*, 2004). Toutefois, beaucoup de données ont été obtenues grâce au modèle murin et à des études *in vitro*.

Tout d'abord, à l'aide du modèle murin d'infection par HCoV-OC43, il a été démontré que la cible principale d'infection, le neurone, subissait une fragmentation nucléaire associée à une activation de la caspase-3, suggérant que l'infection peut induire directement une mort neuronale (Jacomy *et al.*, 2006). La même étude démontre également des signes d'apoptose observés dans des cellules non-infectées, suggérant un mécanisme de mort cellulaire indirecte associée au relargage de molécules proinflammatoires, comme le TNF-alpha par exemple. Cette activité pro-inflammatoire pourrait être associée à l'activation des microglies (Edwards *et al.*, 2000; Jacomy et Talbot, 2003). De plus, les coronavirus humains activent des cellules T autoréactives qui possèdent une réactivité croisée pour les antigènes viraux et ceux de la myéline. Ce phénomène a été observé chez les patients atteints de sclérose en plaques, mais pas chez les patients sains. Il est donc possible qu'un mécanisme de mimétisme moléculaire intervienne dans le développement de neuropathologie suite à l'infection par un coronavirus humain (Boucher *et al.*, 2007; Talbot *et al.*, 1996). Finalement, une publication récente a démontré que des mutations acquises lors de la persistance dans des lignées de cellules neurales humaines pouvaient causer un changement de la neuropathologie induite dans le modèle murin. En effet, comme précédemment rapporté, les souris infectées par HCoV-OC43 développaient une encéphalite, alors que les souris infectées par le virus recombinant contenant des mutations dans la protéine S présentaient une démyélinisation accompagnée d'une neuroinflammation accrue (Jacomy *et al.*, 2010).

Ainsi, malgré l'incertitude entourant le lien entre la présence de coronavirus humains au cerveau et leur implication dans des maladies neurologiques, les résultats obtenus suite à des études sur du matériel humain ou des modèles animaux permettent de suggérer que ces virus pourraient être impliqués dans le développement de maladies neurodégénératives chez l'humain (Talbot *et al.*, 2008).

### 3. Déterminants viraux de la pathologie

#### 3.1 Généralités

L'association possible du coronavirus humain OC43 avec des maladies neurodégénératives apporte de nouveaux questionnements au sujet des facteurs impliqués dans l'apparition et le développement de la pathologie. Bien entendu, la réponse immunitaire provoquée par l'infection ou encore des facteurs génétiques associés à l'hôte peuvent participer à l'établissement de symptômes neurologiques. Par contre, dans cet état des connaissances, nous nous intéresserons surtout aux déterminants viraux de la pathologie ou plus précisément de la neuropathologie, lorsque applicable. Ce rôle peut être associé à certaines protéines associées au gène de la réplicase ou aux protéines structurales du coronavirus. De plus, et comme c'est souvent le cas pour d'autres virus, les protéines accessoires, qui ne semblent pas posséder de rôle dans la réplication du virus en culture cellulaire, peuvent aussi être des déterminants de la pathologie.

Parmi les protéines impliquées dans les interactions virus-hôte jouant un rôle sur le développement d'une pathologie, celles responsables de l'échappement du virus à la réponse immunitaire peuvent être considérées comme des déterminants de la virulence. Un mécanisme de réponse immunitaire innée important pour initier la réponse antivirale est la voie de réponse aux interférons (IFN). Les interférons de type I, IFN-alpha et IFN-beta, sont des cytokines synthétisées et sécrétées par différents types de cellules (entre autres les lymphocytes, les cellules dendritiques, les macrophages et au SNC, les astrocytes, les microglies et parfois les neurones) suite à une infection virale. Ils peuvent agir de façon autocrine, sur la cellule elle-même, ou paracrine, sur les cellules avoisinantes, pour réguler à la hausse l'expression de plus de 300 gènes antiviraux stimulés par les IFN (*IFN-stimulated genes* ou ISG) (Randall et Goodbourn, 2008). La voie des IFN peut être induite de multiples façons dont la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogens-associated molecular patterns* ou PAMP) ou la présence d'ARN bicaténaire (ARNdb pour ARN double-brin) inhérente à la réplication des virus à ARN. Les voies de l'oligoadénylate synthétase (OAS) et de la protéine kinase R (PKR) peuvent aussi être activées par la détection d'ARNdb. L'OAS cause la dimérisation et l'activation de la RNase L qui inhibe la réplication du virus par la dégradation de l'ARN (Silverman, 2007). La PKR, aussi activée par la présence d'ARNdb, a la capacité de phosphoryler et ainsi d'inactiver le facteur de traduction eIF2alpha menant à une réduction de la synthèse des protéines cellulaires et virales (Garcia *et al.*, 2006).

Ainsi, les mécanismes de réponse cellulaire antivirale sont nombreux et les stratégies des virus pour les déjouer peuvent être associées à plusieurs protéines virales qui seront décrites dans les prochaines sections. Une interaction des différentes protéines du virus avec des facteurs cellulaires impliqués dans ces mécanismes de réponse antivirale peut jouer un rôle important dans la détermination de la virulence en permettant au virus de se répliquer, de se disséminer et de persister à l'intérieur de l'hôte.

### **3.2 Réplicase**

Comme mentionné précédemment, les produits de clivage des polyprotéines (pp1ab et pp1a) codées par l'ORF1ab semblent surtout associés à la réplication du génome et à la synthèse des ARN sous-génomiques (sgARNm). Par contre, le rôle de certaines de ces protéines reste encore méconnu et il est possible que ces protéines non-structurales pourraient affecter le tropisme ou la pathogenèse associé à un virus en modifiant le taux de réplication virale ou en interagissant avec des facteurs cellulaires ou des éléments de réponse immunitaire. Par exemple, chez MHV, un changement d'un seul acide aminé dans la protéine nsp14, une exoribonucléase issue du clivage de la pp1ab, n'affecte pas la réplication du virus en culture cellulaire mais résulte en une atténuation de la virulence suite à une infection intracérébrale (Sperry *et al.*, 2005). Chez le SARS-CoV, il a été démontré que la protéine nsp1 était impliquée dans l'inhibition de l'expression des gènes de l'hôte par l'inactivation de la sous-unité ribosomale 40S et par la modification des ARNm (Kamitani *et al.*, 2009; Kamitani *et al.*, 2006; Narayanan *et al.*, 2008a). En supprimant l'expression des gènes de l'hôte, dont ceux reliés à la réponse immunitaire innée comme les interférons de type I, cela suggère un rôle de nsp1 dans la pathogenèse de SARS-CoV. Finalement, une étude a été réalisée sur la souche A59 du MHV, considérée « hépatotrope », et la souche JHM, considérée « neurotrope », afin de former des virus chimères dont le gène de la replicase avait été interchangé. Ce remplacement n'a pas semblé avoir d'effet sur la pathogénicité respective de ces deux souches de MHV, indiquant que les protéines incluses dans le gène de la replicase ne semblent pas être des déterminants importants de la pathogenèse (Navas-Martin *et al.*, 2007).

### **3.3 Protéines structurales**

#### **3.3.1 Protéine de surface (S)**

La protéine de surface qui médie l'entrée du virus à l'intérieur de la cellule est considérée comme un déterminant important de la pathogenèse ou plus précisément de la neuropathogenèse. Des études à l'aide d'un système de génétique inverse ont permis de démontrer l'importance de la

protéine S dans la neurovirulence chez le coronavirus murin. En effet, le remplacement de la protéine de surface de MHV-A59, considéré comme peu neurotrophe, par celle de la souche MHV-JHM, possédant une neurovirulence élevée, confère une plus grande neurovirulence au virus résultant (Phillips *et al.*, 1999). Inversement, le gène de la protéine S de MHV-A59 a été remplacé par celui de la protéine S de MHV-JHM qui est peu hépatotrope. Le virus recombinant résultant ne possédait pas la capacité d'induire une hépatite sévère comme le fait normalement la souche MHV-A59 (Navas *et al.*, 2001). La protéine S semble donc avoir un rôle important à jouer dans la pathogenèse. Par ailleurs, il a été démontré qu'un virus possédant la protéine S de MHV-JHM se disséminait plus rapidement et induisait une plus grande inflammation dans le SNC comparé au virus possédant la protéine S de MHV-A59 (Phillips *et al.*, 2002). Toutefois, la présence de la protéine S de MHV-A59 dans le génome de MHV-JHM n'est pas suffisante pour l'induction d'un phénotype hépatotrope (Navas et Weiss, 2003). Il semble donc que d'autres gènes puissent jouer un rôle dans le développement de la pathologie. Effectivement, même si le remplacement de la protéine S de A59 par celle de JHM est suffisant pour conférer au virus résultant une neurovirulence accrue, l'échange contraire, c'est-à-dire le remplacement de la protéine S de JHM par celle de A59, n'est pas suffisant pour altérer la neurovirulence de JHM (Iacono *et al.*, 2006).

Les études portant sur le coronavirus humain OC43 présentent d'autres indices qui démontrent l'importance de la protéine S dans la virulence associée à l'infection en culture cellulaire et en modèle murin. En effet, des mutations dans la protéine S, obtenues suite à une infection persistante dans des lignées de cellules neurales humaines, mènent à un changement dans la neuropathologie induite chez la souris (Jacomy *et al.*, 2010). Comme mentionné auparavant, l'infection de souris par HCoV-OC43 de type sauvage, mène à une encéphalite tandis que le virus mutant contenant les mutations dans la protéine S induit une paralysie des membres inférieurs suivie d'une démyélinisation chez les souris infectées. Ce changement de neuropathologie est associé à une dissémination plus rapide et à une réplication accrue du virus mutant au niveau de la moelle épinière ainsi qu'à une infiltration accrue de cellules lymphoïdes accompagnée par des niveaux augmentés de production de certaines cytokines/chimiokines proinflammatoires (Jacomy *et al.*, 2010). Lors de l'infection de lignées cellulaires neuronales, un virus possédant deux mutations ponctuelles dans la protéine S induit une réponse aux protéines mal-repliées (UPR pour *unfolded protein response*) plus élevée que le virus de type sauvage (Favreau *et al.*, 2009). L'activation de cette UPR peut mener à une augmentation de la mort cellulaire, comme démontrée par l'activation de la caspase-3 et la présence de fragmentation nucléaire (Favreau *et*

*al.*, 2009). Cette capacité à moduler la dégénérescence neuronale pourrait être impliquée dans le développement de la pathologie observée chez la souris et appuie l'implication possible de la protéine S comme déterminant de la neurovirulence.

### **3.3.2 Protéine de l'enveloppe (E)**

Il semblerait que la protéine de l'enveloppe (E) possède de nombreux rôles lors de l'infection. En plus de son implication dans l'induction de la courbure de la membrane et de sa capacité à former des canaux à ions, il semblerait que l'expression de la protéine E dans certaines lignées cellulaires puisse mener à la mort cellulaire (An *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2005). Toutefois, ce phénomène dépend apparemment de l'espèce de coronavirus et de la lignée cellulaire concernée (Ortego *et al.*, 2002). De plus, le contexte de surexpression de la protéine pourrait ne pas refléter la situation réelle d'une infection.

La délétion, à l'aide d'un système de génétique inverse, du gène de E chez MHV a démontré que la présence de la protéine n'était pas essentielle à la réplication du virus, bien que celle-ci se trouvait significativement diminuée et que son absence altérait grandement la capacité de MHV à former des plaques (Kuo et Masters, 2003). Une expérience similaire chez le coronavirus porcine TGEV bloque la maturation du virion dans la voie de sécrétion et empêche ainsi la complétion du cycle de réplication (Ortego *et al.*, 2007). Tandis que chez SARS-CoV, la délétion de la protéine E diminue faiblement la réplication du virus en souris suite à une inoculation intranasale, mais atténue complètement la virulence et la mortalité chez l'animal (Netland *et al.*, 2010). Les données manquent encore pour déterminer si E est vraiment un déterminant de la virulence ou si l'atténuation de la pathologie observée est associée à la diminution de la réplication.

### **3.3.3 Protéine de la membrane (M)**

Des études de surexpression de la protéine de la membrane du SARS-CoV à l'intérieur de différentes lignées cellulaires ont permis d'établir sa capacité à induire l'apoptose par l'activation des caspases associées à la voie apoptotique intrinsèque (mitochondriale) (Chan *et al.*, 2007).

L'hypothèse d'un rôle de la protéine M dans l'inhibition de l'activité liée aux interférons a tout d'abord été mentionnée chez le coronavirus porcine TGEV (Laude *et al.*, 1992). Depuis, il a été démontré que l'expression de la protéine M de SARS-CoV avait la capacité d'inhiber la production d'interféron de type I suite à l'induction par la présence d'ARN bicaténaire (double-brin d'ARN, ARNdb) (Siu *et al.*, 2009). Cette inhibition pourrait être reliée à la capacité de M de

lier les « senseurs » de la présence d'ARNdb, comme RIG-I et MDA5, et de possiblement les séquestrer à la membrane empêchant la cascade de signalisation en découlant (Siu *et al.*, 2009).

Par ailleurs, comme mentionné dans la première partie de ce mémoire, la protéine peut être glycosylée en *N*, comme pour les membres des genres *Alpha-* et *Gammacoronavirus*, ou en *O*, comme pour les membres du genre *Betacoronavirus* dont font partie les coronavirus murins. Chez MHV, la glycosylation de la protéine M n'est pas essentielle à l'assemblage du virus ou à son infectivité (de Haan *et al.*, 2003). Toutefois, bien que l'état de glycosylation de la protéine M n'altère pas l'habileté du virus à se répliquer en culture cellulaire, cela affecte sa capacité à induire l'interféron-alpha et à se répliquer dans le foie (de Haan *et al.*, 2003).

En résumé, ces études sur la capacité de la protéine de la membrane à interagir avec la voie des interférons semblent en faire un déterminant important dans l'échappement du coronavirus à la réponse immunitaire innée et suggère que la protéine M pourrait ainsi être impliquée dans la pathogenèse.

#### **3.3.4 Protéine de la nucléocapside**

En plus de sa fonction de protection du génome et de son rôle de chaperonne à ARN lié à son implication dans le mécanisme de transcription des ARN viraux mentionnés précédemment, la protéine de la nucléocapside (N) semble être capable d'interférer avec différents mécanismes impliqués dans la relation virus-hôte.

Tout d'abord, il semblerait que la protéine de la membrane ne soit pas la seule responsable de l'inhibition de la réponse interféron chez le SARS-CoV. En effet, il est possible que d'autres protéines, dont la protéine de la nucléocapside, possèdent une fonction d'antagoniste aux interférons (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007). Ensuite, la protéine N de SARS-CoV pourrait aussi interagir dans la régulation de facteurs de transcription ou de molécules pro-inflammatoires (He *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2006). Il semblerait aussi que des mutations dans certains domaines de la protéine N pourrait mener à l'arrêt du cycle cellulaire (Li *et al.*, 2005a).

Par ailleurs, à l'instar de la protéine S, l'échange du gène de la protéine N entre la souche neurotrope du coronavirus murin MHV-JHM et la souche plutôt hépatotrope, MHV-A59, a permis d'établir le rôle de la protéine N comme déterminant de la neurovirulence (Cowley *et al.*, 2010).



### 3.4 Protéines accessoires

À ce jour, les rôles des protéines accessoires des différents coronavirus restent encore méconnus. Toutefois, comme il sera décrit dans cette section, il semblerait que leur fonction soit surtout associée aux interactions avec l'hôte et au développement de la pathologie induite par l'infection. Il est donc possible, par analogie avec d'autres virus à ARN, de spéculer sur une implication possible des protéines accessoires des coronavirus dans les différents mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte.

Le virus à ARN dont les protéines accessoires sont sans doute les mieux étudiées est sans contredits le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ces protéines accessoires semblent avoir comme rôle principal l'échappement à la réponse immunitaire en supprimant l'activité antivirale de nombreux facteurs de restriction cellulaires. Que ce soit par dégradation de ces facteurs d'immunité intrinsèque par le protéasome, par les protéines accessoires Vif, Vpu ou Vpr, ou par la modulation des molécules de reconnaissance à la surface cellulaire, par les protéines virales Nef et Vpu, il semblerait que ces protéines permettent la persistance, la réplication et la dissémination virale dans un environnement hostile au virus (Malim et Emerman, 2008). De plus, on retrouve dans l'état des connaissances sur le sujet, de nombreuses études sur les protéines accessoires de plusieurs virus à ARN ayant comme fonction de supprimer la voie de réponse aux IFN. Parmi les protéines virales impliquées dans ce mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire, se retrouvent entre autres : les protéines accessoires C et V du virus de la rougeole (*Measles virus*) (Nakatsu *et al.*, 2008; Yokota *et al.*, 2003), la protéine vp35 du virus Ébola (Basler *et al.*, 2000), les protéines non-structurales ns1 et ns2 du virus respiratoire syncytial humain (hRSV) (Spann *et al.*, 2004) et la protéine non-structurale NS1 chez le virus Influenza A (Hale *et al.*, 2008). Par ailleurs, cette dernière protéine semble aussi avoir un rôle dans l'inhibition de la fonction de d'autres facteurs cellulaires impliqués dans la mise en place de mécanismes antiviraux innés comme l'oligoadénylate synthétase (OAS) ou la protéine kinase R (PKR) (Hale *et al.*, 2008).

Puisque le rôle des protéines accessoires des coronavirus semble surtout important dans la relation virus-hôte, il est possible, à l'instar des autres virus à ARN, que leur fonction soit reliée à une de ces voies d'échappement au système immunitaire.

#### 3.4.1 Protéines accessoires des membres du genre *Betacoronavirus*

Puisque cet état des connaissances se concentre surtout sur le coronavirus humain OC43 et sa possible implication dans le développement d'une neuropathologie, seules les protéines

accessoires de ce virus et leurs homologues chez les autres membres du genre *Betacoronavirus* seront présentées dans les sections suivantes.

#### 3.4.1.1 ORF2a : Protéine non structurale 2 (ns2)

La protéine non structurale encodée par l'ORF2a, ns2, possède un domaine d'homologie avec la superfamille des phosphodiesterases cycliques à deux histidines (CPD, 2H-phosphoestérase) (Mazumder *et al.*, 2002). Ce type d'activité, en concert avec celle de d'autres protéines codées par l'ORF1ab, comme l'ADP ribose phosphatase, pourrait être impliquée dans la synthèse ou la maturation des sgARNm. Le rôle d'une activité phosphoestérase au sein de la réplication virale est plus ou moins connu. Toutefois, chez le virus Sindbis, un virus à ARNsb à polarité positive membre de la famille *Togaviridae* et du genre *Alphavirus* infectant l'humain et pouvant causer des encéphalomyélites chez la souris, la protéine nsP3 possédant un domaine de phosphoestérase semblable à celui de la protéine ns2 semble impliqué dans la neurovirulence (Park et Griffin, 2009). De plus, même si une activité CPD n'a toujours pas été démontrée pour la protéine ns2 des virus du genre *Betacoronavirus*, la mutation du site actif putatif chez le coronavirus murin résulte en une atténuation de l'hépatite induite par la souche A59 (Roth-Cross *et al.*, 2009). En effet, le virus dont les deux histidines du motif conservé de la superfamille des 2H-phosphoestérase de la protéine ns2 ont été mutées se réplique au même niveau que le virus de type sauvage en culture cellulaire, mais présente une diminution de la pathogénicité suite à une inoculation intrahépatique. Ainsi, même si dans cette étude, ces mutations n'affectent nullement la neurovirulence suite à une injection intracérébrale, il semblerait que la protéine ns2 ait une importance au niveau de la virulence au niveau du foie (Roth-Cross *et al.*, 2009).

Mises à part les études sur cette fonction supposée de ns2, d'autres équipes ont tenté d'élucider le rôle de cette protéine non structurale en observant l'effet de sa délétion lors de la réplication du virus. Par exemple, dans les années 1990, a été isolée une souche de virus MHV-JHM dans laquelle l'ORF2a n'était pas exprimé. Cette mutation n'avait pas d'effet sur la croissance en lignée cellulaire murine (Schwarz *et al.*, 1990). Depuis, par des études de génétique inverse, un virus recombinant possédant une mutation dans l'ORF2a a été produit et cette mutation de la protéine ns2 n'a pas d'effet sur la croissance des cellules en culture cellulaire, mais provoque une diminution de la mortalité chez les souris infectées (Sperry *et al.*, 2005). Par ailleurs, un virus recombinant de MHV-A59 dont les protéines accessoires codées par les ORF2a et -2b ont été délétées se réplique à un taux semblable au virus de type sauvage en culture cellulaire mais sa virulence est atténuée en souris (de Haan *et al.*, 2002a). Comme l'ORF2b qui code normalement la protéine HE n'est pas fonctionnel chez MHV-A59, il est possible de penser que cette

atténuation soit due à une fonction de la protéine ns2. Il est donc supposé que la protéine ns2, chez MHV, aurait un rôle comme déterminant de la pathogenèse du virus.

#### 3.4.1.2 ORF2b : Hémagglutinine estérase (HE)

Le rôle de la protéine HE et son importance dans la réplication du virus est encore sujet à débat. En effet, chez BCoV, une infection en présence d'inhibiteurs de l'activité acétyl estérase de la protéine HE résulte en une réduction des titres viraux (Vlasak *et al.*, 1988). De plus, toujours chez BCoV, des anticorps spécifiques à la protéine HE ont une activité neutralisante (Deregt *et al.*, 1989). Par contre, une autre étude à l'aide d'un virus chimère MHV-BCoV montre que HE ne serait pas suffisante ni essentielle à la réplication du virus en culture cellulaire (Popova et Zhang, 2002).

Par ailleurs, comme précédemment mentionné, même si l'ORF2b est présent chez la souche du coronavirus murin A59 (MHV-A59), ce virus ne produit pas d'ARNm 2b à cause de la présence d'une mutation dans la séquence de régulation de la transcription (TRS pour *transcription-regulating sequence*) associée aussi à la présence d'un codon stop au début du gène de HE (Luytjes *et al.*, 1988; Shieh *et al.*, 1989). L'inactivation du gène 2b dans cette souche de MHV adaptée à la culture cellulaire suggère que la protéine HE n'est pas essentielle à la réplication du virus *in vitro*. De plus, MHV-A59, dont HE est manquante, peut tout de même établir une infection productive en souris menant à une hépatite et à une pathologie du système nerveux central (SNC) (Blau *et al.*, 2001; Lavi *et al.*, 1986). Toutefois, MHV-A59 serait moins neurovirulent qu'une souche exprimant HE comme MHV-JHM. Dans le même ordre d'idées, des variants de MHV-JHM qui expriment une quantité plus élevée de protéine HE induisent une plus grande mortalité et présentent un plus grand tropisme pour les neurones que des variants qui exprimaient une faible quantité de HE (Yokomori *et al.*, 1995). En 2005, des virus recombinants de MHV-A59 exprimant la protéine HE de MHV-S ou de MHV-JHM ont été fabriqués par recombinaison ciblée (Kazi *et al.*, 2005; Lissenberg *et al.*, 2005). Il a été démontré que la protéine HE peut augmenter l'infectivité en liant l'acide sialique à la surface des cellules. La présence de la protéine HE lors d'une infection en souris promeut la dissémination et l'entrée du virus au cerveau par sa fonction de liaison aux acides sialiques et ce, sans nécessiter la fonction acétyl estérase (Kazi *et al.*, 2005). De plus, il semblerait que la protéine HE réduise l'efficacité de propagation du virus en culture cellulaire. L'expression de cette protéine accessoire est donc maintenue au coût de la *fitness* virale, c'est-à-dire au coût d'une capacité de réplication la plus efficace possible (Lissenberg *et al.*, 2005). Il semblerait donc que l'hémagglutinine estérase ne soit pas essentielle à la réplication des coronavirus en culture cellulaire, mais que sa présence

augmente la neurovirulence lors de l'infection du SNC, en faisant ainsi un déterminant important de la pathologie.

### 3.4.1.3 ORF4 : Protéine non-structurale 12.9 (ns12.9)

Les homologues de cette protéine non structurale de 12.9kDa (ns12.9) chez HCoV-OC43 sont codés par l'ORF5a chez les coronavirus murins et bovins. Ces virus possèdent aussi un ORF4, mais la présence de la protéine correspondante dans les cellules infectées n'a toujours pas été démontrée.

Il existe tout de même une étude où le gène 4 de MHV-JHM a été inactivé par recombinaison ciblée. Le virus résultant montre une cinétique de réplication similaire à celle du virus de type sauvage en culture cellulaire. Ce virus n'exprimant pas la protéine codée par l'ORF4 possède aussi un degré similaire de virulence lors de l'infection dans l'animal hôte (Ontiveros *et al.*, 2001). Ainsi, la fonction biologique de l'ORF4 chez MHV, qui ne possède pas d'homologue chez HCoV-OC43, demeure inconnue.

Dans une autre étude faite avec MHV, un mutant avec une délétion des gènes 4 et 5a (ce dernier étant l'homologue du gène de ns12.9 chez HCoV-OC43), a montré un taux de réplication en culture cellulaire dix fois plus faible que le virus de type sauvage. Ce virus montrait aussi un phénotype atténué en souris. Toutefois, la délétion en soi des ORF4 et -5a semble avoir un effet délétère sur l'expression de la protéine structurale E (de Haan *et al.*, 2002a). D'autres études seront nécessaires pour vérifier si l'altération de la virulence est due à l'absence de l'expression de ces protéines ou à la délétion des ORF en soi.

Dans une étude récente comparant deux souches de coronavirus murin, MHV-S et MHV-A59, une différence dans la résistance à l'interféron (IFN) entre ces deux virus a été observée. En analysant les séquences, la principale différence se situait au niveau de l'ORF5a qui n'est pas présent chez MHV-S. À l'aide de virus chimères où l'ORF5a de MHV-A59 était inséré dans MHV-S, on a pu démontrer le rôle de la protéine codée par l'ORF5a dans la résistance à l'IFN. Un rôle qui semblait aussi être présent chez les homologues de ce gène chez les autres membres du genre *Betacoronavirus*, comme BCoV et HCoV-HKU1 avec lesquels MHV-A59 partage environ 50% d'identité de séquence (Koetzner *et al.*, 2010).

À l'instar des autres protéines accessoires du genre *Betacoronavirus*, il semblerait que la protéine codée par l'ORF4 chez HCoV-OC43 et par l'ORF5a chez BCoV et MHV ne soit pas essentielle à la réplication du virus en culture cellulaire, mais ait un rôle au niveau de la relation hôte-virus. Il est donc possible que la protéine ns12.9 chez HCoV-OC43 soit aussi un déterminant de la virulence.

## **PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS**

Même si aucune association directe n'a été faite entre une neuropathologie humaine et les coronavirus humains, il a clairement été démontré que le coronavirus humain OC43 possède des capacités neuroinvasives et neurotropes. Les résultats obtenus suite à des études sur du matériel humain ou des modèles animaux, décrits dans l'État des connaissances (Section 2.4), permettent de suggérer que ces virus pourraient être impliqués dans le développement ou l'exacerbation de maladies neurodégénératives chez l'humain.

Hors, l'association possible du coronavirus humain OC43 avec des maladies neurodégénératives chez l'humain apporte de nouveaux questionnements au sujet des facteurs impliqués dans l'apparition et le développement de la pathologie. Bien entendu, la réponse immunitaire provoquée par l'infection ou encore des facteurs génétiques associés à l'hôte peuvent participer à l'établissement de symptômes neurologiques. Toutefois, ce sont plutôt les déterminants viraux de la pathologie ou plus précisément de la neuropathologie qui ont fait l'objet de la présente étude. Ce rôle peut être associé à certaines protéines issues des ORF 1a et 1b encodant le gène de la réplicase ou aux protéines structurales du coronavirus. De plus, et comme c'est souvent le cas pour d'autres virus, les protéines accessoires, qui ne semblent pas posséder de rôle dans la réplication du virus en culture cellulaire, peuvent aussi être des déterminants de la pathologie.

À ce jour, les rôles des protéines accessoires des différents coronavirus restent encore méconnus. Toutefois, il semblerait que leur fonction soit majoritairement associée aux interactions avec l'hôte et au développement de la pathologie induite par l'infection. Il est donc possible de spéculer sur une implication possible des protéines accessoires du coronavirus humain OC43 dans les différents mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte.

Les gènes codant pour les différentes protéines accessoires du coronavirus humain OC43, HE, ns2 et ns12.9 ont donc été délétés, inactivés ou mutés à l'aide d'un système de génétique inverse de façon à étudier le rôle de ces protéines lors de l'infection des cellules cibles du système nerveux central, les neurones, en culture cellulaire ou lors de l'infection du SNC dans un modèle murin.

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **1. Lignées cellulaires**

#### **1.1 Culture**

Les cellules de la lignée BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*, ATCC-CCL10) ainsi que les cellules HRT-18 (gracieuseté de Dr David A. Brian, University of Tennessee, Knoxville) ont été cultivées dans du milieu *minimum essentiel alpha* (MEM- $\alpha$ ) additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) (*Gibco-Invitrogen*).

La lignée cellulaire neurale LA-N-5 issue d'un neuroblastome humain (un don du Dr Stephan Ladisch, George Washington University School of Medicine) a été cultivée dans du milieu RPMI additionné de 10% (v/v) SVF, 10 mM HEPES, 1 mM pyruvate de sodium et 10  $\mu$ M d'acides aminés non-essentiels (*Gibco-Invitrogen*).

#### **1.2 Différenciation des cellules LA-N-5**

Les cellules LA-N-5 ont été différenciées en neurones selon un protocole adapté à partir de celui établi par Hill et Robertson (Hill et Robertson, 1998). Les cellules ont étéensemencées dans des plateaux 24-puits Cell+ (*Sarstedt*) à une concentration de  $1 \times 10^4$  cellules dans du milieu RPMI additionné de 10% (v/v) SVF, 10 mM HEPES, 1mM pyruvate de sodium et 10  $\mu$ M d'acides aminés non-essentiels. Puis, le jour suivant et tous les deux jours pour une durée de sept jours, le milieu a été remplacé pour le même milieu contenant en plus 10  $\mu$ M d'acide rétinoïque (ATRA pour *All-trans Retinoic Acid*) (SIGMA). Les cellules LA-N-5 différenciées en neurones étaient prêtes à être infectées dès le huitième jour après avoir étéensemencées.

### **2. Production des virus recombinants mutés**

#### **2.1 Introduction de mutations dans le clone infectieux d'ADNc pBAC-OC43**

Les différentes mutations des gènes des protéines accessoires de HCoV-OC43 ont tout d'abord été effectuées dans les vecteurs intermédiaires pSMART D (pour HE et ns2) et pSMART A (pour ns12.9) avant d'être réintroduit dans le vecteur BAC. Ces vecteurs intermédiaires ont été utilisés pour l'assemblage du clone infectieux d'ADNc (St-Jean *et al.*, 2006)et contiennent des fragments du génome d'une taille se situant entre 5,5 kb et 6,5 kb. Le fragment sous-génomique D possède aux extrémités les sites de restriction *SfoI* et *SacII* alors que le fragment sous-génomique A possède les sites *SacII* et *BbvCI*. Ces sites de restriction, uniques à l'intérieur du clone infectieux,

ont servi à introduire les fragments dans le BAC afin d'obtenir des clones infectieux d'ADNc mutants.

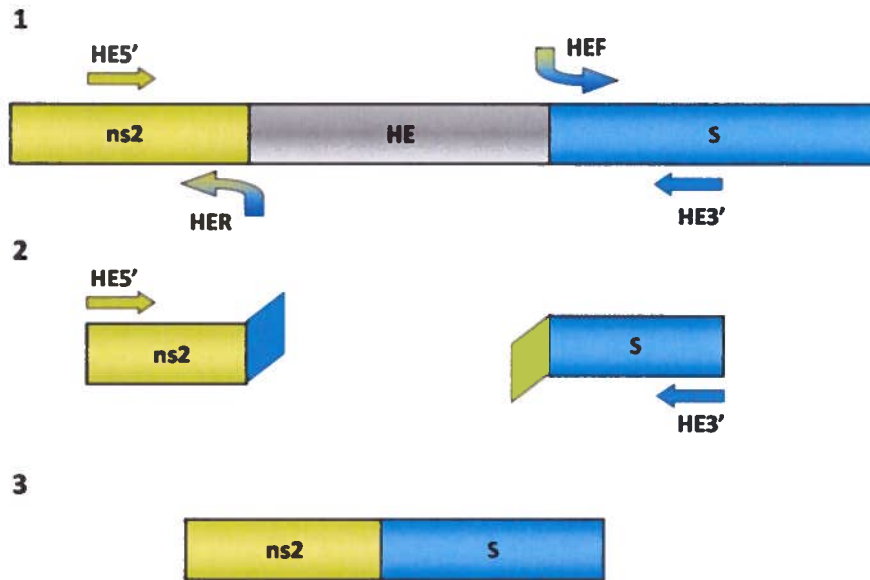
### 2.1.1 PCR de chevauchement à partir du fragment intermédiaire D

La délétion du gène de la protéine HE à partir du vecteur intermédiaire contenant le fragment D du génome du coronavirus humain OC43 (St-Jean *et al.*, 2006) a été faite en deux étapes de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) illustrées à la figure 5.

La première étape (Fig 5.1) consistait en une amplification de fragments d'environ 400 paires de bases de chaque côté du gène à déléter. Dans ce cas-ci, la partie en amont du gène de la protéine HE a été amplifiée à l'aide d'une amorce se situant à l'intérieur du gène de la protéine ns2 (à partir du nucléotide 462 du gène de ns2 ou de la position 21968 du génome de HCoV-OC43) (HE5' : 5'- CAATTATAAAATCACCATCAACCCC -3') et d'une deuxième amorce complémentaire en 3' à la fin du gène de la protéine ns2 (nucléotides 817 à 836 du gène ns2 et positions 22323-22343 du génome de HCoV-OC43), immédiatement en amont du début du gène de HE, et dont la partie en 5' flottante (identifiée par une séparation « / » dans la séquence) possède la capacité de s'hybrider au début du gène de la protéine S se situant immédiatement à la suite du gène de HE (Région intergénique entre HE et S, positions 23630-23643 du génome de HCoV-OC43) (HER : 5'- CATGTTTAGATTATGGT/TTAATATTCTTCAACTGAAGA -3'). La partie en aval du gène de la protéine HE, c'est-à-dire le début du gène S, a été amplifiée à l'aide d'une amorce à l'intérieur du gène S (à partir du nucléotide 340 du gène de la protéine S et de la position 23991 du génome de HCoV-OC43) (HE3' : 5'- GGGAACTCACTATACATTACACGATCTTTA -3') et une seconde dont l'extrémité flottante possède la capacité de s'hybrider à la fin du gène de la protéine ns2 (nucléotides 823 à 836 du gène ns2 et positions 22329-22343 du génome de HCoV-OC43) (HEF : 5'- GTTGAAGAATATTTAAA/CCATAATCTAAACATGTTTTTGATAC -3'). Ainsi, suite à ces deux premiers PCR, deux fragments correspondants aux séquences se situant de chaque côté du gène de la protéine HE et se «chevauchant» ont été produits (Fig. 5.2).

La deuxième étape, le PCR de chevauchement à proprement parler, consistait donc en une amplification de ces deux fragments comme matrice d'ADN avec les amorces HE5' et HE3' (Fig. 5.2), ce qui devait permettre de les relier entre eux et donc d'obtenir une séquence sans le gène de la protéine HE (Fig 5.3).





**Figure 5 : PCR de chevauchement pour la délétion complète du gène HE**

1- Le fragment en amont du gène de la protéine HE (en gris) est amplifié avec HES' se situant environ à la moitié du gène ns2 (en vert) et l'amorce HER qui s'hybride à la fin du gène ns2 et qui contient une queue flottante complémentaire au début du gène de la protéine S (en bleu). Le fragment en aval du gène de la protéine HE (en gris) est amplifié avec HEF qui s'hybride au début du gène de la protéine S (en bleu) et qui contient une queue flottante complémentaire à la fin du gène de la protéine ns2 (en vert) et HE3' qui se situe à environ 340 pb du début du gène de la protéine S (en bleu). 2- Les fragments produits lors de la première amplification sont utilisés comme matrice pour une deuxième ronde de PCR où le chevauchement des queues flottantes complémentaires permet, la production d'un fragment sans le gène de la protéine HE (3).

Les deux rondes d'amplification ont été effectuées avec le système *Expand High Fidelity PCR* selon les directives du fabricant (*Roche*). Brièvement, 50 nanogrammes du fragment D a été utilisé lors des premiers PCR consistant en 30 cycles d'amplification et 1 µL de chacune des réactions a été utilisé comme matrice d'ADN pour la ronde de PCR de chevauchement comprenant 35 cycles d'amplification. Pour tous les PCR, chacune des amorces a été ajoutée à une concentration finale de 300 nM. Les températures et les temps d'hybridation et d'élongation étaient respectivement de 50°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 min pour les deux rondes d'amplification.

### 2.1.2 Mutagenèse dirigée sur les fragments intermédiaires

Les mutations de terminaison (mutation ponctuelle créant un codon STOP) au début de chacun des différents gènes des protéines accessoires, ainsi que la mutation d'inhibition de l'activité acétyl estérase de la protéine HE ont été faites à l'aide du kit *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)*. Le fragment intermédiaire D a été utilisé comme matrice avec les amorces HEstop (nucléotides -10 à 24 du gène de HE et positions 22345-22379 du génome de HCoV-OC43) (5'- CTCAGTGAAAATGTTTTAGCTTCCTAGATTTATTC -3') ou ns2stop (nucléotides 1 à 31 du gène ns2 et positions 21507-22537 du génome de HCoV-OC43) (5'- ATGGCTGTCGCTTAAGCAGACAAGCCTAATC -3') dont un nucléotide (souligné) a été changé de façon à obtenir un codon de terminaison dans les premiers codons des gènes correspondants. L'amorce permettant de changer la sérine en position 40 de HE pour une thréonine, S40T (nucléotides 107 à 132 du gène HE et positions 22455-22490 du génome de HCoV-OC43) (5'- GGTTTTTATTTGGTGACACTCGTTCAGATTGTAATC -3') a aussi été utilisée avec le fragment D lors du PCR avec le kit *QuikChange*. Pour la mutation inactivatrice de l'expression du gène de la protéine ns12.9, le fragment intermédiaire A contenant les 5 derniers kilobases de l'extrémité 3' du génome de HCoV-OC43 (St-Jean *et al.*, 2006) a été utilisé comme matrice pour la mutagenèse dirigée avec l'amorce ns12.9stop (nucléotides -10 à 23 du gène de ns12.9 et positions 27792-27815 du génome de HCoV-OC43) (5'- CGCCCTATTAATG GACATTTAGAGACCTGAGAAG -3'). Lors de ces PCR avec le kit *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)*, 100 nanogrammes de l'ADN matrice (pSMART A ou D) ont été amplifiés avec 100 nanogrammes de l'amorce pour 30 cycles d'amplification à une température d'hybridation de 55°C pour 1 minute et une température d'élongation de 65°C pour 16 minutes. La réaction PCR a par la suite été incubée avec l'enzyme *DpnI* pendant 1h à 37°C de façon à éliminer l'ADN matrice et 1,5 uL de la réaction a été introduit dans les bactéries chimiocompétentes *XL10-Gold* par transformation.

### 2.1.3 Insertion des fragments intermédiaires mutés dans le clone infectieux d'ADNc pBAC-OC43

Suite à la réalisation du PCR de chevauchement ou de la mutagenèse dirigée sur les fragments intermédiaires, les fragments d'ADN maintenant mutés ont été réintroduits à l'intérieur du clone infectieux d'ADNc pBAC-OC43 à l'aide des sites de restriction uniques *SfoI* et *SacII* pour le fragment D et des sites uniques *SacII* et *BbvCI* pour le fragment A, selon la méthode utilisée lors de l'assemblage du clone infectieux (St-Jean *et al.*, 2006). Suite à la ligation du fragment à l'aide de la T4 DNA Ligase (Invitrogen), le clone infectieux d'ADNc a été introduit par électroporation dans les bactéries *E. Cloni 10G BAC-Optimized Electrocompetent cells* (Lucigen). La purification en grande quantité du clone infectieux d'ADNc a été faite à l'aide du kit *Large-Construct Kit* (QIAGEN) optimisé pour récolter des plasmides de grande taille, puisque le BAC contenant le génome de HCoV-OC43 fait plus de 30 kb.

### 2.2 Transfection du clone infectieux

Les clones infectieux sont tout d'abord transfectés dans les cellules BHK-21 car cette lignée cellulaire est une bonne candidate à la transfection par un vecteur de grande taille. Ainsi, les cellules BHK-21 ont étéensemencées dans des plateaux pour culture cellulaire de 6-puits à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules dans 2 mL de milieu MEM-alpha additionné de 10% (v/v) SVF de façon à atteindre entre 80 et 90% de confluence après 24h. Ainsi, le lendemain, le clone infectieux d'ADNc a été transfecté en utilisant le réactif *Lipofectamine 2000* selon les directives du fabricant (*Invitrogen*) et comme ayant été précédemment décrit par Julien St-Jean ((St-Jean *et al.*, 2006), matériel supplémentaire). Brièvement, 5 µg d'ADN du clone infectieux d'ADNc a été pré-mélangé avec 12 µL de *Lipofectamine 2000* dans du milieu OPTIMEM non-additionné de sérum pendant 20 minutes avant d'être ajoutés aux puits contenant les cellules dans du milieu OPTIMEM supplémenté avec 10% (v/v) SVF. Une incubation de 6 heures à 37°C s'en est suivie, puis le milieu a été changé pour du milieu MEM-alpha supplémenté avec 10% (v/v) SVF et 125 µg/mL Gentamicine. Le surnageant ainsi que le lysat cellulaire (nommé P0 pour passage 0, voir figure 6) ont été récoltés et clarifiés par centrifugation après 72 heures d'incubation à 37°C.

### 2.3 Amplification du virus recombinant produit

Suite à la transfection, le virus recombinant produit est amplifié sur les cellules HRT-18 puisque celles-ci sont très susceptibles à l'infection, malgré le fait que cette lignée cellulaire ne soit pas une bonne candidate à la transfection de vecteur de grande taille. Ainsi, les cellules HRT-18 ont étéensemencées dans des pétris de 150 cm<sup>2</sup> à une concentration de  $5 \times 10^4$  cellules/mL dans du

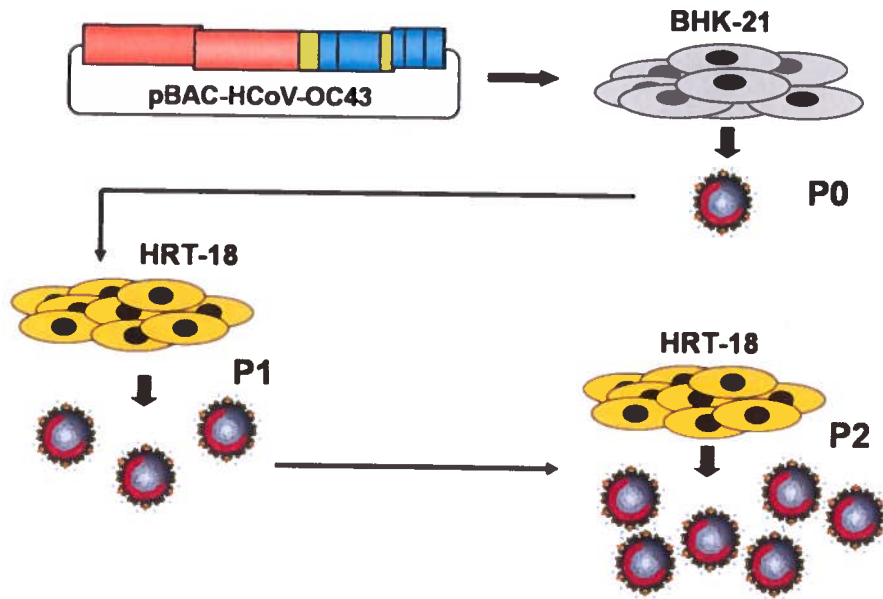
milieu MEM-alpha supplémenté avec 10% (v/v) SVF pour atteindre une confluence d'environ 70% après trois jours. De façon à amplifier la quantité de particules infectieuses obtenues suite à la transfection du clone infectieux, 5 mL de lysat cellulaire clarifié (provenant des cellules BHK-21 transfectées) ont été incubés pendant 2 heures à 33°C avec des agitations à toutes les 20-30 minutes. Par la suite, 10 mL de milieu MEM-alpha additionné de 1% (v/v) SVF a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 4 jours à 33°C. Le surnageant et le lysat cellulaire ont encore une fois été récoltés et clarifiés avant d'être titrés par une méthode d'immunoperoxydase indirecte. Le virus recombinant récolté à partir de cette première étape d'amplification sur cellules HRT-18 est appelé P1. Une deuxième ronde d'amplification sur cellules HRT-18 peut être nécessaire selon le virus recombinant. Le virus issu de cette seconde amplification est nommé P2 (figure 6).

#### **2.4 Extraction d'ARN à la suite de la production des virus recombinants pour confirmer la présence des mutations dans les gènes des protéines accessoires**

Dans le but de vérifier la conservation des différentes mutations à la suite de la production du virus recombinant, l'ARN provenant des culots cellulaires des différentes rondes de production et amplification (P0, P1 et P2) ont été extraits selon le protocole *RNeasy Mini Kit (QIAGEN)*. Brièvement, les cellules ont été lysées à l'aide du tampon fourni RLT additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol (10  $\mu$ L par millilitre de tampon RLT) avant d'être homogénéisées à l'aide des colonnes *QIAshredder (QIAGEN)* et l'ARN a été extrait à l'aide des colonnes *RNeasy (QIAGEN)* selon les directives du fabricant.

La réaction de transcription inverse a été effectuée avec le *SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen)* selon le protocole suggéré par le fabricant, c'est-à-dire que 1  $\mu$ g d'ARN a été transcrit inversement avec le *RT Reaction Mix* fourni dans le kit et incluant l'oligo(dT)<sub>20</sub>.

L'ADNc produit a ensuite été amplifié par PCR et séquencé chez Génome Québec (Montréal) à l'aide des amorces correspondantes aux fragments d'intérêts ayant été précédemment décrites par Julien St-Jean (St-Jean *et al.*, 2004).



**Figure 6 : Production du virus recombinant par la transfection du clone infectieux d'ADNc (pBAC-HCoV-OC43) dans les cellules BHK-21 (P0) suivi de deux amplifications (P1 et P2) dans les cellules HRT-18**

## 2.5 Titrage par immunoperoxydase indirecte

La méthode par immunoperoxydase indirecte (Lambert *et al.*, 2008) a été utilisée pour titrer la production de virus infectieux recombinant ou lors de l'établissement de cinétique d'infection. Brièvement, les cellules HRT-18 ont étéensemencées dans des plateaux de 96-puits ( $5 \times 10^3$  cellules/puits) et incubées à 37°C dans un milieu MEM-alpha additionné de 10% (v/v) SVF pour 3 jours pour atteindre une confluence de 70%. Ces cellules ont ensuite été mises en présence de lysat cellulaire clarifié provenant de la production des virus recombinants (P0, P1 ou P2) à une dilution sérielle d'un facteur de 10. Plus précisément, 111 uL de lysat cellulaire clarifié sont ajoutés dans le premier puits, puis 11 uL sont transférés dans le second puits où avait préalablement été ajouté 100 uL de milieu. Après mélange, 11 uL de cette première dilution sont transférés dans le troisième puits et ainsi de suite. Après 4 jours d'incubation, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec du méthanol 100% additionné de 0.3% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de façon à épuiser l'activité peroxydase présente à l'intérieur des cellules. La présence de la protéine S, démontrant une infection des cellules HRT-18 par des particules virales infectieuses, a été détectée en utilisant le surnageant d'hybridome CF 1-10C.3 dilué 1/50 et incubé 2 heures à 37°C. Un anticorps secondaire conjugué à la *horseradish* peroxydase (HRP) (*Goat anti-mouse IgG (H+L), KPL*) dilué 1/500 a été ajouté sur les cellules après 3 lavages au PBS et les cellules ont été incubées 2 heures à 37°C sans CO<sub>2</sub>. La détection de la protéine S a ensuite été révélée en ajoutant une solution de PBS + 0.025% (p/v) DAB (diaminobenzidine) et 0,01% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le DAB est un substrat se liant à la HRP et prenant une coloration brune suite à son oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les cellules infectées prenaient donc la coloration brune et la dose infectieuse à 50% en culture de tissus ou DICT<sub>50</sub> a été calculée d'après la méthode Karber (Karber, 1931). Le seuil de détection de cette méthode était de 1.5 log de DICT<sub>50</sub>/mL lorsque le titrage était effectué à partir de l'échantillon non-dilué.

## 2.6 Transfection stable des cellules BHK-21 avec un vecteur d'expression de la protéine HE

Deux stratégies semblables d'expression de la protéine recombinante HE dans les cellules BHK-21 ont été utilisées pour théoriquement permettre la production de virus recombinant dont le gène de la protéine HE était muté par le principe de complémentation. Dans un premier temps, le vecteur pIRES-HE-V5-GFP a été utilisé. Ce vecteur, où le gène de la protéine HE, associé à un épitope V5 en 3', a été introduit, contenait un site interne d'entrée du ribosome (*Internal ribosome entry site* ou IRES) permettant théoriquement l'expression du gène de la GFP en même temps que l'expression du gène d'intérêt (HE) de façon à permettre l'observation et la sélection rapide des cellules exprimant HE. Le gène HE fusionné à l'épitope V5 a également été réintroduit

dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 (+) (*Invitrogen*) La seconde stratégie a consisté à introduire le gène de la protéine HE amplifié par PCR à partir de cellules infectées par HCoV-OC43 dans le vecteur de clonage *CloneSmart HCKan* (*Lucigen*) (fait par Marc Desforges). Les sites de restriction *SacII* et *AgeI* (ayant été au préalable ajouté aux extrémités des amorces de PCR) ont par la suite été utilisés pour transférer le gène de la protéine HE à l'intérieur du vecteur d'expression pcDNA3.1/myc-His A (+) (*Invitrogen*).

Les cellules BHK-21 ont étéensemencées dans des plateaux pour culture cellulaire de 6-puits à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules dans 2 mL de milieu MEM-alpha additionné de 10% (v/v) SVF de façon à atteindre entre 80 et 90% de confluence après 24h. Ainsi, le lendemain, les vecteurs d'expression contenant le gène de la protéine HE ont été transfectés en utilisant le réactif *Lipofectamine 2000* selon les directives du fabricant (*Invitrogen*). Brièvement, 2 µg du vecteur d'expression ont été pré-mélangés avec 5 µL de *Lipofectamine 2000* dans du milieu OPTIMEM non-additionné de sérum pendant 20 minutes avant d'être ajouté aux puits contenant les cellules dans du milieu OPTIMEM supplémenté avec 10% (v/v) SVF. Une incubation de 6 heures à 37°C s'en est suivie, puis le milieu a été changé pour du milieu MEM-alpha supplémenté avec 10% (v/v) SVF et 125 µg/mL Gentamicine. Deux jours post-transfection et tous les deux jours suivants, pendant quatorze jours, le milieu a été changé pour le même milieu contenant 1 mg/mL de l'agent de sélection *G418* (ou *Geneticine*) (*Invitrogen*). L'ARN des différentes populations cellulaires sélectionnées (BHK-21-HE) a par la suite été extrait, tel que décrit à la section 2.4, transcrit en ADNc et amplifié par PCR (RT-PCR) afin de vérifier le niveau d'expression du gène HE.

### **3. Étude en culture cellulaire**

#### **3.1 Infection cellulaire**

Les cellules humaines LA-N-5 différenciées en neurone ou les cellules HRT-18 ont été infectées à une MOI de 0.2 dans du milieu RPMI supplémenté avec 1% (v/v) SVF, 10 mM HEPES, 1 mM pyruvate de sodium et 10 µM d'acides aminés non-essentiels (cellules LA-N-5) ou du milieu MEM-alpha + 1% (v/v) SVF (cellules HRT-18). Le virus a tout d'abord été adsorbé pendant 2 heures à 37°C pour les cellules LA-N-5 et à 33°C pour les cellules HRT-18 avant que le milieu soit changé pour du RPMI complet, mais avec 2,5% (v/v) SVF pour les cellules LA-N-5 ou du MEM-alpha + 1% (v/v) SVF pour les cellules HRT-18.

Dans le cas de l'établissement d'une cinétique d'infection, le milieu intra- et extracellulaire a ensuite été récolté à 4h, 16h, 24h, 48h et 72h avant d'être clarifié par centrifugation et d'être titré par la méthode d'immunoperoxydase indirecte décrite dans la section précédente afin d'évaluer la production de particules virales infectieuses. Pour la détection de la protéine S par immunofluorescence à l'intérieur des cellules infectées, celles-ci ont été fixées puis perméabilisées avant d'être marquées comme décrit dans la section suivante.

### **3.2 Immunofluorescence**

Suite à la transfection ou à l'infection, les cellules ont été fixées avec 4% (p/v) paraformaldéhyde pour 20 minutes à température pièce puis perméabilisées avec du méthanol à -20°C pour 5 min. Les cellules ont ensuite été incubées avec agitation pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps monoclonal de souris (surnageant d'hybridome) CF 1-10C.3 pour la détection de la protéine S ou l'antisérum de lapin P7 5.1.94 contre la protéine ns2, obtenu précédemment au laboratoire comme décrit par Patrick Labonté (Labonté *et al.*, 1995), à l'intérieur des cellules infectées ou transfectées. Après trois lavages au PBS, les anticorps secondaires correspondants (*Molecular Probes-Invitrogen*) ont été ajoutés selon le type d'anticorps primaire utilisé, l'anti-souris Alexafluor488 (1/1000) pour les cellules BHK-21 transfectées ou l'anti-souris Alexafluor568 (1/1500) pour les cellules HRT-18 infectées et l'anti-lapin Alexafluor488 (1/1000) pour les cellules HRT-18 infectées. Un marquage des noyaux a aussi été effectué par une incubation avec du DAPI pendant 5 minutes et lavées trois fois avec du PBS avant d'être observées au microscope.

## **4. Étude en modèles murins**

Toutes les expériences faites en souris ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) de l'INRS-Institut Armand-Frappier qui a veillé à s'assurer que chacun des protocoles respectent les lois et politiques du Comité Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et de l'Association Internationale pour l'évaluation et l'accréditation du traitement des animaux de laboratoire (AAALAC pour *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International*).

### **4.1 Infection intracérébrale**

Les souris CD1 ont été infectées de façon intracérébrale (IC) avec 10 µL d'une dilution de virus contenant  $10^{1.5}$  DICT<sub>50</sub> et les souris BALB/c ont été infectées avec 10 µL d'une dilution de virus contenant  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>. La dose virale a été administrée IC dans la partie droite du cerveau de



souris de 22 jours profondément anesthésiées avec une solution de kétamine/xylazine (200 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine). Les souris servant de témoins ont été infectées avec 10  $\mu$ L de PBS stérile utilisé pour diluer le virus clarifié au titre désiré.

Les statistiques sur les courbes de survie des souris infectées ont été calculées avec le test de la loi binomiale, en utilisant le logiciel SPSS version 16.0, pour établir la significativité de la différence entre le nombre de souris vivantes et mortes à un jour fixe post-infection.

Pour l'établissement de la cinétique de répllication du virus au SNC, trois souris infectées par chacun des virus ont été sacrifiées à intervalle de deux jours et leur cerveau a été récolté et homogénéisé dans du milieu MEM-alpha afin de détecter la présence de particules virales infectieuses par la méthode d'immunoperoxydase indirecte. Dans le cas particulier du titrage du virus au SNC, le seuil de détection de la méthode était de 2.5 log de DICT<sub>50</sub>/gramme de tissu, puisque l'échantillon de départ était dilué 1/10 dans du milieu MEM-alpha afin de permettre une bonne homogénéisation.

Pour effectuer des marquages histologiques sur des coupes de cerveaux, deux souris BALB/c infectées ont été perfusées aux jours 3, 6, 10 et 12 post-infection. Les cerveaux ont par la suite été récoltés et coupés à l'aide d'un vibratome Lancer avant d'être marqué par immunohistochimie.

#### **4.2 Immunohistochimie**

Les souris ont été perfusées par une injection intraventriculaire de 4% (p/v) paraformaldéhyde sous anesthésie par kétamine/xylazine. Les cerveaux ont été récoltés et laissés dans la solution de paraformaldéhyde pour au moins 24h avant d'être coupés en tranches d'une épaisseur de 65  $\mu$ m avec un vibratome Lancer. L'anticorps primaire de souris (surnageant d'hybridome) CF 1-10C.3 dilué 1/100 dans du PBS a été incubé avec les coupes de cerveau et le tout a été incubé toute la nuit à température ambiante avec agitation. Le lendemain, après 3 lavages de 5 minutes avec du PBS, l'anticorps secondaire anti IgG de souris biotinylé ainsi que les réactifs du kit *VECTASTAIN Elite ABC (Mouse IgG)* ont été utilisés selon les directives du fabricant (*Vector Laboratories*) puis la coloration brune mettant en évidence la présence de la protéine S du coronavirus OC43 a été obtenue en ajoutant une solution de PBS avec 0,03% (p/v) DAB et 0,01% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les coupes ont par la suite été déposées sur des lames *Superfrost Plus* pré-nettoyées (*Fischer Scientific*) avant d'être déshydratées dans des bains d'éthanol de 5 minutes successifs à 50%, 70%, 80%, 95%, 100% puis un bain de xylène 100%. Les coupes de cerveaux ont par la suite été observées par microscope à contraste de phase.

### 4.3 Extraction de l'ARN du cerveau des souris infectées

Dans le but de vérifier la conservation de la mutation inactivatrice de l'expression du gène de la protéine ns12.9 suite à l'infection en modèle murin, l'ARN a été extrait du cerveau des souris infectées par rOC/ns12.9stop. Le cerveau a été homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur *Polytron* dans 1 mL de *TRIzol* (*Invitrogen*) et 200 µL de Chloroforme ont été ajoutés à l'extrait. Après incubation à température ambiante pendant environ 5 minutes, l'homogénat a été centrifugé à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. À la phase aqueuse, a été ajouté 0,5 mL d'isopropanol et après incubation de 10 minutes à température ambiante, l'ARN précipité a été récolté par centrifugation à 13 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN a été rincé avec 1 mL d'éthanol à 75%, centrifugé à 10 000 x g pendant 10 minutes à 4°C et resuspendu dans 100 µL d'H<sub>2</sub>O-DEPC (eau traitée pour inactiver les RNases). La réaction de transcription inverse ainsi que l'amplification par PCR pour préparer l'échantillon pour le séquençage ont été effectuées comme décrites précédemment à la section 2.4.

## RÉSULTATS

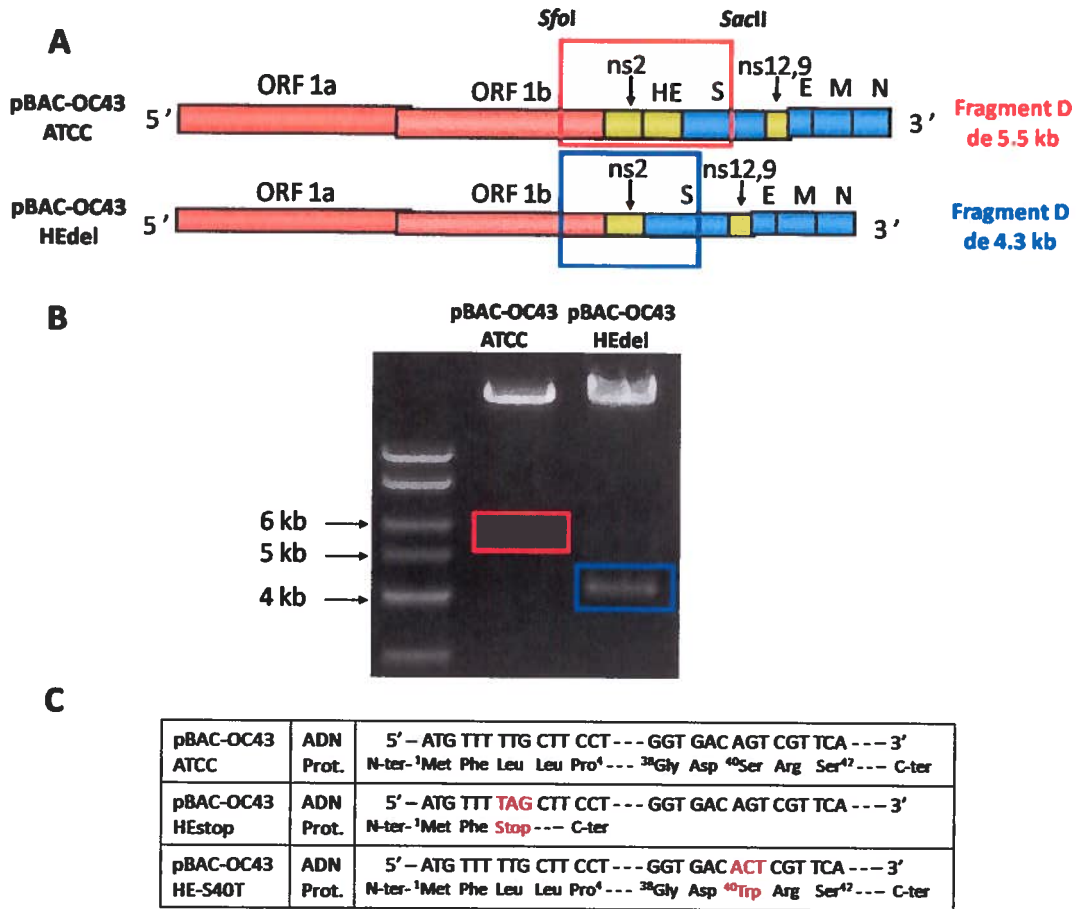
### 1. Hémagglutinine estérase (HE)

Dans le but d'étudier le rôle de la protéine HE lors de l'infection par HCoV-OC43, le gène codant cette protéine a été délété, inactivé ou muté.

#### 1.1 Obtention des clones infectieux d'ADNc

En utilisant le clone pSMART-D, contenant un sous-fragment génomique de 5,5 kb où se retrouve le gène codant pour la protéine HE, comme matrice, la délétion complète du gène HE a été effectuée par PCR de chevauchement. Cette approche a permis d'enlever la région codante ainsi que la région intergénique où se trouve la région régulatrice de HE (HEdel) et de s'assurer que les séquences des autres gènes à proximité (ns2 et S) étaient correctement conservées. Comme indiqué sur la figure 7B, la délétion de HE dans le clone infectieux (pBAC-OC43 HEdel) a été confirmée par une digestion *SfoI/SacII* correspondante au fragment intermédiaire D couvrant la région de la fin de l'ORF1b jusqu'au début du gène de la protéine S. Ce fragment d'une taille de 5,5 kb dans le clone infectieux du virus de référence (ATCC) était réduit à 4,3 kb suite au PCR de chevauchement puisque le gène codant pour la protéine HE possède environ 1,2 kb (Fig. 7A). La délétion a aussi été vérifiée par le séquençage de la nouvelle région de jonction entre ns2 et S. Par ailleurs, ce séquençage (non-montré) a permis de confirmer que le codon stop à la fin du gène ns2 ainsi que la région régulatrice et le début du gène S étaient conservés et identiques au virus de référence.

En plus de la délétion complète du gène de HE (pBAC-OC43 HEdel), un deuxième clone infectieux d'ADNc a été conçu où l'expression de HE était inactivée par la présence d'un codon de terminaison (STOP) en troisième position du cadre de lecture ouvert (pBAC-OC43 HEstop) (Fig. 7C). De plus, le site actif supposé de l'activité acétyl estérase de la protéine HE de HCoV-OC43, déterminé par homologie avec les coronavirus bovin (BCoV) et murin (MHV), a aussi été inactivé, en construisant un troisième clone moléculaire où la sérine en position 40 dans la protéine HE de type sauvage a été remplacée par une thréonine (pBAC-OC43 HE-S40T), comme montré dans la figure 7C. Ces deux dernières modifications (codon STOP et S40T) ont été effectuées par mutagenèse dirigée directement dans le fragment intermédiaire D, pSMART-D, qui a par la suite été réintroduit dans le pBAC-OC43 afin d'obtenir les clones infectieux mutants, dont le séquençage du gène de HE a permis de confirmer la présence des différentes mutations (Fig. 7C).



**Figure 7 : Obtention des clones infectieux d'ADNc n'exprimant pas HE ou dont l'activité acétyl estérase a été inactivée**

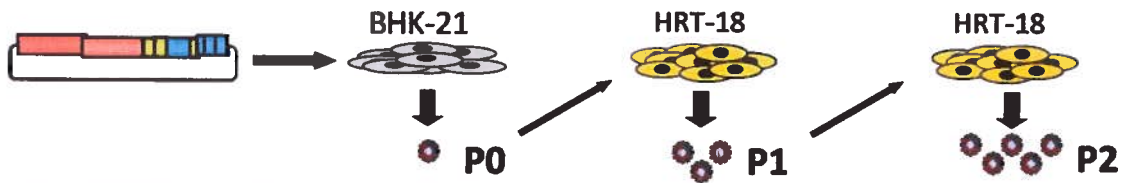
Les schémas A et B illustrent la délétion du gène HE d'une longueur de 1.2kb, confirmée par la migration sur gel de la digestion d'un fragment D, digéré en *SfoI/SacII*, de 4.3kb (en bleu) au lieu de 5.5kb (en rouge) comme le clone infectieux d'ADNc du virus de référence (ATCC). Le tableau C illustre le résultat de séquençage des clones infectieux possédant un codon de terminaison au début du gène de HE, pBAC-OC43 HEstop, et dont l'activité acétyl estérase a été inhibée, pBAC-OC43 HE-S40T.

## 1.2 Production des virus recombinants

Comme mentionné dans la section « Matériels et méthodes », la production des différents virus recombinants (rOC) a été effectuée par la transfection du clone infectieux d'ADNc (pBAC-OC43) dans des cellules BHK-21 suivi de deux amplifications sur les cellules HRT-18. Dans le cas du virus de référence (rOC/ATCC), cette méthode a permis la production d'une quantité suffisante de particules infectieuses pour les expérimentations subséquentes, c'est-à-dire un titre infectieux variant autour de  $10^5$  à  $10^6$   $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$  (dose infectieuse en culture de tissu à 50%). Comme indiqué à la figure 8, dans le cas des différents clones infectieux dont l'expression de HE a été inactivée, par délétion du gène (pBAC-OC43 HEdel) ou codon de terminaison (pBAC-OC43 HEstop), ou dont l'activité acétyl estérase a été inhibée (pBAC-OC43 HE-S40T), il a été impossible de produire une quantité de particules infectieuses suffisantes pour en permettre la détection par la méthode de titrage à immunoperoxydase indirecte, détectant la présence de la protéine S à l'intérieur des cellules infectées.

L'impossibilité de produire et/ou de détecter des particules infectieuses suite à la transfection de cellules BHK-21 et aux amplifications sur cellules HRT-18 semblait réellement être associé à l'inactivation de l'expression de HE ou de son activité acétyl estérase. En effet, il a été possible d'introduire des mutations ailleurs dans le génome sans nuire à la production de virus recombinant. Cela a été démontré par la mutagenèse de la sérine 116 en phénylalanine (HE-S116F), une mutation observée suite à la persistance du virus de référence dans une lignée de cellule neurale. Cette mutation HE-S116F n'avait pas d'effet sur la production du virus recombinant (Fig. 8), ni sur la réplication du virus en culture cellulaire en modèle LA-N-5 (résultat non-montré).

Les résultats présentés à la figure 8 sont représentatifs de trois tentatives de production de particules infectieuses recombinantes sauf pour le virus recombinant HEstop-A dont les trois tentatives sont identifiées #1, #2 et #3. En effet, lors de la première tentative de production de virus recombinant (HEstop-A #1), des particules infectieuses à une concentration de  $10^{1.5}$  et de  $10^{2.5}$   $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$  ont été détectées après les première (P1) et deuxième (P2) rondes d'amplification sur cellules HRT-18 (Figure 8).



pBAC-OC43	log DICT <sub>50</sub> /mL du P0	log DICT <sub>50</sub> /mL du P1	log DICT <sub>50</sub> /mL du P2
<b>ATCC</b>	<b>2.75</b>	<b>5.5</b>	<b>6.25</b>
HEdel-A	< 1.5	< 1.5	< 1.5
HEdel-B	< 1.5	< 1.5	< 1.5
HEstop-A #1	< 1.5	1.5	2.5
HEstop-A #2 et #3	< 1.5	< 1.5	< 1.5
HEstop-B	< 1.5	< 1.5	< 1.5
HE-S40T-A	< 1.5	< 1.5	< 1.5
HE-S40T-B	< 1.5	< 1.5	< 1.5
HE-S116F	-	5.5	6.00

**Figure 8 : Production de virus recombinants sans protéine HE ou avec la protéine HE sans activité acétyl estérase**

Les clones infectieux d'ADNc sont transfectés dans des cellules BHK-21 (Passage 0, P0). Le lysat cellulaire est récolté et amplifié pour deux passages (P1 et P2) sur les cellules HRT-18. Le clone infectieux du virus de référence, pBAC-OC43 ATCC, en rouge, passe de 2.75 log de DICT<sub>50</sub>/mL après le P0 à 6.25 log de DICT<sub>50</sub>/mL après le P2, ce qui est une quantité suffisante pour les expérimentations subséquentes. Deux clones infectieux (A et B) ont été transfectés pour chacune des mutations : délétion complète du gène de HE (HEdel), inactivation par codon de terminaison (HEstop), inhibition de l'activité acétyl estérase (HE-S40T). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences. La transfection de pBAC-HEstop-A (#1), en gris, indique une production de virus suite au P1 et P2, alors que les tentatives #2 et #3 n'indique aucune détection de particules virales. Les résultats avec le clone infectieux HE-S116F ne sont représentatifs que d'une seule production de virus recombinant où le P0 a été directement utilisé pour être amplifié sur les cellules HRT-18 sans être titré auparavant (-). Les doses infectieuses à 50% sont déterminées par une méthode de titrage par immunoperoxydase indirecte dont le seuil de détection est plus petit ou égal à 1.5 log de DICT<sub>50</sub>/mL.

Toutefois, il s'est avéré que les particules infectieuses détectées lors de cette expérience présentaient une réversion de la mutation, c'est-à-dire un changement du codon de terminaison pour un tryptophane, alors que l'acide aminé d'origine était une leucine, comme observé suite au séquençage de l'ARN viral extrait des lysats cellulaires du P1 et de P2 (Fig. 9). Le changement d'acide aminé observé après seulement un passage sur les cellules HRT-18 suggère une forte pression de sélection pour permettre l'expression de la protéine HE. En effet, même si la séquence retrouvée ne correspondait pas à la séquence originale, le codon de terminaison a bel et bien été modifié pour permettre de rétablir un ORF complet codant pour la protéine HE. Cette réversion n'a toutefois été observée qu'une seule fois lors des différentes tentatives pour produire des virus recombinants (Fig. 8).

En conclusion, il semble que la délétion du gène de HE, l'inactivation de son expression par la présence d'un codon de terminaison ou la mutation de son site supposé d'activité acétyl estérase empêche la production et la détection de particules infectieuses recombinantes.

pBAC-OC43 ATCC	ADN Prot.	5' – ATG TTT TTG CTT CCT --- GGT GAC AGT CGT TCA --- 3' N-ter- <sup>1</sup> Met Phe Leu Leu Pro <sup>4</sup> --- <sup>38</sup> Gly Asp <sup>40</sup> Ser Arg Ser <sup>42</sup> --- C-ter
pBAC-OC43 HEstop	ADN Prot.	5' – ATG TTT TAG CTT CCT --- 3' N-ter- <sup>1</sup> Met Phe Stop -C-ter
pBAC-OC43 HEstop-A #1	ADN Prot.	5' – ATG TTT TGG CTT CCT --- GGT GAC AGT CGT TCA --- 3' N-ter- <sup>1</sup> Met Phe Trp Leu Pro <sup>4</sup> --- <sup>38</sup> Gly Asp <sup>40</sup> Ser Arg Ser <sup>42</sup> --- C-ter

**Figure 9 : Réversion de HEstop-A #1**

Séquences attendues pour le gène de la protéine HE du clone infectieux du virus de référence, pBAC-OC43 ATCC, et suite à la mutagenèse dirigée pour l'introduction d'un codon de terminaison, pBAC-OC43 HEstop et séquence obtenue suite au séquençage de l'ARN viral extrait des lysats cellulaires des deux amplifications sur HRT-18, passage 1 et 2 (P1 et P2), provenant de la première tentative de transfection (#1) du clone pBAC-OC43 HEstop-A.

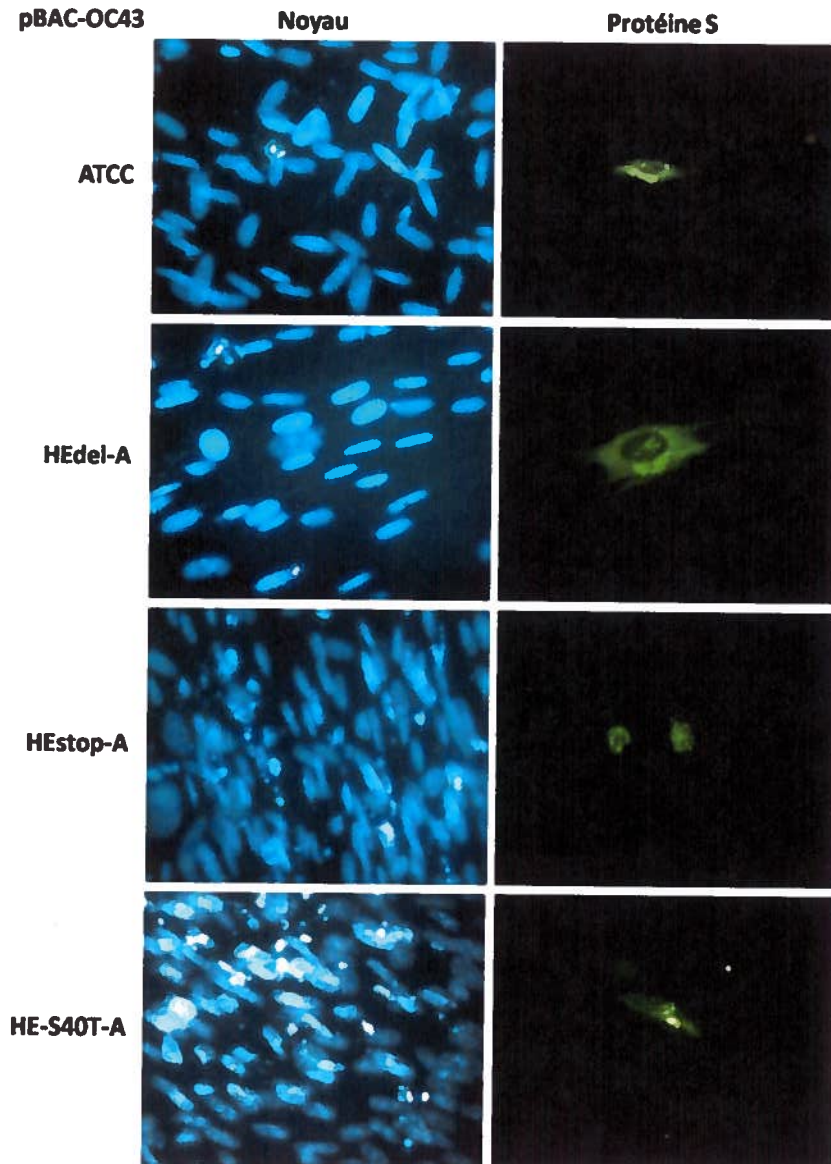


### **1.3 Détection des protéines virales à l'intérieur des cellules transfectées**

Dans le but de déterminer si les clones infectieux d'ADNc portant des mutations au niveau du gène de HE étaient transfectés, transcrits et traduits avec la même efficacité que le virus de référence (pBAC-OC43 ATCC), la protéine de surface a été détectée par immunofluorescence dans les cellules BHK-21 transfectées (P0) (Fig. 10). Comme attendu à la lumière du faible taux de production de virus recombinant suite à la transfection observé à la figure 8, le nombre de cellules exprimant la protéine S 48h après la transfection des clones infectieux mutants de HE est très faible, mais il reste comparable au taux observé lors de la transfection du clone infectieux du virus de référence. Il semble donc, que l'absence d'expression de la protéine HE ou l'absence de son activité acétyl estérase ne nuise pas à la transfection des clones infectieux.

### **1.4 Complémentation de la production de virus recombinant par l'expression constitutive de la protéine HE dans les cellules BHK-21**

Dans l'objectif de restaurer la production des différents virus recombinants dont le gène de la protéine HE a été muté, les cellules BHK-21 ont été transfectées de façon stable par les vecteurs d'expression contenant le gène de la protéine HE (pcDNA3.1/HE) ou pIRES-HE-V5-GFP (section 2.6 des Matériels et Méthodes). Il a été impossible de détecter de façon concluante l'expression de la protéine fluorescente verte dans les cellules transfectées par pIRES-HE-V5-GFP (résultats non-montrés). De plus, l'ARN a été extrait des populations de cellules BHK-21 transfectées de façon stable pour tenter d'observer, par RT-PCR, la transcription de l'ARNm de la protéine HE. Or, la présence d'ARNm de la protéine HE n'a pas pu être mise en évidence lors de deux extractions d'ARN (résultats non-montrés). Malgré l'absence de détection d'ARNm de la protéine HE, les cellules BHK-21 devant théoriquement exprimer la protéine HE suite à la transfection avec pcDNA3.1/HE, ont tout de même été utilisées pour une tentative de complémentation de la production de virus recombinant, sans succès. En effet, les populations cellulaires sélectionnées (cellules BHK-21-HE) ont été transfectées, comme décrit à la section 2.2 des Matériels et méthodes, par les différents virus recombinant n'exprimant pas la protéine HE ou dont l'activité acétyl estérase a été inhibée. Toutefois, tout comme le résultat montré à la figure 8, aucune particule infectieuse n'a été détectée suite à cette tentative de complémentation (résultat non-montré).



**Figure 10 : Détection de protéines virales à l'intérieur des cellules transfectées**

Les cellules BHK-21 ont été transfectées avec les différents clones infectieux présentant des mutations du gène de HE : HEdel, HEstop et HE-S40T. Les images sont tirées de la transfection du clone A qui est représentative de celle du clone B de chacune des mutations. L'efficacité de transfection ainsi que les capacités de transcription et traduction du génome viral ont été observées par la détection de la protéine virale S par immunofluorescence et comparées aux cellules transfectées par le clone infectieux du virus de référence. La présence de protéines virales à l'intérieur des cellules transfectées a été observée lors de deux expériences de transfection.

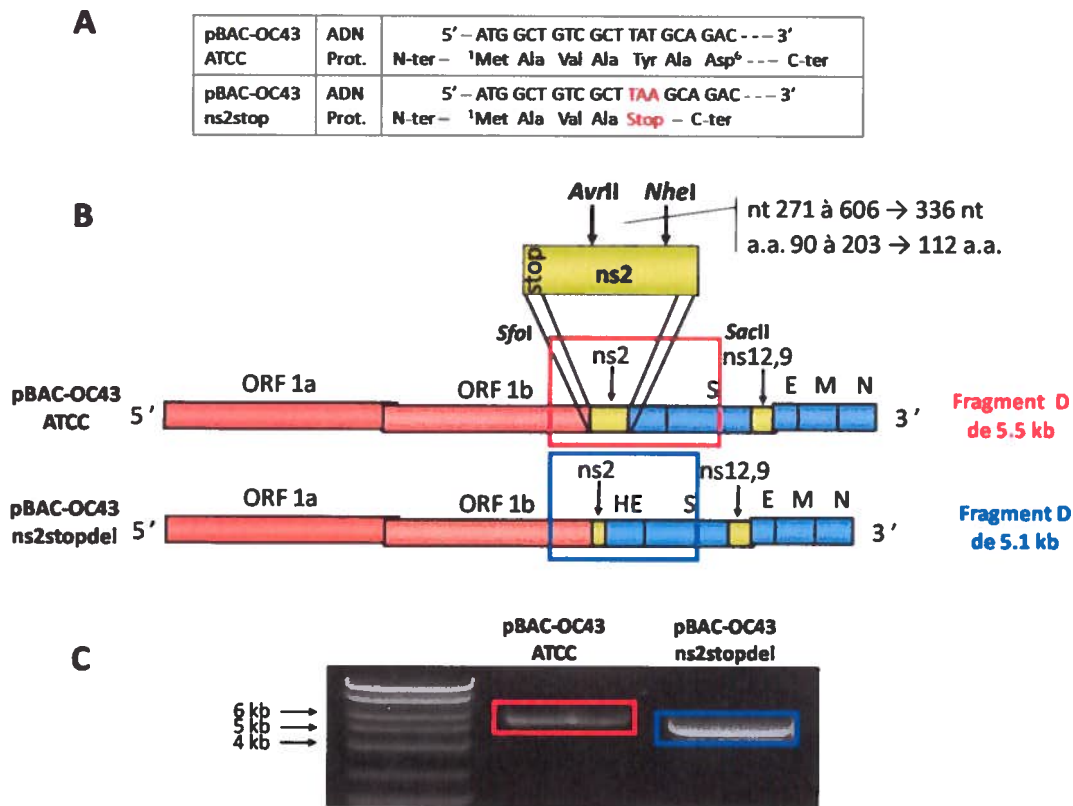
## 2. Protéine non-structurale 2 (ns2)

Dans le but de déterminer le rôle de la protéine ns2, le gène codant cette protéine non-structurale a été inactivé et en partie délété et les virus recombinants résultants ont été étudiés lors de l'infection du modèle neuronal LA-N-5 et du modèle animal murin d'infection du SNC.

### 2.1 Obtention des clones infectieux d'ADNc

Dans le but d'étudier l'effet de l'absence de la protéine ns2 lors de l'infection, un premier clone infectieux a été construit où le cinquième codon du gène de cette protéine a été muté en codon de terminaison (pBAC-OC43 ns2stop) (Fig. 11A). De plus, comme indiqué à la figure 11B, à l'intérieur du gène de ns2 deux sites de restriction aux extrémités compatibles sont présents et ont permis la délétion de 336 pb, c'est-à-dire la suppression des bases 271 à 606 inclusivement dans le gène ns2. Cette digestion/ligation a aussi permis de conserver le cadre de lecture de l'ORF2a en enlevant les 112 acides aminés se situant aux positions 90 à 203. Toutefois, puisque le clone infectieux dont cette région a été supprimée, pBAC-OC43 ns2stopdel, possédait un codon de terminaison, tout comme le clone infectieux pBAC-OC43 ns2stop de la figure 9A, la protéine ns2 ne devait pas du tout être exprimée. Néanmoins, cette délétion de plus de 40% de la région codante de ns2 a été vérifiée par la digestion du fragment intermédiaire D avec les enzymes de restriction *SfoI* et *SacII*. Le clone infectieux d'ADNc du virus de référence, pBAC-OC43 ATCC, possédait un fragment D de 5.5 kb, alors que le clone infectieux pBAC-OC43 ns2stopdel en possédait un d'environ 5.1 kb. Cette différence fut observable sur gel d'agarose suite à la digestion des différents clones infectieux d'ADNc (Fig. 11C).

Les fragments intermédiaires D contenant les différentes mutations ont été introduits dans des clones infectieux d'ADNc qui ont ensuite été transfectés dans des cellules BHK-21 pour la production de virus recombinant n'exprimant pas ns2. Contrairement aux clones infectieux mutants de HE, les virus rOC/ns2stop et rOC/ns2stopdel ont pu être produits avec la même efficacité que le virus recombinant de référence, rOC/ATCC.



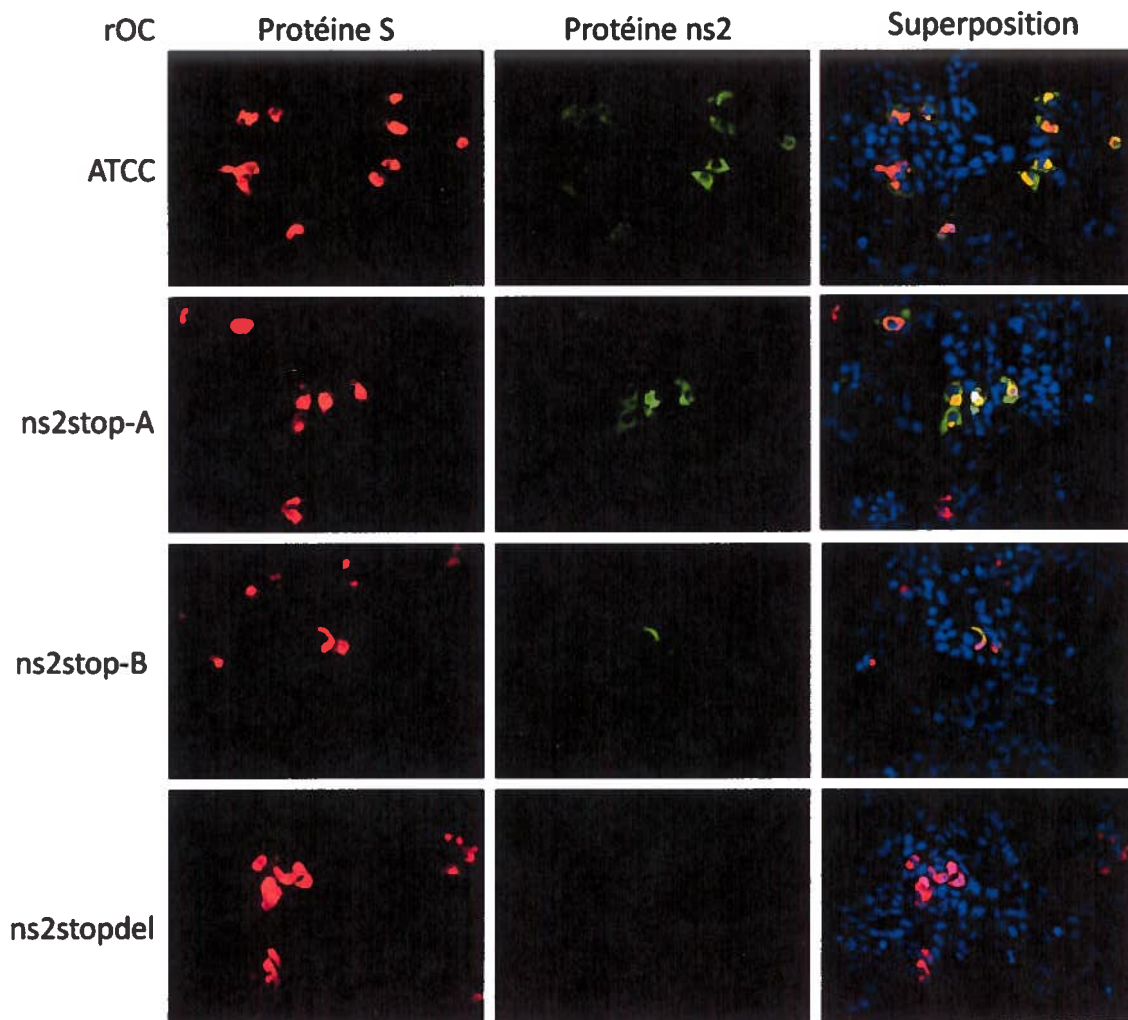
**Figure 11 : Obtention des clones infectieux n'exprimant pas ns2**

Le tableau A représente le résultat de séquençage du clone infectieux dont la traduction a été bloquée par l'introduction d'un codon de terminaison, en rouge, au début du gène de la protéine ns2. La présence de deux sites de restriction dont les extrémités étaient compatibles, *AvrII* et *NheI*, illustrés en B, a permis la délétion d'une partie du gène de la protéine ns2, 336 nucléotides (nt) ou 112 acides aminés (a.a.). La délétion a été confirmée par la double digestion du fragment D en *SfoI/SacII*, illustrée sur gel d'agarose en C. Dans le clone infectieux du virus de référence, le fragment D, en rouge, était de 5,5 kb, alors que suite à la délétion d'une partie du gène de la protéine ns2, le fragment D était de 5.1 kb en bleu.

## 2.2 Détection de la protéine ns2 à l'intérieur des cellules infectées

Suite à l'introduction des fragments intermédiaires D dans les clones infectieux d'ADNc, ceux-ci ont été séquencés pour confirmer la conservation de la mutation. Toutefois, comme cela a été observé dans un échantillon dans le cas des clones infectieux mutants de HE, il était possible qu'une réversion de la mutation ait eu lieu lors de la production des virus recombinants. Ainsi, un anticorps contre la protéine ns2 a été utilisé pour détecter, s'il y a lieu, la présence de cette protéine non-structurale à l'intérieur des cellules HRT-18 infectées par les différents virus recombinants dont le gène ns2 a été inactivé.

Dans le cas du virus de référence (rOC/ATCC), chaque cellule infectée, observable par la présence de la protéine de surface S, exprimait aussi la protéine ns2 (Fig. 12). Pour chaque stratégie d'inactivation utilisée (délétion d'une partie du gène en plus du codon de terminaison en début de gène (ns2stopdel) ou présence du codon de terminaison seulement (ns2stop), deux clones infectieux ont été obtenus et ont permis la production de virus recombinants. Étonnamment, les virus recombinants provenant des deux clones infectieux possédant un codon de terminaison, rOC/ns2stop-A et rOC/ns2stop-B, ont montré un certain niveau d'expression de la protéine ns2 dans les cellules infectées détectée par un anticorps polyclonal de lapin anti-ns2 (figure 12). Il semblerait donc que la production et l'amplification de rOC/ns2stop-A et -B a mené à l'apparition d'une population hétérogène de virus recombinants suite à la deuxième amplification sur cellules HRT-18 (P2). Alors que toutes les cellules infectées produisaient la protéine S, certaines cellules ont été infectées par du virus exprimant ns2 et d'autres cellules ne montraient pas la présence de ns2, contrairement à rOC/ATCC où toutes les cellules infectées (détectées par la présence de la protéine S) exprimaient la protéine ns2. Les virus recombinants dérivés des deux clones infectieux pBAC-OC43 ns2stop-A et -B



**Figure 12 : Détection de la protéine ns2 dans les cellules infectées**

Les cellules HRT-18 (noyaux détectées par DAPI, en bleu) ont été infectées avec les différents virus recombinants dont l'expression de la protéine ns2 a été inactivée, ns2stop (clone A et clone B) et ns2stopdel (représentatif de deux clones), ainsi que le virus recombinant de référence, rOC/ATCC, a une multiplicité d'infection (MOI) de 0,2. Les protéines virales, S en rouge, utilisé comme marqueur d'infection, et ns2 en vert, ont été détectées 48 heures post-infection. Ces images sont représentatives de deux expériences faites en duplicata.

semblaient contenir une population hétérogène de virus dont certains exprimaient la protéine ns2 et d'autres ne l'exprimaient pas ou à des niveaux moindres que le virus de référence. Toutefois, les cellules infectées par les virus recombinants provenant des deux clones infectieux dont près de la moitié du gène de ns2 a été déléetée (rOC/ns2stopdel-A et rOC/ns2stopdel-B) ne démontraient pas d'expression de la protéine ns2 (Fig. 12).

Ce sont donc les virus recombinants dont une partie du gène de ns2 a été déléetée, rOC/ns2stopdel, qui ont été principalement utilisés pour les expériences subséquentes.

### **2.3 Cinétique de répliation des virus n'exprimant pas ns2**

Dans le but d'étudier le rôle de la protéine ns2 dans le cycle de répliation du virus, un modèle neuronal a été utilisé puisque, comme mentionné dans l'état des connaissances, le neurone est la cellule cible primaire lors de l'infection du SNC par le HCoV-OC43. Les cellules de la lignée LA-N-5, différenciées en neurone à l'aide d'un traitement à l'acide rétinoïque, ont donc été infectées par rOC/ns2stop, rOC/ns2stopdel et rOC/ATCC et les surnageants de culture ainsi que les lysats cellulaires ont été récupérés à différents temps post-infection de façon à comparer la cinétique de répliation. Aucune différence n'a été détectée dans la répliation des virus recombinants n'exprimant pas ns2 (rOC/ns2stopdel) ou dans la répliation de la population de virus recombinants exprimant ns2 à des niveaux moindres (rOC/ns2stop) par rapport au virus de référence (Fig. 13). Il semblerait donc que la protéine ns2 ne soit pas essentielle à la répliation du virus en culture cellulaire utilisant un modèle neuronal humain.

## Cinétique de réplication du virus dans les cellules LA-N-5

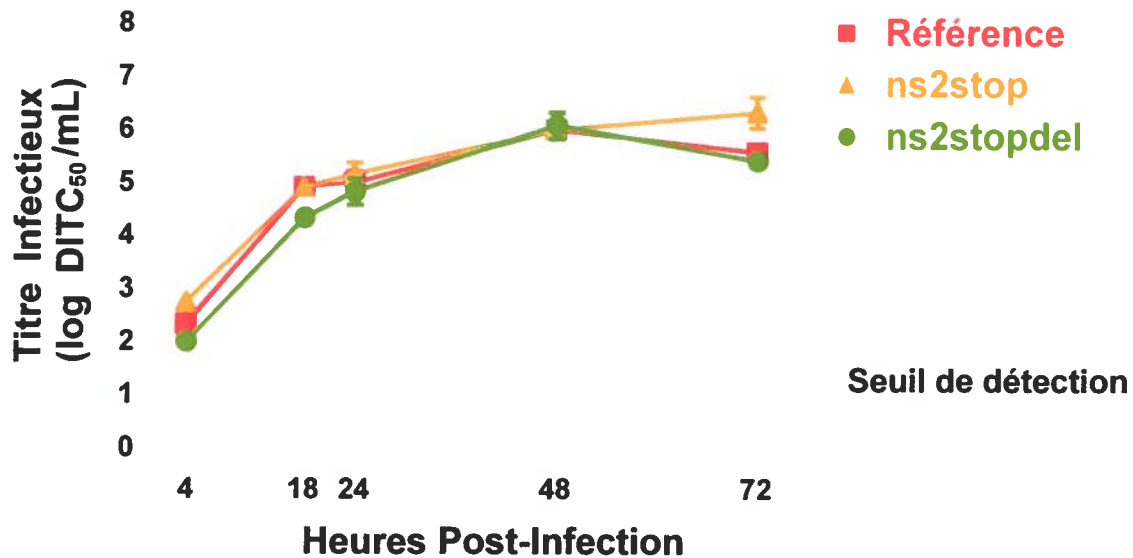


Figure 13 : Cinétique de réplication des virus recombinants n'exprimant pas ns2 dans les cellules LA-N-5 comparée à celle du virus de référence rOC/ATCC.

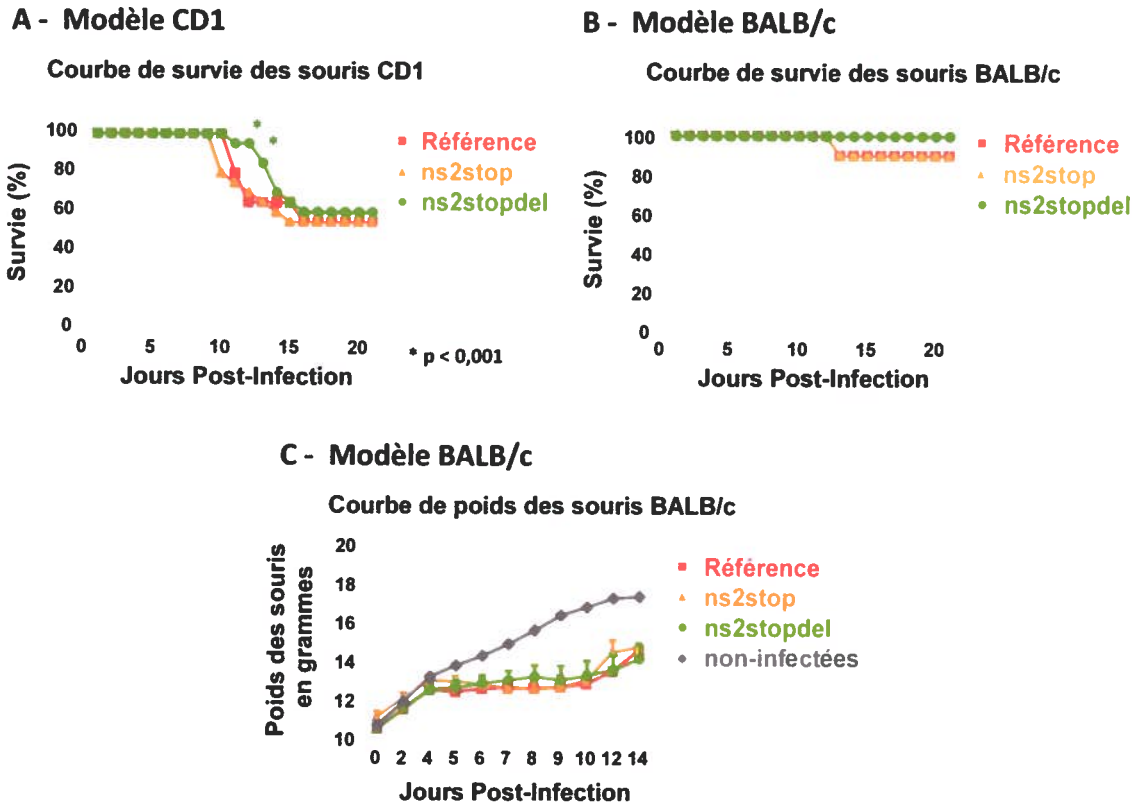
Les cellules LA-N-5 différenciées en neurones ont été infectées à une MOI de 0,2 par les différents virus recombinants portant des mutations dans ns2, ns2stop (triangle orange) et ns2stopdel (rond vert), et le virus de référence (carré rouge). À 4h, 18h, 24h, 48h et 72h post-infection, le lysat cellulaire a été récolté et titré par méthode d'immunoperoxydase indirecte de façon à déterminer la dose infectieuse à 50% (DICT<sub>50</sub>/mL). La cinétique de réplication illustrée est représentative de 3 expériences.



## 2.4 Courbe de survie des souris infectées par les virus n'exprimant pas ns2

Les souris de souche CD1 sont très susceptibles à l'infection par HCoV-OC43, c'est-à-dire qu'à une faible dose de  $10^{1.5}$  DICT<sub>50</sub>/mL, environ 50% d'entre elles meurent suite à l'infection avec le virus de référence (rOC/ATCC). Ces souris ont donc été utilisées dans un premier temps, pour observer s'il y avait des variations dans la mortalité des souris infectées avec les différents virus recombinants. La figure 12A représente la courbe de survie des souris CD1 infectées à une dose de  $10^{1.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L avec le virus de référence, rOC/ATCC, ou les virus recombinants mutants de ns2, rOC/ns2stop et rOC/ns2stopdel. Les souris infectées par rOC/ns2stop montraient une courbe de survie similaire à celle du virus de référence (Figure 14). L'infection par le virus recombinant dont une partie du gène ns2 a été déléetée, rOC/ns2stopdel, menait aussi à une mortalité d'environ 50% des souris, mais l'apparition de symptômes d'encéphalite, tels qu'une apathie ou une posture avec le dos recourbé, ainsi que la mortalité était retardée. En effet, alors que rOC/ATCC et rOC/ns2stop induisaient une mortalité similaire tout au long de l'étude, la mort des souris infectées par le virus rOC/ns2stopdel étaient en comparaison significativement retardée entre les jours 12 et 13 post-infection. Cette différence entre la survie des souris infectées par rOC/ATCC et rOC/ns2stopdel a été observée dans deux expériences indépendantes où l'échantillonnage comportait 10 et 20 souris.

Les souris de souche BALB/c ont aussi été utilisées puisqu'il s'agit du modèle le plus utilisé au laboratoire et qu'il est bien documenté dans plusieurs publications. Ces souris ont donc été infectées à une dose plus élevée de  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L, mais présentaient un taux de mortalité plus faible, autour de 10%, suite à l'infection. Étant associé à un faible taux de mortalité, ce modèle permettait de mieux suivre la réplication du virus à l'intérieur du cerveau des animaux infectés mais il était toutefois plus difficile de mettre en évidence une différence au niveau de la courbe de survie entre le virus de référence et le virus n'exprimant pas ns2. La figure 14B montre une différence de 10% entre la mortalité induite par rOC/ns2stopdel comparé à rOC/ATCC et même si cette différence de mortalité de 10% n'est pas significative d'un point de vue statistique à cause d'un échantillonnage trop petit, elle a été observée de façon reproductible lors de deux expériences comprenant chacune 10 souris. Par ailleurs, même si 100% des souris infectées par rOC/ns2stopdel ont survécu, elles étaient tout de même atteintes au même titre que les souris infectées par le virus de référence comme l'indique la courbe de poids de la figure 14C.



**Figure 14 : Courbe de survie et de variation du poids des souris infectées par ns2stopdel compar e   rOC/ATCC (ou référence) et rOC/ns2stop**

Les souris de souche CD1 (A) ont été infectées intracérébralement avec  $10^{1.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 L et les souris de souche BALB/c, avec  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 L. La survie des souris a été suivie pendant trois semaines post-infection et le poids des souris pris pendant deux semaines post-infection. Le graphique A montre la courbe de survie représentative de deux infections avec 10 et 20 souris/virus. Statistiques d termin es par le test de la loi binomiale où \* =  $p < 0,001$ . Le graphique B est représentatif de deux expériences avec 10 souris/virus chacune. La courbe de poids en C est représentative d' une seule expérience avec 10 souris/ virus et 2 souris non-infectées (*sham*).

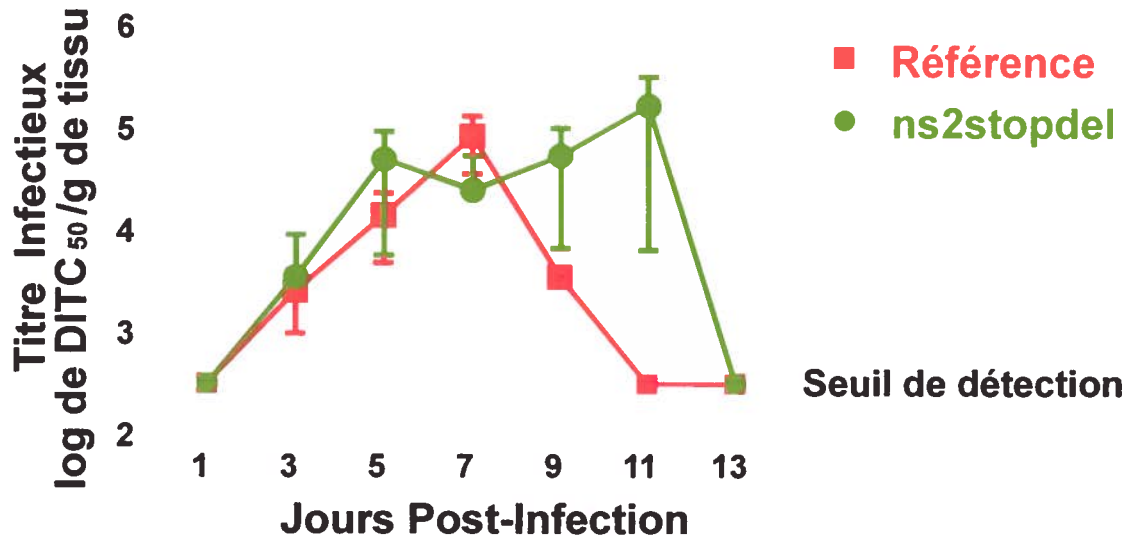
## **2.5 Réplication dans le SNC des virus n'exprimant pas ns2**

Dans le but de vérifier si le virus recombinant n'exprimant pas ns2 (rOC/ns2stopdel) se répliquait au même titre que le virus de référence (rOC/ATCC), ces deux virus ont été inoculés de façon intracérébrale dans des souris BALB/c de 22 jours à une dose de  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/mL. Par la suite, les cerveaux de trois souris infectées par chacun des virus ont été récoltés et broyés à tous les deux jours pendant 2 semaines afin d'évaluer la production de virus infectieux au niveau du cerveau. Les résultats, répertoriés dans la figure 15, montrent que le virus de référence possédait un pic de réplication au jour 7 (J7) de l'infection et était complètement éliminé du cerveau, c'est-à-dire que le virus de référence n'a jamais été détecté, après 11 jours (J11). Toutefois, le virus n'exprimant pas ns2, rOC/ns2stopdel, même s'il atteignait son pic de réplication dans un temps semblable au virus de référence, n'était pas éliminé aussi rapidement du SNC. En effet, dans le cas de rOC/ns2stopdel, la cinétique de réplication montrait l'atteinte d'un plateau de réplication dès le J5 et qui se poursuivait jusqu'au J11 avant d'être complètement éliminé du cerveau au J13.

## **2.6 Dissémination dans le SNC des virus n'exprimant pas ns2**

De façon à déterminer si le délai observé dans l'apparition des symptômes et de la mortalité des souris (Figure 14) ainsi que la présence plus longue du virus infectieux au cerveau (Figure 15) pouvaient être associés à une dissémination restreinte du virus rOC/ns2stopdel, des coupes histologiques sur le cerveau des souris infectées ont été effectuées à différents temps post-infection. À la figure 16, il est possible d'observer, à l'aide d'un anticorps contre la protéine de surface (S) du virus, la présence d'antigènes viraux dans différentes régions du cerveau. Comme ces coupes histologiques ne représentent que le cerveau d'une seule souris pour chacun des virus à l'étude et que l'intensité et la localisation du signal varient de façon significative, il sera nécessaire de répéter l'expérience pour s'assurer de la représentativité des résultats et pour se prononcer au niveau de la cinétique de dissémination des virus. Néanmoins, ces résultats suggèrent qu'il n'y a aucune restriction dans la dissémination du virus n'exprimant pas ns2 comparé au virus de référence.

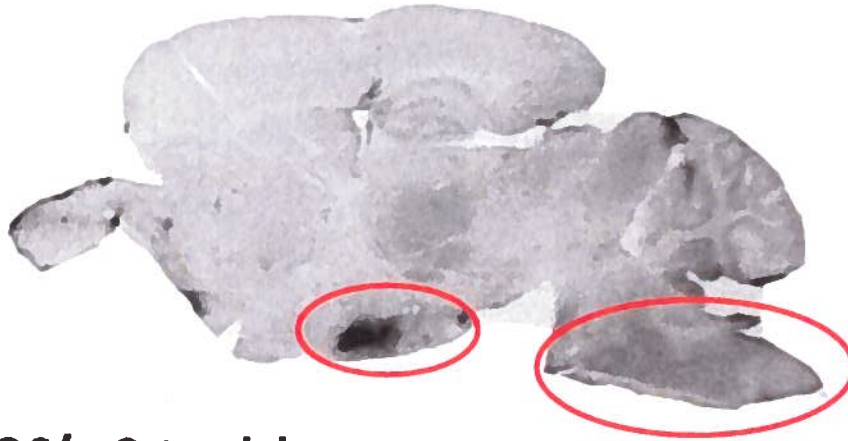
## Réplication du virus dans le SNC



**Figure 15 : Réplication du virus rOC/ns2stopdel dans le SNC de souris BALB/c comparée à celle du virus de référence**

Souris BALB/c infectées avec rOC /ns2stopdel ou le virus de référence, rOC/ATCC à une dose de  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L. Représentatif de deux expériences où la dose infectieuse par gramme de tissu cérébral pour trois souris/virus a été déterminée tous les deux jours post-infection. Le seuil de détection est de 2.5 log DICT<sub>50</sub>/gramme de tissu.

**rOC/ATCC**



**rOC/ns2stopdel**



**Figure 16 : Dissémination du virus rOC/ns2stopdel au SNC de souris BALB/c comparée au virus de référence (rOC/ATCC)**

Coupes histologiques du cerveau des souris BALB/c infectées par le virus de référence ou le virus n'exprimant pas ns2 (rOC/ns2stopdel) à une dose de  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L. Les cerveaux d'une souris pour chacun virus ont été récoltés et coupés au jour 6 post-infection. Les antigènes viraux (mis en évidence par des cercles rouges) ont été détectées par la présence de la protéine de surface S dans le cerveau (en noir).

### **3. Protéine non-structurale ns12.9**

Dans le but de déterminer le rôle de la protéine ns12.9, le gène codant pour cette protéine non-structurale a été inactivé par un codon de terminaison au début du gène et le virus recombinant résultant a été étudié lors de l'infection du modèle neuronale LA-N-5 et du modèle animal murin d'infection du SNC.

#### **3.1 Obtention du clone infectieux d'ADNc**

Le gène codant pour la protéine non-structurale de 12.9kDa (ns12.9) est situé entre les gènes des protéines S et E et possède 327 pb codant pour 109 acides aminés. Cette petite protéine ne possède pas d'activité enzymatique connue. Pour étudier le rôle de ns12.9 dans un contexte d'infection du système nerveux central, son expression a été inactivée par mutagenèse dirigée sur le quatrième codon, un tryptophane, changé pour un codon de terminaison. L'introduction de cette mutation dans le clone infectieux d'ADNc, pBAC-OC43 ns12.9stop, via le clone pSMART A, un fragment de 6.5 kb contenant entre autres le gène codant pour la protéine ns12.9, devrait empêcher la traduction de l'ARNm sous-génomique de ns12.9. La présence du codon de terminaison a été vérifiée par séquençage du clone infectieux d'ADNc, comme indiqué à la figure 17, avant la production du virus recombinant correspondant.

#### **3.2 Conservation de la mutation inactivatrice du gène ns12.9**

La présence du codon de terminaison en quatrième position du cadre de lecture du gène de la protéine ns12.9 a été vérifiée par séquençage de pBAC-OC43 ns12.9stop avant que le virus recombinant ne soit produit. Toutefois, comme il n'y avait pas d'anticorps disponible contre la protéine ns12.9, il fut impossible de démontrer l'absence de la protéine lors de l'infection en culture cellulaire suite à la production du virus recombinant correspondant. Dans le but de vérifier que la mutation inactivatrice était conservée, contrairement à ce qui semble être arrivé dans le cas du virus rOC/ns2stop (section 2.1), l'ARN viral a été extrait et séquencé suite à l'infection en souris. Ainsi, après une injection intracérébrale du virus rOC/ns12.9stop dans les souris BALB/c et 5 jours de répliation dans le système nerveux central, l'ARN viral récupéré au cerveau présentait encore un codon de terminaison en quatrième position du gène de la protéine ns12.9, indiquant que la mutation inactivatrice était conservée et que théoriquement la protéine ns12.9 n'était pas exprimée (figure 18).

pBAC-OC43 ATCC	ADN Prot.	5' – ATG GAC ATT TGG AGA CCT --- 3' N-ter – <sup>1</sup> Met Asp Ile Trp Arg Pro <sup>5</sup> --- C-ter
pBAC-OC43 ns12.9stop	ADN Prot.	5' – ATG GAC ATT TAG AGA CCT --- 3' N-ter – <sup>1</sup> Met Asp Ile Stop – C-ter

**Figure 17 : Obtention des clones infectieux n'exprimant pas la protéine ns12.9**

Résultat de séquençage du clone infectieux d'ADNc pBAC-OC43 ns12.9stop contenant un codon de terminaison, en rouge, en 4<sup>e</sup> position de codon.

rOC/ATCC	ADN Prot.	5' – ATG GAC ATT TGG AGA CCT --- 3' N-ter – <sup>1</sup> Met Asp Ile Trp Arg Pro <sup>5</sup> --- C-ter
rOC/ ns12.9stop	ADN Prot.	5' – ATG GAC ATT TAG AGA CCT --- 3' N-ter – <sup>1</sup> Met Asp Ile Stop – C-ter

**Figure 18 : Conservation de la mutation inactivatrice dans l'ORF ns12.9 5 jours post-infection au niveau du SNC de souris BALB/c**

Le codon de terminaison (en rouge) du gène ns12.9 du virus recombinant rOC/ns12.9stop est conservé dans l'ARN viral extrait du cerveau des souris BALB/c, 5 jours après l'infection.



### **3.3 Cinétique de réplication du virus n'exprimant pas ns12.9**

Suite à la production du virus recombinant n'exprimant pas la protéine ns12.9 et dans le but de déterminer si cette protéine non-structurale est essentielle au cycle de réplication du virus, la cinétique de réplication en neurone a été établie par comparaison au virus de référence lors de l'infection des cellules LA-N-5. Comme observable à la figure 19, la courbe de réplication de rOC/ns12.9stop était en tout point semblable à celle de rOC/ATCC.

## Cinétique de réplication du virus dans les cellules LA-N-5

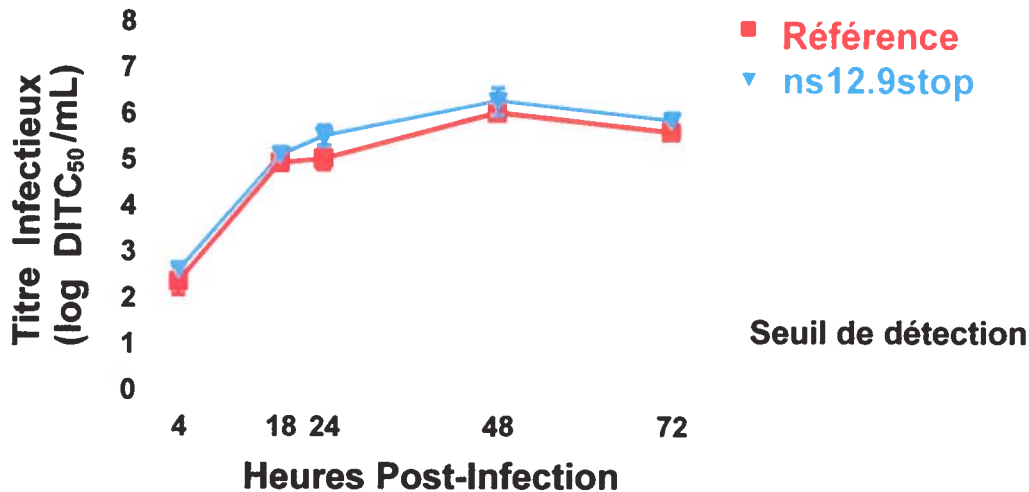


Figure 19 : Réplication du virus n'exprimant pas ns12.9 en neurone comparée au virus de référence (rOC/ATCC)

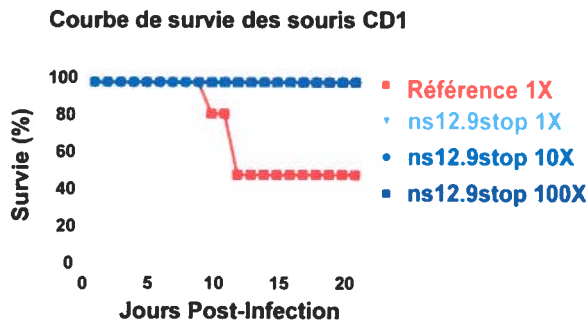
Les cellules LA-N-5 différenciées en neurones ont été infectées à une MOI de 0,2 par le virus recombinant n'exprimant pas ns12.9, rOC/ns12.9stop (triangle inversé bleu) et le virus de référence (carré rouge). À 4h, 18h, 24h, 48h et 72h post-infection, le lysat cellulaire a été récolté et titré par méthode d'immunoperoxydase indirecte de façon à déterminer la dose infectieuse à 50% (DICT<sub>50</sub>/mL). La cinétique de réplication illustrée est représentative de trois expériences.

### 3.4 Courbe de survie des souris infectées par le virus n'exprimant pas ns12.9

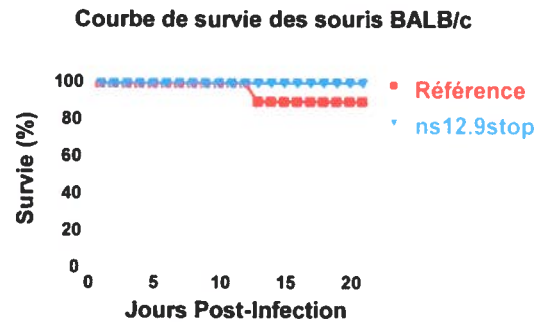
Puisque aucun effet n'a été observé sur la réplication du virus en culture cellulaire suite à la délétion de la protéine ns12.9, le virus recombinant n'exprimant pas ns12.9 a été inoculé intracérébralement à des souris de façon à déterminer l'impact de cette mutation sur la neurovirulence. Tout comme pour les virus n'exprimant pas la protéine ns2 (section 2.4), deux souches de souris ont été utilisées pour le virus n'exprimant pas ns12.9 : la souche CD1, plus sensible à l'infection par le HCoV-OC43 et inoculée à une dose plus faible et la souche BALB/c qui, même inoculée à une dose dix fois plus élevée, présente peu de mortalité suite à l'infection. Il est intéressant de constater (Figure 20A et 20B) que pour les deux souches de souris, l'infection intracérébrale par rOC/ns12.9stop n'a pas altérée la survie des souris par rapport aux souris non-infectées. En effet, les groupes de souris infectées par le virus n'exprimant pas ns12.9 ont présenté une survie de 100% ainsi qu'une absence de symptômes d'encéphalite, tels qu'une apathie ou une posture avec le dos recourbé observées suite à l'infection par le virus de référence. Étonnamment, même quand la dose de rOC/ns12.9stop injectée dans les souris CD1 (Figure 20A) était de dix ou cent fois plus élevée que la dose létale à 50% de rOC/ATCC, les souris ne présentaient toujours aucun symptôme d'encéphalite et survivaient toutes à l'infection.

Il fût toutefois possible de détecter des traces d'infection par rOC/ns12.9stop en observant la courbe de poids des souris BALB/c infectées. En effet, comme indiqué à la figure 20C, il est possible de constater un retard dans la croissance des souris infectées par le coronavirus humain OC43 dont l'expression de la protéine ns12.9 a été inactivée comparées aux souris témoins injectées avec une solution saline (*sham*). Par contre, la diminution dans la prise de poids des souris infectées par rOC/ns12.9stop semblait moins importante que celle des souris infectées par le virus de type sauvage. Ces résultats confirment donc que les souris étaient bel et bien infectées suite à l'injection du virus recombinant n'exprimant pas ns12.9 au cerveau, mais qu'elles étaient pathologiquement moins atteintes, ce qui est en accord avec leur taux de survie de 100%.

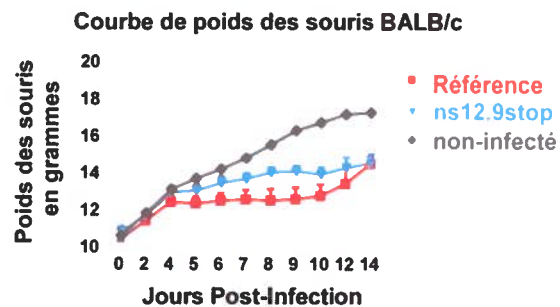
### A - Modèle CD1



### B - Modèle BALB/c



### C - Modèle BALB/c



**Figure 20 : Courbe de survie des souris infectées par le virus n'exprimant pas la protéine ns12.9 comparée au virus de référence**

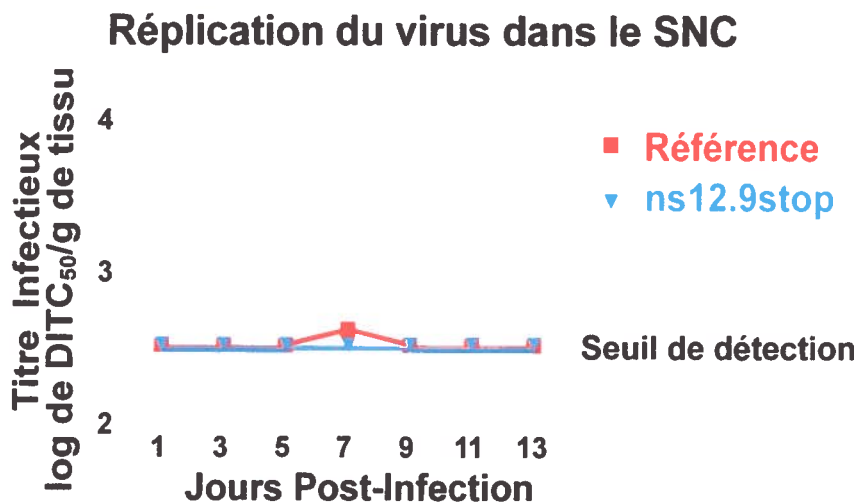
Les souris de souche CD1 (A) ont été infectées intracérébralement avec  $10^{1.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L (1X),  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L (10X) ou  $10^{3.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L (100X) et les souris de souche BALB/c, avec  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L. La survie des souris a été suivie pendant trois semaines post-infection et le poids des souris a été pris pendant deux semaines post-infection. La courbe de survie en A est représentative de trois infections avec 10 souris/virus pour Référence (à une dose 1X) et ns12.9stop (à une dose 1X) et d'une seule expérience avec 10 souris/virus pour ns12.9stop aux doses de 10X et 100X. Le graphique B est représentatif de deux expériences avec 10 souris/virus chacune. La courbe de poids en C est représentative d'une seule expérience avec 10 souris/virus et 2 souris non-infectées (*sham*).

### 3.5 Réplication dans le SNC du virus n'exprimant pas ns12.9

Dans le but de déterminer si le virus n'exprimant pas ns12.9 possédait tout de même la capacité de se répliquer au système nerveux central, le cerveau des souris infectées a été récolté à tous les deux jours post-infection pendant deux semaines. Ensuite, les homogénats de cerveaux ont été titrés par une méthode de détection des particules infectieuses par immunoperoxydase indirecte.

Comme mentionné précédemment, l'infection des souris de souche CD1 a été réalisée à une dose faible de  $10^{1.5}$  DICT<sub>50</sub>/10  $\mu$ L. Cette faible dose est suffisante, due à la grande susceptibilité des souris de souche CD1, pour causer un taux de mortalité de 50% chez les souris infectées avec le virus de type sauvage, comme observé à la figure 20. Toutefois, le seuil de détection de la méthode de titrage utilisée est d'un titre de  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/gramme de tissus puisque les échantillons ont été dilués 1/10 de façon à permettre le broyage et l'homogénéisation des cerveaux. Il s'avère donc difficile d'observer la courbe de réplication du virus à l'intérieur du cerveau des souris infectées. En effet, comme observable à la figure 21A, un titre infectieux de  $10^{2.75}$  DICT<sub>50</sub>/gramme de tissu était détectable pour le virus de référence, rOC/ATCC, au pic de l'infection au jour 7 post-infection. Autrement, la quantité de particules infectieuses dans les homogénats de cerveaux de souris de souche CD1 infectées ne dépassait pas le seuil de détection inhérent à la méthode de titrage utilisée. Toutefois, le titre infectieux dans le cerveau des souris infectées par le virus n'exprimant pas ns12.9 restait toujours plus petit ou égal à  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/gramme de tissu même au pic supposé de réplication, ce qui suggère que le virus n'était jamais détectable. Cela semblait donc indiquer une réplication plus faible de rOC/ns12.9stop comparé au virus de référence dans le cerveau des souris de souche CD1 infectées.

## A- Modèle CD1



## B- Modèle BALB/c

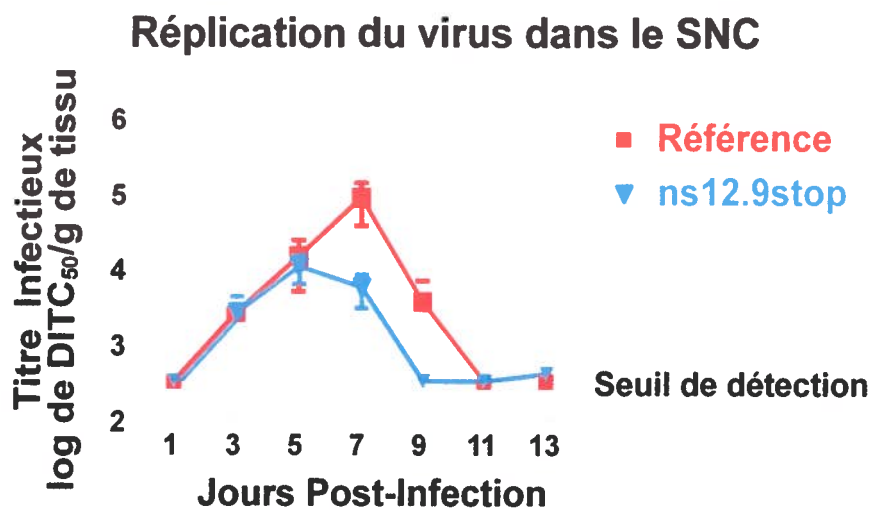


Figure 21 : Réplication dans le cerveau des souris infectées du virus n'exprimant pas la protéine ns12.9 comparée au virus de référence

Souris CD1(A) infectées à une dose de  $10^{1.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L et souris BALB/c (B) infectées à une dose de  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/10 $\mu$ L avec rOC/ns12.9stop ou le virus de référence, rOC/ATCC. Les graphiques A et B sont représentatifs de deux expériences où la dose infectieuse par gramme de tissu cérébral pour 3 souris/virus a été déterminée tous les deux jours post-infection. Le seuil de détection est de 2.5 log DICT<sub>50</sub>/gramme de tissu.

Néanmoins, la réplication du virus portant la mutation inactivatrice de l'expression de la protéine ns12.9 a été vérifiée au SNC à l'aide de la souche de souris BALB/c, qui a été inoculée à une dose de  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/10  $\mu$ L et dont les titres infectieux au cerveau suite à l'infection se retrouvaient au-delà de la limite de détection mentionnée précédemment. Il est donc possible d'observer à la figure 21B, la réplication de rOC/ns12.9stop comparé à rOC/ATCC à différents temps suivant l'infection intracérébrale dans les souris BALB/c. Le virus de référence a atteint son pic de réplication au J7 post-infection avant d'être éliminé du cerveau, ou à tout le moins de passer sous le seuil de détection de la méthode, à partir du J11. Le virus n'exprimant pas la protéine ns12.9 avait quant à lui un taux de réplication dix fois moins élevé que le virus de référence, n'atteignait pas le pic de réplication observable dans le cas du virus de type sauvage et commençait à être éliminé du cerveau des souris infectées à partir du J7 post-infection pour complètement passer sous le seuil de détection dès le J9. Le virus possédant la mutation inactivatrice de l'expression de la protéine ns12.9 n'atteignait donc pas un taux de réplication semblable au virus de référence lors de l'infection intracérébrale des souris BALB/c. Les deux résultats présentés à la figure 21 semblent donc indiquer qu'en absence de la protéine ns12.9, la réplication du coronavirus humain OC43 était atténuée dans le SNC des deux modèles d'infection murins.

## DISCUSSION

### 1. Hémagglutinine estérase (HE)

La protéine hémagglutinine estérase (HE) du coronavirus humain OC43 possède la capacité de lier le même type d'acide sialique que la protéine de surface S (Hogue *et al.*, 1989) ainsi qu'une activité acétyl estérase qui pourrait être associée à une activité de « destructeur de récepteur » (de Groot, 2006). Ces fonctions de la protéine pourraient être impliquées dans l'attachement des virions à la cellule cible mais aussi dans les étapes d'assemblage, de maturation, de transit à travers les membranes intracellulaires et de bourgeonnement des particules virales (de Groot, 2006). Bien entendu, son activité de « destructeur de récepteur » ainsi que sa capacité d'attachement aux cellules cibles pourraient aussi favoriser la dissémination du virus à l'intérieur de l'hôte, comme cela semble le cas pour le coronavirus murin et ainsi participer à la neurovirulence (Kazi *et al.*, 2005) (Pour plus de détails se référer aux sections 1.4.3.2 et 3.4.1.2 de l'État des connaissances). C'est donc dans le but de vérifier ces hypothèses que le gène codant pour la protéine HE a été délété, inactivé ou muté.

#### 1.1 Obtention des clones infectieux d'ADNc

Pour étudier le rôle de la protéine HE dans un contexte d'infection, de nombreuses stratégies ont été utilisées. Le PCR de chevauchement ayant permis la délétion complète du gène de l'hémagglutinine estérase a été élaboré en considérant les principes de transcription discontinue qui mène à la synthèse des ARNm sous-génomiques (sgARNm). En effet, selon le modèle accepté, chacune des protéines exprimées par le dernier tiers en 3' du génome du coronavirus humain OC43 possède son propre sgARNm et la séquence requise à la production de cet sgARNm se situe dans la région intergénique précédant chacun des gènes (Siddell et Snijder, 2008). Cette région régulatrice est nommée la séquence régulatrice de la transcription ou TRS (*transcription-regulating sequence*). Toutefois, même si le rôle des séquences régulatrices est assez bien connu, l'identification de ces séquences chez HCoV-OC43 a seulement été faite (St-Jean *et al.*, 2004) par homologie de séquence avec d'autres coronavirus et n'est toujours pas confirmée par des données expérimentales. De plus, dans certains cas, le TRS d'un gène se situe dans la séquence codante du gène précédent. Toutefois, même si cela ne semblait pas être le cas du gène de la protéine HE, l'effet de la délétion d'une région intergénique et, par le fait même, de l'altération de la transcription d'un sgARNm n'est pas connu. Ainsi, lors de l'élaboration du PCR de chevauchement, il a été convenu d'utiliser des amorces permettant la délétion ou encore la conservation de cette région intergénique. Les deux clones infectieux d'ADNc, celui dont le gène



de la protéine HE ainsi que la région intergénique le précédent ont été délétés et celui où seulement la portion codante du gène HE a été délétée, ont donc été construits. Toutefois, rien n'indique qu'il existait une différence dans la production de virus recombinants infectieux et de synthèse de la protéine S exprimée dans les cellules BHK-21 transfectées entre ces deux clones infectieux d'ADNc. Ainsi, seul le clone infectieux d'ADNc dont la région régulatrice du gène HE avait été délétée en même temps que la région codante, a été conservé et est identifié HEdel dans le présent mémoire. Il pourra toutefois être intéressant d'éventuellement comparer les résultats obtenus avec les deux types de virus recombinants obtenus à partir des clones infectieux d'ADNc dans les expériences subséquentes pour vérifier l'effet de la délétion de la région intergénique contenant le TRS.

Par ailleurs, il est possible de penser qu'une délétion de plus de 1200 paires de bases peut grandement entraver la réplication du coronavirus, en changeant la structure secondaire de certaines régions importante du génome d'ARN viral ou encore en empêchant les repliements et associations nécessaires aux mécanismes de réplication continue et discontinue. C'est pourquoi la mutagenèse dirigée a été utilisée pour introduire un codon de terminaison au tout début de la région codante de façon à empêcher la traduction de la protéine.

Finalement, la mutation de la sérine du site actif par une thréonine, de façon à inactiver l'activité acétyl estérase de la protéine HE, a été effectuée en se basant sur les résultats obtenus pour les coronavirus murins et bovins. En effet, le site actif supposé de l'activité acétyl estérase de la protéine HE de HCoV-OC43 a été déterminé par analogie avec ceux de MHV, pour lequel il s'agit en fait de la sérine en position 45 (Lissenberg *et al.*, 2005) et de BCoV, pour lequel il s'agit de la sérine en position 40 (Zeng *et al.*, 2008). Pour l'instant, il n'a pas été prouvé que la mutation S40T du gène de la protéine HE de HCoV-OC43 cause l'inhibition de son activité enzymatique. Toutefois, cette hypothèse est basée sur la grande homologie en séquence nucléotidique et en acides aminés que partage HCoV-OC43 avec les coronavirus murins (environ 60%) et les coronavirus bovins (plus de 95%) (Vijgen *et al.*, 2005).

Bien entendu, l'inhibition de l'activité acétyl estérase de la protéine HE chez le virus possédant la mutation S40T, ainsi que l'absence d'expression de la protéine HE chez le mutant HEstop devront être démontrées. Toutefois, l'effet de ces mutations, observé lors de la tentative infructueuse de production du virus recombinant (discuté à la prochaine section), laisse supposer que celles-ci étaient effectives.

## 1.2 Production infructueuse des virus recombinants infectieux

Comme présenté à la figure 8 de la section des résultats, la délétion du gène HE, l'inhibition de son expression par la présence d'un codon de terminaison ou la mutation de son site supposé d'activité acétyl estérase, empêchaient la détection de particules infectieuses recombinantes. En effet, la méthode de titrage par immunoperoxydase indirecte détecte seulement les particules virales capables d'infecter les cellules HRT-18. Or, il est possible que des particules virales étaient produites, mais qu'elles ne possédaient pas la capacité d'infecter les cellules utilisées dans la méthode. Ces particules virales non-infectieuses peuvent être détectées par d'autres méthodes, comme par exemple en microscopie électronique. Toutefois, la détection visuelle des particules virales avec un microscope électronique exige une grande concentration de virus et il s'agit d'une condition très difficile à atteindre sans amplification sur cellules HRT-18 suite à la transfection des cellules BHK-21 par le clone infectieux d'ADNc telle qu'effectuée dans le cadre de ce projet. Il est d'autant plus difficile d'atteindre une concentration de virions suffisante si les particules virales sont non-infectieuses puisqu'elles ne peuvent pas être amplifiées sur les cellules HRT-18 comme l'est normalement le virus de référence. Dans cette situation, il faut que les virus recombinants n'exprimant pas HE soit produits et amplifiés sur des cellules exprimant la protéine HE de façon constitutive; pour ce faire, un approche de complémentation pourrait être utilisée et sera abordée plus en détail dans la section 1.4. Une autre méthode de détection virale est l'observation de protéines virales dans l'échantillon, comme cela sera discuté dans la section 1.3. Toutefois, suite à la transfection des clones infectieux d'ADNc dans les cellules BHK-21, la détection de protéines virales permet seulement de se prononcer sur la transcription et la traduction du génome viral transfecté, sans réelle indication sur la présence de particules virales assemblées infectieuses ou non.

De plus, un autre détail est intéressant à noter. En effet, lors de la première tentative de production et d'amplification de virus n'exprimant pas la protéine HE, du virus recombinant a été détecté suite à la transfection du clone d'ADNc de pBAC-OC43 HEstop-A. Il s'est par contre avéré que le virus recombinant produit possédait une mutation au troisième codon, permettant la réversion de la mutation introduisant un codon de terminaison mais aussi un changement d'acide aminé pour un tryptophane au lieu de la leucine du virus de référence. Il semble que cette réversion permettait la production d'un virus recombinant viable, mais dont la réplication semblait atténuée si on comparait les taux d'amplification de HEstop-A#1 au virus de référence (Résultats, Section 1.2, Figure 8). Toutefois, l'effet de cette mutation sur la protéine HE n'est pas connu et le taux de virus recombinant produit n'était pas suffisant pour permettre de faire des

expérimentations pour le vérifier. De plus, cette réversion n'est apparue que lors d'une unique tentative de production de virus recombinant et ce type de résultat ne semblait pas être reproductible. Ce résultat anecdotique reste tout de même intéressant, car il témoigne d'une forte pression de sélection pour l'expression de la protéine HE. En effet, malgré une certaine stabilité des clones infectieux d'ADNc, connue au laboratoire grâce au suivi de l'introduction de mutations dans la protéine S (résultats non-montrés), l'acquisition rapide d'une réversion de la mutation empêchant la traduction de la protéine HE suggère que cette protéine est essentielle pour le virus.

### **1.3 Détection des protéines virales à l'intérieur des cellules transfectées**

Tel que démontré à la section 1.3 des résultats, l'observation de protéines virales à l'intérieur des cellules BHK-21 transfectées a permis de déterminer que les clones infectieux portant des mutations au niveau du gène HE ont été transfectés, transcrits et traduits avec la même efficacité que le virus de référence. En effet, une fois à l'intérieur de la cellule les clones infectieux d'ADNc semblent avoir été transcrits pour permettre, dans un premier temps, l'expression des protéines de la réplicase et, dans un deuxième temps, la synthèse par la polymérase virale des sgARNm qui permettent l'expression des protéines virales se situant dans la région 3' du génome, dont la protéine S, détectée par immunofluorescence. Le fait que le sgARNm de la protéine S, détectée à l'intérieur des cellules BHK-21 (figure 10), se retrouve après celui de la protéine HE d'un point de vue structurel et séquentiel dans le génome, semble indiquer que les mutations au niveau du gène HE n'affectent pas ces étapes du cycle de réplication viral.

Il semblerait donc que la protéine HE ne joue pas de rôle au niveau de la réplication du génome viral ou de la synthèse et l'expression des sgARNm. D'ailleurs, dans les études déjà publiées sur la protéine HE chez les autres coronavirus, entre autres par Popova et Zhang en 2002 pour BCoV et par Lissenberg et ses collègues en 2005 pour MHV, rien ne laissait présager une importance de la protéine HE au niveau de la réplication du génome. Toutefois, comme aucune particule infectieuse n'a pu être détecté, cela laisse supposer que HE, ou plus particulièrement son activité acétyl estérase, pourrait avoir un rôle dans les dernières étapes du cycle de réplication, c'est-à-dire au niveau de l'assemblage, de la maturation ou du bourgeonnement des virions. De plus, il est aussi possible que la protéine HE ait un rôle dans les premières étapes du cycle de réplication, c'est-à-dire dans l'attachement et l'entrée du virion à l'intérieur de la cellule, puisqu'il est connu que la protéine HE possède, comme la protéine S responsable de l'attachement du virus au récepteur cellulaire, la capacité de lier les acides sialiques. De plus, un rôle de la protéine HE

dans les étapes primaires de l'infection empêcherait les particules virales d'être détectées avec la méthode de titrage utilisée, qui requiert une infection, et donc l'attachement et l'entrée du virus dans les cellules HRT-18.

Contrairement aux résultats obtenus pour le coronavirus humain OC43, la protéine HE du coronavirus murin, avec lequel HCoV-OC43 partage près de 60% d'homologie (Vijgen *et al.*, 2005), ne semble pas être nécessaire à la réplication du virus en culture cellulaire (Lissenberg *et al.*, 2005). Cette différence en apparence contradictoire peut s'expliquer en partie par la spécificité de liaison de la protéine HE des deux virus : la protéine HE de HCoV-OC43 lie les Neu5,9Ac<sub>2</sub>, alors que celle de MHV lie les Neu4,5Ac<sub>2</sub> (Wurzer *et al.*, 2002b). De plus, chez le coronavirus murin, l'activité de liaison aux acides sialiques semble être exclusivement associée à la protéine HE (Langereis *et al.*, 2010), alors que, chez le coronavirus humain OC43, l'acide sialique semble être un récepteur important de la protéine de surface S (Schwegmann-Wessels et Herrler, 2006). Ainsi, la délétion de la protéine HE de MHV ne devrait pas empêcher pas la liaison de la protéine S à son récepteur protéique CEACAM-1 (Williams *et al.*, 1991) ni empêcher les virions de bourgeonner de la cellule, ce qui expliquerait que la protéine HE n'est pas essentielle à l'infection par le coronavirus murin. Toutefois, dans le cas de HCoV-OC43, l'activité acétyl estérase de HE pourrait être essentielle pour permettre aux virions, retenus par une liaison aux acides sialiques, via les protéines S ou HE, de bourgeonner adéquatement de la cellule suite à l'infection. Ce genre d'activité destructeur de récepteur (RDE) est d'ailleurs essentiel pour la propagation des virus Influenza. En effet, à l'instar de HCoV-OC43, l'attachement des virus Influenza se fait via les acides sialiques et suite au bourgeonnement des virions nouvellement formés, l'activité RDE de la protéine neuraminidase (pour Influenza A et B) et de la protéine HEF (chez Influenza C) est nécessaire à la relâche des particules virales (Wagner *et al.*, 2002). C'est d'ailleurs sur ce principe que reposent certaines stratégies antivirales contre Influenza. En effet, parmi les antiviraux les plus utilisés pour soigner la grippe se retrouvent Tamiflu® (Roche) et Relenza® (GlaxoSmithKline) qui sont des inhibiteurs de la neuraminidase (Moscona, 2005). L'importance de prendre en considération le type de récepteur utilisé pour l'attachement du virus aux cellules cibles dans l'analyse des résultats obtenus parmi les différents coronavirus du genre *Betacoronavirus*, pourrait permettre d'expliquer les résultats obtenus pour le coronavirus bovin avec lequel HCoV-OC43 possède plus de 90% d'homologie (Vijgen *et al.*, 2005). En effet, comme mentionné dans l'état des connaissances (section 3.4.1.2), le rôle de la protéine HE du BCoV en contexte d'infection est encore sujet à débat puisque certaines expériences montrent son importance dans l'infection (Deregt *et al.*, 1989; Vlasak *et al.*, 1988) alors qu'une étude avec un

virus chimère de MHV et BCoV a démontré que la protéine HE n'est pas suffisante ni essentielle à la réplication du virus (Popova et Zhang, 2002).

#### **1.4 Complémentation de la production de virus recombinant et autres perspectives**

Afin de mieux comprendre le rôle de la protéine HE, il serait intéressant d'arriver à produire une quantité substantielle de particules virales infectieuses possédant des mutations à l'intérieur du gène codant pour cette protéine pour pouvoir réaliser des expérimentations subséquentes. Une concentration supérieure de virions pourrait permettre l'observation par microscopie électronique des étapes d'assemblage, de maturation et de relargage des particules virales à l'intérieur de la cellule transfectée ou infectée. En effet, la protéine HE, ou plus précisément son activité acétyl estérase, pourrait permettre aux virions de se détacher des acides sialiques qui sont non seulement présents à la surface cellulaire, mais aussi à la surface des membranes intracellulaires (Torrise et Pinto da Silva, 1984). Un attachement irréversible des virions pourrait les empêcher de poursuivre leur transit à travers le réseau du RE et du Golgi et les empêcher de bourgeonner à la surface cellulaire. Une quantité suffisante de particules virales pourrait aussi permettre d'observer l'effet de l'absence de la protéine HE sur l'attachement des particules virales aux cellules cibles, par exemple en marquant radioactivement les virions de façon à pouvoir les détecter (comme décrit précédemment pour HCoV-229E, (Lachance *et al.*, 1998)).

Pour réussir à produire du virus recombinant, la complémentation de la production des virus recombinants par la présence de protéine HE exogène dans les cellules BHK-21 transfectées serait une méthode de choix. En effet, si les clones infectieux possédant des mutations dans le gène de la protéine HE sont transfectés dans des cellules BHK-21 exprimant la protéine HE de façon constitutive, cela devrait permettre de rétablir la production de virus recombinant. Ainsi, en plus de confirmer que l'absence de détection de particules virales infectieuses en absence de HE ou de son activité acétyl estérase est directement associée à un rôle de la protéine HE, cette approche devrait permettre de produire du virus recombinant contenant la protéine HE dans sa structure, mais qui n'est pas exprimée dans son génome. Ces particules virales pourraient par la suite être utilisées pour vérifier les hypothèses concernant un rôle possible de la protéine HE dans le bourgeonnement et/ou dans l'attachement aux cellules cibles tel que mentionné précédemment.

Toutefois, pour des raisons encore inconnues, il s'est jusqu'à présent avéré difficile d'exprimer la protéine HE de façon constitutive à l'intérieur des cellules BHK-21. En effet, des populations de cellules BHK-21 transfectées avec différents vecteurs d'expression contenant le gène de la protéine HE (pIRES-HE-V5-GFP et pcDNA3.1/HE, Section 1.4 des Résultats) ont pu être

sélectionnées, à l'aide de la généticine, afin d'obtenir des cellules exprimant théoriquement la protéine HE de façon stable. Toutefois, l'analyse par RT-PCR n'a pas permis de détecter la présence de l'ARNm codant pour cette protéine accessoire. Cela semblerait indiquer que, pour une raison inconnue, la protéine HE n'était pas exprimée à l'intérieur de ces cellules. Il est toutefois à noter que le gène HE est bel et bien présent dans le vecteur d'expression et que la vérification par séquençage indique que ce gène devrait être transcrit adéquatement. De plus, le vecteur pcDNA3.1/HE ayant été transfecté dans les cellules BHK-21 l'a aussi été dans des HRT-18 (aussi sélectionnées) et au moins une des populations de ces cellules HRT-18 semblait exprimer le gène HE. De plus, une tentative de production des virus recombinants dont le gène de la protéine HE a été muté par la transfection de ces cellules sélectionnées n'a pas été concluante. Bien qu'il y ait la possibilité que ce type de complémentation ne soit pas suffisant à la restauration de la production de virus recombinant, ce résultat semblait plutôt confirmer que les populations de cellules sélectionnées n'exprimaient pas le gène de la protéine HE en quantité suffisante pour que son ARNm soit détecté. Ce résultat est surprenant considérant que les cellules BHK-21 transfectées par pcDNA3.1/HE ont été sélectionnées à l'aide d'un agent de sélection présent dans le vecteur d'expression. La survie des cellules transfectées devraient donc, théoriquement, être associée à la réussite de la transfection de pcDNA3.1/HE. Toutefois, il est possible que des variations d'expression de la protéine HE chez les différentes cellules à l'intérieur de la population de cellules BHK-21-HE expliquent l'absence de détection d'ARNm de la protéine HE dans les ARN totaux extraits de cette population. En effet, le problème semble se situer au niveau de l'expression du gène de la protéine HE dans les populations de cellules BHK-21 puisqu'il a été vérifié, par séquençage et par la détection de l'expression de l'ARNm de HE dans les cellules HRT-18 transfectées, que la construction du vecteur d'expression était fonctionnelle. Ainsi, la sélection clonale des cellules BHK-21 transfectées avec pcDNA3.1/HE est en cours pour tenter d'obtenir des clones exprimant fortement la protéine HE de façon à répéter l'expérience de complémentation de la production des virus recombinants dont le gène de la protéine HE a été muté.

De plus, d'autres expériences sont envisagées pour déterminer l'importance de la protéine HE dans différentes étapes du cycle de répllication. Notamment, il est possible d'inhiber l'activité acétyl estérase de HE à l'aide d'un inhibiteur chimique, le diisopropylfluorophosphate (DFP), connu pour inactiver l'activité enzymatique de la protéine HE du coronavirus bovin (Vlasak *et al.*, 1988) avec lequel HCoV-OC43 possède beaucoup d'homologie (Vijgen *et al.*, 2005). Ainsi, même si cet inhibiteur n'a jamais été utilisé pour le coronavirus humain, il pourrait être

envisageable de l'utiliser pour confirmer l'importance de l'activité acétyl estérase de HE lors de l'infection.

Finalement, comme mentionné dans la section précédente, il est nécessaire de tenir compte de la capacité de liaison aux acides sialiques de la protéine de surface S pour vérifier l'importance de la protéine HE. En effet, il est possible que la protéine HE, ou plus précisément son activité acétyl estérase, soit nécessaire pour le bourgeonnement adéquat à partir de la cellule suite à l'infection car les virions nouvellement formés pourraient être retenus par une liaison aux acides sialiques via les protéines S ou HE tout comme cela est observé chez le virus Influenza (Wagner *et al.*, 2002). Il serait donc intéressant de procéder à la transfection de lignées cellulaires CHO, disponibles au laboratoire, et mutantes dans leur métabolisme de production des différents types d'acides sialiques, éliminant ainsi leur présence à la surface cellulaire, (gracieuseté de Dr Howard L. Lipton, University of Illinois, Chicago) par les différents virus recombinants n'exprimant pas HE, ce qui permettrait possiblement d'observer le relargage de particules infectieuses dans le milieu en s'assurant que les virions nouvellement formés ne seront pas retenus par une liaison aux acides sialiques. Il est aussi possible de muter le site de liaison de la protéine HE à l'acide sialique de façon à pouvoir observer l'impact sur l'attachement des virions. L'acide aminé principalement responsable de cette liaison a été déterminé récemment dans une étude sur la protéine HE de BCoV (Zeng *et al.*, 2008) comme étant la phénylalanine en position 211. La protéine HE du coronavirus humain OC43 possède aussi cet acide aminé, il est donc envisageable que le remplacement de la phénylalanine par une alanine (F211A) soit suffisant pour inhiber l'interaction de HE avec les acides sialiques. La production de virus recombinant dont le site de liaison aux acides sialiques de la protéine HE a été muté (HE-F211A)\_ou la production de virus via la transfection des lignées cellulaires n'exprimant pas d'acides sialiques, permettraient de départager l'importance du rôle de la protéine HE, entre sa capacité de liaison à l'acide sialique et son activité de destructeur de récepteur.

## **2. Protéine non-structurale ns2**

La protéine non-structurale ns2 possède un domaine d'homologie avec la superfamille des phosphodiéstérases cycliques pouvant être associée à l'addition de la coiffe sur les ARN viraux (Mazumder *et al.*, 2002). Quoi qu'il en soit, la mutation du site actif supposé lié à cette fonction au sein de la protéine correspondante chez le coronavirus murin n'affectait nullement la réplication du virus en culture cellulaire ni la capacité de MHV à être neurovirulent. Toutefois, cette inhibition présumée de la fonction liée à l'ajout d'une coiffe sur les ARN viraux résultait en

une atténuation de la pathogénicité du MHV au niveau du foie (Roth-Cross *et al.*, 2009). Ces résultats concordent avec ceux d'autres publications qui semblent associer le rôle de la protéine ns2 à la relation hôte-virus (de Haan *et al.*, 2002a; Schwarz *et al.*, 1990; Sperry *et al.*, 2005). Dans le projet présenté dans ce mémoire, le gène codant la protéine ns2 a donc été inactivé ou en partie délété de façon à vérifier ces hypothèses chez le coronavirus humain OC43.

## 2.1 Obtention des clones infectieux d'ADNc

À l'instar du gène codant pour la protéine HE, celui de la protéine non-structurale ns2 a aussi été inactivé par mutagenèse dirigée sur un des premiers codons pour le transformer en codon de terminaison. De plus, la présence, de deux sites de restriction possédant des extrémités compatibles à l'intérieur du gène de la protéine ns2, permettait de retirer près de 50% de la région codante de la protéine avec facilité. Deux clones infectieux ont ainsi été construits : ns2stop et ns2stopdel. La présence d'un codon de terminaison au tout début du gène devrait être suffisante à inactiver l'expression de la protéine ns2 (virus ns2stop), mais suite à la réversion du codon stop présent dans le virus recombinant HEstop détectée par la présence de particules virales infectieuses lors de la première tentative de production de virus recombinant (figures 8 et 9), un deuxième clone infectieux permettant d'inactiver la protéine ns2 et dont la réversion était beaucoup moins envisageable avec une délétion d'une partie du gène, a aussi été construit (virus ns2stopdel). De plus, contrairement à la délétion du gène de la protéine HE qui possédait plus de 1200 paires de bases, la délétion à l'intérieur du gène de la protéine ns2 était de seulement 336 nucléotides. Ainsi, il serait étonnant que le simple fait de déléter une partie aussi restreinte du génome ait en soi un impact négatif sur la réplication virale puisque des délétions de cet ordre de grandeur ont déjà été effectuées entre autre sur le génome du coronavirus porcine TGEV (DeDiego *et al.*, 2007; Ortego *et al.*, 2003). De plus, puisque cette délétion se situait au milieu du gène ns2, elle n'impliquait pas de région régulatrice de transcription et ne devrait pas affecter la synthèse des sgARNm. Dans l'optique où le mutant ns2stopdel subirait une réversion de la mutation du codon de terminaison, la protéine exprimée serait sévèrement altérée par la délétion de près de la moitié de ces acides aminés et aussi par la délétion d'au moins une des histidines (H129) potentiellement associées à son activité supposée de phosphodiesterase cyclique (Mazumder *et al.*, 2002; Roth-Cross *et al.*, 2009). Les deux clones infectieux ainsi conçus devraient donc permettre de déterminer si la protéine non-structurale ns2 a un rôle lors de l'infection du SNC par le coronavirus humain OC43.



## 2.2 Détection de la protéine ns2 à l'intérieur des cellules infectées

Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine ns2 a permis la détection par immunofluorescence de la protéine ns2 dans les cellules infectées par les différents virus recombinants possédant ou non des mutations à l'intérieur du gène de ns2. Ceci a permis de confirmer l'absence d'expression de la protéine ns2 dans le cas de l'infection par rOC/ns2stopdel.

Toutefois, tel que montré en résultats (Section 2.2, Figure 12), il semble que certaines des cellules infectées par les virus rOC/ns2stop-A et -B, observables par la détection de la protéine S, exprimaient aussi la protéine non-structurale ns2. Il est donc possible que la mutation menant à la conversion du cinquième acide aminé de ns2 en codon de terminaison ait révertée lors de la production des virus recombinants ou encore que cette mutation n'était pas suffisante pour empêcher la traduction de la protéine ns2. Le séquençage de l'ARN viral suite aux deux amplifications dans les cellules HRT-18 (P2) a montré que la mutation de terminaison était toujours présente. Ainsi, soit la population de virus ayant révertés représentait une sous-population ou quasi-espèce, trop peu représentée pour être facilement détecté lors du séquençage de l'ARN viral, mais pouvant être observé dans quelques unes des cellules infectées, soit la mutation n'était pas suffisante pour empêcher complètement la traduction de la protéine. Le fait que, contrairement au virus de référence, ce n'était pas toutes les cellules infectées qui exprimaient la protéine ns2, laisse croire que la mutation était efficace, mais qu'une certaine partie de la population apparemment hétérogène des virus recombinants ait révertée. Pour arriver à isoler ces virus recombinants exprimant ns2 et confirmer la réversion de la mutation, il serait nécessaire de vérifier par séquençage une grande quantité de clones provenant de l'amplification de cette région par RT-PCR.

Il est pour l'instant impossible de déterminer si l'effet observé était associé à des problèmes techniques de production de virus ou si cela témoignait d'une quelconque pression de sélection. Toutefois, la cinétique de répllication, semblable au virus de référence, des virus n'exprimant pas la protéine ns2, montrée à la figure 13 des résultats et discutée ci-après à la section 2.3, ne laissaient pas présager un rôle essentiel de la protéine ns2 qui justifierait une telle pression de sélection.

Finalement, puisqu'ils présentaient des niveaux différents d'expression de la protéine ns2 à travers la population de cellules infectées (figure 12), les deux types de virus recombinants ont été utilisés pour les expériences subséquentes de façon à tenter d'observer une variation de type « dose-dépendante » en fonction de la quantité de protéine ns2 exprimée.

### **2.3 Cinétique de répllication des virus n'exprimant pas ns2**

L'infection des cellules neuronales humaines LA-N-5 a montré que la cinétique de répllication des virus recombinants dont le gène de la protéine ns2 a été muté, était en tout point semblable à celle du virus recombinant de référence (figure 13). En effet, la mutation de ns2 ne semblait pas avoir d'effet sur la répllication du virus, indiquant donc que cette protéine ne semblait pas essentielle à la complétion du cycle de répllication dans les cellules neuronales. Par ailleurs, des résultats préliminaires (visuellement par l'observation des effets cytopathiques en microscopie optique ou par l'utilisation d'un test colorimétrique MTS/PMS mesurant le métabolisme mitochondrial associé à la viabilité cellulaire) se basant sur une seule expérience (résultats non-montrés), ne semblaient indiquer aucune différence significative sur la viabilité des cellules infectées en comparant avec le virus de référence. Il est donc étonnant de ne constater aucune différence dans la répllication du virus n'exprimant pas ns2 puisque la réversion de deux clones possédant une mutation de terminaison laissait croire à une pression de sélection élevée. Ainsi, il serait nécessaire de revérifier ces résultats, de façon à confirmer qu'aucun effet n'est observable au niveau de la viabilité des cellules. De plus, pour l'instant, la cinétique de répllication a été établie sur les cellules LA-N-5 différenciées en neurone. Il pourrait alors être intéressant de répéter l'expérience avec d'autres lignées cellulaires neuronales ou non. Toutefois, il est à noter qu'aucune différence significative n'a été observée entre les virus mutants de ns2 et le virus de référence lors des amplifications sur les cellules HRT-18 (P1 et P2). En effet, la quantité de virus recombinant possédant des mutations dans le gène de la protéine ns2 retrouvée suite à la deuxième amplification sur cellules HRT-18 (P2) était similaire à la quantité obtenue pour le virus de référence. De plus, c'est d'ailleurs sur les cellules HRT-18 qu'a été effectuée la détection de la protéine ns2 et la quantité de cellules infectées est semblable d'un virus à l'autre (figure 12). Il semble donc que l'absence d'effet au niveau de la répllication des virus n'exprimant pas ns2 n'était pas exclusif à une lignée cellulaire en particulier. Toutefois, les résultats obtenus suite à l'infection *in vivo* à l'aide d'un modèle murin (section 2.4) suggéraient qu'il pourrait être intéressant de comparer la répllication des virus sur des cultures primaires mixtes issues du SNC murin.

### **2.4 Études du rôle de la protéine ns2 dans un modèle murin d'infection du SNC**

Les données obtenues suite aux expérimentations sur deux souches de souris différentes, CD1 et BALB/c, permettaient de constater que l'absence complète de la protéine ns2 (virus ns2stopdel) semblait retarder l'apparition de la neurovirulence et de la mortalité de HCoV-OC43. Par contre, cet effet n'était pas observable lors d'une infection par rOC/ns2stop ce qui pourrait s'expliquer

par l'expression de la protéine ns2 à un faible niveau, observée dans les cellules HRT-18 infectées. Cette réversion de la mutation semble s'être produite pendant ou après la production de virus recombinant, puisque le clone infectieux pBAC-OC43 ns2stop possédait le codon stop au début du gène de ns2 comme indiqué dans la figure 11. Or, lors de l'infection des cellules HRT-18 par rOC/ns2stop, certaines cellules exprimaient la protéine ns2. Il est donc possible que la pression de sélection *in vivo* soit plus élevée et que la sélection des virus ayant révertés soit plus rapide, ce qui expliquerait que la courbe de survie des souris infectées par rOC/ns2stop était similaire à celle des souris infectées par le virus de référence. Il aurait par ailleurs été intéressant d'effectuer l'extraction de l'ARN des cerveaux de souris infectées par rOC/ns2stop pour procéder au séquençage du gène ns2 de façon à détecter la présence ou non de la mutation de terminaison, comme cela a été fait pour le virus rOC/ns12.9stop. Quoi qu'il en soit, le virus recombinant possédant uniquement un codon stop au début du gène de ns2 ne sera pas pris en compte pour le restant de l'analyse.

Ainsi, un délai dans l'apparition des symptômes d'encéphalite et de la mortalité des souris de souche CD1 infectées par le virus dont une partie du gène de la protéine ns2 a été délété, était observable comparé au virus de référence. De plus, malgré le fait que l'expérience devra être répétée avec une quantité de souris plus élevée pour être statistiquement valable, cette différence semblait aussi se refléter sur la survie des souris de souche BALB/c, moins sensibles à l'infection (Résultat, Section 2.4, Figure 14).

Le délai dans l'apparition des symptômes et de la mortalité en absence de ns2, peut être relié à l'activité supposée de phosphodiesterase cyclique (CPD) de la protéine ns2. La protéine pourrait avoir un rôle dans la réplication virale qui n'aurait pu être mis en évidence en culture cellulaire puisque représentant un changement trop subtil, mais qui pourrait être magnifié par l'infection *in vivo*. Il s'agit d'ailleurs de l'hypothèse avancée dans le cas du coronavirus murin pour expliquer l'atténuation de la pathogénèse au foie en absence d'un effet sur la réplication virale en culture cellulaire lors de la mutagenèse du site actif supposé de l'activité CPD (Roth-Cross *et al.*, 2009). Toutefois, aucun effet n'a été observé par cette équipe lors de l'infection du SNC. Par contre, la mutation de la protéine nsP3 du virus Sindbis, possédant un domaine phosphoestérase similaire, mène à une réduction de la mortalité neuronale et de la neurovirulence en souris, mais ne semble pas essentielle à la réplication du virus (Park et Griffin, 2009). Ainsi, ce changement subtil dans la réplication aurait ainsi possiblement pu être observé lors de l'infection de d'autres lignées cellulaires ou mis en évidence en effectuant une infection persistante de lignées cellulaires neurales ou non ou encore suite à l'infection de cultures primaires mixtes issues du SNC murin.

Toutefois, la cinétique de réplication au SNC du virus n'exprimant pas ns2 n'était pas atténuée comparée au virus de référence : rOC/ns2stopdel était seulement éliminé moins rapidement. Par ailleurs, l'activité CPD de la protéine ns2 ou de d'autres protéines homologues, n'a toujours pas été démontrée chez les coronavirus (Mazumder *et al.*, 2002; Roth-Cross *et al.*, 2009), il est donc possible que la protéine ns2 soit multifonctionnelle et que l'effet observé ne soit pas associé à cette activité enzymatique.

Le délai dans la mortalité des souris infectées et l'élimination moins rapide du virus n'exprimant pas ns2 peuvent aussi être expliqués par une dissémination restreinte du virus rOC/ns2stopdel dans le cerveau des souris infectées. En effet, des protéines accessoires d'autres virus ont déjà été associées à la dissémination du virus dans l'hôte, comme la protéine Vpu du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Malim et Emerman, 2008). Pour vérifier cette hypothèse, une expérience préliminaire a été réalisée. En effet, des coupes histologiques ont été obtenues à partir des cerveaux des souris infectées et même s'il était difficile de se prononcer sur la significativité réelle de la cinétique de dissémination entre les zones infectées, il ne semblait pas y avoir de restriction au niveau de la dissémination du virus n'exprimant pas ns2 dans les différentes zones du cerveau (figure 16). Par ailleurs, pour mieux se prononcer sur la dissémination du virus au SNC, il serait intéressant de procéder à une inoculation intranasale, de façon à observer le cheminement du virus à partir de son entrée au cerveau par le bulbe olfactif jusqu'à la moelle épinière. Cette inoculation permettrait ainsi d'éliminer les variations d'une souris à l'autre dues site d'injection intracérébrale et de mieux se prononcer sur la cinétique de dissémination du virus dans les différentes régions infectées. Toutefois, il est aussi possible de causer des variations dans la véritable quantité de virus inoculés par cette méthode qui nécessite l'inhalation du virus par les souris.

D'un autre point de vue, les résultats obtenus avec le virus recombinant n'exprimant pas la protéine ns2 (rOC/ns2stopdel) peuvent être expliqués par la capacité de la protéine ns2 à interagir avec l'hôte de façon à modifier la réplication du virus ainsi que la neurovirulence qui lui est associée. Le fait que le virus n'exprimant pas la protéine ns2 demeurait présent au cerveau pour une période de temps plus longue que le virus de référence, laisse penser que le système immunitaire, responsable de l'élimination du virus, était moins efficace en l'absence de la protéine ns2. Par ailleurs, l'élimination du virus de référence se produisait graduellement à partir du J7 post-infection, ce qui coïncide généralement avec la migration des cellules T effectrices suite à une infection (Parham, 2000), alors que le virus n'exprimant pas la protéine ns2 commençait plutôt à être éliminé plus tard (après le J11, figure 15) lors de l'infection, ce qui

appuie l'hypothèse d'une réponse immunitaire moins efficace. Cette hypothèse concorderait aussi avec le délai dans l'apparition des symptômes et de la mortalité dans l'optique où ceux-ci pourraient être en partie immunomédiés (Butler *et al.*, 2006; Jacomy *et al.*, 2010). Ainsi, une activation moins efficace du système immunitaire pourrait mener à une élimination moins rapide du virus et à un délai dans la neurovirulence.

Puisque la réponse immunitaire mène généralement à l'élimination du virus, une activation accrue du système immunitaire est difficilement réconciliable avec la fonction d'une protéine virale puisque si cela était le cas, rien ne justifierait la conservation de cette protéine lors de l'évolution. Toutefois, il est possible que cette activation accrue présumée du système immunitaire soit en fait une conséquence de la fonction réelle de la protéine ns2. Ainsi, le rôle de la protéine non-structurale ns2 pourrait être associé à de nombreux facteurs, comme par exemple la capacité du virus à causer des dommages neuronaux qui peuvent induire de la neuroinflammation et éventuellement provoquer la dispersion d'épitopes viraux. Dans cette hypothèse, en l'absence de la protéine non-structurale ns2, une diminution des effets cytopathiques et de l'inflammation causés par l'infection, diminuerait la quantité de cytokines et chimiokines libérées, menant ainsi à une moins grande stimulation de la réponse immunitaire ou une moins grande reconnaissance des épitopes viraux par le système immunitaire. Les mécanismes par lesquels ns2 serait impliquée dans la neurodégénérescence ou dans la neuroinflammation restent à ce jour inconnu, mais cette hypothèse concorderait avec une élimination moins rapide du virus au cerveau ainsi qu'à un délai dans l'apparition de la pathologie. Par ailleurs, la protéine accessoire 3a du SARS-CoV a aussi été associée à une activation accrue du système immunitaire par sa capacité à causer des effets cytopathiques suite à l'infection (Lu *et al.*, 2009). De plus, il a aussi été démontré que la protéine accessoire 3a du SARS-CoV possédait la capacité d'activer fortement la réponse immunitaire humorale et cellulaire. En effet, une immunisation par la protéine 3a déclenche la production d'IFN $\gamma$  et d'Interleukine-2, deux cytokines impliquées dans le développement de la réponse immunitaire adaptative (Lu *et al.*, 2009). Cette hypothèse pourra être vérifiée par la détection de neurodégénérescence ou l'observation d'une augmentation de l'activation des microglies ou des astrocytes sur des coupes histologiques des cerveaux infectés par le virus n'exprimant pas ns2 comparé au virus de référence. Il serait aussi intéressant de procéder à des études de cytomètre en flux pour observer l'infiltration des lymphocytes au SNC à différents temps post-infection de façon à établir une cinétique de la réponse immunitaire.

### 3. Protéine non-structurale ns12.9

La protéine accessoire la moins bien caractérisée du coronavirus humain OC43 est probablement la protéine non-structurale ns12.9. Cette protéine est codée par l'ORF4 chez HCoV-OC43, mais des homologues sont retrouvés chez les autres membres du genre *Betacoronavirus* codés par l'ORF5a, comme pour les coronavirus bovins et murins. Une étude de délétion complète de cet homologue de ns12.9 chez MHV semble indiquer une atténuation de la virulence, mais cet effet a été associé à la délétion du gène en soi. En effet, la délétion de l'homologue de ns12.9 chez MHV semblait altérer l'expression de la protéine de l'enveloppe puisque ces deux protéines partagent le même cadre de lecture chez le coronavirus murin (de Haan *et al.*, 2002a). Toutefois, l'ORF5a du coronavirus murin a récemment été associé à un rôle d'antagoniste à la réponse IFN suite à des expérimentations en culture cellulaire avec des virus chimères recombinants entre la souche prototype de MHV-A59 et une souche, MHV-S, manifestant une sensibilité supérieure à l'IFN ((Koetzner *et al.*, 2010). C'est donc dans l'objectif d'étudier le rôle de la protéine ns12.9 de HCoV-OC43 dans l'infection du système nerveux central en modèle cellulaire et en modèle animal murin que l'expression du gène codant pour cette protéine accessoire a été inactivée par l'introduction d'un codon stop.

#### 3.1 Obtention du clone infectieux d'ADNc n'exprimant pas ns12.9 et conservation de la mutation inactivatrice

Comme cette petite protéine non-structurale de 109 acides aminés ne possède pas d'activité enzymatique connue, une seule stratégie de mutagenèse a été utilisée pour inactiver l'expression de la protéine ns12.9. En effet, à l'instar des autres protéines accessoires, un des premiers codons du gène de la protéine ns12.9 a été changé pour un codon de terminaison. Cette mutation n'a pas nuit à la production de virus recombinant qui ont pu être produits à un titre similaire au virus recombinant de référence. Le séquençage du virus recombinant produit a permis de démontrer la présence et la conservation du codon de terminaison au début du gène de la protéine ns12.9. Toutefois, la non-disponibilité d'un anticorps contre la protéine ns12.9 a rendu impossible la confirmation de l'absence de la protéine dans les cellules infectées. Ainsi, rien n'indiquait que la protéine ns12.9 ne pouvait pas être tout de même exprimée, comme c'était le cas pour rOC/ns2stop. Toutefois, la mutation inactivatrice était conservée même après 5 jours post-infection intracérébrale en souris et une différence notable était observée dans la neurovirulence et la réplication de rOC/ns12.stop comparé au virus de référence. Cela indiquait donc que, non seulement la mutation inactivatrice était conservée (aucune sous-population de virus n'était

détectable dans le chromatogramme de séquençage), ce qui laisse croire que la très grande majorité des virus pouvant se répliquer dans le SNC des souris continuait d'arborer la mutation dans le gène de la protéine ns12.9, mais qu'elle semblait aussi être efficace pour empêcher la traduction de la protéine ns12.9. Parmi les moyens pour détecter la présence de la protéine ns12.9, un anticorps est présentement en cours de fabrication dans le laboratoire.

### **3.2 Cinétique de répllication du virus n'exprimant pas ns12.9**

La protéine ns12.9 ne semble pas essentielle ou nécessaire à la répllication du virus en culture cellulaire puisque le virus recombinant portant la mutation inactivatrice de son expression avait une cinétique de répllication similaire au virus de référence. De plus, il semble aussi que l'absence de la protéine ns12.9 n'avait pas d'effet sur la viabilité des cellules infectées (résultats non-montrés, une seule expérience). Toutefois, il pourrait être intéressant de vérifier ces résultats en utilisant d'autres lignées cellulaires. Néanmoins, ces résultats semblent confirmer l'hypothèse que le rôle de la protéine non-structurale ns12.9 se situe plutôt probablement au niveau de l'interaction avec l'hôte.

À la lumière des résultats obtenus en culture cellulaire (figure 19) et considérant l'impossibilité de détecter la présence de la protéine ns12.9 en absence d'anticorps, il est possible de se questionner à savoir si cette protéine était réellement produite chez le virus de référence et si la traduction était réellement inactivée chez le virus portant le codon stop. Toutefois, la différence très importante obtenue en lien à la mortalité induite chez les souris infectées par rOC/ATCC et rOC/ns12.9stop (section 3.4 des résultats) indiquaient que la protéine ns12.9 semble jouer un rôle très significatif au niveau de la neurovirulence du coronavirus humain OC43.

### **3.3 Études du rôle de la protéine ns12.9 dans un modèle murin d'infection du SNC**

Étonnamment, même s'il n'y a aucune différence dans la répllication du coronavirus en l'absence de la protéine ns12.9 en culture cellulaire, les souris infectées par rOC/ns12.9stop ne présentaient aucun symptôme d'encéphalite et survivaient à un taux de 100% à l'infection intracérébrale. En comparaison, et selon la souche, les souris infectées par le virus de référence mourraient à un taux allant de 10% pour les BALB/c à 50% pour les CD1 et présentent, dans tous les cas, des symptômes graves d'encéphalite. La neurovirulence et le pourcentage de mortalité induite par le virus n'exprimant pas ns12.9 semblaient donc sévèrement diminués comparé au virus de référence. Toutefois, même si les souris ne présentaient aucun signe d'encéphalite observable par une apathie, une déshydratation, un manque de réflexe et une posture avec un dos courbé (Jacomy

et Talbot, 2003), celles-ci semblaient tout de même atteintes à un certain niveau par l'infection puisque leur courbe de croissance ne suivait pas celle des souris non-infectées (Résultats, Section 3.4, Figure 20). Puisque leur phénotype de croissance semblait intermédiaire entre les souris infectées par le virus de référence et les souris non-infectées et que la mortalité et les symptômes d'encéphalite étaient complètement atténués, il est possible d'affirmer que la protéine ns12.9 semble jouer un rôle dans la relation virus-hôte.

Dans le but de vérifier si le virus n'exprimant pas ns12.9 possédait tout de même la capacité de se répliquer dans le SNC des souris infectées intracérébralement, une cinétique de répllication au niveau du cerveau des souris infectées a été établie. Malgré l'écart dans le titre viral au cerveau des souris BALB/c infectées par le virus recombinant de référence au jour 9 post-infection (figure 21B), le virus rOC/ns12.9stop se répliquait à un taux dix fois moins élevé et était éliminé plus rapidement, puisque, lors de trois infections, aucune particule virale n'a été détectée après le jour 7 post-infection dans les souris infectées. Il semble donc que ns12.9 confère un avantage réplcatif au virus lors de l'infection du SNC et/ou que son absence résulte en une induction plus forte du système immunitaire et donc en une élimination plus rapide des particules virales au cerveau.

Lors de la délétion complète du gène codant pour l'homologue de ns12.9 chez le coronavirus murin, une atténuation de la virulence avait aussi été observée de même d'une diminution de la répllication en culture cellulaire (de Haan *et al.*, 2002a). Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus avaient plutôt été associés à la délétion du gène en soi, puisque la délétion de l'ORF5a chez MHV nuisait à l'expression de la protéine de l'enveloppe (E), codée par l'ORF5b. Dans le cas du coronavirus humain OC43, la protéine ns12.9 est encodée par l'ORF4 et ne semble donc pas être associée à l'expression de la protéine de l'enveloppe par la présence d'un site interne d'entrée du ribosome (*Internal ribosome entry site* ou IRES) comme cela semble le cas pour le coronavirus murin (de Haan *et al.*, 2002a). De plus, la stratégie de mutation utilisée pour l'inactivation de l'expression de la protéine ns12.9 de HCoV-OC43 était l'introduction d'un codon de terminaison. Le cadre de lecture ainsi que les séquences de régulation associées à ns12.9 étaient donc conservées intactes. Il y a donc peu de chance pour que la mutagenèse de ns12.9 chez HCoV-OC43 puisse nuire à l'expression de d'autres protéines virales, telle que E. À la lumière de ces arguments, la différence observée dans la neurovirulence et la répllication du virus rOC/ns12.9stop comparé au virus de référence semble être bel et bien associée à l'absence de la protéine ns12.9.



Une explication possible liée aux résultats observés à la figure 21, serait que la protéine ns12.9 contribue à un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte infecté par le coronavirus humain OC43. Comme le virus recombinant n'exprimant pas ns12.9 commençait à être éliminé du cerveau dès le jour 5 après l'infection et qu'il est accepté que la migration des cellules T effectrices de système immunitaire adaptatif s'effectue en général seulement à partir du J7 post-infection (Parham, 2000), il est probable que la réponse immunitaire impliquée dans l'évasion virale associée à la protéine ns12.9 soit plutôt un mécanisme de réponse innée. D'ailleurs, les interférons (IFN) de type I font partie d'un système de réponse immunitaire innée souvent activé lors d'infection virale. Leur activation a par ailleurs été observée lors de l'infection par d'autres membres du genre *Betacoronavirus* comme MHV (Cervantes-Barragan *et al.*, 2007) et SARS-CoV (Cinatl *et al.*, 2003). De plus, le système d'IFN de type I est essentiel à l'élimination de MHV lors de l'infection *in vivo* (Ireland *et al.*, 2008). Chez MHV et SARS-CoV, la protéine nsp1 a été associée à un mécanisme de réponse à l'IFN par la suppression de l'expression des gènes de l'hôte, incluant ceux des IFN de type 1 (Wathelet *et al.*, 2007; Zust *et al.*, 2007). Toujours chez le coronavirus associé au SRAS, la protéine de la nucléocapside et deux protéines accessoires, codées par les ORF 3b et 6, ont été associées à l'inhibition de la production et de la signalisation des IFN (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007). Il est donc possible que plus d'une protéine virale soit associée à la réponse aux IFN. Dans la famille *Orthomyxoviridae*, la protéine NS1, présente chez les virus Influenza A et B, est aussi associée à une régulation pré- et post-transcriptionnelle des IFN de type 1 (Hale *et al.*, 2008). De plus, récemment, la protéine codée par l'ORF5a chez MHV-A59 a aussi été associée à une fonction d'antagoniste à l'action antivirale des IFN (Koetzner *et al.*, 2010). Comme le gène codant pour la protéine ns12.9 de HCoV-OC43 montre près de 50% d'identité de séquence (Vijgen *et al.*, 2005) avec le gène 5a de MHV-A59, il est possible de penser que ns12.9 pourrait aussi avoir un rôle important dans le mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire innée médiée par les IFN. Par ailleurs, les résultats obtenus pour la protéine ns12.9 étaient très semblables à ceux obtenus avec un mutant possédant une délétion à l'intérieur de nsp1 chez MHV, c'est-à-dire que la réplication du virus semblait normale en culture cellulaire, mais que la pathologie était complètement atténuée *in vivo* et que la réplication du virus était sévèrement diminuée (Zust *et al.*, 2007).

Le fait que la cinétique de réplication de rOC/ns12.9stop en culture cellulaire n'était pas altérée comparée au virus de référence n'est pas nécessairement contradictoire avec l'hypothèse de l'implication de ns12.9 dans le mécanisme d'évasion à la réponse aux IFN. En effet, ce genre de résultat a été observé suite à la délétion d'une partie du gène de la protéine nsp1 chez MHV (Zust

*et al.*, 2007). Il est possible que les lignées cellulaires utilisées pour la production de virus recombinant (HRT-18) et l'infection (LA-N-5 différenciées en neurones) par le virus recombinant n'exprimant pas ns12.9 ne puissent monter une réponse antivirale à l'IFN efficace menant à l'inhibition de la réplication de HCoV-OC43 puisqu'il s'agit de lignées provenant de cellules cancéreuses dont la capacité de réponse aux IFN peut avoir été altérée.. Ainsi, la capacité de production des IFN de ces deux lignées cellulaires devra être vérifiée. Il est aussi possible, tout comme c'est le cas pour le SARS-CoV (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007), que le coronavirus humain OC43 possède plus d'une protéine virale responsable de l'échappement à ce mécanisme de réponse immunitaire innée et que ces autres antagonistes aux IFN soient suffisants pour permettre une bonne réplication du virus en culture cellulaire.

Un moyen de confirmer le rôle de la protéine non-structurale ns12.9 dans l'échappement à la réponse immunitaire innée liée à la réponse aux IFN serait de procéder à l'infection de souris déficientes en IFN, de façon à vérifier si la pathologie du virus recombinant n'exprimant pas ns12.9 est restaurée. Une autre méthode, *in vitro* cette fois-ci, serait de procéder à l'infection de lignées cellulaires pré-stimulées par la présence d'IFN pour observer si la réplication de rOC/ns12.9stop est atteinte comparée au virus de référence. Finalement, il serait aussi intéressant de caractériser histologiquement de quelle façon la pathologie est atténuée lors de l'infection au SNC en utilisant par exemple des marqueurs de neurodégénérescence et en observant la dissémination du virus dans le cerveau et la moelle épinière.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le coronavirus humain OC43 est un virus respiratoire, associé principalement à des rhumes saisonniers chez la population en général et à de possibles complications plus graves comme les pneumonies et l'asthme chez les populations plus à risque comme les personnes âgées ou immunosupprimées. Toutefois, il est clair que ce virus possède aussi la capacité d'envahir et d'infecter le système nerveux central. L'infection en modèle murin ainsi que la présence d'ARN viraux ou d'anticorps contre le coronavirus humain dans le SNC, entre autre chez les patients atteints de maladies neurodégénératives, permettent de suggérer une implication possible de HCoV-OC43 dans le développement de neuropathologies. La réponse immunitaire provoquée par l'infection ou encore des facteurs génétiques associés à l'hôte peuvent participer à l'établissement de symptômes neurologiques. Ce rôle peut aussi être associé à certaines protéines issues du gène de la réplicase ou aux protéines structurales du coronavirus. Toutefois, les protéines accessoires, qui ne semblent pas posséder de rôle dans la réplication du virus en culture cellulaire, peuvent aussi être des déterminants de la pathologie. La présente étude s'intéressait donc au rôle des protéines accessoires du coronavirus humain OC43, HE, ns2 et ns12.9 dans l'infection du système nerveux central.

Les gènes codant les différentes protéines accessoires du coronavirus humain OC43, HE, ns2 et ns12.9 ont donc été délétés, inactivés ou mutés à l'aide d'un système de génétique inverse de façon à étudier le rôle de ces protéines lors de l'infection des cellules cibles du système nerveux central, les neurones, en culture cellulaire ou lors de l'infection du SNC dans un modèle murin.

Ces travaux ont permis de démontrer que l'absence de la protéine HE ou de son activité acétyl estérase a rendu impossible la production de virus recombinants infectieux, suggérant que la protéine HE est essentielle à la réplication virale. Ce résultat, en apparence contradictoire avec ceux obtenus pour le coronavirus murin (Kazi *et al.*, 2005; Lissenberg *et al.*, 2005), peut s'expliquer en partie par la différente spécificité de liaison de leur protéine de surface S. Quoiqu'il en soit, il apparaît que, contrairement à ce qui est accepté au niveau des écrits sur le sujet, la protéine HE ne semble pas être accessoire à la réplication du coronavirus humain OC43. Il sera intéressant de confirmer ce résultat en procédant à la complémentation de la production de virus recombinant possédant des mutations dans le gène de la protéine HE puis, de déterminer à quelles étapes de l'infection la protéine HE joue un rôle important et comment ses fonctions se répercutent sur les capacités neurovirulentes du coronavirus.

D'autre part, les virus recombinants dont les gènes ns2 ou ns12.9 ont été inactivés, ont montré une cinétique de réplication semblable à celle du virus sauvage de référence en culture cellulaire. Ces protéines non-structurales ne semblent donc pas avoir de rôle essentiel dans la réplication virale *in vitro*. Par contre, des essais d'infection du SNC de souris ont démontré que l'absence de la protéine ns2 provoquait un délai dans l'apparition de la neurovirulence et de la mortalité, associé à une élimination moins rapide du virus au SNC. Une atténuation de la neurovirulence avait déjà été observée chez le coronavirus murin suite à la délétion complète des gènes de la protéine ns2 et HE (de Haan *et al.*, 2002a), mais dans ce mémoire, il s'agit de l'impact de la mutation du gène de la protéine ns2 uniquement qui est mis en lumière. De plus, contrairement aux résultats obtenus pour le coronavirus murin (de Haan *et al.*, 2002a), l'absence d'expression de la protéine ns2 chez HCoV-OC43 ne diminue pas la dose létale à 50%, mais cause plutôt un délai dans l'apparition de la mortalité. L'absence de la protéine ns2 a donc un effet sur la neurovirulence et la relation hôte-virus lors de l'infection du SNC. Dans le cas du coronavirus murin, la mutation des histidines associées au domaine de phosphodiesterase cyclique supposé de la protéine ns2 a été associée à une atténuation de la virulence lors d'une infection intra-hépatique, alors qu'aucun effet n'avait été observé sur la neurovirulence (Roth-Cross *et al.*, 2009). Tel que présenté en section 2.4 et 2.5 des Résultats et discuté à la section 2.4 de la Discussion, la protéine ns2 du HCoV-OC43 a possiblement un rôle associé à une modulation de la réponse immunitaire adaptative de l'hôte. Ainsi, il sera intéressant de vérifier l'hypothèse d'une implication de cette protéine dans une activation accrue du système immunitaire lors de l'infection du SNC. Cette activation accrue de la réponse immunitaire pourrait être associée à une augmentation de la neurodégénérescence et de la neuroinflammation en présence de la protéine ns2. Ces hypothèses pourront être vérifiées par des études d'immunohistochimie sur des coupes de cerveaux infectés.

Dans le cas de l'absence de la protéine ns12.9, les essais d'infection *in vivo* ont démontré une atténuation complète de la neurovirulence associée à une diminution de la réplication du virus au SNC. Si on ne tient pas compte de l'atténuation de la neurovirulence en souris, qui a été associée à la délétion en soi de l'ORF codant pour l'homologue de la protéine ns12.9 chez le coronavirus murin (de Haan *et al.*, 2002a), ce résultat étonnant, lié à un rôle potentiel de la protéine accessoire ns12.9 de HCoV-OC43 dans l'infection du système nerveux central, ne possède pas de précédents rapportés dans la revue des écrits scientifiques. Une étude récente réalisée avec MHV a suggérée que la protéine ns12.9 était un antagoniste important de la réponse aux interférons (IFN) (Koetzner *et al.*, 2010). Toutefois, ce rôle dans la défense contre la réponse immunitaire innée,

qui concorderait avec les résultats obtenus lors de cette présente étude portant sur le HCoV-OC43, n'a toujours pas été démontré *in vivo*. Il serait donc intéressant de confirmer cette hypothèse en infectant, par exemple, des souris déficientes en réponse à l'IFN.

En conclusion, les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent que la protéine accessoire HE est essentielle à la production de HCoV-OC43 infectieux et à l'infection de cellules cibles, alors que le rôle des protéines ns2 et ns12.9 serait plutôt associé à la relation virus-hôte par l'entremise possible d'une interaction avec le système immunitaire. Ceci suggère que certaines protéines accessoires peuvent être essentielles à la réplication du virus et confirme qu'elles peuvent être considérées comme des déterminants de la pathologie au niveau du système nerveux chez un hôte susceptible.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Almazan, F., Galan, C. et Enjuanes, L. (2008). Engineering infectious cDNAs of coronavirus as bacterial artificial chromosomes. *Methods Mol Biol* 454, 275-291.
- Almazan, F., Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J. et Enjuanes, L. (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5516-5521.
- Almeida, J.D. et Tyrrell, D.A. (1967). The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol* 1, 175-178.
- An, S., Chen, C.J., Yu, X., Leibowitz, J.L. et Makino, S. (1999). Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. *J Virol* 73, 7853-7859.
- Arbour, N., Cote, G., Lachance, C., Tardieu, M., Cashman, N.R. et Talbot, P.J. (1999). Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *J Virol* 73, 3338-3350.
- Arbour, N., Day, R., Newcombe, J. et Talbot, P.J. (2000). Neuroinvasion by Human Respiratory Coronaviruses. *J Virol* 74, 8913-8921.
- Armstrong, J., Niemann, H., Smeekens, S., Rottier, P. et Warren, G. (1984). Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature* 308, 751-752.
- Barnett, E.M. et 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.
- Basler, C.F., Wang, X., Muhlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H.D., Garcia-Sastre, A. et Palese, P. (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12289-12294.
- Blau, D.M., Turbide, C., Tremblay, M., Olson, M., Letourneau, S., Michaliszyn, E., Jothy, S., Holmes, K.V. et Beauchemin, N. (2001). Targeted disruption of the Ceacam1 (MHVR) gene leads to reduced susceptibility of mice to mouse hepatitis virus infection. *J Virol* 75, 8173-8186.
- Bonavia, A., Arbour, N., Yong, V.W. et Talbot, P.J. (1997). Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *J Virol* 71, 800-806.
- Bos, E., Heijnen, L., Luytjes, W. et Spaan, W. (1995). Mutational analysis of the murine coronavirus spike protein: effect on cell-to-cell fusion. *Virology* 214, 453 - 463.
- Bosch, B.J., de Haan, C.A., Smits, S.L. et Rottier, P.J. (2005). Spike protein assembly into the coronavirus: exploring the limits of its sequence requirements. *Virology* 334, 306-318.
- Bosch, B.J., van der Zee, R., de Haan, C.A. et Rottier, P.J. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* 77, 8801-8811.

- Boucher, A., Desforages, M., Duquette, P. et Talbot, P.J. (2007). Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 123, 258-267.
- Bournsnel, M.E., Brown, T.D., Foulds, I.J., Green, P.F., Tomley, F.M. et Binns, M.M. (1987). Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* 68 ( Pt 1), 57-77.
- Bradburne, A.F., Bynoe, M.L. et Tyrrell, D.A. (1967). Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. *Br Med J* 3, 767-769.
- Bredenbeek, P.J., Noten, A.F., Horzinek, M.C. et Spaan, W.J. (1990). Identification and stability of a 30-kDa nonstructural protein encoded by mRNA 2 of mouse hepatitis virus in infected cells. *Virology* 175, 303-306.
- Breslin, J.J., Mork, I., Smith, M.K., Vogel, L.K., Hemmila, E.M., Bonavia, A., Talbot, P.J., Sjostrom, H., Noren, O. et Holmes, K.V. (2003). Human coronavirus 229E: receptor binding domain and neutralization by soluble receptor at 37 degrees C. *J Virol* 77, 4435-4438.
- Brian, D.A., Hogue, B.G. et Kienzle, T.E. (1995). The Coronavirus Hemagglutinin Esterase Glycoprotein. In *The Coronaviridae*, Siddell, S.G., ed. (New York, Plenum Press), pp. 165-179.
- Brierley, I., Bournsnel, M.E., Binns, M.M., Bilimoria, B., Blok, V.C., Brown, T.D. et Inglis, S.C. (1987). An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J* 6, 3779-3785.
- Brockway, S.M., Clay, C.T., Lu, X.T. et Denison, M.R. (2003). Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 77, 10515-10527.
- Buchmeier, M.J., Dalziel, R.G. et Koolen, M.J. (1988). Coronavirus-induced CNS disease: a model for virus-induced demyelination. *J Neuroimmunol* 20, 111-116.
- Butler, N., Pewe, L., Trandem, K. et Perlman, S. (2006). Murine encephalitis caused by HCoV-OC43, a human coronavirus with broad species specificity, is partly immune-mediated. *Virology* 347, 410-421.
- Campbell, I.L. et Buchmeier, M.J. (2001). Introduction. In *Advances in Virus Research*, Michael, J.B. et Iain, L.C., eds. (Academic Press), pp. xiii-xiv.
- Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D. et Britton, P. (2005). Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *J Virol* 79, 8065-8078.
- Casais, R., Thiel, V., Siddell, S.G., Cavanagh, D. et Britton, P. (2001). Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* 75, 12359-12369.
- Cavanagh, D. (1995). The Coronavirus Surface Glycoprotein. In *The Coronaviridae*, Siddell, S.G., ed. (New York, Plenum Press), pp. 73-113.
- Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142, 629-633.

- Cavanagh, D., Mawditt, K., Welchman Dde, B., Britton, P. et Gough, R.E. (2002). Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol* 31, 81-93.
- Cervantes-Barragan, L., Zust, R., Weber, F., Spiegel, M., Lang, K.S., Akira, S., Thiel, V. et Ludewig, B. (2007). Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood* 109, 1131-1137.
- Chan, C.M., Ma, C.W., Chan, W.Y. et Chan, H.Y. (2007). The SARS-Coronavirus Membrane protein induces apoptosis through modulating the Akt survival pathway. *Arch Biochem Biophys* 459, 197-207.
- Chan, W.S., Wu, C., Chow, S.C., Cheung, T., To, K.F., Leung, W.K., Chan, P.K., Lee, K.C., Ng, H.K., Au, D.M. et Lo, A.W. (2005). Coronaviral hypothetical and structural proteins were found in the intestinal surface enterocytes and pneumocytes of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Mod Pathol* 18, 1432-1439.
- Chany, C., Moscovici, O., Lebon, P. et Rousset, S. (1982). Association of coronavirus infection with neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 69, 209-214.
- Chen, D., Luongo, C.L., Nibert, M.L. et Patton, J.T. (1999). Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* 265, 120-130.
- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H. et Doerr, H.W. (2003). Treatment of SARS with human interferons. *Lancet* 362, 293-294.
- Cowley, T.J., Long, S.Y. et Weiss, S.R. (2010). The murine coronavirus nucleocapsid gene is a determinant of virulence. *J Virol* 84, 1752-1763.
- Cox, G.J., Parker, M.D. et Babiuk, L.A. (1991). Bovine coronavirus nonstructural protein ns2 is a phosphoprotein. *Virology* 185, 509-512.
- Cristallo, A., Gambaro, F., Biamonti, G., Ferrante, P., Battaglia, M. et Cereda, P.M. (1997). Human coronavirus polyadenylated RNA sequences in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *New Microbiol* 20, 105-114.
- Curtis, K.M., Yount, B. et Baric, R.S. (2002). Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles. *J Virol* 76, 1422-1434.
- Davies, H.A. et Macnaughton, M.R. (1979). Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Arch Virol* 59, 25-33.
- Day, C.W., Baric, R., Cai, S.X., Frieman, M., Kumaki, Y., Morrey, J.D., Smee, D.F. et Barnard, D.L. (2009). A new mouse-adapted strain of SARS-CoV as a lethal model for evaluating antiviral agents in vitro and in vivo. *Virology* 395, 210-222.
- de Groot, R.J. (2006). Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconj J* 23, 59-72.



- de Groot, R.J., Luytjes, W., Horzinek, M.C., van der Zeijst, B.A., Spaan, W.J. et Lenstra, J.A. (1987). Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J Mol Biol* 196, 963-966.
- de Haan, C.A., de Wit, M., Kuo, L., Montalto-Morrison, C., Haagmans, B.L., Weiss, S.R., Masters, P.S. et Rottier, P.J. (2003). The glycosylation status of the murine hepatitis coronavirus M protein affects the interferogenic capacity of the virus in vitro and its ability to replicate in the liver but not the brain. *Virology* 312, 395-406.
- de Haan, C.A., Haijema, B.J., Masters, P.S. et Rottier, P.J. (2008). Manipulation of the coronavirus genome using targeted RNA recombination with interspecies chimeric coronaviruses. *Methods Mol Biol* 454, 229-236.
- de Haan, C.A., Masters, P.S., Shen, X., Weiss, S. et Rottier, P.J. (2002a). The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* 296, 177-189.
- de Haan, C.A., Vennema, H. et Rottier, P.J. (2000). Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *J Virol* 74, 4967-4978.
- de Haan, C.A., Volders, H., Koetzner, C.A., Masters, P.S. et Rottier, P.J. (2002b). Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *J Virol* 76, 12491-12502.
- DeDiego, M.L., Alvarez, E., Almazan, F., Rejas, M.T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Subbarao, K. et Enjuanes, L. (2007). A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* 81, 1701-1713.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjostrom, H., Noren, O. et Laude, H. (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357, 417-420.
- Delmas, B. et Laude, H. (1990). Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol* 64, 5367-5375.
- Deregt, D., Gifford, G.A., Ijaz, M.K., Watts, T.C., Gilchrist, J.E., Haines, D.M. et Babiuk, L.A. (1989). Monoclonal antibodies to bovine coronavirus glycoproteins E2 and E3: demonstration of in vivo virus-neutralizing activity. *J Gen Virol* 70 ( Pt 4), 993-998.
- Doms, R.W., Lamb, R.A., Rose, J.K. et Helenius, A. (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* 193, 545-562.
- Donaldson, E.F., Yount, B., Sims, A.C., Burkett, S., Pickles, R.J. et Baric, R.S. (2008). Systematic assembly of a full-length infectious clone of human coronavirus NL63. *J Virol* 82, 11948-11957.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H. et Doerr, H.W. (2003). Identification of

- a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348, 1967-1976.
- Ebner, D., Raabe, T. et Siddell, S.G. (1988). Identification of the coronavirus MHV-JHM mRNA 4 product. *J Gen Virol* 69 ( Pt 5), 1041-1050.
- Edwards, J.A., Denis, F. et Talbot, P.J. (2000). Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. *J Neuroimmunol* 108, 73-81.
- Enjuanes, L., Sola, I., Alonso, S., Escors, D. et Zuniga, S. (2005). Coronavirus reverse genetics and development of vectors for gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 287, 161-197.
- Esper, F., Ou, Z. et Huang, Y.T. (2010). Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. *J Clin Virol* 48, 131-133.
- Esposito, S., Bosis, S., Niesters, H.G., Tremolati, E., Begliatti, E., Rognoni, A., Tagliabue, C., Principi, N. et Osterhaus, A.D. (2006). Impact of human coronavirus infections in otherwise healthy children who attended an emergency department. *J Med Virol* 78, 1609-1615.
- Favreau, D.J., Desforges, M., St-Jean, J.R. et Talbot, P.J. (2009). A human coronavirus OC43 variant harboring persistence-associated mutations in the S glycoprotein differentially induces the unfolded protein response in human neurons as compared to wild-type virus. *Virology* 395, 255-267.
- Fazzini, E., Fleming, J. et Fahn, S. (1992). Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 7, 153-158.
- Fielding, B.C., Tan, Y.J., Shuo, S., Tan, T.H., Ooi, E.E., Lim, S.G., Hong, W. et Goh, P.Y. (2004). Characterization of a unique group-specific protein (U122) of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 78, 7311-7318.
- Fischer, F., Peng, D., Hingley, S.T., Weiss, S.R. et Masters, P.S. (1997). The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. *J Virol* 71, 996-1003.
- Fouchier, R.A., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G.J., van den Hoogen, B.G., Peiris, M., Lim, W., Stohr, K. et Osterhaus, A.D. (2003a). Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423, 240.
- Fouchier, R.A.M., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G.J.J., van den Hoogen, B.G., Peiris, M., Lim, W., Stohr, K. et Osterhaus, A.D.M.E. (2003b). Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423, 240-240.
- Freundt, E.C., Yu, L., Goldsmith, C.S., Welsh, S., Cheng, A., Yount, B., Liu, W., Frieman, M.B., Buchholz, U.J., Sreaton, G.R., Lippincott-Schwartz, J., Zaki, S.R., Xu, X.N., Baric, R.S., Subbarao, K. et Lenardo, M.J. (2010). The open reading frame 3a protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus promotes membrane rearrangement and cell death. *J Virol* 84, 1097-1109.
- Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S.A., Palese, P. et Baric, R.S. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by

- sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *J Virol* *81*, 9812-9824.
- Gallagher, T.M. et Buchmeier, M.J. (2001). Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* *279*, 371-374.
- Garcia, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. et Esteban, M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 1032-1060.
- Garwes, D.J., Stewart, F. et Britton, P. (1989). The polypeptide of Mr 14,000 of porcine transmissible gastroenteritis virus: gene assignment and intracellular location. *J Gen Virol* *70* ( Pt 9), 2495-2499.
- Geng, H., Liu, Y.M., Chan, W.S., Lo, A.W., Au, D.M., Waye, M.M. et Ho, Y.Y. (2005). The putative protein 6 of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus: expression and functional characterization. *FEBS Lett* *579*, 6763-6768.
- Gerna, G., Campanini, G., Rovida, F., Percivalle, E., Sarasini, A., Marchi, A. et Baldanti, F. (2006). Genetic variability of human coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. *J Med Virol* *78*, 938-949.
- Gerna, G., Passarani, N., Battaglia, M. et Rondanelli, E.G. (1985). Human enteric coronaviruses: antigenic relatedness to human coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. *J Infect Dis* *151*, 796-803.
- Gerna, G., Percivalle, E., Sarasini, A., Campanini, G., Piralla, A., Rovida, F., Genini, E., Marchi, A. et Baldanti, F. (2007). Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. *J Clin Virol* *38*, 244-250.
- Gonzalez, J.M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E. et Enjuanes, L. (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch Virol* *148*, 2207-2235.
- Gonzalez, M.E. et Carrasco, L. (2003). Viroporins. *FEBS Lett* *552*, 28-34.
- Gorbalenya, A.E. (2008). Genomics and Evolution of the Nidovirales. In *Nidovirus*, Stanley, P., Gallagher, T. et Snijder, E.J., eds. (Washington, DC, ASM Press), pp. 15-28.
- Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J. et Snijder, E.J. (2006). Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* *117*, 17-37.
- Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J., Butt, K.M., Wong, K.L., Chan, K.W., Lim, W., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Peiris, J.S. et Poon, L.L. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* *302*, 276-278.
- Guo, J.P., Petric, M., Campbell, W. et McGeer, P.L. (2004). SARS corona virus peptides recognized by antibodies in the sera of convalescent cases. *Virology* *324*, 251-256.

- Haijema, B.J., Volders, H. et Rottier, P.J. (2004). Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J Virol* *78*, 3863-3871.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J. et Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* *89*, 2359-2376.
- Hamre, D. et Procknow, J.J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* *121*, 190-193.
- He, R., Leeson, A., Andonov, A., Li, Y., Bastien, N., Cao, J., Osiowy, C., Dobie, F., Cutts, T., Ballantine, M. et Li, X. (2003). Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun* *311*, 870-876.
- Herrler, G., Durkop, I., Becht, H. et Klenk, H.D. (1988). The glycoprotein of influenza C virus is the haemagglutinin, esterase and fusion factor. *J Gen Virol* *69 (Pt 4)*, 839-846.
- Hill, D.P. et Robertson, K.A. (1998). Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain Research Protocols* *2*, 183-190.
- Hingley, S.T., Leparc-Goffart, I., Seo, S.H., Tsai, J.C. et Weiss, S.R. (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.
- Hingley, S.T., Leparc-Goffart, I. et Weiss, S.R. (1998). The spike protein of murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 is not cleaved in primary glial cells and primary hepatocytes. *J Virol* *72*, 1606-1609.
- Hodgson, T., Britton, P. et Cavanagh, D. (2006). Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication. *J Virol* *80*, 296-305.
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B. et Pohlmann, S. (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7988-7993.
- Hogue, B.G. et Brian, D.A. (1986). Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43. *Virus Res* *5*, 131-144.
- Hogue, B.G., Kienzle, T.E. et Brian, D.A. (1989). Synthesis and processing of the bovine enteric coronavirus haemagglutinin protein. *J Gen Virol* *70 (Pt 2)*, 345-352.
- Hogue, B.G. et Machamer, C.E. (2008). Coronavirus Structural Proteins and Virus Assembly. In *Nidovirus*, Stanley, P., Gallagher, T. et Snijder, E.J., eds. (Washington, DC, ASM Press), pp. 179-200.
- Huang, C., Ito, N., Tseng, C.T. et Makino, S. (2006a). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J Virol* *80*, 7287-7294.

- Huang, C., Narayanan, K., Ito, N., Peters, C.J. et Makino, S. (2006b). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is released in membranous structures from 3a protein-expressing cells and infected cells. *J Virol* *80*, 210-217.
- Iacono, K.T., Kazi, L. et Weiss, S.R. (2006). Both spike and background genes contribute to murine coronavirus neurovirulence. *J Virol* *80*, 6834-6843.
- Ingallinella, P., Bianchi, E., Finotto, M., Cantoni, G., Eckert, D.M., Supekar, V.M., Bruckmann, C., Carfi, A. et Pessi, A. (2004). Structural characterization of the fusion-active complex of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8709-8714.
- Ireland, D.D.C., Stohlman, S.A., Hinton, D.R., Atkinson, R. et Bergmann, C.C. (2008). Type I Interferons Are Essential in Controlling Neurotropic Coronavirus Infection Irrespective of Functional CD8 T Cells. *J Virol* *82*, 300-310.
- Ito, N., Mossel, E.C., Narayanan, K., Popov, V.L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C.J. et Makino, S. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *J Virol* *79*, 3182-3186.
- Ivanov, K.A., Hertzog, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A.E. et Ziebuhr, J. (2004). Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 12694-12699.
- Jacomy, H., Fragoso, G., Almazan, G., Mushynski, W.E. et Talbot, P.J. (2006). Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. *Virology* *349*, 335-346.
- Jacomy, H., St-Jean, J.R., Brison, E., Marceau, G., Desforges, M. et Talbot, P.J. (2010). Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. *J Neurovirol* *16*, 279-293.
- Jacomy, H. et Talbot, P.J. (2003). Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* *315*, 20-33.
- Johnston, S.L., Pattemore, P.K., Sanderson, G., Smith, S., Lampe, F., Josephs, L., Symington, P., O'Toole, S., Myint, S.H., Tyrrell, D.A. et al. (1995). Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* *310*, 1225-1229.
- Jouvenne, P., Mounir, S., Stewart, J.N., Richardson, C.D. et Talbot, P.J. (1992). Sequence analysis of human coronavirus 229E mRNAs 4 and 5: evidence for polymorphism and homology with myelin basic protein. *Virus Res* *22*, 125-141.
- Kamitani, W., Huang, C., Narayanan, K., Lokugamage, K.G. et Makino, S. (2009). A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 1134-1140.
- Kamitani, W., Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Ikegami, T., Ito, N., Kubo, H. et Makino, S. (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 12885-12890.

Karber, G. (1931). Beitrag zur Kollktiven Behandlung Pharmakologischer Reiherversuche. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 162.

Kazi, L., Lissenberg, A., Watson, R., de Groot, R.J. et Weiss, S.R. (2005). Expression of hemagglutinin esterase protein from recombinant mouse hepatitis virus enhances neurovirulence. *J Virol* 79, 15064-15073.

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

Koetzner, C.A., Kuo, L., Goebel, S.J., Dean, A.B., Parker, M.M. et Masters, P.S. (2010). Accessory Protein 5a is a Major Antagonist of the Antiviral Action of Interferon Against Murine Coronavirus. *J Virol*.

Koetzner, C.A., Parker, M.M., Ricard, C.S., Sturman, L.S. et Masters, P.S. (1992). Repair and mutagenesis of the genome of a deletion mutant of the coronavirus mouse hepatitis virus by targeted RNA recombination. *J Virol* 66, 1841-1848.

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

Kopecky-Bromberg, S.A., Martinez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R.A. et Palese, P. (2007). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Open Reading Frame (ORF) 3b, ORF 6, and Nucleocapsid Proteins Function as Interferon Antagonists. *J Virol* 81, 548-557.

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

Kunkel, F. et Herrler, G. (1993). Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* 195, 195-202.

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

Kuo, L., Godeke, G.J., Raamsman, M.J., Masters, P.S. et Rottier, P.J. (2000). Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol* 74, 1393-1406.

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

Kuypers, J., Martin, E.T., Heugel, J., Wright, N., Morrow, R. et Englund, J.A. (2007). Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics* 119, e70-76.

- Labonte, P., Mounir, S. et Talbot, P.J. (1995). Sequence and expression of the ns2 protein gene of human coronavirus OC43. *J Gen Virol* 76 ( Pt 2), 431-435.
- Lachance, C., Arbour, N., Cashman, N.R. et Talbot, P.J. (1998). Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by human coronavirus 229E. *J Virol* 72, 6511-6519.
- Lai, M.M. (1992). Genetic recombination in RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 176, 21-32.
- Lai, M.M. (1995). Transcription, replication, recombination, and engineering of coronavirus genes. *Adv Exp Med Biol* 380, 463-471.
- Lai, M.M. et Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 48, 1-100.
- Lai, M.M., Patton, C.D., Baric, R.S. et Stohlman, S.A. (1983). Presence of leader sequences in the mRNA of mouse hepatitis virus. *J Virol* 46, 1027-1033.
- Lambert, F., Jacomy, H., Marceau, G. et Talbot, P.J. (2008). Titration of human coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, by an indirect immunoperoxidase assay. *Methods Mol Biol* 454, 93-102.
- Langereis, M.A., van Vliet, A.L.W., Boot, W. et de Groot, R.J. (2010). Attachment of Mouse Hepatitis Virus to O-Acetylated Sialic Acid Is Mediated by Hemagglutinin-Esterase and Not by the Spike Protein. *J Virol* 84, 8970-8974.
- Lau, S.K., Woo, P.C., Li, K.S., Huang, Y., Tsoi, H.W., Wong, B.H., Wong, S.S., Leung, S.Y., Chan, K.H. et Yuen, K.Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14040-14045.
- Laude, H., Gelfi, J., Lavenant, L. et Charley, B. (1992). Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 66, 743-749.
- Lavi, E., Gildeen, D.H., Highkin, M.K. et Weiss, S.R. (1986). The organ tropism of mouse hepatitis virus A59 in mice is dependent on dose and route of inoculation. *Lab Anim Sci* 36, 130-135.
- Li, F.Q., Xiao, H., Tam, J.P. et Liu, D.X. (2005a). Sumoylation of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *FEBS Lett* 579, 2387-2396.
- Li, W., Sui, J., Huang, I.C., Kuhn, J.H., Radoshitzky, S.R., Marasco, W.A., Choe, H. et Farzan, M. (2007). The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2. *Virology* 367, 367-374.
- Li, Y.H., Li, J., Liu, X.E., Wang, L., Li, T., Zhou, Y.H. et Zhuang, H. (2005b). Detection of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus in serum: comparison with results of other viral markers. *J Virol Methods* 130, 45-50.

- Liao, Y., Lescar, J., Tam, J.P. et Liu, D.X. (2004). Expression of SARS-coronavirus envelope protein in *Escherichia coli* cells alters membrane permeability. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 374-380.
- Lissenberg, A., Vrolijk, M.M., van Vliet, A.L., Langereis, M.A., de Groot-Mijnes, J.D., Rottier, P.J. et de Groot, R.J. (2005). Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. *J Virol* 79, 15054-15063.
- Liu, D.X. et Inglis, S.C. (1991). Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* 185, 911-917.
- Liu, D.X., Yuan, Q. et Liao, Y. (2007a). Coronavirus envelope protein: a small membrane protein with multiple functions. *Cell Mol Life Sci* 64, 2043-2048.
- Liu, P., Li, L., Millership, J.J., Kang, H., Leibowitz, J.L. et Giedroc, D.P. (2007b). A U-turn motif-containing stem-loop in the coronavirus 5' untranslated region plays a functional role in replication. *RNA* 13, 763-780.
- Lodha, A., de Silva, N., Petric, M. et Moore, A.M. (2005). Human torovirus: a new virus associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* 94, 1085-1088.
- Lu, B., Tao, L., Wang, T., Zheng, Z., Li, B., Chen, Z., Huang, Y., Hu, Q. et Wang, H. (2009). Humoral and cellular immune responses induced by 3a DNA vaccines against severe acute respiratory syndrome (SARS) or SARS-like coronavirus in mice. *Clin Vaccine Immunol* 16, 73-77.
- Luytjes, W., Bredenbeek, P.J., Noten, A.F., Horzinek, M.C. et Spaan, W.J. (1988). Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 166, 415-422.
- Macneughton, M.R. et Davies, H.A. (1978). Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. *J Gen Virol* 39, 545-549.
- Madan, V., Garcia Mde, J., Sanz, M.A. et Carrasco, L. (2005). Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. *FEBS Lett* 579, 3607-3612.
- Maeda, J., Maeda, A. et Makino, S. (1999). Release of coronavirus E protein in membrane vesicles from virus-infected cells and E protein-expressing cells. *Virology* 263, 265-272.
- Malim, M.H. et Emerman, M. (2008). HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 3, 388-398.
- Masters, P.S. (1999). Reverse genetics of the largest RNA viruses. *Adv Virus Res* 53, 245-264.
- Masters, P.S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 66, 193-292.
- Masters, P.S. et Rottier, P.J. (2005). Coronavirus reverse genetics by targeted RNA recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* 287, 133-159.



- Matsuyama, S. et Taguchi, F. (2002a). Communication between S1N330 and a region in S2 of murine coronavirus spike protein is important for virus entry into cells expressing CEACAM1b receptor. *Virology* 295, 160-171.
- Matsuyama, S. et Taguchi, F. (2002b). Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *J Virol* 76, 11819-11826.
- Matsuyama, S. et Taguchi, F. (2009). Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis. *J Virol* 83, 11133-11141.
- Mazumder, R., Iyer, L.M., Vasudevan, S. et Aravind, L. (2002). Detection of novel members, structure-function analysis and evolutionary classification of the 2H phosphoesterase superfamily. *Nucleic Acids Res* 30, 5229-5243.
- McIntosh, K., Dees, J.H., Becker, W.B., Kapikian, A.Z. et Chanock, R.M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57, 933-940.
- Minakshi, R., Padhan, K., Rani, M., Khan, N., Ahmad, F. et Jameel, S. (2009). The SARS Coronavirus 3a protein causes endoplasmic reticulum stress and induces ligand-independent downregulation of the type I interferon receptor. *PLoS ONE* 4, e8342.
- Moscona, A. (2005). Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *New England Journal of Medicine* 353, 1363-1373.
- Mounir, S. et Talbot, P.J. (1993). Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Virology* 192, 355-360.
- Myint, S.H. (1995). Human Coronavirus Infections. In *The Coronaviridae*, Siddell, S.G., ed. (New York, Plenum Press), pp. 389-401.
- Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Shirogane, Y., Iwasaki, M. et Yanagi, Y. (2008). Measles Virus Circumvents the Host Interferon Response by Different Actions of the C and V Proteins. *J Virol* 82, 8296-8306.
- Namy, O., Moran, S.J., Stuart, D.I., Gilbert, R.J. et Brierley, I. (2006). A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* 441, 244-247.
- Narayanan, K., Chen, C.J., Maeda, J. et Makino, S. (2003). Nucleocapsid-independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal. *J Virol* 77, 2922-2927.
- Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Kamitani, W., Ikegami, T., Tseng, C.-T.K. et Makino, S. (2008a). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus nsp1 Suppresses Host Gene Expression, Including That of Type I Interferon, in Infected Cells. *J Virol* 82, 4471-4479.
- Narayanan, K., Huang, C. et Makino, S. (2008b). Coronavirus Accessory Proteins. In *Nidovirus*, Stanley, P., Gallagher, T. et Snijder, E.J., eds. (Washington, DC, ASM Press), pp. 235-244.
- Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J. et Makino, S. (2000). Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol* 74, 8127-8134.

- Narayanan, K. et Makino, S. (2001a). Characterization of nucleocapsid-M protein interaction in murine coronavirus. *Adv Exp Med Biol* 494, 577-582.
- Narayanan, K. et Makino, S. (2001b). Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA packaging. *J Virol* 75, 9059-9067.
- Navas-Martin, S., Brom, M., Chua, M.M., Watson, R., Qiu, Z. et Weiss, S.R. (2007). Replicase genes of murine coronavirus strains A59 and JHM are interchangeable: differences in pathogenesis map to the 3' one-third of the genome. *J Virol* 81, 1022-1026.
- Navas, S., Seo, S.H., Chua, M.M., Das Sarma, J., Lavi, E., Hingley, S.T. et Weiss, S.R. (2001). Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in the liver and cause hepatitis. *J Virol* 75, 2452-2457.
- Navas, S. et Weiss, S.R. (2003). Murine coronavirus-induced hepatitis: JHM genetic background eliminates A59 spike-determined hepatotropism. *J Virol* 77, 4972-4978.
- Netland, J., DeDiego, M.L., Zhao, J., Fett, C., Alvarez, E., Nieto-Torres, J.L., Enjuanes, L. et Perlman, S. (2010). Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease. *Virology* 399, 120-128.
- Nicholson, K.G., Kent, J. et Ireland, D.C. (1993). Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 307, 982-986.
- Ontiveros, E., Kuo, L., Masters, P.S. et Perlman, S. (2001). Inactivation of expression of gene 4 of mouse hepatitis virus strain JHM does not affect virulence in the murine CNS. *Virology* 289, 230-238.
- Ortego, J., Ceriani, J.E., Patino, C., Plana, J. et Enjuanes, L. (2007). Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* 368, 296-308.
- Ortego, J., Escors, D., Laude, H. et Enjuanes, L. (2002). Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J Virol* 76, 11518-11529.
- Ortego, J., Sola, I., Almazan, F., Ceriani, J.E., Riquelme, C., Balasch, M., Plana, J. et Enjuanes, L. (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. *Virology* 308, 13-22.
- Parham, P. (2000). L'immunité anti-infectieuse. In *Le système immunitaire* (Éditions de Boeck), pp. 201-238.
- Park, E. et Griffin, D.E. (2009). The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virology* 388, 305-314.
- Pendleton, A.R. et Machamer, C.E. (2005). Infectious bronchitis virus 3a protein localizes to a novel domain of the smooth endoplasmic reticulum. *J Virol* 79, 6142-6151.

- Pewe, L., Zhou, H., Netland, J., Tangudu, C., Olivares, H., Shi, L., Look, D., Gallagher, T. et Perlman, S. (2005). A severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-specific protein enhances virulence of an attenuated murine coronavirus. *J Virol* 79, 11335-11342.
- Phillips, J.J., Chua, M.M., Lavi, E. et Weiss, S.R. (1999). Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence. *J Virol* 73, 7752-7760.
- Phillips, J.J., Chua, M.M., Rall, G.F. et Weiss, S.R. (2002). Murine coronavirus spike glycoprotein mediates degree of viral spread, inflammation, and virus-induced immunopathology in the central nervous system. *Virology* 301, 109-120.
- Popova, R. et Zhang, X. (2002). The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. *Virology* 294, 222-236.
- Pringle, C.R. (1996). Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch Virol* 141, 2251-2256.
- Pyrk, K., Sims, A.C., Dijkman, R., Jebbink, M., Long, C., Deming, D., Donaldson, E., Vabret, A., Baric, R., van der Hoek, L. et Pickles, R. (2010). Culturing the Unculturable: Human Coronavirus HKU1 Infects, Replicates, and Produces Progeny Virions in Human Ciliated Airway Epithelial Cell Cultures. *J Virol*.
- Raabe, T. et Siddell, S.G. (1989). Nucleotide sequence of the gene encoding the membrane protein of human coronavirus 229 E. *Arch Virol* 107, 323-328.
- Randall, R.E. et Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89, 1-47.
- Resta, S., Luby, J.P., Rosenfeld, C.R. et Siegel, J.D. (1985). Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science* 229, 978-981.
- Roth-Cross, J.K., Stokes, H., Chang, G., Chua, M.M., Thiel, V., Weiss, S.R., Gorbalenya, A.E. et Siddell, S.G. (2009). Organ-Specific Attenuation of Murine Hepatitis Virus Strain A59 by Replacement of Catalytic Residues in the Putative Viral Cyclic Phosphodiesterase ns2. *J Virol* 83, 3743-3753.
- Rottier, P.J., Welling, G.W., Welling-Wester, S., Niesters, H.G., Lenstra, J.A. et Van der Zeijst, B.A. (1986). Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. *Biochemistry* 25, 1335-1339.
- Rousset, S., Moscovici, O., Lebon, P., Barbet, J.P., Helardot, P., Mace, B., Bargy, F., Le Tan, V. et Chany, C. (1984). Intestinal lesions containing coronavirus-like particles in neonatal necrotizing enterocolitis: an ultrastructural analysis. *Pediatrics* 73, 218-224.
- Salanueva, I.J., Carrascosa, J.L. et Risco, C. (1999). Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol* 73, 7952-7964.
- Salmi, A., Ziola, B., Hovi, T. et Reunanen, M. (1982). Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* 32, 292-295.

- Sawicki, S.G. et Sawicki, D.L. (1995). Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol* 380, 499-506.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L. et Siddell, S.G. (2007). A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol* 81, 20-29.
- Schalk, A.F. et Hawn, M.C. (1931). An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J A Vet Med Assoc*, 78, 413-422.
- Schultze, B., Gross, H.J., Brossmer, R. et Herrler, G. (1991). The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J Virol* 65, 6232-6237.
- Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., den Boon, J. et Ahlquist, P. (2002). A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* 9, 505-514.
- Schwarz, B., Routledge, E. et Siddell, S.G. (1990). Murine coronavirus nonstructural protein ns2 is not essential for virus replication in transformed cells. *J Virol* 64, 4784-4791.
- Schwegmann-Wessels, C. et Herrler, G. (2006). Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconj J* 23, 51-58.
- Schwegmann-Wessels, C., Zimmer, G., Schroder, B., Breves, G. et Herrler, G. (2003). Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to brush border membrane sialoglycoproteins. *J Virol* 77, 11846-11848.
- Shen, S., Wen, Z.L. et Liu, D.X. (2003). Emergence of a coronavirus infectious bronchitis virus mutant with a truncated 3b gene: functional characterization of the 3b protein in pathogenesis and replication. *Virology* 311, 16-27.
- Shieh, C.K., Lee, H.J., Yokomori, K., La Monica, N., Makino, S. et Lai, M.M. (1989). Identification of a new transcriptional initiation site and the corresponding functional gene 2b in the murine coronavirus RNA genome. *J Virol* 63, 3729-3736.
- Siddell, S. et Snijder, E.J. (2008). An Introduction to Nidoviruses. In *Nidovirus*, Stanley, P., Gallagher, T. et Snijder, E.J., eds. (Washington, DC, ASM Press), pp. 1-13.
- Silverman, R.H. (2007). Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 81, 12720-12729.
- Siu, K.L., Kok, K.H., Ng, M.H., Poon, V.K., Yuen, K.Y., Zheng, B.J. et Jin, D.Y. (2009). Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3.TANK.TBK1/IKKepsilon complex. *J Biol Chem* 284, 16202-16209.
- Sizun, J., Soupre, D., Giroux, J.D., Alix, D., De, P., Legrand, M.C., Demazure, M. et Chastel, C. (1993). Nasal colonization with coronavirus and apnea of the premature newborn. *Acta Paediatr* 82, 238.

Sizun, J., Soupre, D., Legrand, M.C., Giroux, J.D., Rubio, S., Cauvin, J.M., Chastel, C., Alix, D. et de Parscau, L. (1995). Neonatal nosocomial respiratory infection with coronavirus: a prospective study in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr* 84, 617-620.

Skinner, M.A., Ebner, D. et Siddell, S.G. (1985). Coronavirus MHV-JHM mRNA 5 has a sequence arrangement which potentially allows translation of a second, downstream open reading frame. *J Gen Virol* 66 ( Pt 3), 581-592.

Skinner, M.A. et Siddell, S.G. (1985). Coding sequence of coronavirus MHV-JHM mRNA 4. *J Gen Virol* 66 ( Pt 3), 593-596.

Snijder, E.J., den Boon, J.A., Horzinek, M.C. et Spaan, W.J. (1991). Comparison of the genome organization of toro- and coronaviruses: evidence for two nonhomologous RNA recombination events during Berne virus evolution. *Virology* 180, 448-452.

Snijder, E.J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J.J., van der Meulen, J., Koerten, H.K. et Mommaas, A.M. (2006). Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J Virol* 80, 5927-5940.

Sola, I., Alonso, S., Zuniga, S., Balasch, M., Plana-Duran, J. et Enjuanes, L. (2003). Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J Virol* 77, 4357-4369.

Song, H.D., Tu, C.C., Zhang, G.W., Wang, S.Y., Zheng, K., Lei, L.C., Chen, Q.X., Gao, Y.W., Zhou, H.Q., Xiang, H., Zheng, H.J., Chern, S.W., Cheng, F., Pan, C.M., Xuan, H., Chen, S.J., Luo, H.M., Zhou, D.H., Liu, Y.F., He, J.F., Qin, P.Z., Li, L.H., Ren, Y.Q., Liang, W.J., Yu, Y.D., Anderson, L., Wang, M., Xu, R.H., Wu, X.W., Zheng, H.Y., Chen, J.D., Liang, G., Gao, Y., Liao, M., Fang, L., Jiang, L.Y., Li, H., Chen, F., Di, B., He, L.J., Lin, J.Y., Tong, S., Kong, X., Du, L., Hao, P., Tang, H., Bernini, A., Yu, X.J., Spiga, O., Guo, Z.M., Pan, H.Y., He, W.Z., Manuguerra, J.C., Fontanet, A., Danchin, A., Niccolai, N., Li, Y.X., Wu, C.I. et Zhao, G.P. (2005). Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2430-2435.

Spann, K.M., Tran, K.C., Chi, B., Rabin, R.L. et Collins, P.L. (2004). Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol* 78, 4363-4369.

Sperry, S.M., Kazi, L., Graham, R.L., Baric, R.S., Weiss, S.R. et Denison, M.R. (2005). Single-amino-acid substitutions in open reading frame (ORF) 1b-nsp14 and ORF 2a proteins of the coronavirus mouse hepatitis virus are attenuating in mice. *J Virol* 79, 3391-3400.

St-Jean, J.R., Desforges, M., Almazan, F., Jacomy, H., Enjuanes, L. et Talbot, P.J. (2006). Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J Virol* 80, 3670-3674.

St-Jean, J.R., Jacomy, H., Desforges, M., Vabret, A., Freymuth, F. et Talbot, P.J. (2004). Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. *J Virol* 78, 8824-8834.

- Stauber, R., Pfliegerer, M. et Siddell, S. (1993). Proteolytic cleavage of the murine coronavirus surface glycoprotein is not required for its fusion activity. *Adv Exp Med Biol* 342, 165-170.
- Sturman, L.S., Eastwood, C., Frana, M.F., Duchala, C., Baker, F., Ricard, C.S., Sawicki, S.G. et Holmes, K.V. (1987). Temperature-sensitive mutants of MHV-A59. *Adv Exp Med Biol* 218, 159-168.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V. et Behnke, J. (1980). Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol* 33, 449-462.
- Subbarao, K., McAuliffe, J., Vogel, L., Fahle, G., Fischer, S., Tatti, K., Packard, M., Shieh, W.J., Zaki, S. et Murphy, B. (2004). Prior infection and passive transfer of neutralizing antibody prevent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the respiratory tract of mice. *J Virol* 78, 3572-3577.
- Subbarao, K. et Roberts, A. (2006). Is there an ideal animal model for SARS? *Trends Microbiol* 14, 299-303.
- Surjit, M., Liu, B., Jameel, S., Chow, V.T. et Lal, S.K. (2004a). The SARS coronavirus nucleocapsid protein induces actin reorganization and apoptosis in COS-1 cells in the absence of growth factors. *Biochem J* 383, 13-18.
- Surjit, M., Liu, B., Kumar, P., Chow, V.T. et Lal, S.K. (2004b). The nucleocapsid protein of the SARS coronavirus is capable of self-association through a C-terminal 209 amino acid interaction domain. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 1030-1036.
- Taguchi, F. (1993). Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. *J Virol* 67, 1195-1202.
- Taguchi, F., Ikeda, T., Saeki, K., Kubo, H. et Kikuchi, T. (1993). Fusogenic properties of uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV. *Adv Exp Med Biol* 342, 171-175.
- Taguchi, F., Kubo, H., Suzuki, H. et Yamada, Y.K. (1995). Localization of neutralizing epitopes and receptor-binding site in murine coronavirus spike protein. *Adv Exp Med Biol* 380, 359-365.
- Talbot, P.J., Jacomy, H. et Desforges, M. (2008). Pathogenesis of Human Coronaviruses Other than Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. In *Nidovirus*, Stanley, P., Gallagher, T. et Snijder, E.J., eds. (Washington, DC, ASM Press), pp. 313-324.
- Talbot, P.J., Paquette, J.S., Ciurli, C., Antel, J.P. et Ouellet, F. (1996). Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 39, 233-240.
- Tan, Y.J., Fielding, B.C., Goh, P.Y., Shen, S., Tan, T.H., Lim, S.G. et Hong, W. (2004). Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *J Virol* 78, 14043-14047.
- Tan, Y.J., Lim, S.G. et Hong, W. (2006). Understanding the accessory viral proteins unique to the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Antiviral Res* 72, 78-88.

- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. et Siddell, S.G. (2001). Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol* 82, 1273-1281.
- Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E.J., Rabenau, H., Doerr, H.W., Gorbalenya, A.E. et Ziebuhr, J. (2003). Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol* 84, 2305-2315.
- Thiel, V. et Siddell, S.G. (2005). Reverse genetics of coronaviruses using vaccinia virus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 287, 199-227.
- Tooze, J., Tooze, S. et Warren, G. (1984). Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur J Cell Biol* 33, 281-293.
- Tooze, J., Tooze, S.A. et Fuller, S.D. (1987). Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. *J Cell Biol* 105, 1215-1226.
- Torres, J., Wang, J., Parthasarathy, K. et Liu, D.X. (2005). The transmembrane oligomers of coronavirus protein E. *Biophys J* 88, 1283-1290.
- Torrizi, M.R. et Pinto da Silva, P. (1984). Compartmentalization of intracellular membrane glycoproteins is revealed by fracture-label. *J Cell Biol* 98, 29-34.
- Tung, F.Y., Abraham, S., Sethna, M., Hung, S.L., Sethna, P., Hogue, B.G. et Brian, D.A. (1992). The 9-kDa hydrophobic protein encoded at the 3' end of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus genome is membrane-associated. *Virology* 186, 676-683.
- Tyrrell, D.A., Almeida, J.D., Cunningham, C.H., Dowdle, W.R., Hofstad, M.S., McIntosh, K., Tajima, M., Zakstelskaya, L.Y., Easterday, B.C., Kapikian, A. et Bingham, R.W. (1975). Coronaviridae. *Intervirology* 5, 76-82.
- Tyrrell, D.A. et Bynoe, M.L. (1965). Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. *Br Med J* 1, 1467-1470.
- Vabret, A., Dina, J., Brison, E., Brouard, J. et Freymuth, F. (2009). [Human coronaviruses.]. *Pathol Biol (Paris)* 57, 149-160.
- Vabret, A., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean, J., Corbet, S. et Freymuth, F. (2006). Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin Infect Dis* 42, 634-639.
- Vabret, A., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean, J., Tripey, V., Brouard, J. et Freymuth, F. (2008). Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. *J Paediatr Child Health* 44, 176-181.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J. et Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 10, 368-373.

Vennema, H., Godeke, G.J., Rossen, J.W., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.J. et Rottier, P.J. (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J* 15, 2020-2028.

Vijgen, L., Keyaerts, E., Moes, E., Thoelen, I., Wollants, E., Lemey, P., Vandamme, A.-M. et Van Ranst, M. (2005). Complete Genomic Sequence of Human Coronavirus OC43: Molecular Clock Analysis Suggests a Relatively Recent Zoonotic Coronavirus Transmission Event. *J Virol* 79, 1595-1604.

Vlasak, R., Krystal, M., Nacht, M. et Palese, P. (1987). The influenza C virus glycoprotein (HE) exhibits receptor-binding (hemagglutinin) and receptor-destroying (esterase) activities. *Virology* 160, 419-425.

Vlasak, R., Luytjes, W., Leider, J., Spaan, W. et Palese, P. (1988). The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylsterase activity. *J Virol* 62, 4686-4690.

Vlasak, R., Muster, T., Lauro, A.M., Powers, J.C. et Palese, P. (1989). Influenza C virus esterase: analysis of catalytic site, inhibition, and possible function. *J Virol* 63, 2056-2062.

Wagner, R., Matrosovich, M. et Klenk, H.D. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* 12, 159-166.

Wathelet, M.G., Orr, M., Frieman, M.B. et Baric, R.S. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J Virol* 81, 11620-11633.

Wege, H., Muller, A. et ter Meulen, V. (1978). Genomic RNA of the murine coronavirus JHM. *J Gen Virol* 41, 217-227.

Weiss, S.R., Zoltick, P.W. et Leibowitz, J.L. (1993). The ns 4 gene of mouse hepatitis virus (MHV), strain A 59 contains two ORFs and thus differs from ns 4 of the JHM and S strains. *Arch Virol* 129, 301-309.

Williams, R.K., Jiang, G.S. et Holmes, K.V. (1991). Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5533-5536.

Wilson, L., Gage, P. et Ewart, G. (2006). Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology* 353, 294-306.

Wilson, L., McKinlay, C., Gage, P. et Ewart, G. (2004). SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology* 330, 322-331.

Woo, P.C., Lau, S.K., Chu, C.M., Chan, K.H., Tsoi, H.W., Huang, Y., Wong, B.H., Poon, R.W., Cai, J.J., Luk, W.K., Poon, L.L., Wong, S.S., Guan, Y., Peiris, J.S. et Yuen, K.Y. (2005a). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 79, 884-895.

Woo, P.C., Lau, S.K., Huang, Y., Tsoi, H.W., Chan, K.H. et Yuen, K.Y. (2005b). Phylogenetic and recombination analysis of coronavirus HKU1, a novel coronavirus from patients with pneumonia. *Arch Virol* 150, 2299-2311.



Wu, H.Y. et Brian, D.A. (2010). Subgenomic messenger RNA amplification in coronaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Wurzer, W.J., Obojes, K. et Vlasak, R. (2002a). The sialate-4-O-acetylerases of coronaviruses related to mouse hepatitis virus: a proposal to reorganize group 2 Coronaviridae. *J Gen Virol* 83, 395-402.

Wurzer, W.J., Obojes, K. et Vlasak, R. (2002b). The sialate-4-O-acetylerases of coronaviruses related to mouse hepatitis virus: a proposal to reorganize group 2 Coronaviridae. *J Gen Virol* 83, 395-402.

Yan, X., Hao, Q., Mu, Y., Timani, K.A., Ye, L., Zhu, Y. et Wu, J. (2006). Nucleocapsid protein of SARS-CoV activates the expression of cyclooxygenase-2 by binding directly to regulatory elements for nuclear factor-kappa B and CCAAT/enhancer binding protein. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1417-1428.

Yang, Y., Xiong, Z., Zhang, S., Yan, Y., Nguyen, J., Ng, B., Lu, H., Brendese, J., Yang, F., Wang, H. et Yang, X.F. (2005). Bcl-xL inhibits T-cell apoptosis induced by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors. *Biochem J* 392, 135-143.

Ye, R., Montalto-Morrison, C. et Masters, P.S. (2004). Genetic analysis of determinants for spike glycoprotein assembly into murine coronavirus virions: distinct roles for charge-rich and cysteine-rich regions of the endodomain. *J Virol* 78, 9904-9917.

Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellicchio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T. et Holmes, K.V. (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357, 420-422.

Yeh, E.A., Collins, A., Cohen, M.E., Duffner, P.K. et Faden, H. (2004). Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* 113, e73-76.

Yokomori, K., Asanaka, M., Stohlman, S.A., Makino, S., Shubin, R.A., Gilmore, W., Weiner, L.P., Wang, F.I. et Lai, M.M. (1995). Neuropathogenicity of mouse hepatitis virus JHM isolates differing in hemagglutinin-esterase protein expression. *J Neurovirol* 1, 330-339.

Yokomori, K. et Lai, M.M. (1991). Mouse hepatitis virus S RNA sequence reveals that nonstructural proteins ns4 and ns5a are not essential for murine coronavirus replication. *J Virol* 65, 5605-5608.

Yokota, S., Saito, H., Kubota, T., Yokosawa, N., Amano, K. et Fujii, N. (2003). Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex. *Virology* 306, 135-146.

Yoo, D.W., Parker, M.D. et Babiuk, L.A. (1991). The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. *Virology* 180, 395-399.

- Youn, S., Leibowitz, J.L. et Collisson, E.W. (2005). In vitro assembled, recombinant infectious bronchitis viruses demonstrate that the 5a open reading frame is not essential for replication. *Virology* 332, 206-215.
- Yount, B., Curtis, K.M. et Baric, R.S. (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol* 74, 10600-10611.
- Yount, B., Curtis, K.M., Fritz, E.A., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Prentice, E., Denison, M.R., Geisbert, T.W. et Baric, R.S. (2003). Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12995-13000.
- Yount, B., Denison, M.R., Weiss, S.R. et Baric, R.S. (2002). Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* 76, 11065-11078.
- Yount, B., Roberts, R.S., Sims, A.C., Deming, D., Frieman, M.B., Sparks, J., Denison, M.R., Davis, N. et Baric, R.S. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *J Virol* 79, 14909-14922.
- Zeng, Q., Langereis, M.A., van Vliet, A.L., Huizinga, E.G. et de Groot, R.J. (2008). Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9065-9069.
- Zeng, R., Yang, R.F., Shi, M.D., Jiang, M.R., Xie, Y.H., Ruan, H.Q., Jiang, X.S., Shi, L., Zhou, H., Zhang, L., Wu, X.D., Lin, Y., Ji, Y.Y., Xiong, L., Jin, Y., Dai, E.H., Wang, X.Y., Si, B.Y., Wang, J., Wang, H.X., Wang, C.E., Gan, Y.H., Li, Y.C., Cao, J.T., Zuo, J.P., Shan, S.F., Xie, E., Chen, S.H., Jiang, Z.Q., Zhang, X., Wang, Y., Pei, G., Sun, B. et Wu, J.R. (2004). Characterization of the 3a protein of SARS-associated coronavirus in infected vero E6 cells and SARS patients. *J Mol Biol* 341, 271-279.
- Zhou, H., Ferraro, D., Zhao, J., Hussain, S., Shao, J., Trujillo, J., Netland, J., Gallagher, T. et Perlman, S. (2010). The N-terminal region of severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 induces membrane rearrangement and enhances virus replication. *J Virol* 84, 3542-3551.
- Ziebuhr, J. (2004). Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Curr Opin Microbiol* 7, 412-419.
- Ziebuhr, J. (2005). The coronavirus replicase. *Curr Top Microbiol Immunol* 287, 57-94.
- Ziebuhr, J. (2008). Coronavirus Replicative Proteins. In *Nidoviruses*, Perlman, S., Gallagher, T. et Snijder, E.J., eds. (Washington, DC, ASM Press), pp. 65-81.
- Ziebuhr, J. et Siddell, S.G. (1999). Processing of the human coronavirus 229E replicase polyproteins by the virus-encoded 3C-like proteinase: identification of proteolytic products and cleavage sites common to ppla and pplab. *J Virol* 73, 177-185.
- Zoltick, P.W., Leibowitz, J.L., Oleszak, E.L. et Weiss, S.R. (1990). Mouse hepatitis virus ORF 2a is expressed in the cytosol of infected mouse fibroblasts. *Virology* 174, 605-607.

Zuniga, S., Cruz, J.L., Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L. et Enjuanes, L. (2010). Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J Virol* 84, 2169-2175.

Zuniga, S., Sola, I., Alonso, S. et Enjuanes, L. (2004). Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J Virol* 78, 980-994.

Zuniga, S., Sola, I., Moreno, J.L., Sabella, P., Plana-Duran, J. et Enjuanes, L. (2007). Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* 357, 215-227.

Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Kuri, T., Blakqori, G., Weber, F., Ludewig, B. et Thiel, V. (2007). Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathog* 3, e109.

## ANNEXE 1 : CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

- **Jessica Desjardins**, Marc Desforbes et Pierre J. Talbot, *Rôle des protéines accessoires d'un coronavirus humain*, 78<sup>e</sup> Congrès de l'Association francophone pour le savoir-ACFAS, 10-14 mai 2010, Montréal. **Présentation orale**
- **Jessica Desjardins**, Marc Desforbes et Pierre J. Talbot, *Rôle des protéines accessoires du coronavirus humain OC43*, Congrès Armand-Frappier, 5-7 novembre 2009, Bromont. **Présentation par affiche**
- **Jessica Desjardins**, Marc Desforbes et Pierre J. Talbot, *Role of accessory proteins of human respiratory coronavirus OC43 in infection of the central nervous system*, Neuroinflammation grant lunch meeting, 23 avril 2009. **Présentation orale sur invitation**
- **Jessica Desjardins**, Marc Desforbes et Pierre J. Talbot, *Role of proteins of human respiratory coronavirus OC43 in infection of the central nervous system*, 3<sup>rd</sup> Annual CIHR Neuroinflammation Symposium, 30 mai 2008, Douglas Hospital, Montréal, Québec. **Présentation orale**
- **Jessica Desjardins**, Marc Desforbes et Pierre J. Talbot, *Rôle des protéines HE, ns2 et ns12.9 du coronavirus humain OC43 durant le cycle répliatif et l'infection des cellules du système nerveux central*, Congrès Armand-Frappier, 8-10 nov. 2007, Orford. **Présentation par affiche**