Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
Centre INRS - Institut Armand-Frappier

IMPLICATION DE L'EXCITOTOXICITÉ GLUTAMATERGIQUE DANS LE DÉVELOPPEMENT D'UNE NEUROPATHOLOGIE PARALYSANTE INDUITE PAR UN CORONAVIRUS RESPIRATOIRE HUMAIN

Par

Élodie BRISON

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.) en **virologie et immunologie**

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Pierre-Yves Lozach INRS - Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Jean Martin Beaulieu Université Laval
Examinateur externe	Nathalie Arbour Université de Montréal
Directeur de recherche	Pierre Talbot INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Élodie BRISON, 2013

Un filet d'eau qui coule toujours au même endroit

parvient à la longue à percer le roc

(Dogen, XIII^{ème} siècle)

RÉSUMÉ

Les coronavirus humains (HCoV) sont des pathogènes respiratoires très répandus causant notamment près du tiers des rhumes ainsi que des affections plus graves des voies respiratoires chez des populations vulnérables et pourraient être impliqués dans des pathologies du système nerveux. L'étiologie des maladies neurologiques est souvent multifactorielle, impliquant à la fois des facteurs génétiques et environnementaux, ces derniers incluant notamment des infections virales pendant l'enfance. Les travaux de recherche du laboratoire ont montré que la souche HCoV-OC43 est neuroinvasive et neurotrope chez l'humain et chez la souris. De plus, cette souche est neurovirulente chez des souris génétiquement susceptibles, chez lesquelles elle provoque une encéphalite. Dans le cadre de mon doctorat, nous avons notamment montré qu'une mutation ponctuelle dans la glycoprotéine de surface S (Y241H), acquise durant une infection persistante dans des cellules neurales humaines, et introduite dans un virus mutant, provoque une modification de neuropathologie chez la souris suite à l'infection des neurones. En effet, tandis que l'infection par la souche virale de référence induit une encéphalite, les souris infectées par le virus portant la mutation ponctuelle Y241H dans sa protéine S (rOC/U_{S241}) présentent des problèmes moteurs pouvant conduire à une paralysie totale des membres postérieurs, accompagnée d'une démyélinisation dans la moelle épinière. Nous avons par la suite entamé des études visant à caractériser les mécanismes sous-jacents à cette neuropathogenèse et exploré le rôle de l'excitotoxicité glutamatergique, considérant que le neurone est la cible principale de l'infection par HCoV-OC43 *in vivo* et *in vitro* et que cette infection induit une dégénérescence neuronale qui pourrait provenir d'une dérégulation de l'homéostasie du glutamate.

L'excitotoxicité est un processus pathologique par lequel le glutamate, un neurotransmetteur excitateur majeur du système nerveux central (SNC) associé à la mémoire et à l'apprentissage, peut induire la mort de cellules neurales par une entrée massive d'ions calcium dans les neurones post-synaptiques suite à une hyperstimulation des récepteurs ionotropes de type AMPA (acide 2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthyl-isoxazol-4-yl)propanoique) et/ou NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), responsables de la majorité de la transmission excitatrice rapide dans le SNC. Nous avons montré que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs AMPA (GYKI-52466, 3 µg/g) ou des récepteurs NMDA (mémantine, 3 µg/g ou dizocilpine, 0,5 µg/g) améliorait les scores cliniques reliés à la pathologie paralysante et aux problèmes moteurs chez la souris infectée par le virus HCoV-OC43 portant une mutation ponctuelle dans la protéine S. De plus, nous avons montré que ces antagonistes protégeaient le SNC de dysfonctionnements neuronaux, tel qu'illustré par une restauration majeure de l'état de phosphorylation des neurofilaments dans la moelle épinière. L'expression du transporteur glial du glutamate (GLT-1),

essentiel dans la régulation de l'homéostasie du glutamate, était régulée à la baisse suite à l'infection et le traitement au GYKI-52466 (3 µg/g) ou par la mémantine (3 µg/g) restaurait significativement son niveau d'expression. De plus, l'expression de la glutamine synthétase, essentielle pour le recyclage du glutamate, était régulée à la baisse suite à l'infection et le traitement par la mémantine (3 µg/g) restaurait significativement son niveau d'expression. En regard de l'inflammation au SNC, le traitement par le GYKI-52466 (3 µg/g) ou la mémantine (3 µg/g) des souris infectées, réduisait le niveau d'activation des microglies activées, ce qui pourrait conduire à une meilleure régulation de l'homéostasie du glutamate dans le SNC. En effet, certaines molécules pro-inflammatoires sont reconnues pour réduire l'expression du transporteur GLT-1 ainsi que de la glutamine synthétase, essentiels dans le processus de recyclage du glutamate. Enfin, la mémantine, médicament couramment utilisée chez l'humain pour le traitement de maladies neurologiques comme l'Alzheimer, le Parkinson et la sclérose en plaques, montrait un effet antiviral contre HCoV-OC43 lorsqu'il était utilisé à de plus fortes doses (5, 10 et 30 µg/g).

En conclusion, les résultats présentés dans cette thèse démontrent que l'excitotoxicité est impliquée dans la neuropathologie paralysante induite par un variant de HCOV-OC43 contenant une mutation dans la glycoprotéine de surface acquise suite à une infection persistante, ce qui pourrait représenter une éventuelle adaptation virale chez l'humain. De plus, la perturbation du recyclage du glutamate semble être un point important à la dérégulation de l'homéostasie du glutamate suite à l'infection par HCoV-OC43. En effet, celle-ci induit un stress et une mortalité neuronale, menant à une augmentation de l'inflammation, qui elle même peut perturber le recyclage du glutamate, via notamment des molécules pro-inflammatoires.

De plus, le nouveau mode d'action antiviral de la mémantine suggère que cette molécule pourrait être utilisée comme agent antiviral contre des virus impliqués dans des maladies neurologiques chez l'humain.

Signature étudiant

Signature directeur de recherche

REMERCIEMENTS

J'aimerais profiter de l'occasion pour remercier les personnes qui ont joué un rôle important dans cette aventure qu'est le doctorat.

J'aimerais tout d'abord remercier le docteur Pierre Talbot, pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire pour effectuer mon doctorat en neuroimmunovirologie. Merci pour les nombreux conseils formateurs et perfectionnistes qui m'ont permis d'avancer et de prendre confiance en mes recherches et mes convictions. Merci enfin de m'avoir permis d'assister à de nombreux congrès scientifiques nationaux et internationaux associant le plaisir de voyager et de rencontrer des scientifiques du monde entier.

Je remercie également les associés de recherche Hélène Jacomy et Marc Desforges, pour leurs conseils formateurs, les nombreuses discussions, leurs suggestions, leurs encouragements et l'ambiance de travail très agréable de ces cinq années de recherche.

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

Je remercie la Société Canadienne de la sclérose en plaques pour m'avoir accordé une bourse de recherche durant quatre années.

Enfin je remercie toute ma famille de France, mes proches, mes amis, mon conjoint ainsi que toute sa famille, sans oublier mes fidèles compagnons Frisby et Cocotte pour m'avoir encouragé, supporté moralement et psychologiquement dans ce long parcours qu'est le doctorat.

Cette aventure m'a permis de me rendre compte que le domaine de la neurologie me tient particulièrement à coeur et que je consacrerai ma carrière à faire avancer pas à pas la recherche sur les maladies neurologiques, dans ce beau pays...le Canada...

À Julia...

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ iii

REMERCIEMENTS v

TABLE DES MATIÈRES vi

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX x

Introduction x

Publication No.1 x

Publication No.2 xi

LISTE DES ABRÉVIATIONS xiii

CHAPITRE I: ÉTAT DES CONNAISSANCES

1. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC) 2

1.1 Structure et composantes du SNC 2

1.1.1 Structure du SNC 2

1.1.2 Les neurones et la neurotransmission 2

1.1.3 Les oligodendrocytes 6

1.1.4 Les astrocytes 6

1.1.5 Les microglies 7

1.1.6 La barrière hémato-encéphalique 8

1.2 Les infections du SNC 9

1.2.1 Voies d'entrée pour les virus dans le SNC 9

1.2.2 Neuroinvasion, neurotropisme et neurovirulence 10

1.2.3 Réponse immunitaire à l'infection virale 10

1.2.4 Persistance, adaptation et évasion virale 13

1.2.5 Maladies neurologiques à étiologie virale 14

2. LES CORONAVIRUS 20

2.1 Généralités et taxonomie 20

2.2 Protéines structurales et non-structurales 22

2.3 Le coronavirus murin MHV 25

2.4 Structure et fonctions de la glycoprotéine S 27

2.4.1 Généralités 27

2.4.2 Structure de la protéine S 27

2.4.3 Fonctions de la protéine S 28

2.4.4 Évolution de la protéine S en infection persistante 30

2.5 Cycle réplicatif 34

2.6 Pathologie et réponse immunitaire à l'infection coronavirale 37

3. L'EXCITOTOXICITÉ GLUTAMATERGIQUE 38

3.1 Le glutamate 38

3.2 Les récepteurs du glutamate 38

3.2.1 Les récepteurs ionotropes 39

3.2.2 Les récepteurs métabotropes 43

3.3 Synthèse, libération et recyclage du glutamate 43

3.3.1 Synthèse et libération 43

3.3.2 Recyclage 44

3.4 Mécanismes de l'excitotoxicité 48

3.5 Le glutamate et dysfonctionnements neuronaux 51

3.6 Maladies neurologiques impliquant l'excitotoxicité et traitements 51

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS 54

CHAPITRE II: PUBLICATIONS

Publication No.1: 56

Glutamate Excitotoxicity Is Involved In The Induction Of Paralysis In Mice After Infection By A Human Coronavirus With A Single Point Mutation In Its Spike Protein

Résumé 57

Abstract 58

Introduction 59

Materials and methods 61

Results 64

Discussion 78

Acknowledgments 81

References 82

Publication No.2: 87

Novel treatment with neuroprotective and antiviral properties against a neuroinvasive human respiratory virus

Résumé 88

Abstract 89

Introduction 90

Materials and methods 92

Results 97

Discussion 122

Acknowledgments 126

References 127

CHAPITRE III: DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Des virus portant des mutations ponctuelles dans la protéine S, acquises en infection persistante, induisent un changement de la neuropathologie viro-induite chez la souris 136

1.1 Données générales 136

1.2 Protéine S, neuroinvasion et dissémination 137

1.3 Protéine S et neurotropisme 139

1.4 Protéine S et réponse aux protéines mal repliées 141

1.5 Protéine S et système immunitaire 142

1.6 Protéine S et neurovirulence 145

2. L'excitotoxicité glutamatergique est impliquée dans le développement d'une neuropathologie paralysante suite à l'infection par HCoV-OC43 146

2.1 Données générales 146

2.2 Excitotoxicité, problèmes moteurs et paralysie 147

2.3 Glutamate et inflammation 149

2.4 HCoV-OC43 n'affecte pas la synthèse de glutamate 150

2.5 HCoV-OC43 affecte la repacture et le recyclage de glutamate 151

2.6 Excitotoxicité et virulence 152

3. Conclusion 154

4. Perspectives 155

ANNEXES 158

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 160

LISTE DES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES 192

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Introduction

Figure 1. Principales composantes cellulaires du système nerveux central 4

Figure 2: Phylogénie des *Nidovirales* 21

Figure 3: Représentation schématique du virion des *Coronaviridae* 24

Figure 4: Structure et évolution de la glycoprotéine S de HCoV-OC43 en infection persistante 33

Figure 5: Cycle réplicatif des *Coronaviridae* 36

Figure 6: Rôle des récepteursAMPA et NMDA dans la coordination de l'activité pré- et post-synaptique 42

Figure 7: Représentation schématique du cycle glutamate-glutamine 47

Figure 8: Mécanismes d'excitotoxicité glutamatergique induite par le calcium 50

Tableau I: Exemples de neurotransmetteurs (NT) et leur implication dans des maladies neurologiques 5

Tableau II: Maladies infectieuses virales du système nerveux associées ou non à de la démyélinisation 16

Tableau III: Liste de virus associés à l'induction / exacerbation de maladies neurologiques chez l'humain 19

Tableau IV: Transporteurs du glutamate et leur localisation 45

Tableau V: Antagonistes des récepteurs NMDA utilisés chez l'humain ou chez l'animal pour le traitement de désordres neurologiques 53

Publication No.1

Figure 1: Schematic representation of the point mutations introduced within the viral spike glycoprotein and associated neurovirulence in mice of the different recombinant viruses 66

Figure 2: Infectious virus production measured in the CNS of infected mice 67

Figure 3: AMPA receptor antagonist GYKI-52466 treatment attenuates motor dysfunctions in infected mice without modifying neurovirulence or viral replication 69

Figure 4: AMPA receptor antagonist treatment reduces neuronal dysfunction as observed by the phosphorylation state of heavy neurofilaments in mice infected with rOC/U_{S241} 72

Figure 5: Expression of glutamate transporter 1 (GLT-1) is down-regulated in mice infected with rOC/U_{S241} and partially restored following treatment with AMPA receptor antagonist 75

Figure 6: Treatment with AMPA receptor antagonist reduced microglial activation 77

Publication No.2

Figure 1: Daily memantine and dizocilpine treatment attenuates motor dysfunctions and severe paralysis induced following infection of mice by S-mutant human coronavirus OC43 98

Figure 2: Daily memantine treatment attenuates mortality rates of infected mice compared to dizocilpine treatment and vehicle (control) 100

Figure 3: Daily memantine treatment attenuates/abolishes weight loss of infected mice compared to dizocilpine treatment and vehicle (control) 102

Figure 4: Increase of extracellular glutamate levels and lactate dehydrogenase (LDH) release following infection of primary cultures of mouse CNS 104

Figure 5: Increase of extracellular glutamate levels is not a result of an increase of expression of phosphate-activated glutaminase 106

Figure 6: Expression of glutamine synthetase and glutamate transporter (GLT-1) are downregulated in infected with S-mutant human coronavirus OC43 virus and partially restored following treatment with memantine 109

Figure 7: Daily treatment with a low dose of memantine reduces neuronal dysfunctions in infected mice 112

Figure 8: Daily treatment with high doses of memantine attenuates viral replication in the CNS of infected mice 115

Figure 9: Prophylactic transient treatment with memantine attenuates viral replication in the CNS of infected mice 118

Figure 10: High doses of memantine reduce viral replication in a NMDA-blockade-indepent manner 120

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE2	*Angiotensin converting enzyme 2*
ADEM	Encéphalomyélite aigue disséminée *(Acute disseminated encephalomyelitis)*
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALD	Adrénoleucodystrophie *(Adrenoleukodystrophy)*
AMPA	Acide 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
AVC	Accident vasculaire cérébral
BDNF	Facteurs neurotrophes dérivés du cerveau *(Brain derived neurotrophic factor)*
BCoV	Coronavirus Bovin *(Bovine coronavirus)*
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CCL	Ligand des chimiokines *(Chemokine ligand)*
CD	Classe de différenciation *(Cluster of differentiation)*
CDV	Virus de la maladie de Carré *(Canine distemper virus)*
CEACAM1	*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CNTF	Facteur neurotrophe ciliaire *(Ciliary neurotrophic factor)*
CoV	Coronavirus
DLR	Domaine de liaison au récepteur
EAAT	Transporteur d'acide aminé excitateur *(Excitatory amino-acid transporter)*
EAE	Encéphalomyélite allergique expérimentale (*Experimental Allergic Encephalomyelitis*)
EBV	Virus Epstein-Barr *(Epstein-Barr virus)*
FIPV	Virus de la péritonite infectieuse féline (*Feline infectious peritonitis virus)*

GABA	Acide γ-aminobutyrique *(Gamma-aminobutyric acid)*
GDNF	Facteur neurotrophe dérivé de la glie *(Glial cell derived neurotrophic factor)*
GLAST	Transporteur du glutamate-aspartate *(Glutamate-aspartate transporter)*
GLT-1	Transporteur du glutamate *(Glutamate transporter 1)*
GLUT-1	Transporteur de glucose de type 1 *(Glucose transporter 1)*
GM-CSF	Facteur stimulant des colonies des granulocytes et macrophages
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HBV	Virus de l'hépatite B *(Hepatitis B virus)*
HCoV	Coronavirus humain *(Human coronavirus)*
HCV	Virus de l'hépatite C *(Hepatitis C virus)*
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine *(Human immunodeficiency virus)*
HHV	Herpès virus humain *(Human Herpes virus)*
HSV	Virus de l'Herpès Simplex *(Herpes Simplex virus)*
HTLV-1	Virus T-lymphotrope humain de type 1 *(Human T-Lymphotropic virus type 1)*
ICAM	Molécule d'adhesion intercellulaire *(Intercellular adhesion molecule)*
IFN	Interféron
IL-1	Interleukine-1
IL-3	Interleukine-3
IL-6	Interleukine-6
IL-10	Interleukine-10
IL-15	Interleukine-15
IP-10	Protéine 10 induite par l'interféron gamma *(Interferon gamma-induced protein 10)*
JAM-A	Protéine de jonction *(Junctional adhesion molecule A)*
KGA	Glutaminase de type rénale *(Kidney-type glutaminase)*
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire *(Lymphocytic choriomeningitis virus)*
LCR	Liquide céphalo-rachidien

LGA	Glutaminase de type hépatique *(Liver-type glutaminase)*
MAV-1	Adénovirus murin *(Mouse adenovirus 1)*
MBP	Protéine basique de la myéline *(Myelin basic protein)*
MCP	Protéine chimioattractrice des monocytes *(Monocyte chimoattractant protein)*
MHV	Coronavirus murin *(Mouse hepatitis virus)*
MIP-1β	Protéine inflammatoire 1 beta des macrophages *(macrophage inflammatory protein 1 beta)*
MOBP	Protéine basique de la myéline associée aux oligodendrocytes (*Myelin-Associated Oligodendrocyte Basic Protein*)
MOG	Glycoprotéine des oligodendrocytes de la myéline *(Myelin oligodendrocyte glycoprotein)*
NF	Neurofilament *(Neurofilament)*
NGF	Facteur de croissance des nerfs *(Nerve growth factor)*
NK	Cellule tueuse naturelle *(Natural killer)*
nsp	Protéine non structurale (*non structural protein*)
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NO	Oxyde nitrique *(Nitric oxide)*
ORF	Cadre de lecture ouvert *(Open reading frame)*
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes *(Pathogen-associated molecular patterns)*
PK	Protéine kinase
PLA2	Phospholipase A2
PLP	Protéine protéolipidique *(Proteolipid protein)*
PML	Encéphalopathie progressive multifocale *(Progressive multifocal leukoencephalopathy)*
RANTES	Régulé par activation, exprimé et secrété par les cellules T normales *(Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted)*
RE	Réticulum endoplasmique
RdRp	ARN polymérase ARN-dépendante *(RNA-dependent RNA polymerase)*
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène *(reactive oxygen species)*

RTC	Complexe de transcription-réplication
SARS	Syndrome aigu respiratoire sévère
SEP	Sclérose en Plaques *(Multiple Sclerosis)*
SIV	Virus de l'immunodéficience simien *(Simian immunodeficiency virus)*
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophe *(ALS: Amyotrophic lateral sclerosis)*
SNC	Système nerveux central *(Central nervous system)*
TGEV	Virus de la gastroentérite transmissible porcine (*Transmissible gastroenteritis virus)*
TGF-β	Facteur de croissance transformant bêta *(Transforming growth factor-beta)*
TLR	Récepteurs homologue de Toll (*Toll-Like receptor)*
TMEV	Virus de l'encéphalite murine de Theiler *(Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus)*
TNF-α	Facteur nécrosant des tumeurs alpha *(Tumor necrosis factor-alpha)*
UPR	Réponse aux protéines mal repliées *(Unfolded protein response)*
VCAM	Molécule d'adhérence vasculaire *(Vascular cell adhesion molecule)*
VGLUT	Transporteur vésiculaire du glutamate *(Vesicular glutamate transporter)*
VZV	Virus varicelle-zona *(Varicella-zoster virus)*
WNV	Virus du Nil Occidentale *(West Nile virus)*

CHAPITRE I: ÉTAT DES CONNAISSANCES

1. LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL (SNC)

1.1 Structure et composantes du SNC

1.1.1 Structure du SNC

Le système nerveux central (SNC) est formé de l'encéphale, composé lui-même du cerveau, du tronc cérébral et du cervelet, et de son prolongement dans le canal vertébral de la colonne vertébrale: la moelle épinière (Guyton, 1989). Les informations sensorielles afférentes (signaux corporels et environnementaux) arrivent au SNC, où sont traitées les données et d'où partent les influx nerveux de commande pour le bon fonctionnement de l'organisme et son adaptation à l'environnement. Le SNC se compose de tissu nerveux (neurones), glial et vasculaire. Le SNC est entouré de trois membranes, les méninges (de la profondeur vers la surface: pie-mère, arachnoïde et dure-mère) et des os (les vertèbres et la boite crânienne). Dans les méninges se trouve le liquide céphalo-rachidien (LCR), liquide sécrété par les plexus choroïdes, puis résorbé par l'organisme. Il est contenu dans l'espace subarachnoïdien, plus précisément entre la pie-mère (qui tapisse la surface externe du SNC) et l'arachnoïde (qui tapisse le versant interne de la dure-mère). Le LCR circule également dans les quatre ventricules cérébraux, à l'intérieur du cerveau, et dans le canal central de la moelle épinière. Le liquide céphalo-rachidien absorbe et amortit les mouvements ou les chocs qui risqueraient d'endommager le cerveau (Guyton, 1989). Le LCR contient des substances nutritives et des protéines qui assurent la nutrition et la protection du SNC et joue également un rôle de protection immunologique. De plus, des molécules et des déchets provenant du SNC sont également évacués dans le LCR et la composition de ce liquide particulier reflète le plus souvent l'état physiopathologique du cerveau (inflammation, infection, présence de molécules pharmacologiques, etc.) (Sakka *et al.*, 2011). Enfin, la substance (ou matière) blanche, principalement composée d'axones associées à des gaines de myéline, constitue la partie interne du cerveau et la partie externe de la moelle épinière. Elle relie différentes aires de la substance grise (partie des tissus du SNC composée essentiellement des corps cellulaires des neurones), qui elle est située en périphérie de l'encéphale et au centre de la moelle épinière (Guyton, 1989).

1.1.2 Les neurones et la neurotransmission

Le neurone est une cellule nerveuse excitable constituant l'unité fonctionnelle de base du système nerveux. Les neurones assurent la transmission des influx nerveux et existent dans une grande variété de

formes et de tailles. Chaque neurone est composé d'un corps cellulaire (également appelé *soma*) comportant un noyau avec deux types de ramification: l'axone, qui assure la transmission des messages nerveux (chimiques et électriques), et des dendrites, ramifications arborescentes représentant l'extension du cytoplasme du neurone, qui permettent la réception des messages nerveux (Figure 1). Les neurones ont deux propriétés physiologiques: l'excitabilité, c'est-à-dire la capacité de répondre aux stimulations et de convertir celles-ci en impulsions nerveuses, et la conductivité, c'est-à-dire la capacité de transmettre les impulsions, ce qui permet de transmettre un message, une information sensorielle ou un ordre moteur (Kandel *et al.*, 2000). En effet, les neurones ont la capacité de créer un potentiel d'action, appelé également influx nerveux. L'influx nerveux est transmis le long d'un neurone sous la forme d'une séquence de potentiel d'action. Le potentiel d'action correspond à une dépolarisation transitoire, locale et brève de la membrane plasmique des neurones, selon une loi du tout ou rien. En effet, la membrane plasmique présente une perméabilité sélective à l'égard de différents ions (sodium, potassium, chlore et calcium en particulier) modulable par différents facteurs comme par des neurotransmetteurs. La différence de concentration ionique résultante détermine la valeur locale du potentiel transmembranaire. La dépolarisation correspond à une augmentation de la perméabilité sodique et la repolarisation correspond à la fermeture des canaux sodiques et à l'ouverture de canaux potassiques. Les courants qui permettent la propagation de l'influx nerveux sont composés de vagues de dépolarisation/repolarisation. La synapse correspond au point de connection fonctionnel où l'axone se connecte aux dendrites permettant le passage de l'influx nerveux d'une cellule à une autre (Kandel *et al.*, 2000). La très grande majorité des synapses sont de type chimique. Moins rapides que les synapses électriques, elles sont cependant beaucoup plus souples et malléables, une caractéristique précieuse à la base de tout apprentissage. Dans la synapse électrique le signal est transmis électriquement par l'intermédiaire d'une jonction communicante où les cellules se touchent et sont reliées par des pores, ce qui permet à l'influx nerveux de passer directement de l'une à l'autre. Ce type de synapse joue un rôle important dans la synchronisation de l'activité de populations de cellules comme les neurones de l'hypothalamus à fonction neuroendocrine; le muscle cardiaque et le muscle lisse. La synapse chimique, quant à elle, est la plus fréquente des synapses du SNC qui permet la transmission du signal nerveux d'un neurone à un autre en utilisant un neurotransmetteur qui est émis par le neurone afférent, diffuse dans la fente synaptique et se lie aux récepteurs postsynaptiques. Plus d'une centaine de substances, de différentes natures, servant de neurotransmetteurs sont connus, dont certains ont été très étudiés ces dernières années en raison de leur implication dans diverses pathologies (Tableau 1). Selon la nature du neurotransmetteur, l'élément postsynaptique aura comme réponse un potentiel post-synaptique excitateur ou inhibiteur (Kandel *et al.*, 2000). Dans ce mémoire de thèse nous nous intéresserons particulièrement au glutamate, principal neurotransmetteur excitateur du SNC.

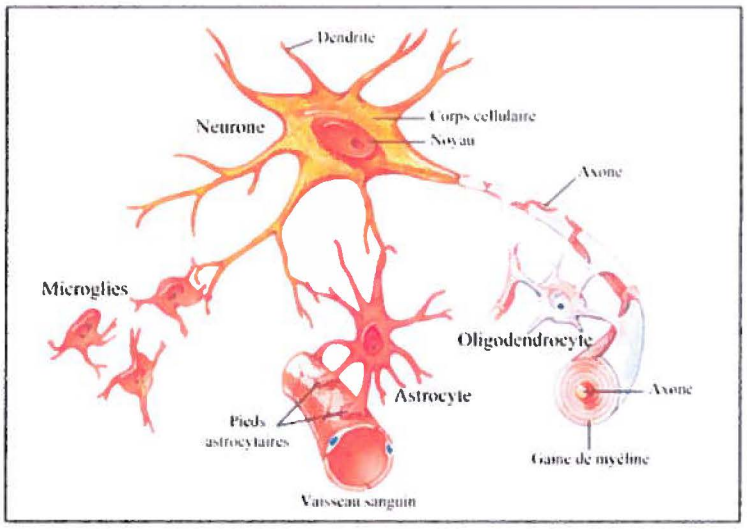


Figure 1. Principales composantes cellulaires du système nerveux central.

Le système nerveux central se compose de tissu nerveux (neurones), glial (oligodendrocytes, astrocytes et cellules microgliales) et vasculaire.

Tableau I: Exemples de neurotransmetteurs (NT) et leurs implications possibles dans des maladies neurologiques. (Adapté de Perry, 1991; Paulose *et al.*, 2007)

Neurotransmetteur	Fonctions au SNC	Désordres neurologiques
Glutamate	Principal NT excitateur du SNC Mémoire / Mouvements Potentialisation à long terme	Excitotoxicité (+) / Alzheimer (+) Parkinson (+) / Épilepsie (+) Schizophrénie (+) / Sclérose latérale amyotrophique (+) Sclérose en plaques (+)
GABA	Principal NT inhibiteur du SNC Mouvements / Sommeil	Maladie de Huntington (-) Épilepsie (-) Anxiété (-)
Dopamine	NT excitateur ou inhibiteur Émotions / Apprentissage Éveil / Mouvements	Maladie de Parkinson (-) Schizophrénie (+)
Acétylcholine	NT principalement excitateur Mouvements / Mémoire Éveil / Apprentissage	Maladie d'Alzheimer (-)
Sérotonine	NT principalement inhibiteur Sommeil / Appétit / humeur	Dépression (-) / Anxiété (-) Autisme (+)
Norépinephrine	NT excitateur ou inhibiteur Émotions / Apprentissage Appétit / Éveil	Dépression (-) Insomnie (+) / Anxiété (+)
Endorphines	NT principalement inhibiteur Réduction douleur et stress	Problèmes de dépendance (-) Douleur (-)

Désordres neurologiques: (+) si NT présent en excès / (-) si déficit du NT

1.1.3 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont retrouvés exclusivement dans le SNC, où ils sont responsables de la myélinisation des axones. Cette enveloppe, appelée gaine de myéline, est un prolongement de la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes (Figure 1). Un oligodendrocyte peut myéliniser plusieurs axones. Les oligodendrocytes se retrouvent aussi bien dans la substance grise que dans la substance blanche. Dans la substance grise, les oligodendrocytes sont proches des corps cellulaires des neurones où ils assurent un rôle métabolique par production entre autre de facteurs neurotrophes (Mekhail *et al.*, 2012; Wilkins *et al.*, 2003). Dans la substance blanche, ils sont responsables de la myélinisation axonale. Le processus de myélinisation promeut la survie et le développement neuronal ainsi que la vitesse de propagation des influx nerveux (Mekhail *et al.*, 2012). Les principales protéines spécifiques de la myéline du SNC sont la protéine protéolipidique (PLP), la protéine basique de la myéline (MBP), la protéine basique de la myéline associée aux oligodendrocytes (MOBP) et la glycoprotéine myéline-oligodendrocyte (MOG) (de Monasterio-Schrader *et al.*, 2012). Les oligodendrocytes sont des cellules essentielles au fonctionnement et à la survie des neurones. Dans le système nerveux périphérique ce sont les cellules de Schwann qui assurent la myélinisation. Le dysfonctionnement ou la dégénérescence de ces cellules peut induire la mort neuronale et mener ainsi à de graves pathologies du SNC comme par exemple la sclérose en plaques (SEP), l'encéphalomyélite aigue disséminée (ADEM), l'encéphalopathie progressive multifocale (PML), ou l'adrénoleucodystrophie (ALD) (Haberland, 2007).

1.1.4 Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses, de formes étoilées, exerçant de multiples fonctions au niveau du SNC centrées sur le support et la protection des neurones. En effet, les astrocytes participent au maintien de la barrière hémato-encéphalique grâce à des protubérances (pieds astrocytaires) en contact avec la membrane basale des vaisseaux sanguins, et les facteurs secretés par les astrocytes favorisent la formation de jonctions serrées entre les cellules endothéliales, limitant les échanges entre le domaine vasculaire et le SNC, contrôlant le flux sanguin et assurant l'approvisionnement en nutriments et le métabolisme énergétique des neurones (Nag, 2011) (Figure 1). De plus, les astrocytes produisent plusieurs facteurs comme le facteur de croissance des nerfs (NGF), le facteur neurotrophe ciliaire (CNTF), et les facteurs neurotrophes dérivés du cerveau (BDNF) qui agissent sur la croissance et la survie des neurones (Farina *et al.*, 2007; Nag, 2011). Les astrocytes sont également impliqués dans la régulation de l'homéostasie d'une variété de molécules du SNC et participent à la neurotransmission en

maintenant l'homéostasie de certains neurotransmetteurs, et maintiennent la balance ionique du milieu extracellulaire. En effet, au niveau de la synapse, les astrocytes interviennent dans le recyclage des neurotransmetteurs (GABA et le glutamate entre autres) et sont capables de produire des co-agonistes comme la D-sérine et la glycine permettant l'activation du récepteur NMDA avec le glutamate, modulant l'efficacité de la synapse (Nag, 2011). Les astrocytes contribuent également à réguler la composition ionique de l'espace extracellulaire. Les astrocytes jouent également un rôle dans la défense immunitaire de part leur capacité à secréter des molécules inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-3 (IL-3), l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-15 (IL-15), le facteur de croissance transformant (TGF-β), le facteur stimulant des colonies des granulocytes et macrophages (GM-CSF), l'interféron-γ (IFN-γ), le facteur nécrosant des tumeurs (TNF-α), l'oxyde nitrique (NO), des prostaglandines et des chimiokines dont entre autres MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 (Farina *et al.*, 2007). De récentes études ont montré que les astrocytes sont capables de phagocytose et de présentation d'antigènes via l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II, mais avec un niveau d'expression inférieur à celui exprimé par les microglies activées (Hamo *et al.*, 2007). Enfin, les astrocytes sont également impliqués dans le processus de réparation et cicatrisation après une lésion de par leur capacité à proliférer et à ainsi remplir les espaces laissés par la destruction de cellules neurales, formant une cicatrice gliale (Nag, 2011). Les astrocytes sont classés en deux catégories de part leurs morphologies: les astrocytes fibrillaires, qui présentent de longs prolongements et sont localisés préférentiellement au niveau de la substance blanche; et les astrocytes protoplasmiques, qui présentent des prolongements courts, et sont localisés préférentiellement au niveau de la substance grise. Les astrocytes peuvent également être classés en deux catégories de part leurs fonctions (ne recoupe pas la classification morphologique): les astrocytes de type I qui participent à la barrière hémato-encéphalique et les astrocytes de type II qui jouent un rôle de soutien métabolique et trophique vis-à-vis des neurones et des oligodendrocytes. Étant donné le nombre de fonctions importantes exercées par les astrocytes, un dysfonctionnement du rôle de ces cellules pourrait avoir de graves conséquences quant à l'homéostasie du SNC en ions, neurotransmetteurs, nutriments ou quant aux défenses immunitaires du SNC, favorisant ainsi le développement de maladies neurologiques.

1.1.5 Les microglies

Les cellules microgliales sont des cellules immunocompétentes résidentes du SNC (Figure 1). Elles représentent l'équivalent fonctionnel des macrophages dans d'autres tissus. Ces cellules représentent environ 10% des cellules gliales en condition physiologique (Kreutzberg, 1996) et s'activent et prolifèrent dans divers cas de lésions cérébrales ou de pathologies. Elles ont une origine hématopoïétique au cours du

développement fœtal et se rendent jusqu'au SNC, contrairement aux cellules de la macroglie (astrocytes et oligodendrocytes entre autre) qui ont une origine neuroectodermique (Bechmann *et al.*, 2005). Les microglies présentent une plasticité morphologique et démontrent différents stades d'activation tout comme les macrophages. En effet, dans le SNC mature, au repos et en condition physiologique, les microglies présentent un petit soma et de nombreux prolongements fins et très ramifiés partant dans toutes les directions permettant d'analyser en permanence leur microenvironnement (Vilhardt, 2005; Kettenmann *et al.*, 2011). Les microglies au stade activé présentent un corps cellulaire plus gros avec des prolongements moins longs. Suite à une activation, elles prolifèrent et deviennent alors mobiles par des déplacements de type amiboïde pour rejoindre le site de lésion (Ladeby *et al.*, 2005). Elles peuvent alors induire l'expression de toutes les molécules nécessaires à une présentation antigénique efficace comme le CMH de classe I et II, et secréter tout un éventail de facteurs susceptibles de réguler la réponse immunitaire comme des cytokines pro- ou anti-inflammatoires (entre autres le TNF-α, l'IL-1, l'IL-6, le TGF-β et l'IL-10), des facteurs cytotoxiques (NO, protéases, glutamate) ou neurotrophes (des neurotrophines, du NGF, BDNF et GDNF) (Wake *et al.*, 2011). Enfin, selon les circonstances, si les dommages cellulaires persistent, les microglies peuvent également assurer une fonction phagocytaire afin de détruire les microorganismes envahissants et d'enlever les débris potentiellement dommageables notamment pour les neurones (Kettenmann *et al.*, 2011). Dans ce cas elles adoptent une morphologie hypertrophiée avec de rares prolongements et deviennent indiscernables des macrophages périphériques tant du point de vue morphologique que phénotypique. En outre, ces cellules peuvent soit être bénéfiques ou néfastes, dépendamment des circonstances. En effet, les microglies vont assurer la protection contre les infections virales, la survie neuronale et le bon fonctionnement général du SNC. Cependant, les microglies peuvent aussi jouer un rôle très important dans le développement de plusieurs maladies neurologiques, telles que la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer, si leur activation est non-contrôlée, et de part l'effet toxique de certaines cytokines sur les cellules avoisinantes.

1.1.6 La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) représente l'interface physiologique entre la circulation sanguine et le SNC. Elle est composée principalement de cellules endothéliales, reliées entre elles par des jonctions serrées, de pieds des prolongements astrocytaires, de la lame ou membrane basale et des péricytes (Ballabh *et al.*,2004). Elle régule l'homéostasie du SNC et apporte des éléments nutritifs au cerveau. La BHE est un filtre extrêmement sélectif contre entre autre des agents pathogènes, des toxines et des hormones circulant dans le sang (Ballabh *et al.*,2004). Cette fonction de protection du cerveau

complique certains traitement médicamenteux pour certaines maladies neurologiques, car de nombreuses molécules actives ne peuvent pas traverser cette BHE (Fu, 2012). La perméabilité de la BHE peut être influencée par différents types de molécules comme les cytokines TNF, IL-1, IL-6 ou le NO (Wong *et al.*, 2004), ou encore des neurotransmetteurs comme le glutamate (Liu *et al.*, 2010). Une augmentation de la perméabilité de la BHE est observée dans certaines pathologies comme entre autres dans la maladie d'Alzheimer (Deane *et al.*, 2007); la SEP (Alvarez *et al.*, 2011); l'épilepsie (Oby *et al.*, 2006) ou dans l'encéphalite associée au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Dallasta *et al.*, 1999).

1.2 Les infections du SNC

1.2.1 Voies d'entrée pour les virus dans le SNC

Les pathogènes ont élaboré des stratégies leur permettant de passer la BHE et d'entrer dans le SNC dont la conséquence est de contribuer au développement de maladies neurologiques. ***1- Les pathogènes peuvent entrer dans le SNC via l'épithélium des capillaires du cerveau.*** En effet, des études in vitro ont montré que plusieurs virus incluant le polyomavirus JC (Chapagain *et al.*, 2007), le virus de la poliomyélite (Coyne *et al.*, 2007), le virus Epstein-Barr (EBV) (Casiraghi *et al.*, 2011), l'adénovirus murin (MAV-1) (Gralinski *et al.*, 2009), le virus T-lymphotrope humain de type 1(HTLV-1) (Afonso *et al.*, 2008) et le virus du Nil Occidental (WNV) (Verma *et al.*, 2010) peuvent infecter directement les cellules de l'endothélium microvasculaire du SNC humain, altérant ainsi les jonctions serrées et augmentant la perméabilité vasculaire de la BHE. De plus, des virus sont capables d'utiliser des protéines exprimées par les cellules endothéliales pour pénétrer dans le SNC. C'est le cas de certains réovirus qui sont capables de se lier à la protéine de jonction (JAM-A), qui a un rôle dans la formation de jonctions serrées de la BHE, et ainsi pénétrer le SNC (Antar *et al.*, 2009). De plus, le rétrovirus humain HTLV-1 peut également se lier à différents récepteurs comme le transporteur de glucose de type 1 (GLUT-1) exprimé par les cellules endothéliales et ainsi pénétrer le SNC (Afonso *et al.*, 2008). ***2- Le "cheval de Troie".*** Les pathogènes peuvent entrer dans le SNC en utilisant des cellules comme véhicule. L'infection des monocytes/macrophages est considérée comme le mécanisme majeur utilisé par les lentivirus (virus de l'immunodéficience humaine VIH, virus de l'immunodéficience simien (SIV) et virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)) (Clay *et al.*, 2007; Alexaki *et al.*, 2008). De plus, le polyomavirus JC, le VIH et le SIV peuvent infecter des leucocytes et ainsi pénétrer le SNC (Monaco *et al.*, 1996; Drevets *et al.*, 2000). Concernant les coronavirus, le coronavirus humains 229E et le virus du SARS (SARS-CoV) ont la capacité d'infecter des monocytes in vitro, ce qui pourrait leur conférer un

moyen potentiel d'entrer au SNC (Collins, 2002; Law *et al.*, 2005; Desforges *et al.*, 2007). ***3- Les pathogènes peuvent entrer dans le SNC via les plexus choroïdes.*** Le virus de Sendai et le virus LCMV peuvent cibler les cellules du plexus choroïde et se retrouver dans le LCR. De plus certains virus comme le virus influenza, le virus herpès simplex, le virus varicelle-zona et le virus des oreillons sont capables d'infecter les cellules épendymales, qui recouvrent les ventricules du cerveau et le canal central de la moelle épinière (Tuomanen, 1996). ***4- Les pathogènes peuvent entrer dans le SNC via les nerfs périphériques.*** Le virus de la poliomyélite, les adénovirus et le virus de la rage peuvent se lier au neurone à la jonction neuromusculaire via l'expression de récepteurs viraux et ainsi pénétrer dans le SNC (Salinas *et al.*, 2010). De plus le virus de l'herpès et le virus de la pseudo-rage peuvent infecter des neurones sensoriels et ainsi pénétrer le SNC (Curanovic *et al.*, 2009). Enfin, les neurones olfactifs qui se ramifient dans les muqueuses des narines et pénètrent directement dans le bulbe olfactif du cerveau peuvent être la cible de pathogènes comme le coronavirus murin, le virus de la stomatite vésiculaire, le virus de l'herpès HSV-1 ou le virus de la maladie de Borna (Mori *et al.*, 2005) et probablement le coronavirus humain HCoV-OC43, capable d'infecter le SNC de souris via le nerf olfactif (St-Jean *et al.*, 2004). Ainsi les virus neuroinvasifs peuvent pénétrer dans le SNC via différentes voies.

1.2.2 Neuroinvasion, neurotropisme et neurovirulence

La neuroinvasion caractérise la capacité d'un pathogène à pénétrer dans le SNC à partir de sites périphériques (voir chapitre *1.2.1 Voies d'entrée pour les pathogènes dans le système nerveux central*) car les pathogènes n'ont pas d'accès direct au SNC à partir de l'extérieur environnant, à moins d'un traumatisme lésionnel ou lors d'un acte chirurgical (Pulzova *et al.*, 2009). Le neurotropisme définit l'habileté d'un pathogène à infecter des cellules du système nerveux central ou périphérique. Enfin la neurovirulence désigne le caractère pathogène, nocif et violent d'un microorganisme, c'est à dire sa capacité à causer une pathologie au SNC détectable par des observations histologiques et/ou cliniques, voire la mort de l'hôte (Notkins *et al.*, 1986) .

1.2.3 Réponse immunitaire à l'infection virale

En règle générale, la première ligne de défense contre une infection virale est la réponse immunitaire innée, induite par la cellule infectée en réponse à la reconnaissance d'acides nucléiques viraux par des récepteurs cellulaires cytoplasmiques ou en réponse au stress dû au détournement de la machinerie métabolique cellulaire (Aoshi *et al.*, 2011). Il s'agit d'une réponse rapide qui permet de

maintenir le virus en quantité raisonnable pendant que la réponse immunitaire acquise se mette en place. La cellule produit différentes molécules pro-inflammatoires, dont les principales sont les interférons (IFN) –α et –β. Leurs effets autocrines et paracrines permettent de limiter la réplication virale dans la cellule infectée, d'induire des mécanismes de résistance à l'infection dans les cellules voisines et d'activer des cellules du système immunitaire et de réduire la traduction protéique de la cellule. Par la suite, les IFNs vont augmenter l'expression du CMH de classe I des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques) et des cellules NK, ce qui va permettre d'initier la réponse immunitaire adaptative à l'infection virale (Aoshi *et al.*, 2011). Les cellules dendritiques et les macrophages sont responsables de la libération de cytokines chimio-attractantes ou chimiokines et de la présentation antigénique aux lymphocytes infiltrants. Les lymphocytes ayant un rôle essentiel lors d'une infection virale sont les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ qui reconnaissent les cellules infectées et induisent leur lyse afin de limiter la prolifération du virus et qui sont une source importante d'IFN- γ (Aoshi *et al.*, 2011). Les lymphocytes T CD4+, sont quant à eux, impliqués dans l'activation des cellules B et de la réponse humorale, et sont également importants quant à leur capacité à sécréter de l'IFN-γ, qui aide à la mise en place et à la maturation des réponses lymphocytaires TCD8 et lymphocytaires B en stimulant la présentation antigénique, en favorisant l'état antiviral, et en inhibant la prolifération cellulaire des cellules infectées afin de limiter la propagation virale (Schroder *et al.*, 2004).

Tel que mentionné précédemment, plusieurs virus sont capables de pénétrer et d'infecter diverses cellules du SNC et d'activer ainsi le système immunitaire (Binder *et al.*, 2003). Pendant longtemps, l'existence d'un système de surveillance immunitaire dans le SNC paraissait inconcevable, d'une part parce que le parenchyme nerveux est séparé de la circulation sanguine par la BHE, et d'autre part parce le cerveau est dépourvu de drainage lymphatique et exprime faiblement des molécules du CMH de classe I et II et de molécules de co-stimulation sur les cellules du cerveau ou sur les cellules endothéliales des capillaires. Une surveillance immunitaire adéquate nécessite que l'antigène et les cellules présentatrices d'antigène puissent gagner les organes du système lymphoïde secondaire, ce qui fait du drainage lymphatique un élément essentiel. En fait, le SNC est capable de drainer les antigènes via des voies alternatives. En effet, les antigènes sont principalement drainés via le drainage physiologique du LCR dans le sang, mais ils peuvent également rejoindre le système lymphoïde secondaire le long des axones des nerf périphériques craniaux ou spinaux (Hatterer *et al.*, 2006; Romo-Gonzalez *et al.*, 2012). Néanmoins, dans certaines conditions, la présentation antigénique peut se réaliser directement dans le SNC dans des structures lymphoïdes ectopiques, lorsqu'elles sont présentes (Pedemonte *et al.*, 2006).

Le SNC doit maintenir une balance entre les effets protecteurs ou délétères de l'activation du système immunitaire. La réponse immunitaire innée du SNC résulte de l'expression de récepteurs dits

"toll-like" (TLR) principalement par les cellules gliales (microglies et astrocytes), mais également par les neurones (Aravalli et *al.*, 2007). Les TLR peuvent reconnaitre des motifs moléculaires uniquement présents chez des microorganismes pathogènes dénommés PAMP pour "pathogen-associated molecular pattern". Ainsi les TLR capables de détecter des virus dans le SNC sont les TLR 2, 3, 4, 7, 8 et 9. Ceci va mener à l'activation d'une cascade de signaux intracellulaires qui va mener entre autre à la sécrétion d'IFN de type I (interféron α et β) qui vont limiter la réplication virale dans la cellule infectée, induire des mécanismes de résistance à l'infection dans les cellules voisines et activer des cellules du système immunitaire. Il y aura également sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (dont l'IL-1, IL-6, IL-12, le TNF-α), de chimiokines (dont la protéine inflammatoire des macrophages (MIP-1β, *également appelée CCL4*); les protéines chimioattractives des macrophages (MCP1/*CCL2* et MCP3/*CCL7*) ou des lymphocytes T (RANTES/*CCL5*) et la protéine inductible par l'interféron gamma de type 10 (IP-10/ *CXCL10*)) et augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation pour la présentation antigénique aux lymphocytes infiltrants (Griffin, 2003).

Dans le SNC sain, très peu de cellules immunitaires passent la BHE. En effet, en conditions physiologiques les neurones et la glie régulent l'entrée de cellules immunitaires dans le SNC via entre autre l'expression de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF-β (Griffin, 2003; Griffiths *et al.*, 2010). C'est donc seulement lors d'une inflammation, que certaines cellules vont pénétrer le SNC. L'inflammation induit l'expression de molécules d'adhésion (ICAM, VCAM) sur l'endothélium et de présentation des antigènes (CMH de classe I et II) qui attirent les neutrophiles et permettent le passage des monocytes et des lymphocytes dans le SNC. En effet, en conditions physiologiques, le SNC n'exprime que peu de CMH de classe I et II, entre autres parce que les neurones régulent à la baisse leur expression sur les cellules gliales environnantes. En conditions pathologiques toutefois, il y a expression des CMH de classe II sur les cellules gliales (astrocytes et microglies) et expression des CMH de classe I sur les neurones et sur les oligodendrocytes. Le premier type de cellules à débuter la réponse immunitaire innée à l'infection virale est la cellule cytotoxique NK qui va induire la mort cellulaire afin de limiter la réplication et la dissémination du virus.

L'infiltration de cellules immunitaires pour l'installation de la réponse immunitaire adaptative dans le SNC commence trois à quatre jours après l'infection. Les lymphocytes primordiaux lors d'une infection virale sont les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (TCD8+) qui reconnaissent les cellules infectées et induisent leur lyse afin limiter la prolifération du virus. Il existe troies voies différentes de cytolyse par les TCD8+. 1/ La lyse de la cellule infectée est produite par le relâchement de substances cytotoxiques contenues dans des granules: la perforine, qui perfore la membrane des cellules cibles; et le granzyme B, qui induit l'apoptose de la cellule cible; 2/ Activation du récepteur Fas par son ligand (FasL) exprimé par

le TCD8+, induisant l'apoptose de la cellule cible; 3/ libération de cytokines par le TCD8+, comme le TNF-α, qui va se lier aux récepteurs du TNF et induire l'apoptose de la cellule cible (Neumann *et al.*, 2002).

Enfin, les lymphocytes T CD4+ (TCD4+), impliqués dans l'activation des cellules B et de la réponse humorale, sont également importants quant à leur capacité à sécréter eux aussi de l'IFN de type II (IFN-γ) qui a un rôle dans la stimulation de l'activité phagocytaire des macrophages, la maturation des lymphocytes T et B, l'expression des molécules de présentation des antigènes (CMH de classe I et II) et l'activation des polynucléaires neutrophiles et des cellules NK.

L'interaction complexe entre les médiateurs inflammatoires, les facteurs environnementaux, l'âge et le bagage génétique peut être critique dans la survenue et le développement de maladies neurologiques lors d'une activation non-contrôlée de la réponse immunitaire dans le SNC.

1.2.4 Persistance, adaptation et évasion virale

Un des lieux de persistance privilégié pour les virus est le SNC, car l'activation des réactions immunitaires est très contrôlée afin d'éviter d'induire des effets secondaires délétères au SNC. Les virus ont co-évolué avec l'hôte. L'infection d'un organisme par un virus, déclenche en général une réaction immunitaire forte qui conduit à l'élimination complète de ce dernier. Cependant, après une phase d'infection aigue, lorsque le système immunitaire échoue à éliminer le virus, des mécanismes variés comme l'échappement à la réponse immunitaire ou une répression générale de l'expression des gènes viraux permettent l'établissement d'une persistance de l'agent infectieux accompagnée parfois de conséquences à long terme sur la santé humaine (Lipton *et al.*, 1996). Trois types principaux de persistance ont été caractérisés selon la stratégie de réplication virale empruntée. ***1- L'infection latente***: le génome persiste dans les cellules hôte. Ce dernier peut se répliquer occasionnellement lors d'épisodes de réactivation. C'est le cas du virus de l'herpes simplex chez l'humain qui persiste dans les neurones sensitifs des ganglions trigéminaux (Nicoll *et al.*, 2012). ***2- L'infection chronique défective.*** Se produit lorsque le cycle réplicatif viral ne produit que les protéines virales, sans assemblage de particules infectieuses. La persistance virale des virus à ARN s'accompagne souvent de l'expression des protéines virales nécessaires à la réplication et au maintien du génome viral car les cellules hôtes ne peuvent fournir les fonctions nécessaires pour répliquer l'ARN comme c'est le cas suite à l'infection par le virus de la Dengue (Holland *et al.*, 1980; Li *et al.*, 2011a). ***3- L'infection chronique lente.*** De faibles quantités de particules infectieuses sont produites de façon continue. C'est le cas du VIH, qui, pendant de longues périodes de temps persiste dans les lymphocytes T CD4+, les monocytes et les macrophages, et se reproduit

activement, causant des dommages au système immunitaire (Weber, 2001). C'est également le cas du virus de l'hépatite B (HBV), qui peut persister dans les hépatocytes, les lymphocytes et les macrophages (Wright, 2006).

Certains critères sont nécessaires à la persistance virale. ***1- Cytolyse limitée.*** Certains virus peuvent être lytiques pour certains types cellulaires sans l'être pour d'autres. ***2- Le génome viral maintenu dans l'hôte***, comme font les rétrovirus en incorporant leur génome sous forme d'ADN dans le génome de la cellule hôte, le virus de l'herpès dont le génome viral est maintenu sous forme d'épisome, ou comme certains virus à ARN qui maintiennent leur génome sous forme d'un intermédiaire d'ADN comme le fait le VIH. ***3- Évasion virale du système immunitaire.*** Les virus ont développé des stratégies pour éviter la surveillance immunitaire de l'hôte, comme l'émergence de variants antigéniques rapides (VIH et virus de l'hépatite C (HCV); faible expression de protéines virales (virus de l'herpès et VIH); la suppression de molécules cellulaires de surface nécessaires à la reconnaissance par les lymphocytes T (Adénovirus, virus de l'herpès, cytomégalovirus (CMV)); interférence avec la présentation antigénique (virus de l'herpès); sécrétion d'analogues de cytokines (virokines); induction de molécules anti-apoptotiques ou dispersion via des syncytia (virus de la rougeole). Les virus ont donc développé de multiples stratégies afin de persister dans leur hôte (Gonzales-Scarano, 2002; Tyler *et al.*, 2001). Cependant, la persistance virale peut induire toute sortes de perturbations au SNC, comme une inflammation accrue, la perturbation de l'influx nerveux, ou même l'induction de la mort de cellules neurales qui peuvent être à l'origine ou contribuer au développement de maladies neurologiques.

1.2.5 Maladies neurologiques à étiologie virale

Les virus peuvent être impliqués dans des maladies neurodégénératives chez l'humain et les animaux, soit comme point de départ dans l'induction de ces maladies ou comme facteur aggravant. Les maladies neurodégénératives affectent le fonctionnement du SNC de façon progressive au cours de leur évolution. Ces maladies provoquent généralement une détérioration du fonctionnement des cellules nerveuses, en particulier les neurones, pouvant conduire à leur mort. Dans certains cas, suite à la mort neuronale, peut s'en suivre une destruction des oligodendrocytes résultant en une démyélinisation dans le SNC (dégénérescence dite "inside-out"). Dans d'autres cas la mort neuronale peut être la conséquence d'une démyélinisation (dégénérescence dite "outside-in") (Amor *et al.*, 2010). Enfin, le mimétisme moléculaire représente également un mécanisme par lequel des virus peuvent déclencher l'autoimmunité et mener à la mort de cellules neurales. Dans ce cas le virus partage des déterminants antigéniques avec des antigènes du soi ce qui permet, une fois la réponse immunitaire déclenchée, l'activation de lymphocytes

dirigés à la fois contre le virus mais également contre des antigènes du soi (Fujinami *et al.*, 2006). L'aptitude des virus à induire des maladies neurodégénératives peut donc résulter soit d'un effet direct de celui-ci en induisant la mort neuronale ou un effet indirect via une activation non-contrôlée du système immunitaire pouvant induire des effets nuisibles sur les cellules du SNC (Amor *et al.*, 2010). Le tableau II décrit plusieurs virus neuroinvasifs et neurotropes chez l'humain et certains animaux associés ou non à une démyélinisation.

Tableau II. Maladies infectieuses virales du système nerveux associées ou non à de la démyélinisation. (Adapté de Atkins *et al.*, 2000; Lipton *et al.*, 2007; Griffin, 2003; Gonzalez-Scarano, 2002)

Virus / *Hôte(s)*	Associée à induction / exacerbation	Site de persistance	Démyélinisation
	Infection transitoire		
Bunyaviridae			
Virus de la Crosse / *Humain*	Encéphalite		non
Flaviviridae			
Nil Occidental / *Humain*	Encéphalite		non
Encéphalite de Saint-Louis / *Humain*	Encéphalite		non
Parainfluenza			
Oreillons / *Humain*	Encéphalite Méningite		non
Rabdoviridae			
Rage / *Humain*	Encéphalomyélite		non
	Infections latentes		
Herpesviridae			
EBV / *Humain*	Encéphalite Méningite ADEM GB	Cellules épithéliales du pharynx Lymphocytes B	oui
CMV / *Humain* *Souris*	Encéphalite ADEM GB	Glandes salivaires Lymphocytes Macrophages	oui
HSV / *Humain*	Encéphalite ADEM	Neurones sensoriels	oui
HHV-6 / *Humain*	Encéphalite	Monocytes / macrophages	non
VZV / *Humain*	Encéphalite Méningite / Myélite	Neurones sensoriels	non

Infections chroniques lentes

Coronaviridae			
MHV / *Souris* *Rat*	Encéphalomyélite	Neurones / Astrocytes Microglies Oligodendrocytes	oui
HCoV	?	SNC	?
Flaviviridae			
Virus de l'encéphalite à puce / *Humain*	Encéphalite de la taïga	SNC	oui
Virus de l'encéphalite Japonaise / *Humain, chevaux, bétail*	Encéphalite	SNC	
Papovaviridae			
JC / *Humain*	PML	Oligodendrocytes	oui
Paramyxoviridae			
Rougeole / *Humain*	Panencéphalite subaigüe sclérosante	Neurones Cellules gliales	oui
CDV / Chien	Encéphalite Démyélinisation	Oligodendrocytes Neurones	oui
Togaviridae			
Rubéole / *Humain*	Panencéphalite progressive	SNC	oui
Fôret de Semliki / *Souris*	Encéphalite	SNC	oui
Picornaviridae			
TMEV / *Souris*	Encéphalomyélite	Neurones Microglies / Oligodendrocytes	oui
Poliovirus / *Humain*	Poliomyélite	Neurones	non
Retroviridae			
HTLV-1 / *Humain*	Myélopathie	Lymphocytes T	oui
VIH / *Humain*	Démence	Lymphocytes T CD4+ Monocytes / Macrophages Microglies	non
Visna / *Mouton*	Encéphalomyélite	Monocytes / Astrocytes	oui

ADEM: encéphalomyélite aiguë disséminée; GB: Syndrome de Guillain-barré

De plus, le développement de maladies neurologiques implique la plupart du temps à la fois des facteurs génétiques et des facteurs liés à l'environnement, probablement infectieux. En effet, plusieurs virus sont associés à l'induction ou à l'exacerbation des maladies telles que la SEP (Virtanen *et al.*, 2012), la maladie d'Alzheimer (Honjo *et al.*, 2009), la maladie de Parkinson (Jang *et al.*, 2009) et la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) (Przedborski *et al.*, 2003). Le tableau III décrit plusieurs virus associés à l'induction / exacerbation de maladies neurologiques chez l'humain. Ces exemples de maladies neurodégénératives, associées à la présence de divers virus, montre la diversité et la complexité de l'interaction entre des virus, le SNC humain et le système immunitaire.

Tableau III. Liste de virus associés à l'induction / exacerbation de maladies neurologiques chez l'humain. (Adapté de Owens *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2009; Przedborski *et al.*, 2003; Libbey *et al.*, 2011; Alfahad et al., 2013)

Virus	Associé à l'induction / exacerbation
Coronaviridae	
HCoV	SEP?
Flaviviridae	
Flavivirus	SEP / PD / Épilepsie
Herpesviridae	
HSV-1	SEP / AD / Schizophrénie / Épilepsie / ADEM
HHV6	SEP / Épilepsie
EBV	SEP / GB / ADEM
CMV	SEP / GB / ADEM
VZV	SEP / GB
Orthomyxoviridae	
Influenza	SEP / GB / PD / Épilepsie / ADEM
Papovaviridae	
JC	LMP
Parainfluenza	
Oreillons	SEP / Épilepsie / ADEM
Paramyxoviridae	
Rougeole	SEP / Épilepsie / ADEM
RSV	SEP
Picornaviridae	
Coxsackie	SLA / PD / ADEM
Parainfluenza de type 1	SEP
Rabdoviridae	
Virus de la rage	SEP
Retroviridae	
HTLV-1	SEP / SLA
HIV	AD / SLA
Togaviridae	
Rubéole	SEP / Épilepsie / ADEM

SEP: Sclérose en Plaques; AD: maladie d'Alzheimer; GB: Syndrome de Guillain-Barré; SLA: Sclérose Latérale Amyotrophique; PD: maladie de Parkinson; ADEM: Encéphalomyélite aigue disséminée; LMP: Leucoencéphalopathie multifocale progressive

2. LES CORONAVIRUS

2.1 Généralités et taxonomie

Le terme coronavirus évoque un aspect en couronne de ces virus lorsqu'observés en microscopie électronique. Cette forme caractéristique est conférée par la présence de trimères de la protéine S à la surface du virion (Davies *et al.*, 1979). Les coronavirus sont des virus enveloppés à capside hélicoïdale, dont le génome est une molécule d'ARN monocaténaire de très grande taille (27 à 31000 nucléotides), linéaire, non segmentée, de polarité positive. La sous-famille des *Coronavirinae* fait partie de la famille des *Coronaviridae* et de l'ordre des *Nidovirales* (de Groot *et al.*, 2012; de Groot *et al.*, 2013). Cette sous-famille se divise en quatre genres (de Groot *et al.*, 2013), classés sur la base de données sérologiques puis moléculaires, qui regroupent des virus animaux connus depuis les années 1930, des virus humains identifiés dans les années 1960 (Hamre *et al.*, 1966; Almeida *et al.*, 1967; McIntosh *et al.* 1967) et de nombreux virus découverts très récemment (de Groot *et al.*, 2011). Les coronavirus du genre *Alpha* et *Betacoronavirus* infectent les mammifères, dont l'humain, et ceux du genre *Gammacoronavirus* et *Deltacoronavirus* infectent entre autre les oiseaux (Figure 2). Jusqu'à récemment, cinq coronavirus étaient identifiés chez l'humain. Le genre *Alphacoronavirus* comprend entre autre les espèces HCoV-229E et HCoV-NL63. Le genre *Betacoronavirus* comprend les espèces HCoV-OC43, SARS-related CoV, responsable de l'épidémie du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère en 2002-2003 et HCoV-HKU1. Très récemment, en juin 2012, fut identifié un nouveau coronavirus humain, appelé MERS-CoV et faisant partie du genre *Betacoronavirus* (Chan *et al.*, 2013). Les personnes atteintes par ce nouveau coronavirus présentent généralement des pneumonies. Les coronavirus hors SARS-CoV sont responsables principalement de rhumes dans la population en général et sont essentiellement étudiés dans ce cadre. Ils sont rarement recherchés en pathologie humaine, toutefois, leur implication est clairement démontrée en tant qu'agent associé au développement de maladies des voies respiratoires inférieures telles les pneumonies et bronchiolites ainsi que comme facteur aggravant de l'asthme (Vabret *et al.*, 2009). De plus, certaines données montrent leur rôle éventuel dans des pathologies autres au niveau du système nerveux (SEP) ou du système digestif (entérocolite nécrosante) (Vabret *et al.*, 2009). La recherche systématique des coronavirus humains dans les prélèvements respiratoires pourrait permettre d'améliorer la connaissance du rôle de ces virus en pathologie.

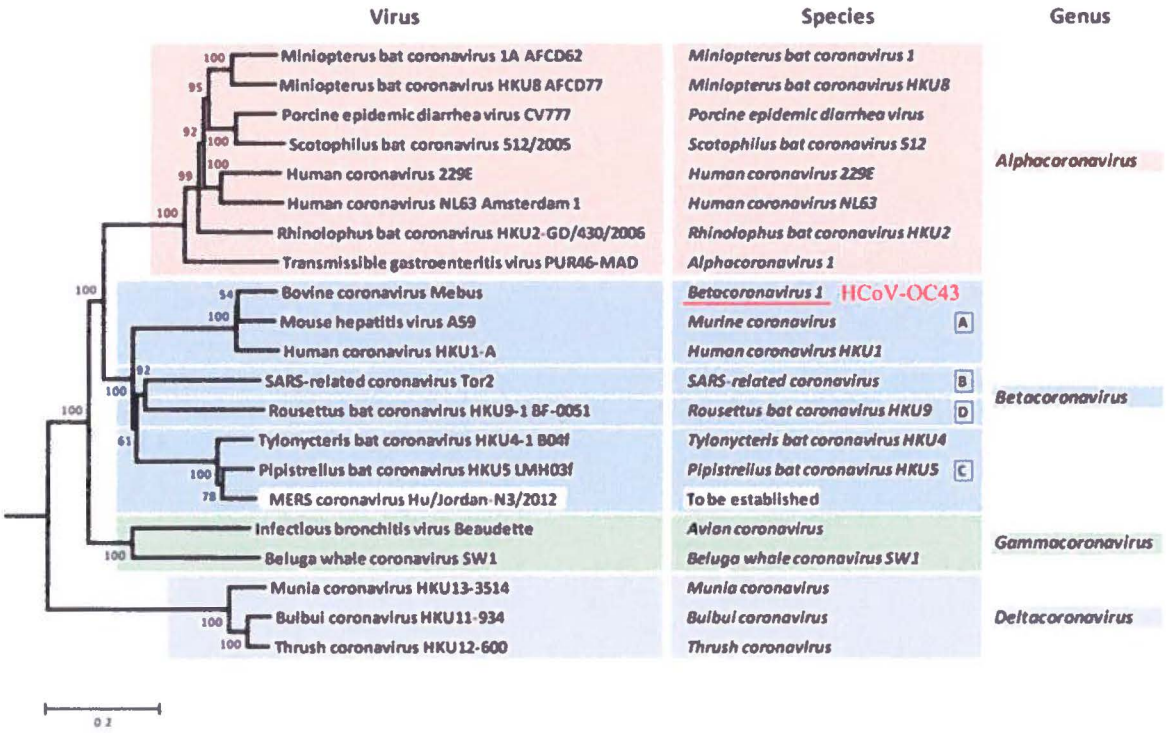


Figure 2. Phylogénie des *Nidovirales*.

Basée sur la taxonomie du *9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (*de Groot et al., 2012; de Groot et al., 2013*). Dans cette thèse nous nous intéresserons particulièrement au coronavirus humain OC43, qui fait partie du genre *Betacoronavirus* et de la famille des *Betacoronavirus 1*.

2.2 Protéines structurales et non-structurales

Les coronavirus sont des virus enveloppés, dont le diamètre est compris entre 100 et 160 nm, à capside hélicoïdale, dont le génome est une molécule d'ARN monocaténaire de très grande taille (de 26 à 32 Kb), linéaire, non segmentée, de polarité positive. Le génome des coronavirus code pour des protéines structurales et non-structurales selon qu'elles possèdent ou non un rôle dans la structure globale du virion.

Les protéines structurales des coronavirus font partie de la capside et de l'enveloppe, et incluent donc les protéines S (spicule), E (enveloppe), M (membrane), N (nucléocapside) et la protéine HE (hémagglutinine-estérase) présente que chez certains coronavirus du genre *Betacoronavirus* (Figure 3).

La glycoprotéine S de spicule est une protéine membranaire, la protéine la plus étudiée et la mieux définie des coronavirus. Elle possède une multitude de rôles et fonctions divers au niveau de la structure du virion, du tropisme ainsi que de la pathogenèse qui sont définis plus amplement dans la section *2.4 Structure et fonction de la glycoprotéine S.*

La glycoprotéine d'enveloppe E est la plus petite protéine structurale des coronavirus. Bien que son rôle dans l'infection ne soit pas clairement défini, on sait qu'elle forme des canaux ioniques chez le SARS-CoV notamment (Wilson *et al.*, 2004). Toutefois, il est clair qu'elle joue un rôle majeur dans l'assemblage et la morphogenèse des particules virales (Lim *et al.*, 2001) ainsi que dans leur bourgeonnement (Kuo *et al.*, 2003). Bien que la protéine E ne semble pas essentielle dans la réplication du coronavirus murin MHV (Murine Hepatitis Virus) *in vitro* (Kuo *et al.*, 2003), elle a un rôle indispensable dans la réplication du coronavirus porcin TGEV (Transmissible Gastroenteritis Virus) (Ortego *et al.*, 2002) ce qui rend son implication dans la réplication des coronavirus encore plus controversé.

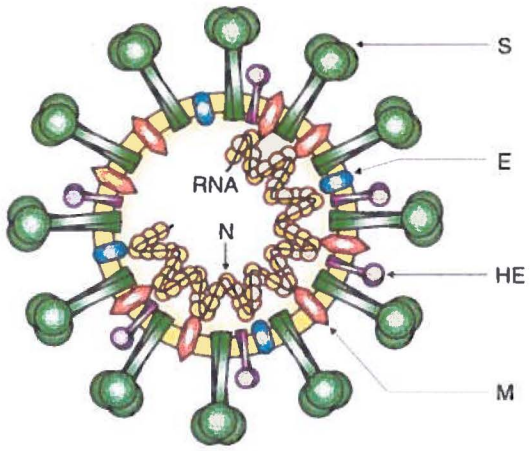
La glycoprotéine membranaire, M, est la protéine virale la plus abondante. Elle est impliquée dans l'assemblage et le bourgeonnement viral (Sturman *et al.*, 1980, Mounir *et al.*, 1992, Lai *et al.*, 1997). La protéine membranaire M avec la protéine d'enveloppe E serait les deux seules protéines virales nécessaires à l'assemblage des particules virales car elles peuvent mener à la formation de pseudoparticules lorsqu'elles sont co-exprimées (Nal *et al.*, 2005). La protéine M orchestre l'assemblage des particules virales par interaction avec les protéines structurales N (Fang *et al.*, 2005), E (Lim *et al.*, 2001), S et HE (de Haan *et al.*, 1999).

La protéine de nucléocapside N est une protéine chaperonne de l'ARN viral présente à l'intérieur de l'enveloppe du virion qui s'associe à l'ARN génomique en formant le complexe ribonucléoprotéique ayant pour rôle la protection du génome viral (Lai *et al.*, 1997). La protéine N jouerait également un rôle

dans les stades précoces de la réplication des coronavirus, notamment lors de la transcription du génome (Schelle *et al.*, 2005) et lors de la stabilisation des réplicons génomiques (Almazan *et al.*, 2004).

Enfin, la glycoprotéine HE est une hémagglutinine-estérase se retrouvant à la surface de certaines espèces coronavirales du genre Betacoronavirus et possédant une fonction de liaison à l'acide sialique ainsi qu'une fonction acétyl-estérase. Bien que la fonction précise de la protéine HE demeure encore mal comprise, son rôle dans l'infectivité des coronavirus demeure controversé. En effet, la protéine HE du coronavirus bovin (BCoV) n'est pas nécessaire à sa réplication ou à l'infection de cellule-cible (Popova *et al.*, 2002), alors que chez le coronavirus murin (MHV-A59), HE n'est tout simplement pas exprimée dû à l'absence d'un codon d'initiation (Yokomori *et al.*, 1991) mais son expression ectopique chez MHV-A59 induit une augmentation de la neurovirulence en souris en favorisant la dissémination du virus dans le SNC (Kazi *et al.*, 2005). Dans le cas du HCoV-OC43, il a été récemment démontré que l'activité acétyl-estérase de la protéine HE améliore la production de virus infectieux et contribue à la dissémination virale (Desforges *et al.*, 2013a).

Les protéines non-structurales des coronavirus sont codées par le génome viral mais ne sont pas incorporées à l'intérieur des virions. Cette catégorie de protéines inclue entre autre les protéines non-structurales nsp issue du clivage de deux polyprotéines 1a et 1ab, elles-même codées par le complexe des gènes de la réplicase, correspondant aux cadre de lecture ouvert (ORF (*Open Reading Frame*) 1a et 1ab) et ayant des fonctions reliées à la réplication et à la transcription du génome viral (Ziebuhr *et al.*, 2000). D'autres protéines non-structurales dont les fonctions biologiques commencent à peine à être caractérisées sont dispersées à l'intérieur du génome des différents coronavirus. Elles seraient associées entre autre à la virulence *in vivo* (Ito *et al.*, 2005) et à la stabilité virale *in vivo* (Tan *et al.*, 2005) ainsi qu'à la capacité de se répliquer dans certains organes (Roth-Cross *et al.*, 2009).



	Nom	Fonctions
S	Glycoprotéine de surface	Forme les protubérances visibles en microscopie électronique Liaison à un récepteur cellulaire spécifique Fusion des membranes virales et cellulaires Rôle dans la pathogenèse
N	Protéine de la Nucléocapside	Lie l'ARN viral et forme la nucléocapside
M	Protéine de la membrane	Assemblage des particules virales Interagit avec la nucléocapside
E	Protéine de l'enveloppe	Assemblage de particules virales Associée à l'enveloppe virale
HE	Hémagluttinine-estérase	Forme des petites spicules à la surface des coronavirus du genre *Betacoronavirus* Lie l'acide neuraminique 9-O-acétylé Clivage des groupes acétyles de l'acide neuraminique Améliore la production de virus infectieux et contribue à la dissémination virale

Figure 3. Représentation schématique du virion des *Coronaviridae* (Bender *et al.*, 2010)

2.3 Le coronavirus murin MHV

L'espèce MuCoV (*murine coronavirus*) représente un large groupe de virus pouvant induire une variété de maladies chez la souris et le rat comme des hépatites, des gastroentérites, et également dans certains cas une encéphalite accompagnée de lésions de démyélinisation dans la moelle épinière. Parmi les principales sous-espèces de MuCoV, on retrouve le MHV (*mouse hepatitis virus*), dont deux souches sont particulièrement bien étudiées et sont connues pour induire une paralysie des membres postérieurs accompagnée de lésions de démyélinisation au SNC et sont ainsi utilisées comme l'un des modèles viraux pour l'étude de la SEP (Marten *et al.*, 2001).

La première souche de MHV neurotrope chez la souris (MHV-JHM) fut isolée en 1949 d'une souris montrant des signes cliniques de paralysie, d'encéphalomyélite et de démyélinisation (Bailey *et al.*, 1949; Cheever *et al.*, 1949). À la suite d'une infection intranasale ou intracérébrale, la souche MHV-JHM infecte les cellules gliales et les neurones et induit une encéphalite aigue avec un fort taux de mortalité chez les souris infectées (Talbot *et al.*, 2001). Les souris qui survivent à l'infection présentent dans la matière blanche du cerveau et de la moelle épinière, une pathologie chronique sous forme de foyers de lésions de démyélinisation avec des épisodes successifs de démyélinisation/remyélinisation (Talbot *et al.*, 2001). Il est à noter que plusieurs variants atténués de MHV-JHM (causant un pourcentage de mortalité moins élevé chez les souris infectées), ont été isolés afin de pouvoir étudier plus facilement la démyélinisation résultante de l'infection. L'infection par MHV-JHM induit une activation exacerbée ou système immunitaire inné (forte expression d'IFN-β, d'IL-1 et d'IL-6) avec une infiltration importante de macrophages et de polynucléaires neutrophiles, puis une importante infiltration de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Haring *et al.*, 2001). Les anticorps spécifiques contre le virus ne semblent pas essentiels à l'élimination de celui-ci mais sont importants pour prévenir la réactivation de l'infection et la mort de l'animal (Lin *et al.*, 1999). L'activation exacerbée du système immunitaire inné ainsi que l'insuffisance d'une réponse T lymphocytaire spécifique contre le virus peuvent résulter en un fort taux de mortalité induit chez les souris infectées avec MHV-JHM (Bender *et al.*, 2010). Suite à l'infection par MHV-JHM, plusieurs études mettent en cause une composante auto-immunitaire (Houtman *et al.*, 1996a; Houtman *et al.*, 1996b; Wu *et al.*, 2000). En effet, il a été montré que l'infection de rats par MHV-JHM permet l'induction de lymphocytes T dirigés contre la MBP, et qu'un transfert adoptif de ces lymphocytes à des rats non sensibilisés induit une maladie similaire à l'EAE avec pour protéine cible la MBP (Watanabe *et al.*, 1983). De plus, une augmentation de la fréquence de cellules T autoréactives a également été démontrée suite à l'infection de souris par MHV (Kyuwa *et al.*, 1991).

Une autre souche de MHV, MHV-A59, moins neurovirulente que MHV-JHM, est également capable d'induire une maladie démyélinisante, en plus de causer une hépatite. MHV-A59 possède un tropisme neuronal et glial au niveau du SNC mais est moins virulente que la souche MHV-JHM, ce qui en fait l'un des modèles intéressants pour étudier la démyélinisation. Suite à l'encéphalite aigue, l'infection par MHV-A59 n'est jamais complètement éliminée. En effet, chez les souris qui survivent, malgré la chute rapide des titres infectieux, une infection persistante s'installe, l'ARN viral persiste dans le SNC, et les lésions de démyélinisation peuvent s'observer une semaine post-infection et deviennent évidentes 4 semaines après l'infection (Bender *et al.*, 2010). L'infection par MHV-A59 induit surtout une réponse antivirale de type T $CD8^+$ (Bender *et al.*, 2010). Par la suite les lymphocytes T $CD8^+$ ne sont pas totalement éliminés du SNC des souris du fait de la persistence de l'ARN viral (Marten *et al.*, 2000).

Le mécanisme menant à la démyélinisation suite à l'infection par MHV-A59 n'est pas totalement élucidé. En effet, comme décrit précédemment dans le paragraphe *1.2.5 Maladies neurologiques à étiologie virale*, il subsiste toujours deux écoles de pensées quant aux causes qui aboutissent à une démyélinisation. En effet, selon certains, la mort neuronale peut être la cause d'une destruction subséquente des oligodendrocytes résultant en une démyélinisation dans le SNC (dégénération dite "inside-out") et selon les autres la mort neuronale peut être la conséquence d'une démyélinisation suite aux conséquences de la réponse immunitaire subséquente à l'infection (dégénération dite "outside-in") (Amor *et al.*, 2010). Il est à noter que ces deux concepts ne sont pas mutuellement exclusifs et qu'une double contribution de ces deux mécanismes proposés peut expliquer la démyélinisation induite par MHV. Le modèle "inside-out" décrit la capacité de MHV à infecter les neurones et à induire leur mort, ce qui conduirait par la suite à une perte de la gaine de myéline, caractéristique de la démyélinisation (Fazakerley *et al.*, 1993; Dales *et al.*, 1995). Cependant, la persistance d'ARN et d'antigènes viraux favorisent la rétention des cellules T et des macrophages au SNC, ainsi qu'une libération de différentes cytokines, notamment IP-10 (*CXCL10*) et RANTES (*CCL5*) qui demeurent à taux élevé lors de la persistance virale. De plus, l'activation chronique des astrocytes durant l'infection persistante contribue à la démyélinisation via la sécrétion de chimiokines pour l'attraction de lymphocytes et de macrophages ainsi que la sécrétion de TNF-α, d'IL-1, d'IL-6 et d'oxydes nitriques (NO) qui peuvent directement contribuer à la destruction des oligodendrocytes résultant en une perte de myéline (Bender *et al.*, 2010). Il apparait donc clair qu'une contribution du système immunitaire, conjointement aux effets cytopahtiques de MHV, participent dans le phénomène de démyélinisation. Enfin, une étude récente a montré que l'infection de souris par MHV-A59 permettait également d'induire des lymphocytes T réactifs contre la MBP, favorisant ainsi la démyélinisation (Gruslin *et al.*, 2005).

Les symptômes peuvent être différents selon la voie d'inoculation et la dose de virus utilisée. MHV-A59 est beaucoup moins virulent que MHV-JHM puisqu'il en faut 750 fois plus en injection intracérébrale (i.c.) que ce dernier pour obtenir la dose létale induisant la mort de 50% des souris infectées (DL_{50}) (Matthews *et al.*, 2002). MHV-A59 est généralement capable d'infecter le foie, que ce virus soit inoculé par voie i.c.; intranasale (i.n.) ou intrapéritonéale (i.p.), cependant si la dose de virus est faible, la voie d'inoculation i.c. ou i.n. n'induira pas d'infection du foie (Matthews *et al.*, 2002). MHV-JHM, inoculé en i.n. peut se répliquer à faible taux dans les poumons et dans les noeuds lymphatiques cervicaux et n'a pas de tropisme hépatique (Matthews *et al.*, 2002).

2.4 Structure et fonctions de la glycoprotéine S

2.4.1 Généralités

La glycoprotéine S des coronavirus est la protéine la plus étudiée et la mieux définie structuralement et fonctionnellement. Elle comporte une multitude de propriétés biologiques importantes telles que la liaison au récepteur ainsi que l'induction de fusions cellule-cellule et virus-cellule. Étant donné sa présence à la surface du virion et de la cellule infectée, c'est une protéine fortement reconnue par le système immunitaire, ce qui induit une production d'anticorps neutralisants et l'activation de lymphocytes T cytotoxiques, ce qui lui confère un rôle important au niveau de la pathogenèse des coronavirus. La protéine S joue également un rôle majeur dans la virulence, le tropisme, et dans la propagation du virus. Cette protéine représente un élément important dans les travaux de cette thèse, c'est pour cette raison que ses rôles seront détaillés de façon plus approfondie dans cette section.

2.4.2 Structure de la protéine S

La glycoprotéine S est une protéine abondamment présente à la surface des particules virales (Krueger *et al.*, 2001), hautement *N*-glycosylée (de Haan *et al.*, 1999), de 1160 à 1450 acides aminés, dont quatre séquences consensus de glycosylation (trois séquences de type N-X-T et une séquence de type N-X-S).

La glycoprotéine S est une protéine membranaire de type I, présente sous forme de trimères, séparée en deux sous-unités (S1 et S2). Elle possède un domaine transmembranaire ainsi qu'un site de clivage reconnu par des protéases cellulaires et présent uniquement chez certaines souches coronavirales dont BCoV, MHV-A59, MHV-JHM et MHV-3. Dans le cas de MHV, le clivage de la protéine S donne lieu

aux deux sous-unités S1 et S2 qui sont respectivement la tête globulaire N-terminale et la région de la tige de la protéine (Daniel *et al.*, 1993). Les espèces HCoV-229E, TGEV, FIPV et HCoV-OC43 ne possèdent pas de site de clivage clairement défini dans la protéine. La sous-unité S1 comprend le site de liaison présumé au récepteur cellulaire ainsi qu'une région hypervariable reconnue pour muter facilement, et probablement impliquée dans l'évasion des coronavirus du système immunitaire (Rowe *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 2001b). De plus, certaines études ont suggéré que des altérations de cette région hypervariable pourraient influencer les interactions entre les sous-unités S1 et S2 pour la fusion cellulaire (Tsai *et al.*, 1999). La région S2 comprend quant à elle un segment intra-cytoplasmique et transmembranaire, ainsi que trois domaines fonctionnels juxtaposés l'un à l'autre qui incluent le peptide de fusion (PF) (Bosh *et al.*, 2003) et les régions répétées « *heptad repeats* » (HR1 et HR2) qui sont impliquées dans la fusion membranaire (Supekar *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). Ces deux régions seraient directement impliquées dans le processus d'entrée du virus dans la cellule (Gallagher *et al.*, 2001).

2.4.3 Fonctions de la protéine S

La fonction principale liée à la protéine S est l'attachement du virus à la cellule cible via son domaine de liaison au récepteur (DLR) situé du côté amino-terminal de la sous-unité S1 de la protéine (Taguchi, 1995a). La protéine S est le principal déterminant du tropisme et permet donc au virus de reconnaitre un récepteur cellulaire spécifique, de le lier et d'initier une cascade de réactions qui mènera ultimement à la pénétration du virus chez la cellule cible (Cullen, 2001; Gallagher *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2004). En effet, la sous-unité S1 serait spécifiquement impliquée dans le processus d'entrée du virus dans la cellule-cible en participant au changement conformationnel de la protéine S suite à sa liaison au récepteur (Lewicki *et al.*, 2002; Matsuyama *et al.*, 2002; Zelus *et al.*, 2003).

Cependant, selon l'espèce de coronavirus, la séquence en acides aminés et la localisation du DLR ainsi que sa spécificité à reconnaitre différents récepteurs peuvent varier. Des récepteurs cellulaires ont été identifiés pour certains coronavirus, tandis que d'autres restent à être identifiés, comme pour le coronavirus humain OC43. Pour les coronavirus du genre *Alphacoronavirus,* comme le FIPV (Feline Infectious Peritonitis Virus), le TGEV (Transmissible gastroenteritis virus) et le HCoV-229, le récepteur utilisé par le virus est l'aminopeptidase N ou le CD13 (Delmas *et al.*, 1992; Yeager *et al.*, 1992; Hegyi *et al.*, 1998; Lachance *et al.*, 1998). Il s'agit d'une metalloprotéase ubiquitaire exprimée dans plusieurs organes et tissus comme l'intestin, les reins et les poumons. Les coronavirus humains HCoV-NL63 et SARS-CoV utilisent un récepteur commun, l'*Angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) (Hofmann *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). Il s'agit d'une exopeptidase exprimée dans le coeur, les reins et les poumons. De

plus, le SARS-CoV peut également utiliser le L-SIGN/CD209L, exprimée dans le foie et les poumons, comme récepteur alternatif (Jeffers *et al.*, 2004). Enfin, le coronavirus MHV, également membre du genre *Betacoronavirus* reconnaît comme récepteur le *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1), une glycoprotéine de surface cellulaire de la famille des immunoglobulines exprimée sur les cellules épithéliales et sur les leucocytes (Saeki *et al.*, 1997). Les espèces BCoV et HCoV-OC43 n'ont pas encore de récepteur cellulaire spécifique identifié, mais il a été reconnu que leur liaison au récepteur est dépendante de la présence d'acide sialique acétylé en position C9 (Kunkel *et al.*, 1996; Gelinas *et al.*, 2001; Schwegmann-Wessels *et al.*, 2006).

La liaison de la protéine S à son récepteur amorce une cascade de réactions menant à l'internalisation du virus dans la cellule hôte. Dépendant de l'espèce coronavirale, il y aura clivage ou non de la protéine S suite à la liaison à son récepteur ce qui peut donc mener à un changement conformationnel de celle-ci. En effet, plusieurs membres des *Alphacoronavirus* et des *Gammacoronavirus* ne subissent pas le clivage de leur protéine S (Breslin *et al.*, 2003), tout comme HCoV-OC43, ne possédant pas de site de clivage clairement défini (Kunkel *et al.*, 1996). Le but du clivage de la protéine S est de permettre le repliement de la sous-unité S2 et l'exposition des domaines de fusion dont le peptide de fusion (PF) et les régions répétées « *heptad repeats* » (HR1 et HR2) à la membrane plasmique de la cellule-cible afin de permettre la fusion membranaire (Matsuyama *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2003). Cependant, le clivage et la libération de la sous-unité S2 ne seraient pas essentiels à la fusion des membranes et à l'entrée du virus. En effet, bien que certains coronavirus ne subissent pas de clivage protéolytique, il semblerait que les protéines S de ces virus soient assez flexibles pour exposer le peptide de fusion membranaire suite à l'attachement au récepteur (Stauber *et al.*, 1993; Hingley *et al.*, 1998). Selon certaines études, il semblerait qu'une augmentation du clivage protéolytique de la protéine S stimulerait les fusions cellule-cellule, ce qui mènerait à la formation de syncytia (de Haan *et al.*, 2004) et, dans certains cas, de plages de lyse *in vitro* (Haijema *et al.*, 2003). Bien qu'à ce jour il n'y ait toujours pas de consensus quant au mode d'entrée des coronavirus dans la cellule-cible, il semblerait que certains coronavirus utilisent l'endocytose en plus de la fusion cellulaire afin d'infecter la cellule. Bien que ces mécanismes aient été démontrés pour les coronavirus humains HCoV-229E et le SARS-CoV, l'intervention de la fusion membranaire ainsi que du phénomène d'endocytose lors d'une même entrée virale demeure controversée (Blau *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2004). Étant donné que l'entrée virale des coronavirus du genre *Alphacoronavirus* (comme HCoV-229E) semble être un phénomène dépendant du pH, et que l'entrée virale des coronavirus du genre *Betacoronavirus* (comme MHV) semble être un phénomène indépendant du pH, il semblerait raisonnable de croire que la plupart des coronavirus du genre *Alphacoronavirus* et *Betacoronavirus* favoriseraient respectivement un mécanisme d'endocytose et de fusion membranaire (Blau *et al.*, 2001; Krueger *et al.*,

2001). Par contre, on ignore s'il existe un lien entre l'efficacité du clivage de la protéine S et le mode d'entrée utilisé par le virus.

La protéine S joue également un rôle dans la pathogenèse induite par les coronavirus. La plupart des connaissances sur le rôle de la protéine S dans la neuropathogenèse ont été obtenues à partir d'études sur le coronavirus murin MHV, entre autre les souches MHV-A59 et MHV-JHM, qui sont connues pour induire des neuropathologies différentes. Tel que mentionné précédemment, MHV-A59 est une souche hépatotrope connue pour induire des hépatites et neurotrope, menant à des lésions de démyélinisation plusieurs semaines suite à l'infection avec une virulence modérée. En contrepartie, MHV-JHM est une souche principalement neurotrope induisant une neurovirulence importante menant rapidement à la perte des neurones et à la mort du sujet infecté. En effet, il a été montré par des études de génétique inverse que la protéine S pouvait influencer la neurovirulence et la dissémination *in vivo* ou *in vitro* (Taguchi *et al.*, 1995b; Phillips *et al.*, 2001a; Fu *et al.*, 2004). Le remplacement de la protéine S de MHV-A59 par celle de MHV-JHM mène à la production d'une souche recombinante possédant une neurovirulence accrue ainsi qu'une dissémination au SNC plus importante par rapport à la souche MHV-A59 de référence (Phillips *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2002). De plus, cette souche recombinante n'est plus à même d'induire une hépatite, comparé à la souche de référence MHV-A59 (Navas *et al.*, 2001). Cependant, le remplacement de la protéine S de MHV-JHM par celle de MHV-A59 ne mène pas à une diminution de la neurovirulence de la souche recombinante résultante (Iacono *et al.*, 2006), pas plus qu'à un phénotype hépatotrope (Navas *et al.*, 2003). Ces données indiquent donc que la protéine S est un déterminant majeur de la pathogenèse mais qu'elle n'est pas la seule protéine coronavirale impliquée dans le tropisme ou la neurovirulence du virus.

2.4.4 Évolution de la protéine S en infection persistante

Les coronavirus sont des virus à ARN qui sont sujets à un haut taux de mutations de leur génome. En effet, les ARN polymérase ARN-dépendantes (RdRp) utilisées par les coronavirus sont reconnues pour leur faible fidélité lors de la réplication du génome (Denison *et al.*, 2011), ce qui permet la génération de plusieurs mutants, sélectionnés entre autres en fonction de l'environnement dans lequel ils se trouvent et l'apparition de quasi-espèces, qui désigne une population de virions d'une même espèce, mais hétérogène et changeant, au sein d'un même organisme hôte (Lauring *et al.*, 2010). Les mutations acquises qui ne sont pas létales pour le virus confèrent souvent un avantage adaptatif au virus (Pond *et al.*, 2012). De nouvelles populations virales, ou quasi-espèces, sont ainsi générées et possèdent de nouvelles propriétés adaptatives en rapport avec leur environnement.

Ainsi, les mutations acquises au sein de la protéine S peuvent moduler les rôles et fonctions principales de celle-ci, soit le tropisme et la pathogenèse. La recombinaison d'ARN lors d'infections persistantes a aussi été proposée comme étant un mécanisme participant également à la génération de variants chez les coronavirus (Makino *et al.*, 1986; Rowe *et al.*, 1997).

Par exemple, il a été montré que suite à une infection persistante en souris par la souche MHV-A59, connue pour ses propriétés hépatotropes, des substitutions d'acides aminés de la protéine S dans la région de liaison présumée au récepteur et dans le site de clivage, modulent l'habileté du virus à atteindre le foie et à causer des hépatites virales (Navas-Martin *et al.*, 2005). Des études *in vitro* ont montré que la persistance de la souche MHV-JHM a mené à l'apparition de mutations dans la protéine S, résultant en une altération de la reconnaissance à son récepteur CEACAM1 (Kruger *et al.*, 2001). De plus des études ont montré que, suite à une infection persistante, les virus pouvaient développer une spécificité pour un récepteur secondaire. C'est le cas du MHV, qui, suite à une infection persistante en culture cellulaire, pouvait employer l'héparan sulfate comme récepteur principal pour l'infection (de Haan *et al.*, 2005). De telles mutations dans la protéine S, induisant une modification du tropisme, ont également été observées chez la souche FIPV où l'acquisition de mutations en persistance induit un changement de tropisme vers les macrophages (Rottier *et al.*, 2005). Cette capacité d'adaptation de la protéine S via l'acquisition de mutations pourrait permettre aux virus de franchir la barrière d'espèce. L'exemple le plus connu chez les coronavirus est lors de l'épidémie du SARS-CoV, en 2003 (Song *et al.*, 2005) où les civettes seraient des hôtes intermédiaires contaminés par les chauves-souris lors de leur passage sur les marchés vivants, à l'origine de la contamination de l'humain. En effet il a été montré que l'acquisition de mutations dans la protéine S aurait permis le franchissement de barrière d'espèce et la capacité à infecter l'humain (Peiris *et al.*, 2004).

De plus, des mutations acquises dans la protéine S peuvent permettre aux virus d'acquérir des propriétés reliées à la virulence. Par exemple chez MHV-JHM, l'acquisition d'une mutation dans la protéine S mène à une augmentation de la dissémination virale dans le SNC et une virulence accrue (Ontiveros *et al.*, 2003).

Enfin, des mutations dans la protéine de surface chez MHV ont montré que la protéine S contient des déterminants responsables de lésions de démyélinisation dans le SNC. En effet, suite à l'insertion de la protéine S d'une souche de MHV non-démyélinisante (MHV-2) à la place de la protéine S de MHV-A59, souche démyélinisante, abolie la démyélinisation (Das Sarma *et al.*, 2001). De plus une autre étude a montré que des mutations dans la sous-unité S1 de MHV-A59 résultaient également en une abolition de la démyélinisation (Fu *et al.*, 2004).

En ce qui concerne la souche HCoV-OC43, étudiée au sein de cette thèse de doctorat, les travaux du laboratoire ont montré que l'infection persistante de lignées neurales humaines représentatives du SNC a mené à l'acquisition de mutations, dans la protéine de surface S (St-Jean *et al.*, 2006b). Parmi l'ensemble des mutations acquises dans la protéine S, quatre mutations ponctuelles prépondérantes (D24Y, S83T, H183R et Y241H) se retrouvaient dans les virus produits dans différentes lignées neurales (St-Jean *et al.*, 2006b) et ont été introduites dans un clone infectieux de HCoV-OC43 afin d'étudier leur rôle biologique (St-Jean *et al.*, 2006a) (Figure 4). Tandis que l'infection de souris BALB/c par le virus de référence de HCoV-OC43 induit une encéphalite (Jacomy *et al.*, 2003; Jacomy *et al.*, 2006), l'infection par le virus mutant arborant les quatre mutations ponctuelles dans la protéine S, induit, en plus d'une encéphalite, une paralysie des membres postérieurs avec des lésions de démyélinisation dans la moelle épinière (Jacomy *et al.*, 2010). La présence de ces mutations ponctuelles permet une dissémination virale accrue dans le SNC, une réplication virale accrue dans la moelle épinière et une neuroinflammation plus importante au SNC (Jacomy *et al.*, 2010). De plus, ce virus mutant induit une virulence accrue car seulement 10% des souris survivent à l'infection comparé à 90% de souris qui survivent suite à l'infection par le virus de référence (Jacomy *et al.*, 2010). Néanmoins, ces mutations ponctuelles dans la protéine S n'affectent pas le tropisme du virus dont la cible principale d'infection *in vivo* demeure le neurone (Jacomy *et al.*, 2010). De récents travaux ont montré que ces mutations menaient également à une activation plus importante et rapide de la *Unfolded Protein Response* (UPR), et des caspases chez le neurone humain, conjointement à une augmentation de la mortalité cellulaire et de l'effet cytopathique (Favreau *et al.*, 2009; Favreau *et al.*, 2012). Enfin il a été montré que la mutation ponctuelle de l'acide aminé Y241H sur la protéine S est nécessaire et suffisante à l'induction d'une pathologie paralysante des membres inférieurs et que cette neuropathologie implique l'excitotoxicité glutamatergique (Brison *et al.*, 2011; Brison *et al.*, soumis à Journal of Virology, octobre 2013) (Figure 4). Ces travaux constituent le cœur de cette thèse de doctorat.

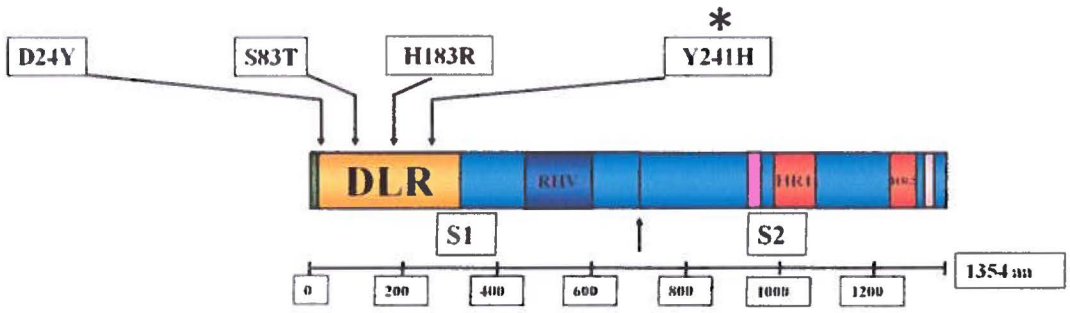


Figure 4. Structure et évolution de la glycoprotéine S de HCoV-OC43 en infection persistante.

La glycoprotéine S est séparée en deux sous-unités (S1 et S2). La sous-unité S1 comprend le domaine de liaison présumé au récepteur cellulaire (DLR) ainsi qu'une région hypervariable (RHV) reconnue pour muter facilement, et probablement impliquée dans l'échappement au système immunitaire. La région S2 comprend quant à elle un segment intra-cytoplasmique et transmembranaire, ainsi que trois domaines fonctionnels juxtaposés l'un à l'autre qui incluent le peptide de fusion et les régions répétées « *heptads repeats* » (HR1 et HR2) qui sont impliquées dans la fusion membranaire. L'infection persistante de lignées neurales humaines représentatives du SNC a mené à l'acquisition de quatre mutations ponctuelles dans la protéine de surface S (D24Y, S83T, H183R et Y241H). L'infection de souris par un virus recombinant arborant les quatre mutations ponctuelles dans la protéine S induit une encéphalite accompagnée d'une paralysie des membres postérieurs avec des lésions de démyélinisation dans la moelle épinière chez la souris comparé au virus de référence qui induit une encéphalite. Enfin il a été montré que la mutation ponctuelle de l'acide aminé Y241H sur la protéine S est nécessaire et suffisante à l'induction de cette pathologie paralysante en modèle murin.

2.5 Cycle réplicatif

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN monocaténaire de polarité positive possédant des mécanismes similaires à ceux retrouvés chez d'autres virus à ARN, comme le mode d'entrée ou les complexes de réplication cytoplasmique associés aux membranes (Brian *et al.*, 2005). La première étape de l'infection correspond à l'attachement de la protéine S du virus à son récepteur cellulaire spécifique (Figure 5). Tel que mentionné précédemment, les Coronavirus utilisent des récepteurs différents selon les espèces, ou selon le type cellulaire qu'ils infectent. Suite à l'attachement, un changement conformationnel de la protéine S entraine un rapprochement des domaines de fusion de la protéine S avec la membrane de la cellule et la particule virale pénètre dans la cellule-cible par un mécanisme d'endocytose ou de fusion membranaire selon le coronavirus (chapitre *2.4.3 Fonctions de la protéine S*). Le cycle de réplication des coronavirus est intracytoplasmique. Suite à la libération du génome dans la cellule-hôte survient le début immédiat de la traduction des gènes viraux puisque le génome à ARN est de polarité positive. Les mécanismes de décapsidation ne sont pas très bien élucidés. Les premières protéines virales produites sont les polyprotéines pp1a et pp1ab, encodées par les « *Open Reading Frame* » ORF1a et ORF1ab, clivées par les protéases virales (PLP (*papain-like protease*) et $3CL^{PRO}$ (protéase *3C-like* ou Mpro)) permettant la formation des protéines non-structurales (nsp: *non structural protein*) associées entre autres aux fonctions de réplication et de transcription du virus. Selon les espèces coronavirales, jusqu'à 16 nsp peuvent être produites. La RdRp est une des protéines produites suite au clivage et participera, en association entre autres avec la protéine N, à la formation du complexe de transcripton-réplication (RTC) qui va permettre de produire des copies d'ARN génomiques à polarité négative qui serviront à l'amplification des copies d'ARN à polarité positive en vue de l'encapsidation des futures particules virales. Le RTC participe également à la transcription des ARNm dédiés à la traduction des protéines virales par un processus caractéristiques de la famille des Nidovirales, la « transcription discontinue », où des segments sous-génomiques d'ARNm de polarité négative de différentes longueurs seront produits et ensuite amplifiés par le RTC afin de produire les ARNm de polarité positive. La RdRp reconnait une séquence dans la région 3' du génome, formée de structure secondaires *hairpin* et *pseudoknot*, et débute la transcription de la copie négative du génome. Lorsqu'elle rencontre une séquence régulatrice de la transcription (TRS), la transcription peut s'arrêter et le complexe de réplication est alors relocalisé dans la portion 5' du génome où la transcription recommence afin de générer la séquence *leader* présente sur tous les ARNm. Si la transcription n'est pas interrompue à la rencontre du premier TRS, elle continue jusqu'à la rencontre d'un second TRS, où la transcription peut également s'interrompre. La protéine de nucléocapside N semble jouer un rôle dans le cette transcription discontinue favorisant le passage d'un TRS à l'autre (Zuniga *et al.*, 2010). Ce mécanisme permet donc de produire des ARNm sous-génomiques de polarité négative de

différentes longueurs qui sont ensuite transcrits en ARN sous-génomiques à polarité positive qui seront traduits en protéines. Par la suite les différentes protéines virales se rendraient à la membrane du compartiment intermédiaire (ERGIC: Endoplasmic Reticulum/Golgi Intermediate Compartiment), afin d'y être encapsidées et afin de terminer leur assemblage (de Haan *et al.*, 1999). Enfin, les coronavirus obtiendraient leur enveloppe des membranes du ERGIC puis les virions seraient libérés de ce compartiment, transportés dans des vésicules à la membrane plasmique, seraient transportés dans l'appareil de GOLGI, puis seraient relargués par exocytose (Blau *et al.*, 2001).

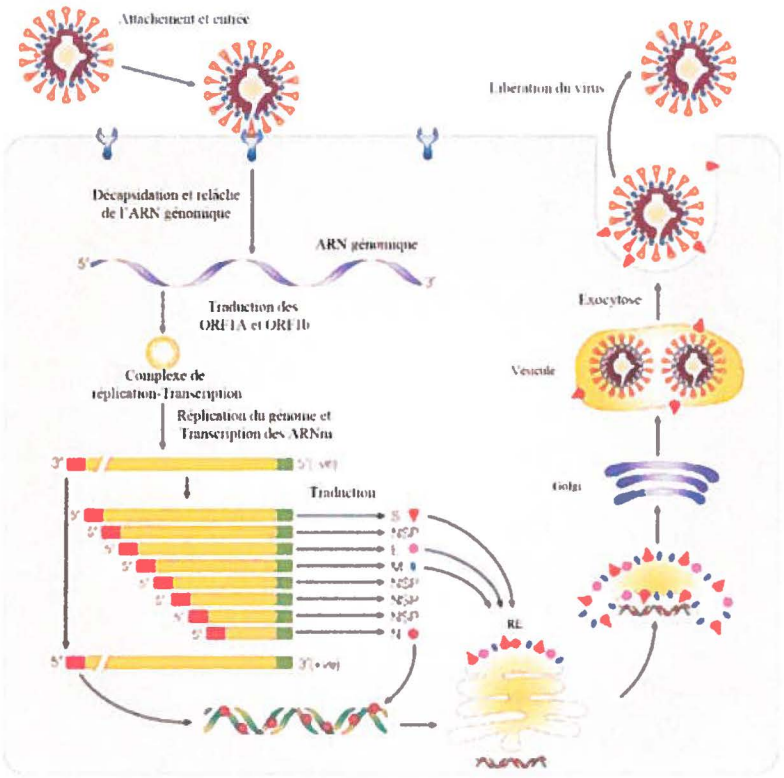


Figure 5. Cycle réplicatif des *Coronaviridae*.

Suite à l'attachement de la glycoprotéine S à son récepteur, le virus pénètre dans la cellule. L'ARN monocaténaire de polarité positive est alors libéré de la capside dans le cytosol où les ORF1a et 1ab sont traduits en polyprotéines pp1a et pp1ab qui seront clivées et associées au complexe de transcription-réplication. S'en suit alors la transcription continue et discontinue du génome viral qui génère respectivement des copies négatives du génome et des ARNm sous-génomiques viraux de polarité négative de différentes longueurs. Ces derniers seront alors amplifiés et transcrits en ARN de polarité positive qui mène à la production de copies positives du génome et des différents ARNm qui permettront la production des différentes protéines virales. Les particules virales peuvent dès lors s'assembler au sein du réticulum endoplasmique (RE), puis de l'appareil de Golgi, où elles acquièrent leur enveloppe puis sont libérées dans le milieu extracellulaire (Adaptée de Stadler Nature Reviews Microbiology, 2003).

2.6 Pathologie et réponse immunitaire à l'infection coronavirale

Chez la majorité des coronavirus humains, la transmission à l'hôte s'effectue principalement par des aérosols avec des durées d'incubation courtes, de l'ordre de trois jours (Vabret *et al.*, 2009). Bien que le site d'infection primaire soit les voies respiratoires, le site d'infection principal est déterminé par le tropisme du virus. Les coronavirus induisent des symptômes du rhume: éternuements, écoulements nasaux, maux de tête et faibles maux de gorge (Tyrrell *et al.*, 1993). La majorité des individus sont séropositifs pour la présence d'anticorps anti-HCoV depuis l'enfance. Les anticorps anti-HCoV détectés dans le sérum sont principalement dirigés contre la protéine S (Macnaughton *et al.*, 1981). Les anticorps circulants et ceux présents dans les muqueuses sont associés à la protection contre l'infection et à l'atténuation des symptômes. La réponse immunitaire induite lors de la primo-infection n'empêche pas l'individu d'être infecté par le même virus l'année suivante (Callow, 1985). Bien que les coronavirus humains soient des virus respiratoires, des études ont montré qu'ils pouvaient être neuroinvasifs chez l'humain. En effet, de l'ARN de coronavirus a été détecté dans des échantillons post-mortem de cerveau à la fois chez des patients sains et chez des patients atteints de maladies neurologiques (Stewart *et al.*, 1992; Arbour *et al.*, 2000). De plus, des études ont rapporté une synthèse d'anticorps et la détection d'ARN viral dans le liquide céphalo-rachidien et dans le cerveau de patients atteints de la SEP (Salmi *et al.*, 1982; Cristallo *et al.*, 1997). Deux hypothèses seraient plausibles en ce qui concerne le mode de propagation de HCoV-OC43 dans le SNC chez l'humain, soit via le nerf olfactif (comme montré chez la souris, (St-Jean *et al.*, 2004)) ou d'autres nerfs crâniens (comme le nerfglossopharyngien ou le nerf vague qui innervent les régions des voies repiratoires supérieures), ou via l'infection de monocytes comme montré pour le coronavirus humain 229E et pour le virus du SARS (Desforges *et al.*, 2007; Law *et al.*, 2005). Connaissant la capacité de HCoV-OC43 et de HCoV-229E à infecter et à se répliquer dans les cellules du système nerveux (Bonavia *et al.*, 1997; Arbour *et al.*, 1999; Arbour *et al.*, 1999b) et sachant que HCoV-OC43 est neuroinvasif chez la souris via le nerf olfactif (St-Jean *et al.*, 2004), la première hypothèse semble valable. De plus, il a été montré l'existence de lymphocytes T auto-réactifs dirigés à la fois contre la protéine basique de la myéline (MBP) et contre des protéines coronavirales suggérant donc un mimétisme moléculaire entre HCoV et la protéine basique de la myéline (Talbot *et al.*, 1996; Boucher *et al.*, 2001; Boucher *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que les coronavirus humains, et notamment la souche HCoV-OC43 pourrait être impliquée dans le développement ou l'exacerbation de maladies neurologiques chez l'humain, dont entre autre la SEP, qui est une maladie auto-immunitaire inflammatoire et démyélinisante du SNC, impliquant à la fois des facteurs génétiques et environnementaux tels que des infections virales. Au laboratoire nous avons montré que la réplication de la souche HCoV-OC43 dans le SNC des souris infectées est accompagnée d'une activation d'astrocytes ainsi que des microglies, avec une

infiltration de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ au SNC plus importante suite à l'infection par le virus mutant arborant quatre mutations dans sa protéine S comparé au virus de référence (Jacomy *et al.*, 2010) (voir chapitre *2.4.4 Évolution de la protéine S en infection persistante*). De plus l'infection de souris par HCoV-OC43 mène à la libération de facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6, l'IFN-γ et le TNF-α, et des chimiokines RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2) et IP-10 (CXCL10) et l'infection par le virus avec les quatre mutations dans la protéine S induit une libération significativement plus importante d'IL-6 et de MCP-1 comparé au virus de référence. La libération de molécules pro-inflammatoires peut mener à l'induction d'effets délétères au SNC si l'inflammation est non-contrôlée.

3. L'EXCITOTOXICITÉ GLUTAMATERGIQUE

3.1 Le glutamate

Le glutamate, ou acide glutamique, est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC. Le glutamate est également un élément nutritif fondamental, impliqué dans de nombreuses voies anaboliques (synthèse des protéines, glyconéogenèse) et cataboliques (cycle de Krebs). Il est présent en concentration importante dans le SNC principalement au niveau intracellulaire (5 - 15 mmol/kg de tissu), tandis qu'il est présent à de plus faibles concentrations dans le milieu extracellulaire (0.5 - 2 μM) et dans le liquide céphalo-rachidien (<1 μM) (Meldrum, 2000). Le glutamate a des rôles importants notamment lors du développement du SNC durant la vie fœtale, au niveau des fonctions cognitives, des mécanismes d'apprentissage et de mémoire et a un rôle au niveau de la motricité (Hugon *et al.*, 1996; Danbolt, 2001). Chez l'adulte, le glutamate ne peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Par conséquent, les niveaux de glutamate présents dans le cerveau sont dus à sa synthèse locale (Hawkins, 2009). La concentration de glutamate plasmatique est de 100 fois plus élevée que celle du milieu extracellulaire du SNC, car cet acide aminé peut également avoir un rôle au niveau de d'autres organes comme le cœur, les intestins, les reins, le pancréas et le placenta (Danbolt, 2001). La régulation de l'homéostasie du glutamate est donc cruciale pour un bon fonctionnement du SNC car ce neurotransmetteur influence l'activité neuronale et sa dérégulation peut mener à des dysfonctions neurologiques.

3.2 Les récepteurs du glutamate

En général, le glutamate est synthétisé au niveau présynaptique à partir de la glutamine et libéré dans la fente synaptique avant de se fixer à deux types de récepteurs sur le neurone post-synaptique: les

récepteurs ionotropes qui sont des canaux ioniques dont l'ouverture dépend de la liaison du ligand et les récepteurs métabotropes, qui sont couplés aux protéines G et une cascade de messagers secondaires.

3.2.1 Les récepteurs ionotropes

Le glutamate agit principalement sur deux types de récepteurs ionotropes caractérisés et dénommés par le nom de leur agoniste le plus sélectif qui sont les récepteurs AMPA (acide α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique) et les récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) principalement localisés sur les cellules neuronales. Il existe également des récepteurs ionotropes de type kainate qui sont des récepteurs physiologiquement sensibles au kainate qui est une drogue isolée de l'algue Digenea Simplex (Ben Ari, 1985). Dans cette thèse nous nous intéresserons particulièrement aux récepteurs ionotropes de types AMPA et NMDA.

Les récepteurs AMPA (acide α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique) forment un canal principalement perméable aux cations monovalents Na^+ et K^+, et sont les acteurs majeurs de la transmission synaptique rapide. Ils sont constitués de sous-unités différentes qui forment un tétramère. À ce jour, quatre sous-unités distinctes ont été identifiées et nommées GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4. Les propriétés du canal changent en fonction des sous-unités qui le composent. En effet, alors que la plupart des récepteurs du SNC contiennent la sous-unité GluR2, il existe des récepteurs résultant de l'assemblage des sous-unités GluR1, GluR3 et GluR4, qui confèrent aux récepteurs AMPA une perméabilité aux ions Na^+, K^+ mais également au Ca^{2+} (Traynelis *et al.*, 2010). La présence de la sous-unité GluR2 rend au contraire le canal imperméable au Ca^{2+}. La multiplicité des sous-unités, leurs variants d'épissage ainsi que la possibilité d'un site d'édition de chaque sous-unité (modification des ARN changeant la séquence codante existant au niveau de l'ADN qui peut se dérouler pendant la transcription ou de manière post-transcriptionnelle consistant en l'addition de nucléotide(s), le remplacement ou la modification d'une base au niveau de l'ARN) offre un nombre de combinaisons de sous-unités possibles très important avec des caractéristiques fonctionnelles différentes. L'épissage alternatif des sous-unités GluR peut avoir une forte influence sur la vitesse de désensibilisation du récepteur. Les sous-unités peuvent également subir des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la glycosylation, la palmitoylation et l'ubiquitination, qui ont un impact sur l'assemblage, le trafic et le recyclage des récepteurs AMPA mais également sur leur activité (Traynelis *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2012). Les récepteurs AMPA sont en effet en perpétuel trafic où ils sont tout d'abord, insérés à la membrane, puis stabilisés à la surface synaptique, avant d'être internalisés, et d'être dégradés ou recyclés. Les récepteurs AMPA permettent une conversion rapide et efficace de la libération vésiculaire de glutamate en activité électrique du neurone post-

synaptique et sont donc concentrés majoritairement sur la membrane post-synaptique (Traynelis *et al.*, 2010).

Les récepteurs NMDA fonctionnels sont composés de l'assemblage de plusieurs sous-unités: NR1, NR2A, NR2B, NR2C ou NR2D et NR3A, NR3B. Ces sous-unités forment une structure tétramérique où la sous-unité NR1 se combine à NR2A-D ou à NR3A-B, même si la grande majorité des récepteurs NMDA seraient des complexes GluNR1/NR2. Les sous-unités NR1 sont obligatoires pour le fonctionnement du récepteur tandis que les sous-unités NR2 et NR3 spécifient les propriétés électrophysiologiques des récepteurs NMDA (leur sensibilité au glutamate, leur perméabilité au Ca^{2+}, l'inhibition du Mg^{2+}) (Paoletti *et al.*, 2007; Traynelis *et al.*, 2010). La sous unité NR1 est issue d'un seul gène mais au total, on peut obtenir plus d'une dizaine d'isoformes des variants d'épissage de la sous unité NR1 (Bradley *et al.*, 2006). Ces variants d'épissage modifient entre autres la sensibilité des récepteurs NMDA ou leur interaction avec des protéines d'ancrage (maintien du récepteurs à la synapse) ou d'adressage (transport du récepteur). Les sous-unités NR2 sont issues de 4 gènes différents et présentent toutes des variants d'épissage sauf la sous-unité NR2A. Le nombre de combinaisons possibles des récepteurs NMDA, est, tout comme pour les récepteurs AMPA, très important. Les sous-unités peuvent également subir des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la glycosylation, la palmitoylation et l'ubiquitination, qui ont un impact sur l'activité et sur le trafic de ces récepteurs à la surface des neurones, assurant un remodelage dynamique de leur distribution et jouant un rôle déterminant dans les propriétés plastiques des synapses (Traynelis *et al.*, 2010). Le canal est principalement perméable à l'ion Ca^{2+} mais également aux ions K^+ et Na^+. Il possède une structure complexe qui lui confère des propriétés singulières notamment un site de liaison pour le magnésium (Mg^{2+}) dans le canal ionique qui bloque le canal et empêche le passage d'ions au potentiel de repos. Pour que ce canal s'ouvre, il faut une dépolarisation suffisante de la membrane capable de dégager l'ion Mg^{2+} qui bloque l'entrée du canal (Luscher *et al.*, 2012). En effet, les concentrations physiologiques de Mg^{2+} dans le milieu extracellulaire inhibent puissamment la réponse des récepteurs NMDA au potentiel de repos des neurones. Cette dépolarisation est fournie suite à l'activation des récepteurs AMPA, qui sont les premiers récepteurs à être activés par le glutamate. Enfin, ces récepteurs possèdent en plus du site de liaison principal des agonistes, un site allostérique qui lie la glycine dont le rôle est de potentialiser l'effet du glutamate (Luscher *et al.*, 2012). La liaison de la glycine à ce site est nécessaire au fonctionnement du récepteur. Une fois ouvert, il y a une entrée abondante d'ions Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique, ce qui sera à l'origine d'une dépolarisation plus puissante et soutenue donnant lieu à un potentiel post-synaptique excitateur qui permet la potentialisation à long terme: c'est le phénomène à la base de la plasticité synaptique (Figure 6). La plasticité synaptique est l'aptitude des neurones à modifier leurs contacts synaptiques en fonction des

stimulations de l'environnement (Luscher *et al.*, 2012). Cette fonction est nécessaire à l'adaptation et est sollicitée lors de l'apprentissage et la promotion de la mémoire. Cette propriété des récepteurs NMDA reposerait sur sa sous-unité NR2. En effet, les récepteurs incorporant la sous-unité NR2C ou NR2D sont un peu moins perméables au Ca^{2+} que ceux contenant la sous-unité NR2A ou NR2B (Santucci *et al.*, 2008). Les récepteurs AMPA et NMDA sont donc des éléments essentiels pour la régulation fine de la transmission synaptique par le glutamate. Cependant, il est important de noter que les oligodendrocytes, responsables de la myélinisation des axones des neurones assurant une transmission nerveuse adéquate, peuvent également exprimer des récepteurs ionotropes au glutamate AMPA et NMDA, mais leurs rôles sur ces cellules sont moins bien connus (Matute, 2011). Enfin, lors de conditions pathologiques, une activation non-contrôlée des récepteurs NMDA peut mener à la mort des cellules neurales puisqu'une activation prolongée des récepteurs NMDA cause une accumulation intracellulaire excessive des ions Ca^{2+} qui va entrainer une cascade d'activation enzymatique qui conduira à la mort cellulaire par excitotoxicité. Ce point sera discuté plus en détail plus loin dans cette section.

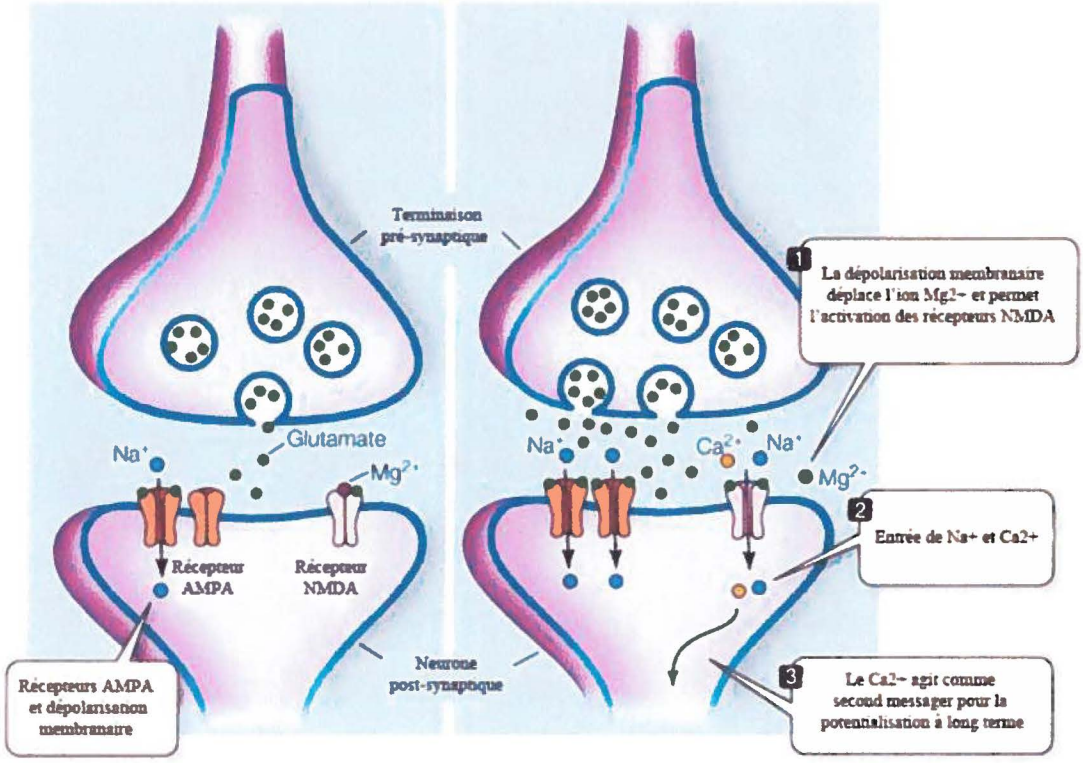


Figure 6 : Rôle des récepteurs AMPA et NMDA dans la coordination de l'activité pré- et post-synaptique.

La stimulation des récepteurs AMPA par le glutamate entraine une entrée massive de Na^+ et la dépolarisation de la cellule. Cette dépolarisation conduit à la levée du blocage des récepteurs NMDA par l'ion Mg^{2+}, qui va permettre ainsi la stimulation des récepteurs NMDA et l'entrée de Na^+ et de Ca^{2+}. Une hyper stimulation des récepteurs AMPA et NMDA mène à une augmentation de la charge calcique dans le neurone post-synaptique qui peut induire la mort neuronale par le phénomène d'excitotoxicité. (Adapté de Life: The science of biology, Freeman, 2007).

3.2.2 Les récepteurs métabotropes

Les récepteurs métabotropes glutamatergiques, nommés mGluRs, sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés à des protéines G. À ce jour, huit d'entre eux ont été identifiés et clonés (mGluR1 à 8) et ont été classés en trois groupes I, II et III, sur la base de similitudes de séquence, de leur profil pharmacologique et de leur mode de signalisation intracellulaire. Le groupe I comprend les récepteurs mGluR1 et mGluR5, le groupe II, les récepteurs mGluR2 et mGluR3 et le groupe III, les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Les récepteurs du groupe I sont couplés positivement à la phospholipase C et activent ainsi la production d'inositol trisphosphate (IP3) qui permet la libération de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme, modulant ainsi la réponse du neurone au glutamate (Tabata *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2010). Les groupes II et III sont couplés négativement à l'adénylyl-cyclase et leur stimulation conduit à une diminution des taux intracellulaires d'AMPc et à une diminution de la libération de glutamate (Spooren *et al.*, 2003). Les récepteurs métabotropes participent à la modulation lente de l'excitabilité synaptique. Ce caractère modulant des récepteurs métabotropes est en accord avec la localisation d'un grand nombre de ces récepteurs à la périphérie des synapses et sur la partie pré-synaptique. Les récepteurs métabotropes peuvent interagir avec les récepteurs NMDA assurant à la fois la mise en place de cascades enzymatiques, mais aussi le lien de ces récepteurs avec le cytosquelette des synapses et avec les dispositifs de transport des protéines (Heidinger *et al.*, 2002).

Dans cette thèse de doctorat nous nous intéresserons particulièrement aux récepteurs du glutamate de type ionotrope AMPA et NMDA.

3.3 Synthèse, libération et recyclage du glutamate

3.3.1 Synthèse et libération

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus abondant qui est synthétisé directement au niveau du SNC car il ne franchit pas la BHE. La synthèse du glutamate peut s'effectuer par quatre voies différentes et est réalisée principalement par les neurones. La voie principale de synthèse du glutamate s'effectue *via* la glutaminase à partir de la glutamine, précurseur majeur de la synthèse du glutamate fourni principalement par les astrocytes (voir point *3.2.2 Recyclage*). Il s'agit d'une réaction de désamination de la glutamine pour donner du glutamate. Il existe deux types de glutaminases exprimées dans le SNC: la glutaminase de type hépatique (LGA: liver-type glutaminase, aussi appelée GLS2) et la glutaminase

rénale (KGA: Kidney-type glutaminase) (Marquez *et al.*, 2009). La seconde voie de synthèse du glutamate s'effectue via la glutamate déshydrogénase par transamination de l'α-kétoglutarate. La troisième voie de synthèse du glutamate s'effectue via l'aspartate amino transférase à partir de l'α-kétoglutarate. Une dernière voie de synthèse de glutamate peut s'effectuer via la GABA-aminotransférase à partir du neurotransmetteur GABA. Ces trois dernières voies de synthèse du glutamate sont mineures comparées à celle empruntant la voie de la glutaminase (Palmada *et al.*, 1998). La libération du glutamate dans le milieu extracellulaire se fait par exocytose dépendante du calcium et du potentiel de membrane *via* trois transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1 à 3). En remplissant les vésicules synaptiques, ces protéines réalisent une fonction clé pour la sécrétion de glutamate et constituent les premiers marqueurs morphologiques du phénotype glutamatergique (Rowley *et al.*, 2012).

3.3.2 Recyclage

Le glutamate n'est pas dégradé dans la fente synaptique. Suite à sa libération, il est principalement recapté par les cellules gliales, plus particulièrement par les astrocytes. Le système de recapture a pour rôle de maintenir une concentration basse de glutamate dans l'espace synaptique et périsynaptique, afin de maintenir une transmission synaptique efficace et afin de protéger les cellules des effets délétères d'un excès de glutamate extracellulaire. Cinq types de transporteurs membranaires ont été identifiés à ce jour chez l'humain et chez le rongeur. La nomenclature actuelle utilise le terme d'EAAT pour « *Excitatory Amino Acid Transporter* » pour la dénomination de ces transporteurs chez l'humain: EAAT1 (ou GLAST), EAAT2 (ou GLT-1), EAAT3 (ou EAAC1), EAAT4, EAAT5. Les transporteurs sont exprimés principalement sur les astrocytes, certains peuvent être exprimés sur les neurones (Tableau V).

Tableau IV. Transporteurs du glutamate et leur localisation.

Sous-type	Homologue humain	Type cellulaire	Localisation anatomique
GLAST	EAAT1	Astrocytes	Cerveau / moelle épinière
GLT-1	EAAT2	Astrocytes	Cerveau / moelle épinière
EAAC1	EAAT3	Neurones	Hippocampe / cervelet
EAAT4	EAAT4	Cellules de Purkinje	Cervelet
EAAT5	EAAT5	Photorécepteurs et cellules bipolaires	Rétine

EAAT: *excitatory amino-acid transporter*; GLAST: *glutamate-aspartate transporter*; GLT: *glutamate transporter*; EAAC: *excitatory amino-acid carrier* (Adapté de Maragakis *et al.*, 2004).

Des expériences de suppression de gènes ont permis de déterminer l'importance relative de chaque sous-type de transporteur. Dans le SNC, le transporteur astrocytaire EAAT2 (GLT-1) est responsable d'environ 90% de la recapture du glutamate et c'est ce transporteur qui a le plus grand impact sur la concentration extracellulaire de glutamate au repos (Tanaka *et al.*, 1997). L'invalidation permanente du transporteur GLT-1 chez la souris augmente la concentration extracellulaire de glutamate, induisant des crises d'épilepsie et induisant une forte létalité (Tanaka *et al.*, 1997). La recapture du glutamate se fait par transport facilité en utilisant les gradients de Na^+ et de K^+ comme source d'énergie (Danbolt, 2001). Les transporteurs du glutamate ont un cycle de transport relativement lent (~70 ms), mais la liaison au glutamate est très rapide (quelques millisecondes) ce qui permet de soustraire le glutamate de la fente synaptique (Wadiche *et al.*, 1995). Les transporteurs du glutamate ont donc un effet sur la transmission glutamatergique en maintenant une faible concentration extracellulaire de glutamate, en raccourcissant la durée des courants NMDA et AMPA, et en évitant la stimulation de synapses voisines (Danbolt, 2001). Une fois le glutamate recapté, il va être transformé en glutamine via la glutamine synthétase astrocytaire, qui sera libérée dans le milieu extracellulaire et recaptée par les terminaisons axonales pour être

transformée en glutamate par la glutaminase neuronale (Ramonet *et al.*, 2004). La figure 7 représente le cycle glutamate-glutamine. La recapture du glutamate peut être régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, mais peut aussi être modulée par des interactions avec des protéines régulatrices ou des changements de localisation subcellulaire (Danbolt, 2001). En effet, la glycosylation de certains transporteurs comme le GLT-1 a un rôle dans l'adressage (ensemble des mécanismes qui permettent à une protéine d'être dirigée vers la bonne position) et l'assemblage, ce qui est important pour un bon fonctionnement de ces transporteurs (Danbolt, 2001). De plus, les transporteurs possèdent également des sites consensus de phosphorylation pour les kinases PKA et PKC et la PI3K qui peuvent engendrer des changements rapides sur l'efficacité de transport ou sur un changement de localisation à la membrane (Anderson *et al.*, 2000). La capacité de recyclage des transporteurs peut être également modulée par l'acide arachidonique, second messager produit à partir des phospholipides membranaires par la phospholipase A2 (PLA2) lors d'une activation neuronale par le glutamate (Zerangue *et al.*, 1995; Amara *et al.*, 2002). Les transporteurs possèdent également des cystéines qui peuvent être oxydées et former des ponts disulfures induisant des changements covalents de la structure des transporteurs et une baisse d'activité. Les transporteurs du glutamate sont donc potentiellement sensibles au stress oxydatif ce qui pourrait expliquer des déficits de transport du glutamate dans certaines pathologies associées à un stress oxydatif (Trotti *et al.*, 1998). Enfin, il est important de noter que lors d'un contexte inflammatoire, l'expression de certains transporteurs du glutamate, notamment le transporteur GLT-1, ainsi que l'expression de la glutamine synthétase peut être altérée en présence de certaines molécules pro-inflammatoires comme les cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α (Huang *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2000; Ronnback *et al.*, 2004; Prow *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2010). L'ensemble de ces observations montre que de nombreux facteurs peuvent perturber la capacité de transport et du recyclage du glutamate et conduire à l'excitotoxicité.

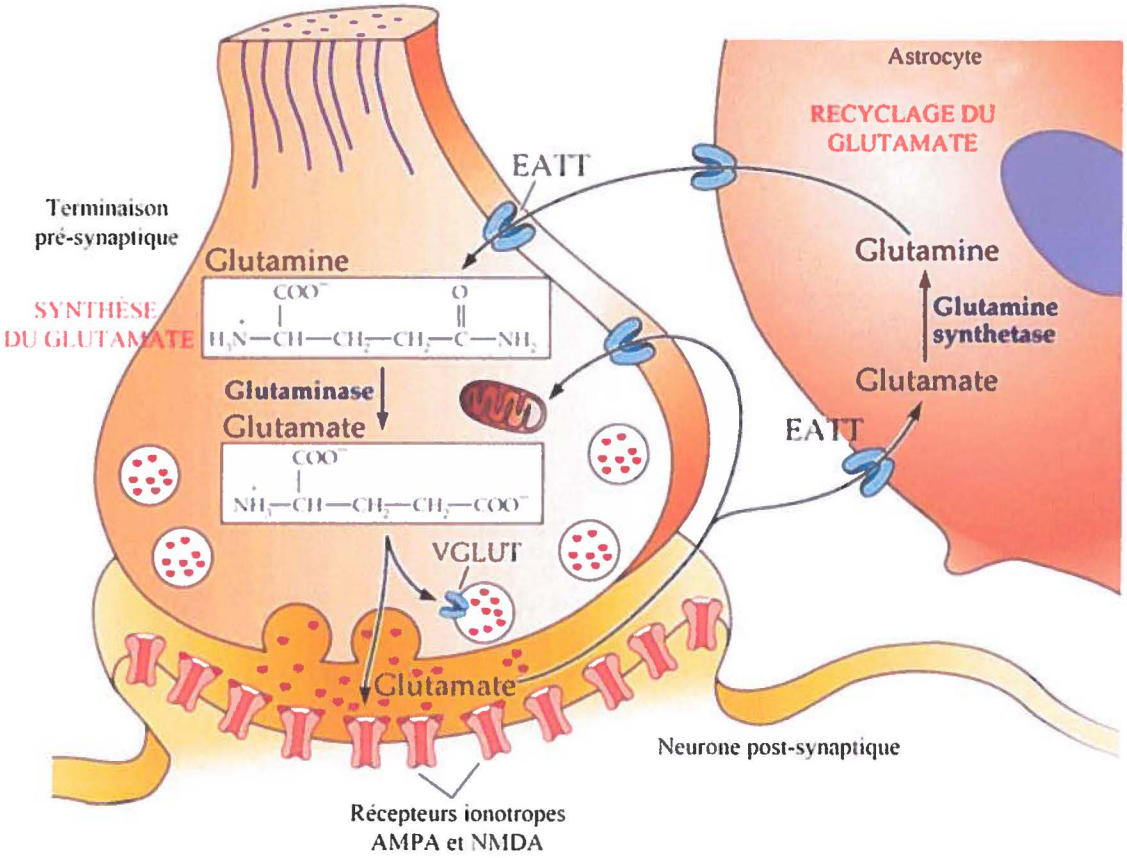


Figure 7. Représentation schématique du cycle glutamate-glutamine.

Dans le SNC, le glutamate est principalement synthétisé par les neurones à partir de la glutamine via la glutaminase. Il est ensuite concentré dans des vésicules grâce à des transporteurs vésiculaires VGLUT (*vesicular glutamate transporter*), puis libéré dans la fente synaptique après un stimulus. Le glutamate va ensuite activer entre autre les récepteurs AMPA et NMDA responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le SNC. Ensuite le glutamate est recapté par l'intermédiaire de transporteurs (EAAT: *Excitatory amino acid transporter*) dont le plus important est le transporteur astrocytaire GLT-1 qui recapte la majorité du glutamate dans le SNC. Ensuite le glutamate est recyclé en glutamine via la glutamine synthétase, puis le glutamate est redistribué aux neurones pour un nouveau cycle glutamate-glutamine (Adapté de *http://flipper.diff.org/app/items/info/5032*).

3.4 Mécanismes de l'excitotoxicité

L'excitotoxicité en référence aux effets à la fois « excitateurs » et « toxiques » a été mise en évidence à partir des travaux d'Olney dans les années 70s, où il observa des lésions cérébrales importantes suite au traitement de souris par du glutamate, démontrant que ce neurotransmetteur excitateur engendrait une souffrance et une mort neuronale (Olney, 1969). Dans des conditions pathologiques, une perturbation de l'homéostasie du glutamate peut induire une stimulation excessive des récepteurs ionotropes AMPA et NMDA, entrainant un influx important de Na^+ et de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique, induisant une dépolarisation des cellules en activant une cascade de voies intracellulaires pouvant mener à la mort neuronale. Cette concentration excessive du calcium intracellulaire active de nombreuses molécules comme: des protéases, des phospholipases, des endonucléases et la NO synthétase (Arundine *et al.*, 2003). Les protéases telles que les calpaïnes, métalloprotéinases, caspases, cathepsines digèrent de nombreuses protéines ayant un rôle physiologique important comme des protéines du cytosquelette, des enzymes, des récepteurs (Figure 8). La calpaïne dégrade également l'échangeur Na^+/Ca^{2+}, qui a pour rôle d'expulser le calcium hors de la cellule pour réguler l'homéostasie du calcium (Bano *et al.*, 2005). Les phospholipases dégradent les lipides membranaires et produisent ainsi de l'acide arachidonique, potentiellement toxique. Les endonucléases clivent irrémédiablement l'ADN. La NO synthétase produit du monoxyde d'azote (NO), qui en s'associant avec les ions superoxydes, va induire la formation de peroxyde d'azote (ONOO-) qui a un fort pouvoir oxydant. De plus, la stimulation excessive des récepteurs ionotropes au glutamate induit en elle-même une production accrue d'espèces réactives oxygénées (ROS) qui peuvent mener à la mort cellulaire. Dans les phénomènes excitotoxiques aigus, l'évènement initial qui va activer la cascade excitotoxique se produit suite à l'entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique, et la mort neuronale se produit à la suite d'une dérégulation calcique irréversible d'origine mitochondriale (Urushitani *et al.*, 2001). En effet, le calcium en excès est stocké dans la mitochondrie qui a une grande capacité de rétention du Ca^{2+}. L'accumulation intra-mitochondriale de Ca^{2+} va ainsi perturber le fonctionnement de la chaine respiratoire et augmenter la production des ROS, ce qui va engendrer une perte du potentiel membranaire mitochondrial, l'ouverture du pore de perméabilité transitoire, l'activation de cascades apoptotiques et la libération du calcium accumulé. La mitochondrie a donc un rôle important dans les phénomènes excitotoxiques notamment par un lien étroit entre le métabolisme énergétique et le glutamate (Nicholls *et al.*, 2007).

En effet, des déficits énergétiques neuronaux induiraient une défaillance dans le blocage « *voltage-dépendant* » des récepteurs NMDA par l'ion Mg^{2+}, les rendant plus sensibles au glutamate. De plus, des dérégulations ioniques générales peuvent également perturber le fonctionnement des neurones,

les rendant plus sensibles à une stimulation par le glutamate. Des mécanismes de défense ont donc été développés sous forme de systèmes de recapture et de recyclage du glutamate afin de contrer la toxicité cellulaire induite par le glutamate (décrit précédemment au chapitre *3.3.2 Recyclage*).

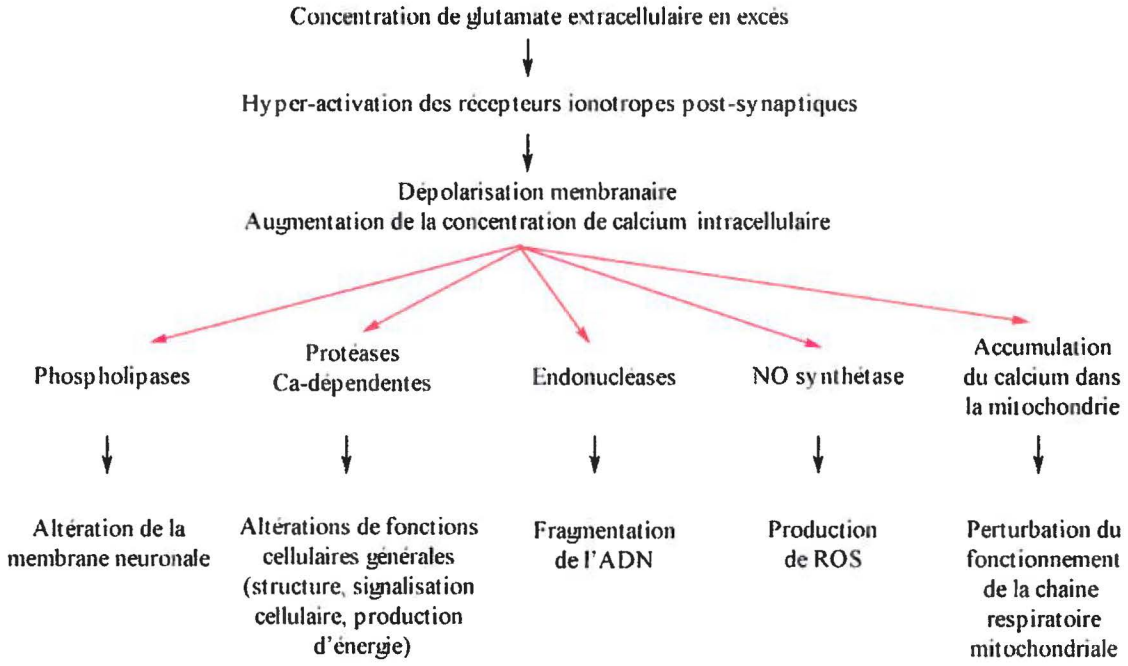


Figure 8. Mécanismes d'excitotoxicité glutamatergique induite par le calcium.

L'excitotoxicité est un processus pathologique d'altération et de destruction neuronale induit suite à une hyper-activation des récepteurs AMPA et NMDA. L'augmentation de la concentration de calcium dans le neurone post-synaptique va induire l'activation de nombreuses molécules comme: des protéases, des phospholipases, des endonucléases et la NO synthétase qui vont avoir un effet délétère sur le neurone. De plus, l'accumulation intramitochondriale de Ca^{2+} va également perturber le fonctionnement de la chaine respiratoire et augmenter la production des ROS. L'activation de ces différentes voies pourra mener à la mort neuronale.

3.5 Le glutamate et dysfonctionnements neuronaux

Un des outils permettant d'estimer les dysfonctionnements neuronaux est l'évaluation de l'état de phosphorylation des neurofilaments (NF), qui sont les filaments intermédiaires de type IV majeurs du cytosquelette neuronal impliqués dans le développement et la stabilité des axones matures, ainsi que dans la régulation du transport axonal et la transmission des impulsions électriques le long des axones (Petzold, 2005). Ils sont formés par hétéropolymérisation de trois types de neurofilaments nommés NF-L (Light), NF-M (Medium) et NF-H (Heavy). Les processus de phosphorylation et de déphosphorylation des NF, assurés par des kinases et des phosphatases, sont des processus complexes finement régulés dans le compartiment axonal des neurones. En effet, les chaines NF-M et NF-H deviennent hautement phosphorylées après leur transport du soma neuronal vers l'axone. De plus, ce sont les chaines NF-H qui sont les plus phosphorylées. Considérant que NF-H est reconnu comme biomarqueur de neurodégénérescence, l'évaluation de l'état de phosphorylation des NF est donc un outil essentiel dans la surveillance des perturbations neuronales progressives. Dans des conditions physiologiques, les NF-H sont, de façon prépondérante, phosphorylés dans les axones et non-phosphorylés dans le soma et les dendrites (Gotow, 2000; Petzold, 2005). Une perturbation de l'état de phosphorylation des NF-H, représentée soit par une perte de NF non-phosphorylés dans le soma, une accumulation de NF phosphorylés dans le soma ou bien encore une augmentation de NF-H non-phosphorylés dans les axones, sont signes de dommages neuronaux. Des études ont montré que le glutamate perturbe le transport axonal des NF notamment suite à l'activation de kinases et de phosphatases (Ackerley *et al.*, 2000; Stevenson *et al.*, 2009), et que les récepteurs du glutamate peuvent réguler l'expression, la phosphorylation et l'accumulation des NF dans les neurones de la moelle épinière (Vartiainen *et al.*, 1999). Une perturbation de l'état de phosphorylation de NF-H a été observée dans des maladies neurologiques chez l'humain telles que la SEP, la SLA, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson (Petzold, 2005).

3.6 Maladies neurologiques impliquant l'excitotoxicité et leurs traitements

Le glutamate étant le principal neurotransmetteur excitateur du SNC, son implication dans diverses maladies neurologiques est très étudiée. En effet, plusieurs études ont montré que l'excitotoxicité glutamatergique est impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Revett *et al.*, 2013), la maladie de Parkinson (Caudle *et al.*, 2009), la SEP (Werner *et al.*, 2000), la SLA (Bogaert *et al.*, 2010), l'épilepsie (Coulter *et al.*, 2012), la maladie de Huntington (Andre *et al.*, 2010), la schizophrénie (McCullumsmith *et al.*, 2012) et dans l'ischémie cérébrale (Li *et al.*, 2011b). L'excitotoxicité peut être

aussi impliquée suite à une infection virale au SNC, comme entre autre dans la démence liée à une infection par le HIV (Cisneros *et al.*, 2012), suite à l'infection par le virus de l'herpès HHV-6 (Fotheringham *et al.*, 2008), par le virus du Nil Occidental (Blakely *et al.*, 2009), par le virus HTLV-1 (Szymocha *et al.*, 2000), par le virus de l'encéphalite japonaise (Chen *et al.*, 2012), par le virus Sindbis (Darman *et al.*, 2004) ou par le virus de la maladie de Borna (Billaud *et al.*, 2000).

Depuis les années 70, les recherches pharmacologiques se sont concentrées sur le développement d'antagonistes des récepteurs ionotropes, et plus particulièrement des récepteurs NMDA, ceux-ci étant impliqués dans l'entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone et dans l'induction de mécanismes d'excitotoxicité. Il existe des antagonistes compétitifs et d'autres non-compétitifs, ces derniers étant avantageux car une forte concentration de glutamate dans le SNC ne peut pas déplacer la liaison de ces antagonistes sur les récepteurs ionotropes. Le tableau V présente des antagonistes des récepteurs NMDA utilisés chez l'humain pour le traitement de maladies neurologiques. De nombreux antagonistes des récepteurs NMDA développés montrent des effets secondaires néfastes aussi bien chez l'animal et chez l'humain, comme entre autre de l'anxiété, de la catatonie, des hallucinations, des maux de tête. Ceci peut s'expliquer par le fait que les récepteurs NMDA ont un rôle fondamental dans la transmission d'informations excitatrices et dans la plasticité synaptique et la potentialisation à long terme, donc le fait de bloquer ces récepteurs peut perturber le rôle physiologique important de ces récepteurs. La mémantine est un antagoniste non-compétitif à faible affinité pour les récepteurs NMDA avec la particularité d'être dépendant du voltage. C'est à dire que la mémantine ne bloque pas le fonctionnement des récepteurs NMDA en conditions physiologiques, mais sous certaines conditions, lorsqu'il y a une dépolarisation excessive de la membrane neuronale qui mène à l'ouverture des canaux NMDA, la mémantine peut alors venir bloquer ces récepteurs afin de protéger le neurone de potentiels mécanismes d'excitotoxicité induits par le glutamate (Lipton, 2006; La Spada, 2009). Depuis peu, les recherches pharmacologiques se focalisent sur le développement d'antagonistes des récepteurs AMPA car une stimulation excessive de ces récepteurs mène tout d'abord à une dépolarisation membranaire qui permet par la suite l'activation des récepteurs NMDA (Rogawski, 2011). Le perampanel est un antagoniste non-compétitif des récepteurs AMPA développé et utilisé depuis peu pour le traitement contre l'épilepsie (Owen, 2013). L'excitotoxicité glutamatergique étant impliquée dans plusieurs maladies neurologiques chez l'humain, la recherche et le développement d'antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA sont donc essentiels pour contrer les effets toxiques du glutamate, tout en préservant le rôle physiologique important de ces récepteurs.

Tableau V. Antagonistes des récepteurs NMDA utilisés chez l'humain ou chez l'animal pour le traitement de désordres neurologiques.

Nom de la molécule		Site d'action pharmacologique	Utilisation thérapeutique
Amantadine	(H)	Antagoniste non-compétitif à faible affinité	Alzheimer / Parkinson Huntington
Mémantine	(H)	Antagoniste non-compétitif à faible affinité, voltage-dépendant	Alzheimer / Parkinson / SEP SLA / Huntington
Selfotel*	(H)	Antagoniste compétitif	Ischémie cérébrale / AVC
Gavestinel *	(H)	Antagoniste compétitif	AVC
Eliprodil *	(H)	Antagoniste non-compétitif	Ischémie cérébrale / AVC
Aptiganel *	(H)	Antagoniste compétitif	Ischémie cérébrale / AVC
Dizocilpine *	(A)	Antagoniste non-compétitif à haute affinité	Anticonvulsant
Ketamine *	(A)	Antagoniste non-compétitif à haute affinité	Anesthésique
Phéncyclidine *(A)		Antagoniste non-compétitif à haute affinité	Anesthésique

*: Peut provoquer des effets secondaires néfastes. (H): utilisé chez l'humain; (A): utilisé chez l'animal. (Adapté de Muir, 2006). Dans cette thèse, nous nous intéresserons entre autre à la mémantine et à la dizocilpine comme antagoniste des récepteurs NMDA.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Les coronavirus humains sont des pathogènes respiratoires ayant des propriétés neurotropes et neuroinvasives chez l'humain et chez la souris. De plus, la souche HCoV-OC43 est neurovirulente chez la souris. En effet, nous avons montré que l'infection de souris BALB/c par le virus de référence de HCoV-OC43 induit une encéphalite, tandis que l'infection par le virus mutant arborant une mutation ponctuelle (Y241H) dans la protéine S, acquise suite à l'infection persistante de lignées neurales humaines représentatives du SNC, induit, en plus d'une encéphalite, une paralysie des membres postérieurs avec des lésions de démyélinisation dans la moelle épinière.

Considérant que **1)** le neurone est la cible principale de l'infection par HCoV-OC43 *in vivo* chez la souris, en culture primaire mixte du SNC murin et en co-culture de neurones-astrocytes humain, que **2)** cette infection induit une dégénérescence neuronale et que 3) une récente étude au laboratoire a montré que l'infection de souris par HCoV-OC43 mène à la libération de facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α, pouvant réguler à la baisse l'expression du transporteur GLT-1 et de la glutamine synthétase astrocytaires nécessaires pour le recyclage du glutamate, notre hypothèse est que l'excitotoxicité glutamatergique pourrait être impliquée dans le développement d'une neuropathologie paralysante induite suite à l'infection par HCoV-OC43.

Afin de vérifier cette hypothèse, des souris ont été infectées par HCoV-OC43 (virus de référence induisant une encéphalite et virus mutant induisant une pathologie paralysante) et traitées chaque jour avec un antagoniste non-compétitif des récepteurs ionotropes AMPA ou NMDA. Tout d'abord, nous avons évalué le taux de survie, les variations de poids, les scores cliniques reliées à des problèmes moteurs ou à une paralysie complète des membres inférieurs ainsi que l'état de phosphorylation des neurofilaments dans la moelle épinière des souris infectées. Ensuite, afin de décortiquer les mécanismes excitotoxiques, nous avons évalué la synthèse de glutamate *via* la glutaminase et le recyclage du glutamate *via* le transporteur GLT-1 et *via* la glutamine synthétase *in vivo* et *in vitro* (culture primaire du SNC murine) suite à l'infection par HCoV-OC43 (virus de référence induisant une encéphalite et virus mutant induisant une pathologie paralysante).

CHAPITRE II: PUBLICATIONS

Publication No.1

Journal of Virology, Décembre 2011, Vol. 85, p. 12464-12473

Glutamate Excitotoxicity is Involved in the Induction of Paralysis in Mice after Infection by a Human Coronavirus with a Single Point Mutation in its Spike Protein

L'excitotoxicité glutamatergique est impliquée dans l'induction d'une pathologie paralysante suite à l'infection de souris par un coronavirus humain exprimant une mutation ponctuelle dans sa protéine de surface

Elodie BRISON [1], Hélène JACOMY [1], Marc DESFORGES [1] and Pierre J. TALBOT [1*]

[1] *Laboratory of Neuroimmunovirology, INRS-Institut Armand-Frappier,*

531 boulevard des Prairies, Laval (Québec), Canada H7V 1B7

* Correspondent footnote:

Dr. Pierre J. Talbot
Laboratory of Neuroimmunovirology
INRS-Institut Armand Frappier
513, boulevard des Prairies
Laval (Québec)
CANADA
H7V 1B7

Tel.: (450) 687-5010 extension 4300
Fax: (450) 686-5501
E-mail: pierre.talbot@iaf.inrs.ca

RÉSUMÉ

Les coronavirus humains sont des pathogènes respiratoires reconnus et certaines souches, incluant le coronavirus humain HCoV-OC43, peuvent infecter les neurones humains et les cellules gliales du système nerveux central (SNC), et activer des mécanismes inflammatoires au SNC. De plus, la souche HCoV-OC43 est neuroinvasive, neurotrope et neurovirulente chez des souris génétiquement susceptibles, où il provoque une encéphalite. Dans cette étude, nous avons montré qu'un virus portant une mutation ponctuelle dans la glycoprotéine de surface S (Y241H), acquise suite à une infection persistante dans des cellules neurales humaines, induisait une pathologie paralysante des membres postérieurs chez la souris. L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs AMPA (GYKI-52466) améliorait les scores cliniques reliés à la pathologie paralysante et aux problèmes moteurs chez la souris infectée par le virus variant de HCoV-OC43 et protégeait le SNC de dysfonctionnements neuronaux, tel qu'illustré par la restauration de l'état de phosphorylation des neurofilaments. De plus, l'expression du transporteur glial du glutamate (GLT-1), impliqué dans la régulation de l'homéostasie du glutamate, était régulée à la baisse suite à l'infection et le traitement au GYKI-52466 restaurait significativement son niveau d'expression. Enfin, le traitement par le GYKI-52466 des souris infectées réduisait le niveau d'activation des microglies activées, ce qui pourrait conduire à une meilleure régulation de l'homéostasie du glutamate dans le SNC. Nos résultats suggèrent fortement que l'excitotoxicité est impliquée dans la neuropathologie paralysante induite par un variant de HCoV-OC43 contenant une mutation ponctuelle dans la glycoprotéine de surface acquise suite à une infection persistante virale.

ABSTRACT

Human coronaviruses (HCoV) are recognized respiratory pathogens and some strains, including HCoV-OC43, can infect human neuronal and glial cells of the central nervous system (CNS), and activate neuroinflammatory mechanisms. Moreover, HCoV-OC43 is neuroinvasive, neurotropic and neurovirulent in susceptible mice, where it induces a chronic encephalitis. Herein, we show that a single point mutation in the viral spike (S) glycoprotein (Y241H), acquired during viral persistence in human neural cells, led to a hind-limb paralytic disease in infected mice. Inhibition of glutamate excitotoxicity using an AMPA receptor antagonist (GYKI-52466) improved clinical scores related to the paralysis and motor disabilities in S-mutant virus-infected mice, as well as protected the CNS from neuronal dysfunctions, as illustrated by restoration of the phosphorylation state of neurofilaments. Expression of the glial glutamate transporter GLT-1, responsible for glutamate homeostasis, was down-regulated following infection and GYKI-52466 also significantly restored its steady state expression level. Finally, GYKI-52466 treatment of S-mutant virus-infected mice led to reduced microglial activation that may lead to improvement in the regulation of CNS glutamate homeostasis. Taken together, our results strongly suggest an involvement of excitotoxicity in the paralysis-associated neuropathology induced by a HCoV-OC43 mutant which harbors a single point mutation in its spike protein that is acquired upon persistent virus infection.

INTRODUCTION

Coronaviruses form a family of ubiquitous enveloped RNA viruses that induce respiratory, enteric and neurological diseases in several species (10). Human coronaviruses (HCoV) are respiratory pathogens responsible for upper and lower respiratory tract infections (49) and for the severe acute respiratory syndrome (SARS; 41). Possible involvement of HCoV other than SARS-CoV in more serious human pathologies was recently reviewed (49). Indeed, HCoV were associated over the years with the development of pneumonia, myocarditis, meningitis (16, 39) and occasionally for acute disseminated encephalitis (54). We have previously demonstrated that HCoV are neuroinvasive in humans, can infect and persist in human neural cells and can activate glial cells to produce pro-inflammatory mediators (3-5, 8, 14). Moreover, we have shown that *wild-type* reference HCoV-OC43 has neuroinvasive properties in mice, leading to chronic encephalitis (25) with accompanying disabilities (23). Given that murine coronavirus (MHV), a structurally related strain of the human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), can cause neurodegenerative and neuroinflammatory disease in mice and rats (10), we hypothesized that HCoV-OC43 might be associated with neuroinflammatory and/or neurodegenerative human diseases. We have recently reported that a viral variant with four point mutations in its surface spike (S) glycoprotein, acquired during viral persistence in human neural cells (48), led to a drastically modified virus-induced neuropathology in BALB/c mice, characterized by a multiple sclerosis (MS)-like flaccid paralysis and inflammatory demyelination (24).

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter of the central nervous system (CNS) that is involved in several neurophysiological functions. A disruption of its homeostasis can damage neurons, which may eventually lead to cell death (30). This pathological process, designated excitotoxicity, is able to induce degeneration of neural cells following an excessive stimulation of glutamate on its specific ionotropic receptors (AMPAr and NMDAr) (35). Activation of these receptors results in neural Ca^{2+} influx, which can mediate excitotoxicity by the means of a cascade of events involving free radical production, mitochondrial dysfunction, and the activation of several enzymes involved in normal cell development and function, resulting in damage to the cell membrane, cytoskeleton and DNA (42). Interestingly, excitotoxicity was reported to be involved in several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease or MS in humans (13). Glutamate re-uptake is necessary for the regulation of physiological extracellular glutamate concentrations and is mainly mediated by high-affinity sodium-dependent transporters. At least five different glutamate transporters expressed on neuronal or glial cells (GLT-1, GLAST, EAAC1, EAAT4 and EAAT5) have been well characterized (12) and up to 90% of the total glutamate re-uptake in the adult CNS is achieved by the glutamate transporter 1 (GLT-1), mainly

expressed on astrocytes (50). In several neurological diseases, disruption of GLT-1 expression level was reported to be associated with alteration in glutamate uptake (52).

Glutamate excitotoxicity can damage the cytoskeleton of axons *in vivo*, which may result in the slowing of axonal transport (1, 31). Neurofilaments (NF) are intermediate filaments constituting the neuron cytoskeleton and are involved in the stability of mature axons and the regulation of axonal transport rate. In physiological conditions, the heavy neurofilament proteins (NF-H) are predominantly phosphorylated in axons and nonphosphorylated in neuronal soma and dendrites (19). A shift of this NF phosphorylation state, which is represented by a loss of nonphosphorylated NF in soma and an increase of nonphosphorylated NF in axons are signs of neuronal injury (44). Evaluation of the NF phosphorylation state is a useful tool to monitor progressive axonal disabilities considering that the heavy NF-H proteins phosphorylation state has been shown to be a biomarker in neurodegeneration (37). We have already demonstrated that the NF-H phosphorylation state was altered following HCoV-OC43 infection of mice (24).

In the present study we demonstrate that only a single point mutation (Y241H) in the spike glycoprotein (S) of HCoV-OC43 is sufficient for the induction of motor dysfunctions and a paralytic disease in infected mice. Furthermore, infection of mice with this HCoV-OC43 S mutant induced a significantly stronger neuronal dysfunction and a significant decrease in the expression of the glutamate transporter GLT-1 on astrocytes compared to sham and *wild-type* virus infection. Therefore, the virus-induced pathological process appears to be driven by a glutamate excitotoxic mechanism, as blockade of AMPA receptor attenuated clinical scores related to the virus-induced paralysis and motor disabilities and partially restored physiological NF phosphorylation state and GLT-1 expression and reduced microglial cell activation.

MATERIALS AND METHODS

Viruses. The *wild-type* reference HCoV-OC43 virus (VR-759) was obtained in the 1980's from the American Type Culture Collection (ATCC). The recombinant viruses of HCoV-OC43 (rOC/ATCC) were generated using the full-length cDNA clone pBAC-OC43^{FL} and displayed the same phenotypic properties as the *wild-type* virus, as previously described (47). This recombinant virus was used as the reference control virus for all experiments. We introduced one or two point mutations at a time in the spike glycoprotein of HCoV-OC43, the D24Y and S83T mutations (corresponding recombinant virus designated rOC/U$_{S24\text{-}83}$), the H183R and Y241H mutations (corresponding recombinant virus designated rOC/U$_{S183\text{-}241}$), the H183R mutation (corresponding recombinant virus designated rOC/U$_{S183}$) or the Y241H mutation (corresponding recombinant virus designated rOC/U$_{S241}$) into the full-length cDNA clone pBAC-OC43^{FL} by site-directed mutagenesis using the QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) as recommended by the supplier. Each cDNA clone was transfected into BHK-21 cells, amplified by two passages in the HRT-18 cell line and sequenced to make sure that only the introduced H183R and/or Y241H mutations were present and no other mutations appeared.

Survival curves and clinical scores. Female BALB/c mice (Jackson Laboratories) aged 22 days post-natal (DPN) were inoculated by the intracerebral (IC) route with $10^{2.5}$ TCID$_{50}$ of recombinant virus, as previously described (24). Groups of ten mice infected by each recombinant virus were observed on a daily basis over a period of 21 days post-infection (DPI) and survival and clinical scores related to motor dysfunctions were evaluated. Mice infected with rOC/U$_{S241}$ which presented motor dysfunctions were evaluated and scored according to a scale based on experimental allergic encephalitis (EAE) clinical score (CS) evaluation (0-1: normal with no clinical signs; 1.5-2: partial hind-limb paralysis with a walk close to ground level; 2.5-3.5: complete hind-limb paralysis, 4-5: moribund state and death).

Infectious virus assays. For each experimental condition, groups of three infected BALB/c mice were selected randomly and dissected every two days to monitor infectious virus production in brains and spinal cords. Tissues were processed for the presence and quantification of infectious virus by an indirect immunoperoxydase assay as previously described (27).

AMPA receptor antagonist. The specific non-competitive AMPA receptor antagonist, GYKI-52466 (1-(4-aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine hydrochloride) was obtained from Tocris Bioscience and dissolved in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen) at a final concentration of 300 µg/mL of HBSS (46). To investigate the effect of treatment with GYKI-52466, two groups of ten BALB/c mice infected with rOC/ATCC or rOC/U$_{S241}$ were treated intraperitoneally with 3 mg/kg body weight of GYKI-52466 at 12 h post-infection, then twice daily for three weeks or only with 100 µl of HBSS (vehicle) to normalize experimental stress conditions, twice

daily, over a period of three weeks. To verify the non-cytotoxic effect of the GYKI-52466 solution, sham-infected mice received the same dose of AMPA receptor antagonist. As described in the literature, this pharmacological dose was reported to have no behavioral effects and to induce neuroprotective actions (20, 40).

Immunohistochemistry. Groups of three BALB/c mice either sham-infected or infected by each virus and treated with GYKI-52466 antagonist or vehicle were selected randomly and perfused with a solution of 4% paraformaldehyde at 10 DPI, which corresponds to the peak of viral replication in the spinal cord and the outcome of clinical scores related to paralytic disease. Lumbar segments from spinal cords were cryoprotected in 30% (w/v) sucrose, frozen at -20°C and processed for sets of 8 µm section size with a cryostat (MICROM HM 525). Axonal damage was investigated by assessing the heavy neurofilament (NF-H) phosphorylation state. Tissue sections were incubated with a mouse anti-nonphosphorylated neurofilaments monoclonal antibody (mAb) (SMI 311, 1/1000, Covance) or a mouse anti-phosphorylated neurofilaments mAb (SMI 312, 1/1000, Covance), or Mac-2 rat mAb (1/200, ATCC, Cedarlane) for 2 h at room temperature. Tissue sections were then washed and incubated with a secondary anti-mouse or anti-rat biotinylated antibody, before revealing with ABC Vectastain kit (Vector Laboratories) as previously described (24). Double staining for astrocytes and glutamate transporter GLT-1 fluorescence were investigated with primary antibodies: polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (1/1000, GFAP, Dako) and goat anti-glutamate transporter GLT-1 (1/500, K-16 sc-31582, Santa Cruz Biotechnology). Spinal cord sections were blocked with horse serum in PBS 1X, for 1 h at room temperature. Following incubation with both primary antibodies for 2 h at room temperature, sections were washed, then incubated with secondary fluorescent antibodies in the dark, for 2 h at room temperature: Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1/1000, Invitrogen) and Alexa Fluor 568 anti-goat (1/1000, Invitrogen). After final PBS 1X washes, tissue sections were incubated 5 min at room temperature with 4,6-diamidino-2-phenylindole (1/100, DAPI; Polysciences Inc.), then mounted with Immuno-mount and observed under a fluorescence microscope.

Protein extraction and Western blot analysis. Spinal cords from groups of three mice selected randomly were homogenized in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 Mm Tris, pH 7.4, 1% (v/v) NP-40, 0.25% (w/v) sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) supplemented with the protease cocktail inhibitor 1X (P8340, Sigma, 100X). Lysates were cleared by centrifugation for 5 min at 4°C at 17,000 x *g* and supernatants were aliquoted and stored at -80°C. The BCA Protein assay kit (Novagen) was used to determine protein concentration, according to the manufacturer's protocol. Proteins (10 µg per sample) were separated on a 4-12% gradient gel Novex NuPage (Invitrogen), transferred to PVDF membrane (Millipore, Immobilon-P Transfer Membrane) with the Bio-Rad Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell apparatus. Membranes were

blocked with TBS buffer containing 1% (v/v) Tween (TBS-T) and 5% (w/v) non-fat milk at 4°C overnight, then membranes were incubated with polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1/2000, Dako) or guinea pig anti-glutamate transporter GLT-1 mAb (1/1000, AB1783, Millipore) or Mac-2 rat mAb (1/100, ATCC, Cedarlane) or rabbit anti-GAPDH (1/1000, Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. Membranes were washed three times with TBS-T and then incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature: anti-rabbit (1/1000, GE Healthcare UK) or anti-guinea pig (1/1000, Millipore) or anti-rat (1/1000, Kirkegaard & Perry Laboratories) coupled to horseradish peroxydase and detection was made by chemiluminescence using the Bio-Rad Immun-Star™ HRP Substrate kit. Band detection and semi-quantification was made using the GeneSnap software from Chemi Genius Syngene apparatus. ANOVA tests followed by post-hoc Tukey's analysis were performed to determine the statistical significances in the differences protein expression between different groups of mice using SPSS software version 16.0.

RESULTS

BALB/c mice infected with HCoV-OC43 containing the Y241H mutation in the spike glycoprotein (rOC/U_{S241}) develop a hind-limb paralytic disease. We recently showed that a viral variant bearing four point mutations in its spike (S) glycoprotein (D24Y, S83T, H183R and Y241H), acquired during viral persistence in human neural cells (48), led to a modified virus-induced neuropathology in BALB/c mice compared to the reference HCoV-OC43 (rOC/ATCC) virus. This modified pathology was characterized by an MS-like flaccid paralysis with areas of demyelination in the spinal cord whereas mice infected by HCoV-OC43 (rOC/ATCC) induced only encephalitis (24). In order to further pinpoint the viral molecular determinants responsible for this modulation of virus-induced neuropathogenesis, we generated recombinant viruses that contained two S mutations at a time: D24Y and S83T (designated rOC/U_{S24-83}) or H183R and Y241H (designated rOC/$U_{S183-241}$) (Fig. 1A). Like in infection with virus containing the four mutations described above, infection of BALB/c mice by rOC/$U_{S183-241}$ also led to a paralytic disease with small areas of demyelination in the spinal cord whereas rOC/U_{S24-83} induced encephalitis like rOC/ATCC. In order to investigate whether only one of the remaining mutations, either H183R or Y241H, was sufficient to induce the paralytic disease in mice, we generated recombinant viruses that harbored only one mutation at a time: H183R, designated rOC/U_{S183}, or Y241H, designated rOC/U_{S241} (Fig. 1A). Whereas BALB/c mice infected with rOC/U_{S183} developed an encephalitis similar to what was observed after rOC/ATCC infection, mice infected with rOC/U_{S241} presented motor dysfunctions and paralytic disease. Neurovirulence of all recombinant viruses was evaluated following intracerebral inoculation of BALB/c mice (Fig. 1B). The survival curves of mice infected by the recombinant viruses bearing one, two, or four point mutations within the viral spike glycoprotein suggested a synergistic effect of these mutations on the mortality rate. Histological examination of infected CNS revealed that the primary target cell of the infection by all these recombinant viruses (rOC/$U_{S183-241}$, rOC/U_{S183}, rOC/U_{S241}) remained the neurons (data not shown), as previously described for rOC/$U_{S24-241}$ and rOC/ATCC (24). The rOC/U_{S241} recombinant virus was associated with motor dysfunctions in infected mice. Therefore, we conclude that the Y241H single mutation was necessary and sufficient to generate the observed paralytic phenotype and focused the rest of the study on this recombinant virus to evaluate the involvement of this single Y241H mutation in paralytic disease, in comparison to the reference virus rOC/ATCC.

To determine whether the difference in pathology induced by rOC/U_{S241} and the reference rOC/ATCC could be related to differences in kinetics of replication in the CNS, brains and spinal cords were harvested and infectious virus titers were assayed every two days for a period of 22 DPI. Even though both viruses replicated to similar extents in the CNS and the highest level of infectious virions

were found at 10 DPI in brains as well as in spinal cords, rOC/U_{S241} remained in the spinal cord for a longer period of time compared to rOC/ATCC. Indeed, infectious rOC/U_{S241} virus was still detectable at 15 DPI whereas rOC/ATCC infectious virus was never detectable beyond 12 DPI (Fig. 2). Even though viral persistence was not evaluated, we have already reported that viral RNA of wild-type reference HCoV-OC43 (ATCC VR759; 23) and recombinant viruses rOC/ATCC (which has exactly the same genomic sequence as the virus ATCC VR759) and rOC/$U_{S24\text{-}241}$ (24) persist in mice for several months post-infection.

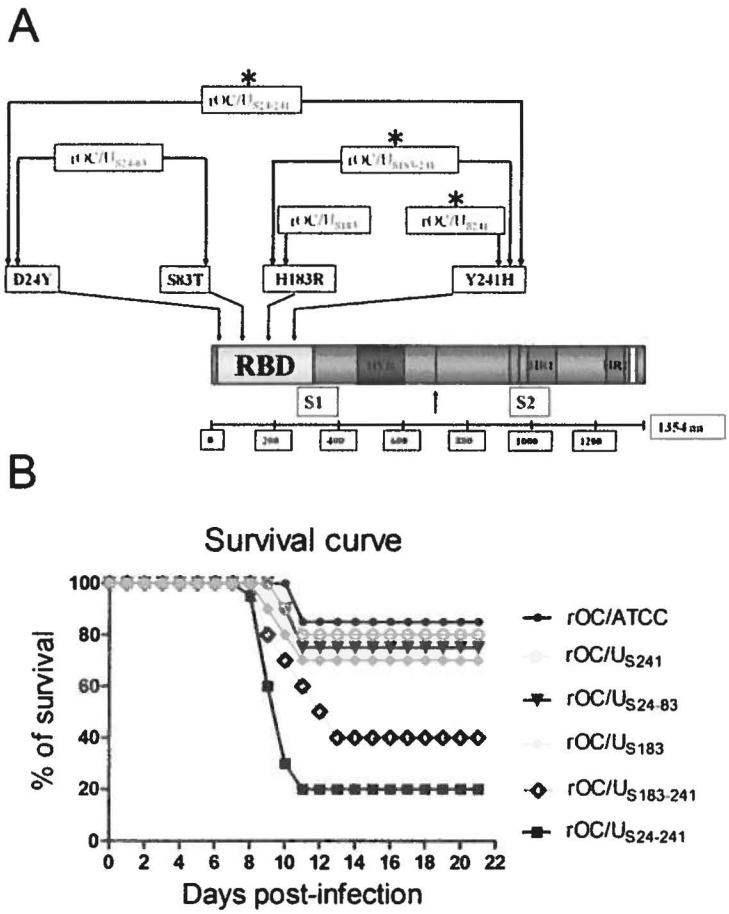


Figure 1. Schematic representation of the point mutations introduced within the viral spike glycoprotein and associated neurovirulence in mice of the different recombinant viruses. (A) Schematic representation of the main structural domains of the S protein of human coronavirus OC43, and the approximate locations of the four point mutations D24Y, S83T, H183R, Y241H. These mutations were introduced into the viral genome to generate rOC/$U_{S24\text{-}241}$ (24). Alternatively, only pairs of mutations were introduced to generate rOC/$U_{S24\text{-}83}$ and rOC/$U_{S183\text{-}241}$. Finally, one single mutation was introduced at a time to generate rOC/U_{S183} and rOC/U_{S241}. * indicates recombinant viruses which induced a paralytic disease following infection. RBD, putative cell receptor - binding domain ; HVR, hypervariable region; HR, heptad repeat regions **(B)** Survival curves following intracerebral inoculation of the different recombinant HCoV-OC43 harboring various mutations in the S protein compared to reference rOC/ATCC virus. Whereas infection of mice with the reference virus rOC/ATCC induced 15% mortality, mice infected with rOC/$US_{24\text{-}241}$ showed a mortality rate of 80%. The relative survival rates of mice infected by different viruses containing one, two or four mutations in the spike protein suggest a synergic effect of these mutations on mortality rate. Results are representative of three independent experiments.

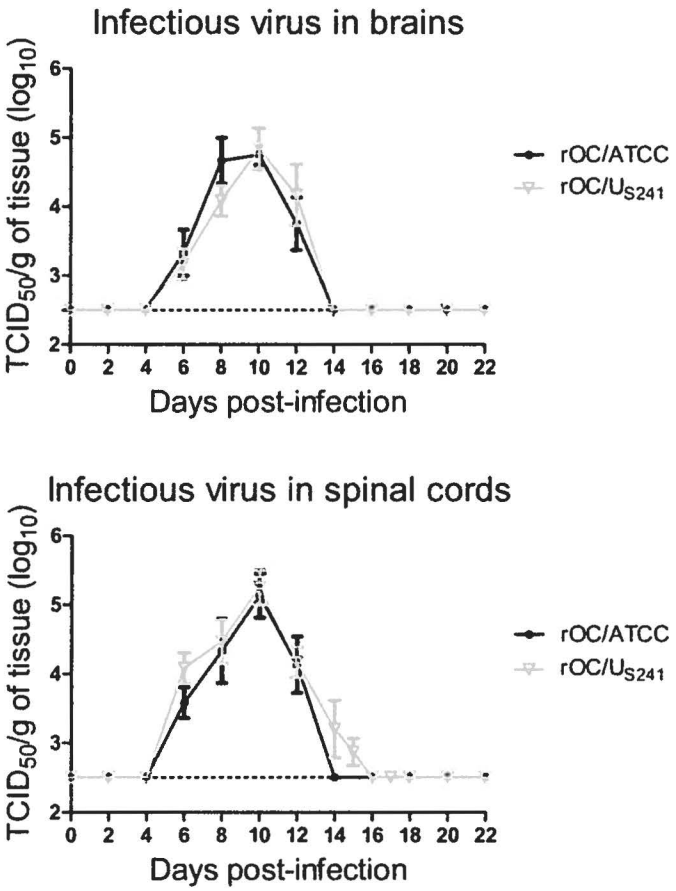


Figure 2. Infectious virus production measured in the CNS of infected mice. The kinetics of infectious virus production in brains and spinal cords was evaluated every two days for 22 DPI. Both viruses replicated to similar levels with the same kinetics in brains and the highest levels of infectious virions were found at 10 DPI in brains as well as in spinal cords. Recombinant virus rOC/U_{S241} was cleared less rapidly from the spinal cord as infectious virus was repeatedly detected for up to 15 DPI. Results are representative of two independent experiments.

AMPA receptor antagonist (GYKI-52466) treatment attenuates mice motor dysfunctions and severe paralysis induced following infection by rOC/U_{S241}. In order to characterize a possible involvement of excitotoxicity in rOC/U_{S241}-induced hind-limb paralysis, mice infected by rOC/U_{S241} were treated with the AMPA receptor antagonist GYKI-52466 or vehicle (HBSS). GYKI-52466 treatment did not affect survival rate of mice infected by either rOC/ATCC or rOC/U_{S241} (Fig. 3A) but it attenuated clinical scores related to motor dysfunctions and paralytic disease induced following rOC/U_{S241} infection (Fig. 3B). Indeed, fewer mice presented mild paralysis (CS 1.5-2) and they recovered more rapidly when treated with GYKI-52466 compared to control vehicle-treated mice. Moreover, whereas 20 to 30% of mice infected by the rOC/U_{S241} virus and treated with vehicle presented severe paralysis (CS 2.5-3.5), only 5-10% of the mice treated with GYKI-52466 (with exception of 12-13 DPI) fell in this category (Fig. 3B). Furthermore, recovery was more rapid following treatment by GYKI-52466. The worst symptoms of motor dysfunctions were observed at 10 DPI, and disappeared totally in the following 6 days of GYKI-52466 treatment, whereas motor disability persisted in vehicle-treated mice. Indeed, as soon as 18 DPI, surviving mice infected and treated with AMPA antagonist recovered completely with no more detectable motor CS. On the other hand, 20% of the infected mice treated with vehicle only were still presenting severe paralysis (CS 2.5-3.5) at 21 DPI. Viral replication in brains and spinal cords was assessed in mice infected by rOC/U_{S241} or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle. For both recombinant viruses, treatment with GYKI-52466 did not modify viral replication (Fig. 3C).

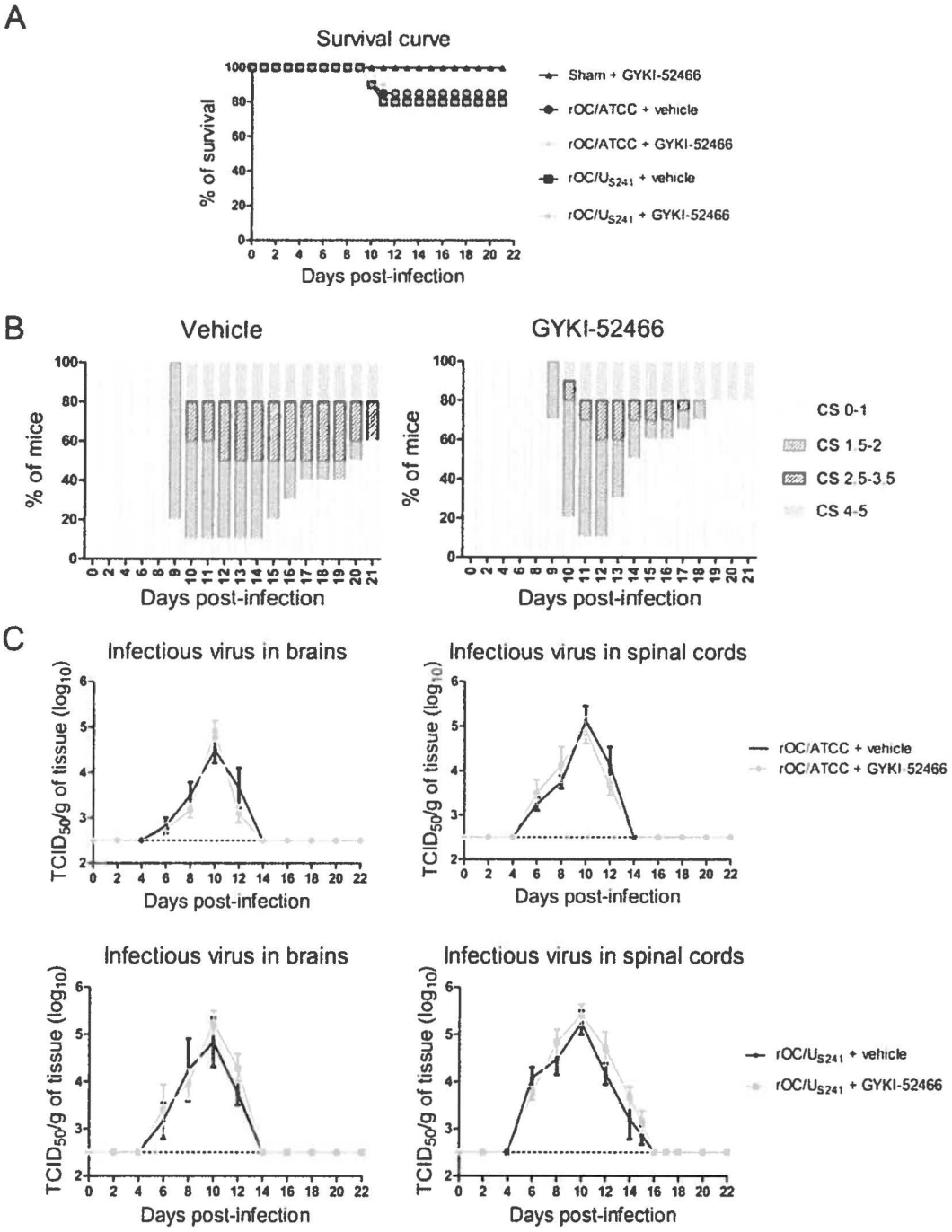

A
Survival curve
% of survival
Days post-infection
Sham + GYKI-52466
rOC/ATCC + vehicle
rOC/ATCC + GYKI-52466
rOC/U$_{S241}$ + vehicle
rOC/U$_{S241}$ + GYKI-52466
B
Vehicle
GYKI-52466
% of mice
Days post-infection
CS 0-1
CS 1.5-2
CS 2.5-3.5
CS 4-5
C
Infectious virus in brains
Infectious virus in spinal cords
TCID$_{50}$/g of tissue (log$_{10}$)
Days post-infection
rOC/ATCC + vehicle
rOC/ATCC + GYKI-52466
rOC/U$_{S241}$ + vehicle
rOC/U$_{S241}$ + GYKI-52466

Figure 3. AMPA receptor antagonist GYKI-52466 treatment attenuates motor dysfunctions in infected mice without modifying neurovirulence or viral replication. (A) Survival curves of mice infected by rOC/US241 or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle. GYKI-52466 treatment did not change the rate of survival of mice following infection by both viruses. Sham-infected mice treated with GYKI-52466 alone illustrated that AMPA treatment was not toxic under the condition used. Results are representative of two independent experiments. **(B)** Effect of GYKI-52466 treatment on motor clinical scores (CS) in mice infected by rOC/US241 and treated with GYKI-52466 or vehicle. GYKI-52466 treatment attenuated clinical scores related to mild (CS 1.5-2) or severe paralysis (CS 2.5-3.5) of mice infected by rOC/US241 compared to mice treated only with vehicle. Twenty to 30% of mice infected and treated with vehicle presented CS of severe paralysis (2.5-3.5) whereas only 5-10% of mice treated with GYKI-52466 fell in this category. CS of motor dysfunction completely disappeared at 18 DPI in GYKI-52466 treated mice whereas 20% of mice infected and treated with vehicle only were still presenting severe paralysis (CS 2.5-3.5) at 21 DPI. Fewer mice presented mild paralysis (CS 1.5-2) were fewer and recovered more rapidly when treated with GYKI-52466. Results are representative of three independent experiments. **(C)** Infectious virus titers in the CNS of mice infected by rOC/US241 or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle. For both recombinant viruses, viral replication (kinetics and total amount of infectious virus) was not affected following GYKI-52466 treatment. Results are representative of two independent experiments.

AMPA receptor antagonist treatment reduces neuronal dysfunction in mice infected by rOC/U_{S241} . Spinal cords from mice infected by rOC/U_{S241} or rOC/ATCC and treated with the AMPA receptor antagonist (GYKI-52466) or vehicle were harvested at 10 DPI (time of motor dysfunctions and severe paralysis) to evaluate whether a neuronal alteration associated with excitotoxicity was underway in infected mice. Neuronal dysregulation was investigated by evaluating the axonal neurofilament phosphorylation state. Using SMI 311, an antibody against nonphosphorylated NF-H proteins, we found that infection of mice with rOC/ATCC and rOC/U_{S241} resulted in abnormal loss of soma nonphosphorylated NF-H in the spinal cord grey matter (GM) compared to sham-infected mice. This modification in the phosphorylation state was much more pronounced following infection with rOC/U_{S241} compared to rOC/ATCC (Fig. 4, SMI 311 GM). On the other hand, spinal cord white matter (WM) of mice infected with rOC/ATCC and rOC/U_{S241} showed an abnormal presence of nonphosphorylated NF-H, and axonal swelling in WM was more important following rOC/U_{S241} infection compared to rOC/ATCC (Fig. 4 SMI 311 WM). Staining with SMI 312 antibodies against phosphorylated NF-H proteins showed a low level of axonal phosphorylated NF in the spinal cord white matter following infection by rOC/U_{S241}, compared to rOC/ATCC- or sham-infected mice. Moreover, treatment with GYKI-52466 of mice infected by both recombinant viruses partially restored the physiological NF-H phosphorylation state.

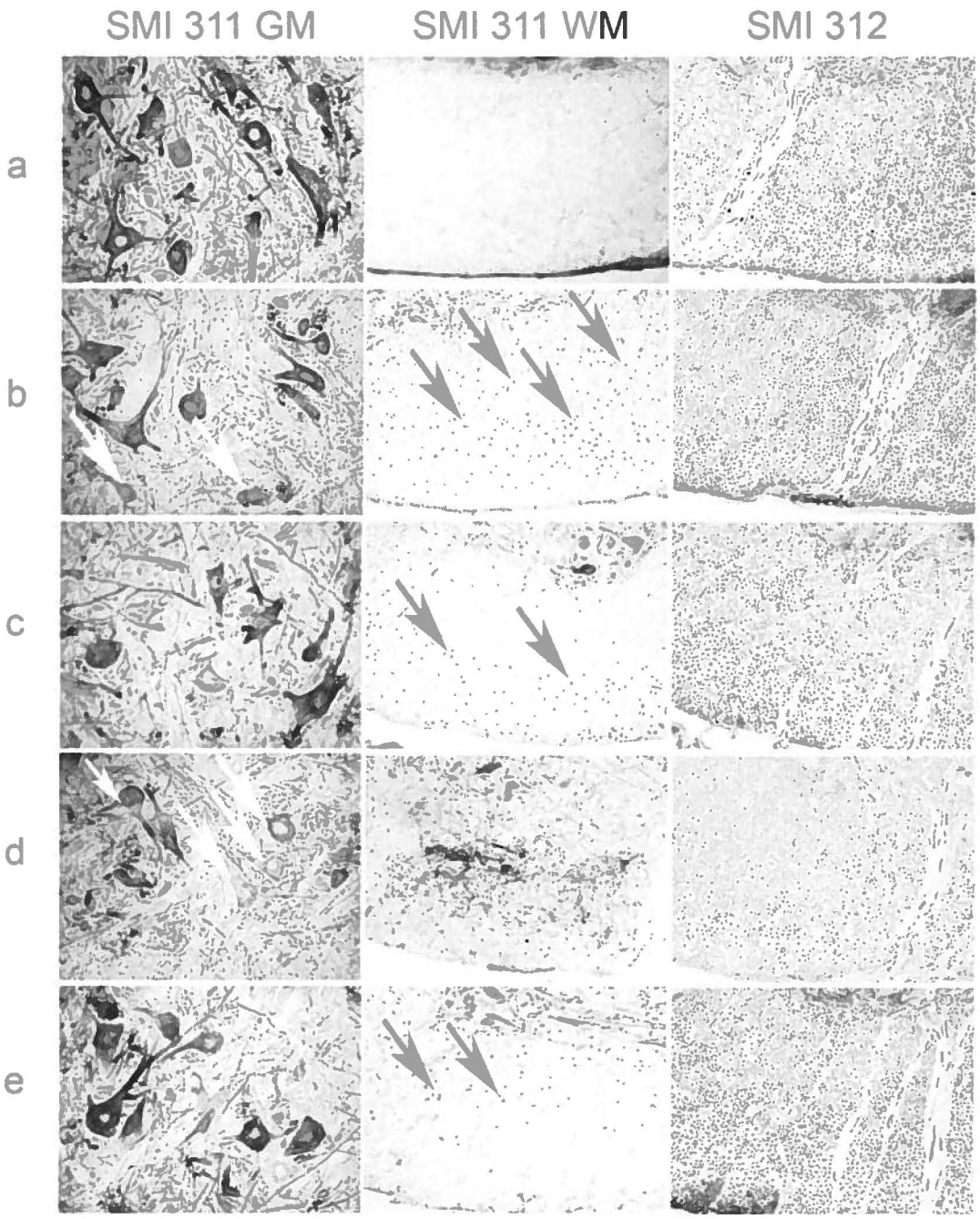
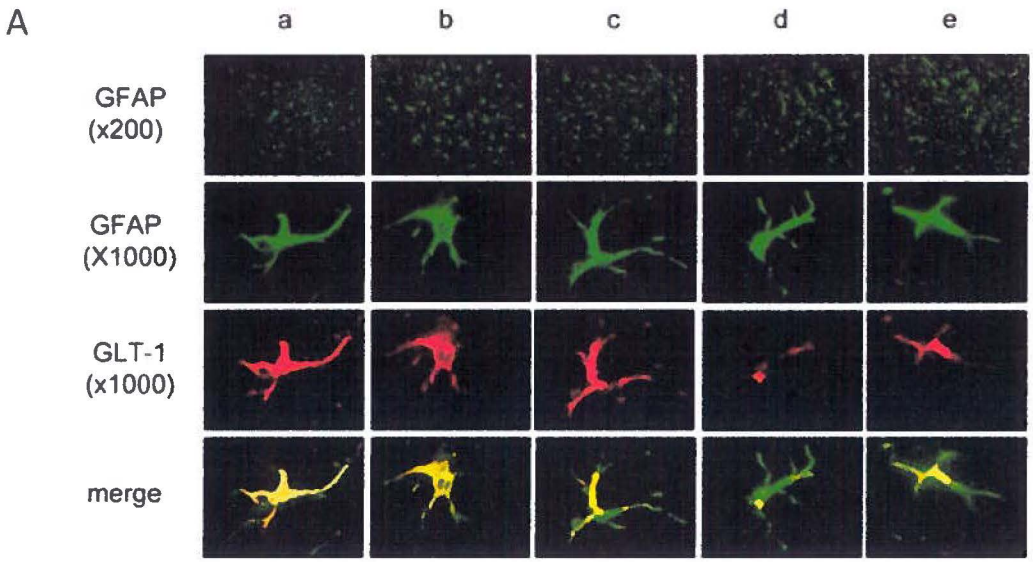

SMI 311 GM
SMI 311 WM
SMI 312
a
b
c
d
e

Figure 4. AMPA receptor antagonist treatment reduces neuronal dysfunction as observed by the phosphorylation state of heavy neurofilaments in mice infected with rOC/U_{S241}. Immunohistochemistry of lumbar spinal cord grey and white matter (GM, WM, respectively) segments of mice infected with rOC/U_{S241} or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle at 10 DPI. In normal spinal cord (a), SMI 311 stained neurofilament of neuronal soma and dendrites. Following infection with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} (b and d, respectively), GM presented less SMI 311 neuronal soma staining, illustrating a loss of normal nonphosphorylated NF in GM compared to sham-infected mice (a) which was more pronounced following rOC/U_{S241} infection (d) compared to rOC/ATCC (white arrows). Interestingly, spinal cord white matter (WM) of mice infected with rOC/ATCC (b) or rOC/U_{S241} (d) showed higher level of abnormal axonal nonphosphorylated NF-H with abnormal axonal swelling, which was more pronounced following infection by rOC/U_{S241} compared to sham-infected mice (a) (black arrows). Staining with SMI-312 showed a low level of phosphorylated NF-H in WM axons following infection by rOC/U_{S241} compared to rOC/ATCC or sham-infected mice. Treatment with GYKI-52466 of mice infected by rOC/ATCC (c) or rOC/U_{S241} (e) partially restored the physiological NF-H phosphorylation state. **a:** sham-infected mice + vehicle; **b**: rOC/ATCC + vehicle; **c**: rOC/ATCC + GYKI-52466; **d**: rOC/U_{S241} + vehicle; **e**: rOC/U_{S241} + GYKI-52466. (Magnification x400). Results are representative of two independent experiments with three mice per group.

Glutamate transporter 1 (GLT-1) expression is down-regulated in mice infected by rOC/U_{S241} and up-regulated following AMPA receptor antagonist treatment. The astrocytic receptor GLT-1 is responsible for 90% of glutamate recapture. Consequently, as glutamate excitotoxicity may be due to a problem in this recapture, we decided to evaluate the expression of GLT-1 on spinal cord astrocytes. Therefore, spinal cords were harvested at 10 DPI and GLT-1 expression was evaluated by immunofluorescence and Western blotting analysis. Infection by both viruses led to significant astrocyte activation compared to sham-infected mice treated with vehicle (Fig. 5A, B ($^{###}P<0.001$)). Even though a greater number of GFAP-positive astrocytes were detected following infection, glial GLT-1 expression was significantly down-regulated in mice infected by rOC/U_{S241} ($P<0.01$) as revealed by immunofluorescence analysis (Fig. 5 A) and confirmed by Western blotting analysis (Fig. 5B) compared to mice infected by rOC/ATCC and sham-infected mice. However, treatment with GYKI-52466 led to partial up-regulation of GLT-1 expression in mice infected by rOC/U_{S241} ($^{**}P<0.01$), as shown by immunofluorescence and Western blotting analysis (Fig. 5 A, B).

Treatment with AMPA receptor antagonist reduces microglial activation. Microglia are often activated during glutamate excitotoxicity. Therefore, microglial activation was evaluated in the spinal cords of infected mice by immunohistochemistry and Western blotting analysis at 10 DPI. Mice infected by both viruses presented a significant activation of microglia/macrophages in the spinal cord as compared to sham-infected mice, where these cells were not activated under normal physiological conditions. Moreover, rOC/U_{S241} infection led to a drastically significant increase ($^{*}P<0.05$) in the activation of microglial cells, compared to rOC/ATCC as revealed by quantitation of Mac-2 expression on Western blots (Fig. 6 A, B). Treatment with GYKI-52466 reduced activation of microglia/macrophages (Mac-2 expression) in mice infected with rOC/U_{S241} ($^{*}P<0.05$) but the level of microglial activation did not return to basal level of sham-infected animals.


A
a
b
c
d
e
GFAP (x200)
GFAP (X1000)
GLT-1 (x1000)
merge

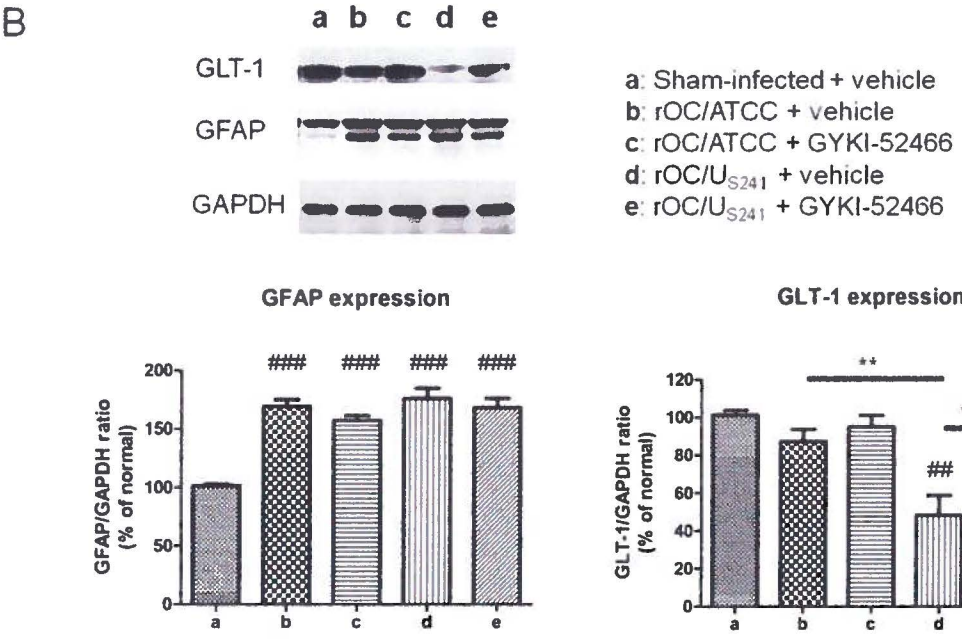

B
a b c d e
GLT-1
GFAP
GAPDH
a: Sham-infected + vehicle
b: rOC/ATCC + vehicle
c: rOC/ATCC + GYKI-52466
d: rOC/U$_{S241}$ + vehicle
e: rOC/U$_{S241}$ + GYKI-52466
GFAP expression
GFAP/GAPDH ratio (% of normal)
###
GLT-1 expression
GLT-1/GAPDH ratio (% of normal)
**
##

Figure 5. Expression of glutamate transporter 1 (GLT-1) is down-regulated in mice infected with rOC/U_{S241} and partially restored following treatment with AMPA receptor antagonist. (A) Immunofluorescence analysis of lumbar spinal cord segments of grey matter from mice infected by rOC/ATCC or rOC/U_{S241} and treated with vehicle (b and d) or GYKI-52466 (c and e) at 10 DPI. Infected mice (b and d) presented an increased number of activated astrocytes compared to sham-infected mice (a) and a down-regulation of GLT-1 staining which was more pronounced following rOC/U_{S241} infection compared to rOC/ATCC (d). Treatment with GYKI-52466 led to partial restoration of GLT-1 expression levels (c and e) (Magnification x1000). Results are representative of two independent experiments with three mice per group. **(B)** Western blotting analysis strengthened histological data. Mice infected by both recombinants showed significant ($^{###}P<0.001$) GFAP expression compared to sham-infected mice. GLT-1 expression was significantly down-regulated in mice infected by rOC/U_{S241} (d) ($P<0.001$) compared to mice infected by rOC/ATCC (b) or control (a). Treatment with GYKI-52466 led to significant upregulation of GLT-1 expression in mice infected by rOC/U_{S241} ($^{**}P<0.01$) compared to mice infected by rOC/ATCC or control. Note that following infection of mice with HCoV-OC43, an additional band of GFAP is detected at 45 kDa, which is suggested to represent a proteolytic fragment derived from the 50 kDa band. Results are expressed as percentage of control (sham-infected mice + vehicle (a)) and data are represented as a mean ± SEM. (n=3). $^{**}P<0.01$ (Dukey's test) for comparison between groups of infected mice. $^{###}P<0.001$ for comparison to sham-infected mice. a: Sham-infected mice + vehicle; b: rOC/ATCC + vehicle; c: rOC/ATCC + GYKI-52466; d: rOC/U_{S241} + vehicle; e: rOC/U_{S241} + GYKI-52466. Results are representative of three independent experiments.

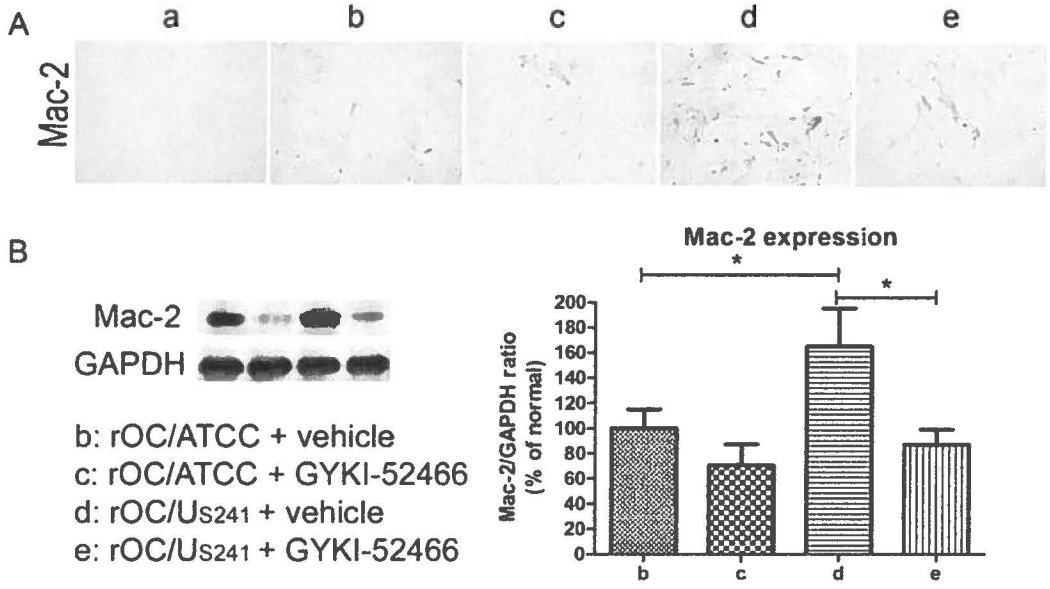


Figure 6. Treatment with AMPA receptor antagonist reduced microglial activation (A) Immunohistochemical staining of activated microglia using Mac-2 antibody in mice infected with rOC/U_{S241} or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle at 10 DPI. Spinal cord grey matter ventral horn from infected mice demonstrated a significant activation of microglia/macrophages following infection by both viruses. Treatment with GYKI-52466 reduced microglia/macrophage activation in mice infected by rOC/U_{S241}. (Magnification x400). Results are representative of two independent experiments with three mice per group. **(B)** Western blotting analysis of spinal cord proteins confirmed the histological finding. Infection of mice by rOC/U_{S241} led to significant increased (*$P<0.05$) activation of microglial cells (Mac-2 staining) compared to mice infected by rOC/ATCC, and GYKI-52466 treatment of mice attenuated microglial cells activation in mice infected by rOC/U_{S241} (*$P<0.05$). These results are expressed as percentage of reference, as 100% represented mice infected by rOC/ATCC and treated with vehicle (**b**), as microglial cells activation was undetectable in sham-infected animals (a). Data are represented as a mean ± SEM. (n=3) *$P<0.05$ (Dukey's test). **a:** Sham-infected mice + vehicle; **b**: rOC/ATCC + vehicle; **c**: rOC/ATCC + GYKI-52466; **d**: rOC/U_{S241} + vehicle; **e**: rOC/U_{S241} + GYKI-52466. Results are representative of three independent experiments.

DISCUSSION

We have previously shown that four mutations in the spike (S) glycoprotein of human coronavirus OC43 (D24Y, S83T, H183R and Y241H) modulate disease in infected BALB/c mice from an encephalitis to a flaccid paralysis and eventual demyelination (24). The aim of the present study was to determine whether only one of these four mutations was sufficient to induce hind-limb paralysis in mice and to determine the mechanism underlying this virus-induced neuropathology. Making use of a series of recombinant viruses produced with our infectious clone pBAC-OC43^{FL} (47), we were able to identify a single point mutation (Y241H) in the HCoV-OC43 S glycoprotein that is necessary and sufficient for induction of hind-limb paralysis in infected BALB/c mice, without affecting viral neurovirulence or the kinetics of viral replication in brain, when compared to rOC/ATCC.

Even though in some viral model of CNS infection, blockade of excitotoxicity results in decrease of mortality of infected (21), we showed that treatment with an AMPA antagonist neither affected the survival rate of mice nor the viral replication in mice infected by both HCoV-OC43 variants (rOC/ATCC or rOC/U_{S241}). However, the number of mice presenting motor dysfunctions or severe paralysis induced by the rOC/U_{S241} variant decreased in the presence of the AMPA antagonist GYKI-52466 and mice recovered more rapidly from motor disability compared to infected mice treated with vehicle alone. These results strongly suggest that glutamate excitotoxicity is involved in pathological process leading to motor dysfunction without any direct association with viral replication, which is not modified by the treatment with the AMPA antagonist.

Mice infected by rOC/U_{S241} or rOC/ATCC showed abnormal loss of soma nonphosphorylated NF-H in the grey matter (GM) and this was more important following rOC/U_{S241} infection. Moreover, spinal cord white matter (WM) of mice infected by rOC/U_{S241} or rOC/ATCC presented abnormal axonal nonphosphorylated NF-H, which was also more important following rOC/U_{S241} infection, even leading to axonal beading and swelling. It has already been reported that modifications in the phosphorylation state of neurofilaments contribute to motor neuron disease, as seen in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Multiple Sclerosis (MS) (9, 43). This abnormal disruption of NF-H phosphorylation state in axon and cell body observed following infection could lead to neuronal dysfunction, disruption of axonal transport with perturbations in neuronal transmission, which was demonstrated to account for motor disabilities (36). Treatment with GYKI-52466 significantly reduced the imbalance of NF-H phosphorylation state and also improved motor dysfunctions. This is consistent with the fact that glutamate excitotoxicity causes damages to the cytoskeleton of axons *in vivo* and that the administration of AMPA antagonist attenuated axonal damages (18). Moreover, glutamate excitotoxicity was shown to be involved in the slowing of axonal transport (1, 22, 31) that could account for axonal swelling observed in axons. As neurons are the

main target of HCoV-OC43 infection, viral replication in neurons may induce neuronal stress that can lead to a dysregulation of glutamate metabolism and homeostasis (glutamate synthesis, release, recycling) as already shown in other neurotropic viral model (26, 33, 51). Indeed, it was reported that human immunodeficiency virus (HIV)-1 can upregulate glutaminase expression in infected macrophages (15), that the HIV-1 viral Tat protein increases neuronal glutamate exocytosis (32). Moreover, other studies have shown that the astrocytic glutamate transporter GLT-1 was also down-regulated in viral models involving Sindbis virus or HIV (11, 53). Furthermore, excessive stimulation of glutamate on its specific receptors is known to induce degeneration of neural cells and to lead to neurodegenerative diseases (13).

In physiological conditions, glutamate homeostasis is in large part regulated by glial glutamate transporter 1 (GLT-1), mainly expressed on astrocytes, which is responsible for up to 90% of the total glutamate clearance in adult CNS (2). We showed a significant activation of astrocytes following infection by both viruses. However, the expression of GLT-1 did not correlate with this activation associated with an increased number of astrocytes expressing high levels of GFAP. Indeed, the results presented in Fig. 5 show that GLT-1 transporter expression was significantly down-regulated following rOC/U_{S241} infection compared to mice infected by rOC/ATCC or sham-infected mice. Interestingly, treatment with GYKI-52466 led to a partial restoration of expression of the GLT-1 transporter, which however always remained inferior to basal levels. This incomplete restoration may account for the remaining motor dysfunctions observed. It was demonstrated that knockout mice for GLT-1 undergo seizures and death as a result of excitotoxicity caused by too elevated extracellular glutamate concentration (50). Moreover, decreased expression of this transporter was reported in several neurological diseases, as well as in viral models (7, 17).

We have previously reported that infection of mice by HCoV-OC43 led to the release of several pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1 and IL-6) with a significant increase of IL-6 in mice infected with an S-mutant virus (24). These cytokines are known to down-regulate glutamate transporter GLT-1 expression (11, 34, 38). In the present study, we show that the mutant virus rOC/U_{S241} (which harbors a single S point mutation Y241H) led to significant microglia/macrophage activation, compared to what is observed with the reference virus, and that treatment with the AMPA antagonist partially reduced microglial cell activation. Moreover, our results (Fig. 6) also indicate that the increased microglial/macrophage activation correlated with the GLT-1 down-regulated expression. Previous studies have demonstrated that microglia/macrophages can sense extracellular glutamate concentration via AMPA receptors on their membrane, and that glutamate acts as a chemokine for these cells (29). Furthermore, activated microglia/macrophages are a significant source of glutamate that can induce excitotoxic neuronal cell death (6). These results suggest that, in our model, the role of astrocytes is to rescue neurons

from excitotoxicity by regulating glutamate homeostasis whereas activation of microglia/ macrophages may exert excitotoxicity by down regulating GLT-1 expression via the release of some cytokines or by their capacity to release glutamate, as previously described (28). This is consistent with a previous study that showed that microglia/macrophages can release glutamate and that blockade of glutamate release from activated microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice (45).

In summary, our study suggests that persistence-acquired mutations in the S glycoprotein of a human coronavirus (HCoV-OC43), which represents a possible viral adaptation within the CNS, could be involved in the development of neurological disorders in humans, and that a single such point mutation is sufficient to modulate virus-induced neuropathology from an encephalitis to an MS-like neuropathology that involves glutamate excitotoxicity in a mouse model. Deciphering the underlying mechanisms of HCoV-OC43 interaction with the central nervous system should lead to a better understanding of potentially pathological consequences of this infection, as well as the importance of viral determinants in the process. Future studies will investigate the mechanism of action of both viruses (rOC/ATCC and rOC/U_{S241}) regarding glutamate synthesis, release and uptake in order to better understand the exact role of excitotoxicity and its pathological consequences following HCoV-OC43 infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant No. MT-9203 from the Institute of Infection and Immunity (III) of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to Pierre J. Talbot, who is the holder of the Tier-1 (Senior) Canada Research Chair in Neuroimmunovirology award. Elodie Brison acknowledges a doctoral studentship from the Multiple Sclerosis Society of Canada. We thank Dominique J. Favreau for his precious help for the treatment of data related to Western blot analysis and for statistical analysis.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Elodie BRISON: Expérimentation, analyse des données et rédaction du manuscrit.

Hélène Jacomy, Marc Desforges et Pierre Talbot: Discussions des données et correction du manuscrit.

REFERENCES

1. Ackerley, S., A. J. Grierson, J. Brownlees, P. Thornhill, B. H. Anderton, P. N. Leigh, C. E. Shaw, and C. C. Miller. 2000. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. J. Cell Biol. 150:165-176.

2. Anderson, C. M., and R. A. Swanson. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia 32:1-14.

3. Arbour, N., G. Côté, C. Lachance, M. Tardieu, N. R. Cashman, and P. J. Talbot. 1999. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. J. Virol. 73:3338-3350.

4. Arbour, N., R. Day, J. Newcombe, and P. J. Talbot. 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. J. Virol. 74:8913-8921.

5. Arbour, N., S. Ékandé, G. Côté, C. Lachance, F. Chagnon, M. Tardieu, N. R. Cashman, and P. J. Talbot. 1999. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. J. Virol. 73:3326-3337.

6. Barger, S. W., M. E. Goodwin, M. M. Porter, and M. L. Beggs. 2007. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. J. Neurochem. 101:1205-1213.

7. Blakely, P. K., B. K. Kleinschmidt-DeMasters, K. L. Tyler, and D. N. Irani. 2009. Disrupted glutamate transporter expression in the spinal cord with acute flaccid paralysis caused by West Nile virus infection. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 68:1061-1072.

8. Bonavia, A., N. Arbour, V. W. Yong, and P. J. Talbot. 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. J. Virol. 71:800-806.

9. Boylan, K., C. Yang, J. Crook, K. Overstreet, M. Heckman, Y. Wang, D. Borchelt, and G. Shaw. 2009. Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker. J. Neurochem. 111:1182-1191.

10. Buchmeier, M. J., and T. E. Lane. 1999. Viral-induced neurodegenerative disease. Curr. Opin. Microbiol. 2:398-402.

11. Carmen, J., J. D. Rothstein, and D. A. Kerr. 2009. Tumor necrosis factor-alpha modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. Brain Res. 1263:143-154.

12. Danbolt, N. C. 2001. Glutamate uptake. Prog. Neurobiol. 65:1-105.

13. Dong, X. X., Y. Wang, and Z. H. Qin. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacol. Sin. 30:379-387.

14. Edwards, J. A., F. Denis, and P. J. Talbot. 2000. Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. J. Neuroimmunol. 108:73-81.

15. Erdmann N., C. Tian, Y. Huang, J. Zhao, S. Herek, N. Curthoys, and J. Zheng. 2009. *In vitro* glutaminase regulation and mechanisms of glutamate generation in HIV-1 infected macrophages. J. Neurochem. 109:551-561.

16. Forgie, S., and T. J. Marrie. 2009. Healthcare-associated atypical pneumonia. Semin. Respir. Crit. Care Med. 30:67-85.

17. Fotheringham, J., E. L. Williams, N. Akhyani, and S. Jacobson. 2008. Human herpesvirus 6 (HHV-6) induces dysregulation of glutamate uptake and transporter expression in astrocytes. J. Neuroimm. Pharmacol. 3:105-116.

18. Fowler, J. H., E. McCracken, D. Dewar, and J. McCulloch. 2003. Intracerebral injection of AMPA causes axonal damage *in vivo*. Brain Res. 991:104-112.

19. Gotow, T. 2000. Neurofilaments in health and disease. Med. Electron. Microsc. 33:173-199.

20. Goulton, C. S., A. R. Patten, J. R. Kerr, and D. S. Kerr. 2010. Pharmacological Preconditioning with GYKI 52466: A Prophylactic Approach to Neuroprotection. Front. Neurosci. 4:54.

21. Greene, I. P., E. Y. Lee, N. Prow, B. Ngwang, and D. E. Griffin. 2008. Protection from fatal viral encephalomyelitis: AMPA receptor antagonists have a direct effect on the inflammatory response to infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105:3575-3580.

22. Hiruma, H., T. Katakura, S. Takahashi, T. Ichikawa, and T. Kawakami. 2003. Glutamate and amyloid beta-protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms. J. Neurosci. 23:8967-8977.

23. Jacomy, H., G. Fragoso, G. Almazan, W. E. Mushynski, and P. J. Talbot. 2006. Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. Virology 349:335-346.

24. Jacomy, H., J. R. St-Jean, E. Brison, G. Marceau, M. Desforges, and P. J. Talbot. 2010. Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. J. Neurovirol. 16:279-293.

25. Jacomy, H., and P. J. Talbot. 2003. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. Virology 315:20-33.

26. Kaul, M., G. A. Garden, and S. A. Lipton. 2001. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. Nature 410:988-994.

27. Lambert, F., H. Jacomy, G. Marceau, and P. J. Talbot. 2008. Titration of human coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, by an indirect immunoperoxidase assay. Methods Mol. Biol. 454:93-102.

28. Liang, J., H. Takeuchi, Y. Doi, J. Kawanokuchi, Y. Sonobe, S. Jin, I. Yawata, H. Li, S. Yasuoka, T. Mizuno, and A. Suzumura. 2008. Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity. Brain Res. 1210:11-19.

29. Liu, G. J., R. Nagarajah, R. B. Banati, and M. R. Bennett. 2009. Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. Eur. J. Neurosci. 29:1108-1118.

30. Mark, L. P., R. W. Prost, J. L. Ulmer, M. M. Smith, D. L. Daniels, J. M. Strottmann, W. D. Brown, and L. Hacein-Bey. 2001. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. AJNR: Am. J. Neuroradiol. 22:1813-1824.

31. Miller, C. C., S. Ackerley, J. Brownlees, A. J. Grierson, N. J. Jacobsen, and P. Thornhill. 2002. Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. Cell. Mol. Life Sci. 59:323-330.

32. Musante V., M. Summa, E. Neri, A. Puliti, T. T. Godowicz, P. Severi, G. Battaglia, M. Raiteri, and A. Pittaluga. 2010. The HIV-1 viral protein Tat increases glutamate and decreases GABA exocytosis from human and mouse neocortical nerve endings. Cereb. Cortex 20:1974-1984.

33. Nargi-Aizenman, J. L., and D. E. Griffin. 2001. Sindbis virus-induced neuronal death is both necrotic and apoptotic and is ameliorated by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. J. Virol. 75:7114-7121.

34. Okada, K., U. Yamashita, and S. Tsuji. 2005. Modulation of Na(+)-dependent glutamate transporter of murine astrocytes by inflammatory mediators. J. UOEH 27:161-170.

35. Olney, J. W. 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids, p. 95-121. *In* E. G. McGeer, J. W. Olney, and P. L. McGeer (ed.), Kainic acid as a tool in neurobiology. Raven Press, New York.

36. Perrot, R., R. Berges, A. Bocquet, and J. Eyer. 2008. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. Mol. Neurobiol. 38:27-65.

37. Petzold, A. 2005. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. J. Neurol. Sci. 233:183-198.

38. Prow, N. A., and D. N. Irani. 2008. The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis. J. Neurochem. 105:1276-1286.

39. Riski, H., and T. Hovi. 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. J. Med. Virol. 6:259-265.

40. Rorick-Kehn, L. M., J. C. Hart, and D. L. McKinzie. 2005. Pharmacological characterization of stress-induced hyperthermia in DBA/2 mice using metabotropic and ionotropic glutamate receptor ligands. Psychopharmacology 183:226-240.

41. Rota, P. A., M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. D. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, and W. J. Bellini. 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science 300:1394-1399.

42. Sattler, R., and M. Tymianski. 2000. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. J. Mol. Med. 78:3-13.

43. Schirmer, L., J. P. Antel, W. Bruck, and C. Stadelmann. 2011. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. Brain Pathol. 21:428-440.

44. Shea, T. B., W. K. Chan, J. Kushkuley, and S. Lee. 2009. Organizational dynamics, functions, and pathobiological dysfunctions of neurofilaments. Results Probl. Cell Differ. 48:29-45.

45. Shijie, J., H. Takeuchi, I. Yawata, Y. Harada, Y. Sonobe, Y. Doi, J. Liang, L. Hua, S. Yasuoka, Y. Zhou, M. Noda, J. Kawanokuchi, T. Mizuno, and A. Suzumura. 2009. Blockade of glutamate release from microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Tohoku J. Exp. Med. 217:87-92.

46. Solyom S., and I. Tarnawa. 2002. Non-competitive AMPA antagonist of 2,3-Benzodiazepine type. Curr. Pharm. Des. 8:913-939.

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

48. St-Jean, J. R., M. Desforges, and P. J. Talbot. 2006. Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. Adv. Exp. Med. Biol. 581:499-502.

49. Talbot, P. J., H. Jacomy, M. Desforges. 2008. Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus, p. 313-324. *In* S. Perlman, T. Gallagher, and E. J. Snijder (ed.), Nidoviruses. ASM Press, Washington, DC.

50. Tanaka, K., K. Watase, T. Manabe, K. Yamada, M. Watanabe, K. Takahashi, H. Iwama, T. Nishikawa, N. Ichihara, T. Kikuchi, S. Okuyama, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto, and K. Wada. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. Science 276:1699-1702.

51. Tian, C., N. Erdmann, J. Zhao, Z. Cao, H. Peng, and J. Zheng. 2008. HIV-infected macrophages mediate neuronal apoptosis through mitochondrial glutaminase. J. Neurochem. 105:994-1005.

52. Tilleux, S., and E. Hermans. 2007. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. J. Neurosci. Res. 85:2059-2070.

53. Wang Z., O. Pekarskaya, M. Bencheikh, W. Chao, H. A. Gelbard, A. Ghorpade, J. D. Rothstein, and D. J. Volsky. Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. 2003. Virology 312:60-73.

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

Publication No.2

Accepté à Journal of Virology, 10 novembre 2013

Novel treatment with neuroprotective and antiviral properties against a neuroinvasive human respiratory virus

Nouveau traitement avec des propriétés neuroprotectrices et antivirales contre un coronavirus respiratoire humain neuroinvasif

Elodie BRISON [1], Hélène JACOMY [1], Marc DESFORGES [1#]

and Pierre J. TALBOT [1#]

[1] *Laboratory of Neuroimmunovirology, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval (Québec), Canada H7V 1B7*

Running title: Memantine antiviral neuroprotection

Keywords: Human Coronavirus, Adaptative mutations, spike protein, Glutamate excitotoxicity, Animal Models

Word count: Abstract: 214 Text: 6077

[#] Co-Correspondent Footnote:

Dr. Pierre J. Talbot
Laboratory of Neuroimmunovirology
INRS-Institut Armand Frappier
513, boulevard des Prairies
Laval (Québec)
CANADA
H7V 1B7

Tel.: (450) 687-5010 extension 4300
Fax: (450) 686-5501
E-mail: pierre.talbot@iaf.inrs.ca

Dr. Marc Desforges
Laboratory of Neuroimmunovirology
INRS-Institut Armand Frappier
513, boulevard des Prairies
Laval (Québec)
CANADA
H7V 1B7

Tel.: (450) 687-5010 extension 4342
Fax: (450) 686-5501
E-mail : marc.desforges@iaf.inrs.ca

RÉSUMÉ

Les coronavirus humains (HCoV) sont des pathogènes respiratoires reconnus, avec des propriétés neuroinvasives et neurotropes chez la souris et l'humain. La souche OC43 (HCoV-OC43) peut infecter et persister dans des cellules neuronales et gliales humaines et activer des mécanismes neuroinflammatoires et neurodégénératifs, suggérant que cette souche pourrait être impliquée dans des maladies neurologiques d'étiologie inconnue chez l'humain. De plus, nous avons préalablement montré que HCoV-OC43 est neurovirulent chez des souris susceptibles, induisant une encéphalite, et qu'un virus mutant arborant une mutation ponctuelle dans la protéine de surface S induit une pathologie paralysante chez des souris susceptibles, impliquant l'excitotoxicité glutamatergique. En utilisant la mémantine, antagoniste des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDAr) utilisé chez l'humain pour le traitement de maladies neurologiques, nous avons montré que cet antagoniste réduitsait les symptômes neurologiques suite à l'infection par HCoV-OC43. En effet, le traitement quotidien par la mémantine améliorait les signes cliniques reliés à la pathologie paralysante et aux problèmes moteurs chez les souris infectées par le virus mutant. Par des techniques d'immunomarquages sur des coupes de moelles épinières et sur des cultures primaires du SNC murin, nous avons montré que la mémantine restaurait significativement l'état de phosphorylation physiologique des neurofilaments chez les souris infectées par le virus mutant. De plus nous avons également montré que le recyclage du glutamate via le transporteur GLT-1 et par l'enzyme glutamine synthétase, était régulé à la baisse chez les souris infectées par le virus mutant, et que le traitement par la mémantine restaure significativement l'expression du GLT-1 et de la glutamine synthétase, menant à une meilleure régulation de l'homéostasie du glutamate. Le recyclage du glutamate est donc un point clé dans la dérégulation de l'homéostasie du glutamate menant au développement de dysfonctions motrices et d'une maladie paralysante suite à l'infection par HCoV-OC43. Il est intéressant de noter que la mémantine atténuait le taux de mortalité, la perte de poids et réduisait la réplication de HCoV-OC43 dans le système nerveux central, de manière dépendante de la dose. Ce nouveau mode d'action de la mémantine sur la réplication virale suggère fortement que cette molécule pourrait être utilisée comme agent antiviral afin de limiter directement la réplication virale tout en améliorant les symptômes neurologiques de nombreuses maladies neurologiques impliquant des virus.

ABSTRACT

Human coronaviruses (HCoV) are recognized respiratory pathogens with neuroinvasive and neurotropic properties in mice and humans. Virus strain OC43 (HCoV-OC43), can infect and persist in human neural cells and activate neuroinflammatory and neurodegenerative mechanisms, suggesting that it could be involved in neurological disease of unknown etiology in humans. Moreover, we have shown that HCoV-OC43 is neurovirulent in susceptible mice, causing encephalitis, and that a viral mutant with one single mutation in the viral S protein induced a paralytic disease that involves glutamate excitotoxicity in susceptible mice. Herein, we show that glutamate recycling via the GLT-1 transporter and glutamine synthetase are central to dysregulation of glutamate homeostasis and development of motor dysfunctions and paralytic disease in HCoV-OC43-infected mice. Moreover, memantine, an NMDA receptor antagonist widely used in the treatment of neurological diseases in humans, improved clinical scores related to paralytic disease and motor disabilities by partially restoring the physiological neurofilament phosphorylation state in virus-infected mice. Interestingly, memantine attenuated mortality rates and body weight loss and reduced HCoV-OC43 replication in the central nervous system in a dose-dependent manner. This novel action of memantine on viral replication strongly suggests that it could be used as an antiviral agent to directly limit viral replication while improving neurological symptoms in various neurological diseases with a viral involvement.

IMPORTANCE OF THE STUDY

Mutations in the surface (S) protein of human respiratory coronavirus OC43 appear after persistent infection of human cells of the central nervous system (CNS), a possible viral adaptation to this environment. Furthermore, a single amino acid change in the viral S protein modulated virus-induced neuropathology in mice from an encephalitis to a neuropathology characterized by flaccid paralysis which involves glutamate excitotoxicity. We now show that memantine, a drug that is used for alleviating symptoms associated with neuropathology, such as Alzheimer's disease, can partially restore the physiologic state of infected mice by limiting both neurodegeneration and viral replication. This suggests that memantine could be used as an antiviral agent while improving neurological symptoms in various neurological diseases with a viral involvement.

INTRODUCTION

Coronaviruses are enveloped RNA viruses recognized to induce respiratory, enteric and neurological diseases in several animal species (1). Human coronaviruses (HCoVs) are pathogens responsible for upper and lower respiratory tract infections (2) and for the severe acute respiratory syndrome epidemic (3). Over the years, HCoV have also been associated with other serious human pathologies such as development of pneumonia, myocarditis, meningitis (4, 5), and occasionally for acute disseminated encephalitis (6).

We have previously shown that HCoV can infect and persist in human neural (neuronal and glial) cells and can activate glial cells to produce pro-inflammatory mediators (7-10). We have also shown that, like its murine counterpart, the mouse hepatitis virus (MHV), which causes a neurodegenerative and neuroinflammatory disease in susceptible mice and rats (1) and is a very useful viral animal model for multiple sclerosis (MS), HCoV-OC43 has neuroinvasive properties in mice (11). Furthermore, as we have demonstrated that this strain of human coronavirus is neuroinvasive in humans (12), we hypothesized that HCoV-OC43 might be associated with neuroinflammatory and/or neurodegenerative human diseases.

Glutamate is a major excitatory neurotransmitter of the central nervous system (CNS) involved in several neurophysiological functions. A disruption of its homeostasis can lead to excitotoxicity, a pathological process by which neural cells may be damaged following an excessive stimulation of glutamate on its specific ionotropic receptors (AMPA (2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoic acid) and NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors) (13, 14). Glutamate is mainly synthesized from glutamine by two different isoforms of glutaminase designated kidney-type glutaminase (KGA or GLS1) and liver-type glutaminase (LGA or GLS2) (15), and is stored in vesicles before being released into the synaptic cleft. In some pathologies, astrocytes and microglial cells can also synthesize and release glutamate by expressing glutaminase (16-18).

Overactivation of the AMPA and NMDA receptors may result in neural Ca^{2+} overload, which can mediate excitotoxicity by means of a cascade of events involving free radical production, mitochondrial dysfunction, and the activation of several enzymes such as phospholipase A2, resulting in damage to cell membranes, cytoskeleton and DNA (19). Glutamate re-uptake is necessary for the regulation of physiological extracellular glutamate concentrations and because it can potentially damage nerve cells. Glutamate homeostasis is mainly mediated by high-affinity sodium-dependent transporters, such as the glial transporter 1 protein (GLT-1). In neurological diseases, disruption of GLT-1 expression was associated with alteration in glutamate uptake (20). After re-uptake, glutamate is converted to glutamine by the glial

enzyme glutamine synthetase (21, 22), and glutamine is transported in nerve terminals and reconverted to glutamate (23).

NMDA receptors have been shown to play a significant physiological role by controlling synaptic plasticity and memory functions and their overactivation by glutamate may lead to excitotoxicity because of their high permeability to calcium ions (24). Some high-affinity NMDA antagonists such as dizocilpine (also designated MK-801) were shown to block excitotoxicity and cell death but also to induce severe side effects in humans, due to the blockade of normal neuronal function (25, 26). Memantine, a low-affinity voltage-dependent uncompetitive antagonist which blocks NMDA receptors only when they are overstimulated by glutamate (27), only acts under pathological conditions during prolonged activation of NMDA receptors without affecting normal neuronal NMDA receptor functions (28). Interestingly, glutamate excitotoxicity was reported to be involved in several human neurological diseases such as Alzheimer's disease, MS, epilepsy, Huntington's disease and Parkinson's disease (29), (30), and memantine was reported to have a beneficial effect in several of these human neuropathologies (31-34). Moreover, glutamate excitotoxicity could be involved following viral infections in the CNS such as West Nile virus (35);Human immunodeficiency virus HIV (36); human herpes virus HHV-6 (37); Human T-lymphotropic virus Type I (HTLV-1) (38); Borna virus (39) and Sindbis virus (40).

We have recently reported that mice infected with a HCoV-OC43 variant harboring one point mutation in its surface spike (S) glycoprotein (Y241H) (41, 42), suffered from glutamate excitotoxicity that induced a neuropathology characterized by a MS-like flaccid paralysis where motor dysfunctions and hind-limb paralysis were associated with dysregulation at the level of the AMPA receptors (42).

In the present study, we now demonstrate that NMDA receptors are also involved and we further characterize the process that leads to a dysregulation in the glutamate homeostasis during infection and show that memantine improved clinical scores related to paralytic disease and motor disabilities and reduced viral replication in the CNS of HCoV-OC43 infected mice in a dose-dependent manner.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement. All animal experiments were approved by the institutional animal care and use ethics committee (IACUC) of INRS *(Institut national de la recherche* scientifique) and conformed to the Canadian Council on Animal Care (CCAC). The animal care and use protocol number 0902-01 was issued by the IACUC of INRS for the animal experiments described herein.

Viruses and cell lines. The wild-type reference HCoV-OC43 virus (VR-759) was obtained in the 1980's from the American Type Culture Collection (ATCC). The recombinant virus HCoV-OC43 (rOC/ATCC) was generated using the full-length cDNA clone pBAC-OC43^{FL} and displayed the same phenotypic properties as the wild-type virus, as previously described (43). This recombinant virus was used as the reference control virus for all experiments. Recombinant virus designated rOC/U_{S241} results from the introduction of a single point mutation in the spike glycoprotein of HCoV-OC43, as previously described (42). The HRT-18 cell line (gift from Dr. David Brian, University of Tennessee, U.S.A.), was cultured in MEM-alpha media (Life Technologies) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, PAA) and used to produce viral stocks and in experiments with NMDA antagonists.

Primary cultures of mouse central nervous system (CNS) cells. Embryos at 11 to 13 days of gestation were removed from pregnant anesthetized BALB/c mice. Cortex and hippocampus of embryonic pup brains were dissected out and placed in HBSS medium without Ca^{2+} and Mg^{2+}, supplemented with 1.0 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES buffer. Tissues were incubated in 5 mL of trypsin-EDTA (0.25%) (Invitrogen) supplemented with 20 µg/mL of DNase I (0.1%) (Sigma) for 20 min at 37°C. After digestion, trypsin/DNase mix was removed from the tissue and enzyme was inactivated with HBSS medium supplemented with 10% FBS (v/v) for 2 min and this medium was removed and replaced by fresh HBSS medium (without Ca^{2+} and Mg^{2+}, supplemented with 1.0 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES buffer). Samples were then briefly centrifuged at 250 x g and the supernatant was removed and replaced by 5 mL of HBSS. Tissues were gently pipetted up and down to dissociate cells with a 1 mL tip. Supernatants were then transferred into a 15-ml tube and centrifuged for 5 min at 1000 x g. The pellet was resuspended in neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 0.5 mM glutaMAX^{TM}-I (Invitrogen) and B27 supplement (Life Technologies). Cells were then seeded at approximately 1x10^6/cm2 and grown on poly-D-lysine treated glass coverslips in the same medium that was replaced by fresh neurobasal medium B27/glutaMAX after 4 days in culture. The cultures were ready for infection after 10 days in culture.

Infection of human cell lines and primary murine CNS cultures. HRT-18 cells and primary mouse CNS cultures were infected at a defined MOI (multiplicity of infection) or mock-infected, then incubated at 33°C or 37°C respectively for 2 hours (for virus adsorption), washed with PBS and incubated at 33°C with fresh MEM-alpha supplemented with 1% FBS (v/v) (for HRT-18 cells), or at 37°C with fresh neurobasal medium B27/glutaMAX (for primary murine CNS cultures) for different periods of time before processing at the indicated time points.

End-point RT-PCR for expression of NMDA-NR1 receptor subunit gene. Total RNA was extracted from HRT-18 cells and primary mouse CNS cell cultures using the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized by the SuperScript III first-strand synthesis supermix kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions and was subsequently quantified using a ND1000 spectrophotometer (Nanodrop). The primers for the NMDA-NR1 subunit of the NMDA receptor were analysed *via* the BLAST database to ensure specificity of binding. The forward primer used was 5'-CAAGTATGCGGATGGGGTGA-3' and the reverse primer used was 5'-CAGTCTGGTGGACATCTGGTA-3' (NMDA-NR1 Genbank accession number NM000832). Two µg of cDNA sample was added to a PCR reaction mixture of Accuprime™ Pfx reaction mix, $MgSO_4$ and dNTPs (Life Technologies). PCR was subsequently run on samples for 35 cycles under the following conditions: denaturation (95°C for 35 sec), annealing (55°C for 45 sec) and extension (68°C for 40 sec).

Mice, survival curves, body weight variations and clinical scores. Female BALB/c mice (Jackson Laboratories) aged 22 days post-natal were inoculated by the intracerebral route with $10^{2.5}$ $TCID_{50}$ of recombinant virus, as previously described (42). Groups of ten mice infected by each recombinant virus were observed and survival, body weight variations and clinical scores related to motor dysfunctions were evaluated on a daily basis over a period of 21 days post-infection (DPI). Mice infected with rOC/U_{S241} were evaluated and scored according to a scale based on experimental allergic encephalitis (EAE) clinical score (CS) evaluation (0-1: normal with no clinical signs; 1.5-2: partial hind-limb paralysis with a walk close to ground level; 2.5-3.5: complete hind-limb paralysis, 4-5: moribund state and death).

NMDA receptor antagonists. The specific uncompetitive NMDA receptor antagonists, memantine (3,5-Dimethyl-tricyclo(3.3.1.13,7)decan-1-amine hydrochloride) and dizocilpine (chemical name: (+)-MK 801 maleate) ((5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclohepten-5,10-imine maleate) were obtained from R&D systems-Tocris.

For animal treatments, memantine and dizocilpine were dissolved in PBS. To investigate the effect of treatment with memantine or dizocilpine, groups of ten BALB/c mice infected with rOC/ATCC or

rOC/U_{S241} were treated intraperitoneally with defined doses of memantine or dizocilpine (μg/g of body weight) 12 h post-infection, then daily for three weeks or only with PBS (vehicle) to normalize experimental stress conditions. To verify the non-cytotoxic effect of different doses of memantine and dizocilpine, sham-infected mice received the same dose of these NMDA receptor antagonists.

For treatment of cell cultures after virus adsorption, HRT-18 cells or primary murine CNS cultures were washed with sterile PBS and incubated with fresh MEM-alpha supplemented with 1% FBS (v/v) (for HRT-18 cells), or at 37°C with fresh neurobasal medium B27/glutaMAX (for primary mouse CNS cultures) containing defined concentrations of memantine or dizocilpine (μM) for different periods of time before processing at the indicated time points.

Infectious virus assay using an immunoperoxydase assay (IPA). Mouse brain and spinal cord tissues or cell culture supernatants were processed for the presence and quantification of infectious virus by an indirect immunoperoxydase assay on HRT-18 cells, as previously described (44). Briefly, cells were incubated with a mouse primary antibody used to detect the S protein of HCoV-OC43. After three PBS washes, cells were incubated with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody immunoglobulin (KPL). Finally, immune complexes were detected by incubation with 0.025% (w/v) 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Bio-Rad) and 0.01% (v/v) hydrogen peroxide in PBS and infectious virus titers were calculated by the Karber method, as previously described (44). Stastistical analysis were conducted by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test.

Extracellular glutamate concentration assay. Extracellular glutamate concentrations were measured using the colorimetric (O.D. 450 nm) glutamate assay kit (ab83389, Abcam) according to the manufacturer's instructions. Stastistical analysis were conducted by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test.

Cell viability and LDH release assay. Viability of cell cultures was assayed via the lactate deshydrogenase (LDH) cytotoxicity assay kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. It consists in a colorimetric assay (O.D. 490 nm) for quantification of cell death and cell lysis based on the measurement of lactate dehydrogenase activity released from cytosol of damaged cells into the supernatant. Stastistical analysis were conducted by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test.

Immunohistochemistry / Immunofluorescence. For immunohistochemistry, groups of three BALB/c mice either sham-infected or infected by recombinant virus and treated with memantine, dizocilpine or vehicle were selected randomly and perfused with a solution of 4% (w/v) paraformaldehyde

at 10 DPI, which corresponds to the peak of viral replication in the spinal cord and the outcome of clinical scores related to paralytic disease. Lumbar segments from spinal cords were cryoprotected in 30% (w/v) sucrose, frozen at -20°C and processed for sets of 15 µm section size with a cryostat (MICROM HM 525). Spinal cord sections were first blocked with horse serum in PBS 1X for 1h at room temperature. Axonal damage was investigated by assessing the heavy neurofilament (NF-H) phosphorylation state. Tissue sections were incubated with a mouse anti-nonphosphorylated neurofilaments monoclonal antibody (mAb) (SMI 311, 1/1000; Covance) for 2 h at room temperature. Activation of the glutaminase enzyme was investigated with a polyclonal goat anti-phosphate-activated glutaminase antibody (KGA (T16), 1/500; Santa Cruz Biotechnology) or with a polyclonal rabbit anti-phosphate-activated glutaminase (GLS2, ab113509, 1/250; Abcam) overnight at 4°C. Recycling of glutamate by the glutamine synthetase enzyme was investigated with a monoclonal mouse anti-glutamine synthetase antibody (MAB302, Clone GS-6, 1/500; Millipore) overnight at 4°C. Tissue sections were then washed with PBS 1X and incubated with a biotinylated secondary anti-mouse, anti-goat or anti-rabbit antibody before revealing with ABC Vectastain kit (Vector Laboratories) as previously described (45).

For immunofluorescence staining, murine primary CNS cultures were washed with sterile PBS, then fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 30 min at room temperature. After washing, cells were permeabilized with 100% methanol at -20°C for 5 min and washed with PBS. Before staining, cells were pre-incubated with a blocking solution containing horse serum in PBS for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibodies: a polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1/1000; Dako), a polyclonal goat anti-phosphate-activated glutaminase antibody (isoform KGA (T16), 1/500; Santa Cruz Biotechnology), a polyclonal rabbit anti-phosphate-activated glutaminase (isoform GLS2, ab113509, 1/250; Abcam) or a monoclonal mouse anti-glutamine synthetase antibody (MAB302, Clone GS-6, 1/500; Millipore) overnight at 4°C. After several washes with PBS, cells were incubated in the dark for 2 h at room temperature with the secondary fluorescent antibodies Alexa Fluor 568 anti-goat, anti mouse or anti-rabbit (1/1000, Life Technologies), Alexa Fluor 488 anti-rabbit or anti-mouse (1/1000, Life Technologies). After final PBS washes, tissue sections were incubated for 5 min at room temperature with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 ug/mL; Life Technologies) and then mounted with Immuno-mount (Fisher Scientific). Immunohistochemical and fluorescent staining were observed under a Nikon Eclipse E800 microscope with a QImaging Retiga-EXi Fast 1394 digital camera using Procapture system software.

Protein extraction and Western blot analysis. Spinal cords from groups of three mice selected randomly were homogenized in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 Mm Tris, pH 7.4, 1% (v/v) NP-40, 0.25% (w/v) sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) supplemented with the protease cocktail inhibitor (P8340, Sigma). Lysates were cleared by centrifugation for 5 min at 4°C at 17,000 x *g* and supernatants were

aliquoted and stored at -80°C until further analysis. The BCA Protein assay kit (Novagen) was used to determine protein concentrations, according to the manufacturer's protocol. Proteins (20 µg per sample) were separated on a 4-12% gradient gel Novex NuPage (Life Technologies), transferred to PVDF membrane (Millipore, Immobilon-P Transfer Membrane) with the Bio-Rad Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell apparatus. Membranes were blocked with TBS buffer containing 1% (v/v) Tween (TBS-T) and 5% (w/v) non-fat milk, over-night at 4°C, then membranes were incubated with a polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1/1000; Dako); a monoclonal guinea pig anti-glutamate transporter GLT-1 (AB1783, 1/1000; Millipore); a monoclonal rat anti-Mac-2 (1/100, ATCC; Cedarlane); a polyclonal goat anti-phosphate-activated glutaminase antibody (KGA (T16), 1/1000; Santa Cruz Biotechnology); a polyclonal rabbit anti-phosphate-activated glutaminase (GLS2, ab113509, 1/1000; Abcam); a monoclonal mouse anti-glutamine synthetase antibody (MAB302, Clone GS-6, 1/1000; Millipore) or a polyclonal rabbit anti-GAPDH (1/1000, Santa Cruz Biotechnology) for 1h at room temperature. Membranes were washed three times with TBS-T and then incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature: anti-rabbit (1/1000, GE Healthcare, Lifescience); anti-mouse (1/1000, GE Healthcare, Lifescience); anti-guinea pig (1/1000; Millipore); anti-rat (1/1000; Kirkegaard & Perry Laboratories); anti-goat (1/1000; R&D Systems) coupled to horseradish peroxydase and detection was made by chemiluminescence using the Bio-Rad Immun-Star™ HRP Substrate kit. Band detection and semi-quantification was made using the GeneSnap software from Chemi Genius Syngene apparatus. ANOVA tests followed by post-hoc Tukey's analysis were performed to determine the statistical significances in the differences protein expression between different groups of mice using SPSS software version 16.0.

RESULTS

Daily treatment of mice with NMDA receptor antagonists (memantine and dizocilpine) attenuates motor dysfunctions and severe paralysis induced following infection by S-mutant HCoV-OC43 (rOC/U_{S241}). We have recently reported that a viral variant with a single point mutation (Y241H) in the surface spike glycoprotein (S) of HCoV-OC43, acquired during viral persistence in human neural cells (41), led to the induction of motor dysfunctions and a paralytic disease in BALB/c infected mice (42). In order to characterize the involvement of NMDA receptors in rOC/U_{S241}-induced hind-limb paralysis, mice infected by rOC/U_{S241} (S-mutant virus) were treated with various doses of NMDA receptor antagonists: memantine or dizocilpine, or vehicle (PBS). The highest dose of dizocilpine that could be administered was 0.5 μg/g. Above that dose, the drug was toxic to the mice (catatonia, weight loss) (data not shown). Both dizocilpine and memantine treatments attenuated clinical scores related to motor dysfunctions and paralytic disease induced following rOC/U_{S241} infection, with a more effective effect for memantine treatment compared to dizocilpine treatment (Figure 1A and 1B). Indeed, fewer mice treated with memantine presented mild paralysis (CS 1.5-2) and they recovered more rapidly compared to dizocilpine-treated mice or control vehicle-treated mice. Moreover, daily memantine treatment attenuated (dose of up to 10 μg/g) and even abolished (dose of 30 μg/g) clinical scores related to the paralytic disease of mice infected by by rOC/U_{S241} in a dose-dependent manner (Figure 1B).

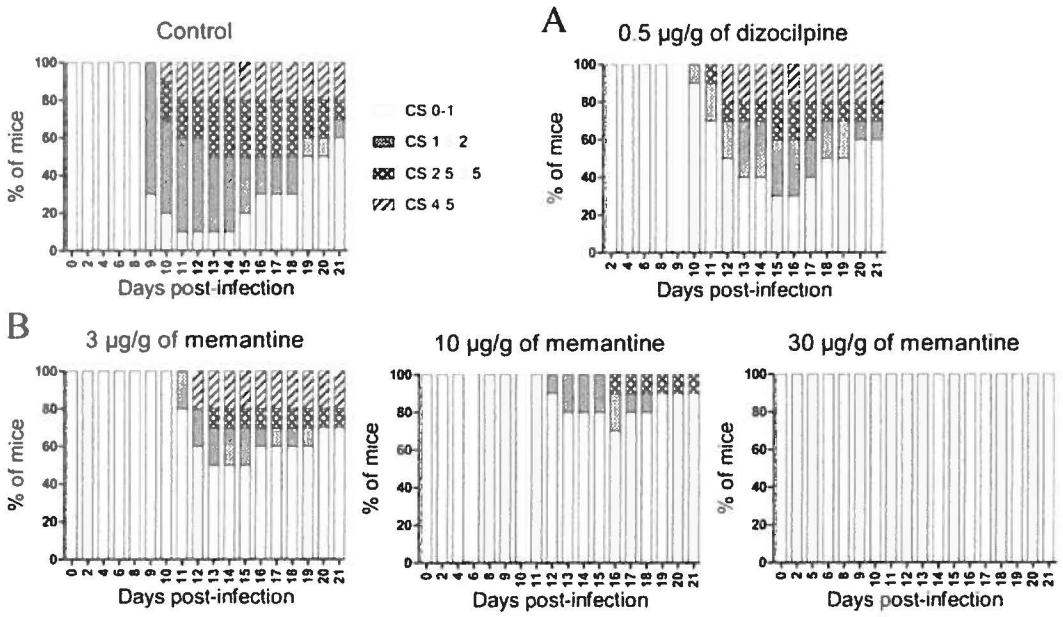


Figure 1. Daily memantine and dizocilpine treatment attenuates motor dysfunctions and severe paralysis induced following infection of mice by S-mutant human coronavirus OC43. Groups of ten BALB/c mice infected with rOC/U_{S241} were treated daily by intraperitoneal injection of a defined dose of memantine or dizocilpine or PBS (vehicle). Motor dysfunctions were evaluated and scored according to a scale based on experimental allergic encephalitis (EAE) clinical score (CS) evaluation (0-1: normal with no clinical signs; 1.5-2: partial hind-limb paralysis with a walk close to ground level; 2.5-3.5: complete hind-limb paralysis, 4-5: moribund state and death). **(A)** Daily treatment with 0.5 µg/g dizocilpine attenuated clinical scores in mice infected by rOC/U_{S241}. Higher doses of dizocilpine had strong side effects on mice and increased the mortality rate as illustrated in figure 2. **(B)** Daily memantine treatment attenuated (doses of up to 10 µg/g) and even abolished (dose of 30 µg/g) clinical scores in a dose-dependent manner. Results are representative of three independent experiments.

Daily memantine treatment attenuates mortality rates and body weight loss of infected mice compared to dizocilpine treatment and vehicle (control). To investigate the effect of treatment with memantine or dizocilpine on survival rates, groups of ten BALB/c mice infected with reference wild-type OC43 coronavirus (rOC/ATCC) or S-mutant OC43 virus (rOC/U_{S241}) were treated intraperitoneally daily, with defined doses of memantine or dizocilpine or PBS (vehicle). Mice infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} and treated with PBS showed respectively 10% and 20% mortality. Daily memantine treatment attenuated (doses up to 5 μg/g) and totally suppressed (doses 10 μg/g and over) mortality of mice infected by either virus in a dose-dependent manner (Figure 2A) compared to dizocilpine treatment, which did not attenuate mortality compared to PBS (Figure 2B). Moreover, a higher dose of dizocilpine (dose 1 μg/g) increased mortality by itself in non-infected mice (Figure 2B). We have previously made sure that the treatment of sham-infected mice with different doses of memantine (3 to 30 μg/g) or dizocilpine (0.5 μg/g) were not toxic and did not affect the survival rate of mice (Data not shown) .

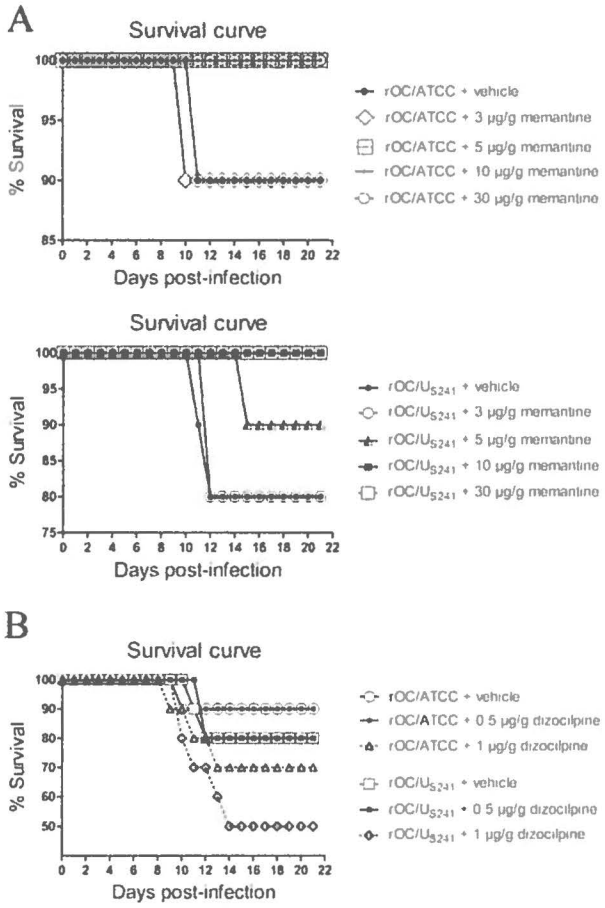


Figure 2. Daily memantine treatment attenuates mortality rates of infected mice compared to dizocilpine treatment and vehicle (control). Groups of ten BALB/c mice infected with reference wild-type (rOC/ATCC) or S-mutant (rOC/US241) virus were treated daily with an intraperitoneal injection of a defined dose of memantine or dizocilpine or PBS (vehicle). (A) Daily memantine treatment attenuated (doses up to 5µg/g) and totally suppressed (dose of 10 µg/g and above) mortality rates of mice infected by either virus in a dose-dependent manner. (B) Daily dizocilpine treatment did not attenuate mortality rates of mice infected by either virus. A higher dose of dizocilpine (1 µg/g) increased mortality rate by itself. Results are representative of three independent experiments.

Mice were also investigated for weight variations because, as previously described (45), weight loss is a specific symptom of mice infected by HCoV-OC43. Mice infected by rOC/ATCC or rOC/U_{S241} and treated with PBS showed a loss of about 10-15 % body weight at 10 days post-infection and recovered between 12 and 22 days post-infection. Daily memantine treatment significantly attenuated (*$P<0.05$ and **$P<0.01$, dose 5 μg/g) and even abolished (dose 10 μg/g and above) weight loss symptoms of mice infected by either virus in a dose-dependent manner (Figure 3A) compared to dizocilpine treatment which did not attenuate weight loss of mice infected by either virus (Figure 3B). As previously mentioned, we made sure that the treatment of sham-infected mice with different doses of memantine (3 to 30 μg/g) or dizocilpine (0.5 μg/g) had no effect and that it did not affect the relative weight of mice (Data not shown).

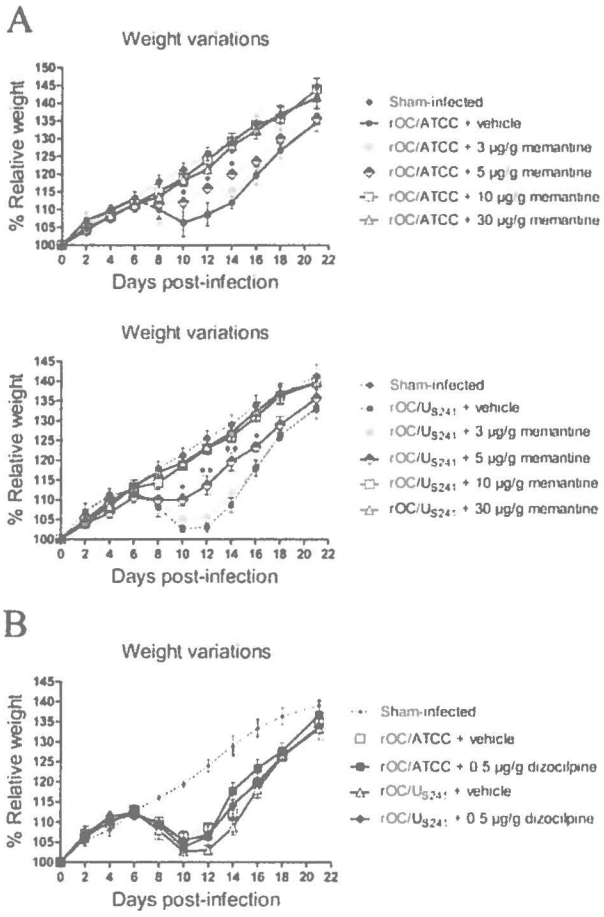


Figure 3. Daily memantine treatment attenuates/abolishes weight loss of infected mice compared to dizocilpine treatment and vehicle (control). Groups of ten BALB/c mice infected with reference wild-type (rOC/ATCC) or S-mutant (rOC/U_{S241}) virus were daily treated intraperitoneally with a defined dose of memantine or dizocilpine or PBS (vehicle). **(A)** Daily memantine treatment attenuated (doses of up to 5µg/g) and abolished (dose of 10 µg/g and above) weight loss of mice infected by either virus in a dose-dependent manner. **(B)** Daily dizocilpine treatment did not attenuate weight loss of mice infected by either virus. Stastistical significance: *P<0.05 and **P<0.01 (Dukey's test) for comparison with infected mice treated with vehicle for a defined day post-infection. Results are representative of three independent experiments.

Increase of extracellular glutamate levels and lactate dehydrogenase (LDH) release following infection of mouse primary CNS cultures. In order to investigate whether HCoV-OC43 causes a dysregulation of glutamate homeostasis that may lead to neuronal loss, murine primary CNS cultures were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} at various multiplicities of infection (MOI) and treated with memantine (20 μM) or vehicle (medium). At 24 hours post-infection, cell supernatants were assessed for extracellular glutamate and lactate dehydrogenase (LDH) release. Increasing MOI of each virus led to a significant increase in extracellular glutamate levels following infection with rOC/ATCC ($^{\#}P<0.05$ for MOI of 1 and 3) or rOC/U_{S241} ($^{\#}P<0.05$ for MOI of 0.1 and 1; $^{\#\#}P<0.01$ for MOI of 3) compared to mock-infected cells (Figure 4A). Moreover, infection with rOC/U_{S241} usually led to a more significant extracellular glutamate release ($^{\&}P<0.05$) compared to rOC/ATCC infection (Figure 4A). Memantine treatment led to a significant decrease of extracellular glutamate concentration following infection of primary cultures of mouse CNS with rOC/ATCC (*P<0.05 for MOI of 1) and rOC/U_{S241} (*P<0.05 for MOI of 0.1 and 1) (Figure 4A).

The viability of cell cultures was assayed via the LDH release assay. Increasing MOI of each virus led to a significant increase of LDH release following infection with rOC/ATCC ($^{\#}P<0.05$ for MOI of 1 and 3) or rOC/U_{S241} ($^{\#}P<0.05$ for MOI of 0.1, 1 and 3) compared to mock-infected cells (Figure 4B). Infection of primary cultures of mouse CNS cells with rOC/U_{S241} usually led to a more significant LDH release ($^{\&}P<0.05$) compared to rOC/ATCC (Figure 4B). Memantine treatment led to a significant decrease in LDH release following infection of primary cultures of mouse CNS by both rOC/ATCC (*P<0.05 for MOI of 1) and rOC/U_{S241} (*P<0.05 for MOI of 0.1 and 1) (Figure 4B).

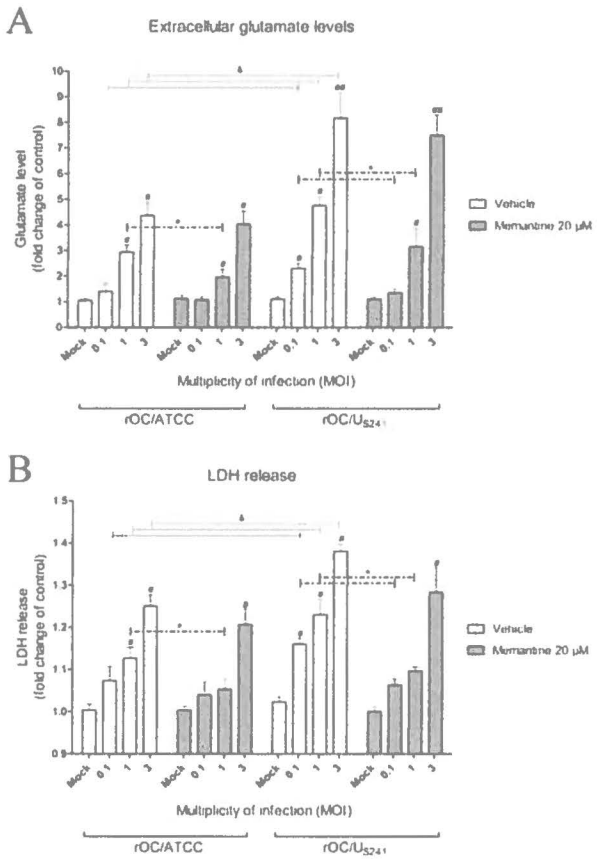


Figure 4. Increase of extracellular glutamate levels and lactate dehydrogenase release following infection of primary cultures of mouse CNS. Primary cultures of mouse CNS cells infected with reference wild-type (rOC/ATCC) or S-mutant (rOC/U_{S241}) virus at different multiplicity of infection (MOI) and treated with memantine (20 µM) or vehicle (medium). **(A)** Increasing MOI of both viruses led to an increase of extracellular glutamate level that was significantly decreased by memantine. (MOI 0.1 and 1). **(B)** Increasing MOI of both viruses also led to an increase in LDH release that was also significantly reduced by memantine (MOI 0.1 and 1). Statistical significance: $^{\#}P<0.05$ and $^{\#\#}P<0.01$ (Dukey's test) for comparison to mock-infected cells; $^{\&}P<0.05$ (Dukey's test) for comparison between rOC/ATCC or rOC/U_{S241}-infected cells at a defined MOI; $^{*}P<0.05$ (Dukey's test) for comparison between memantine- and vehicle-treated infected cells.

Increased extracellular glutamate level is not a result of an increase in expression of phosphate-activated glutaminase. Given that increase of extracellular glutamate concentration could result from an increase in glutamate synthesis, groups of three BALB/c mice infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} treated with memantine or vehicle were sacrificed and evaluated for phosphate-activated kidney-type (KGA) or liver-type (GLS2) glutaminase in lumbar spinal cord grey matter (GM) segments state at 10 DPI (peak of viral replication in spinal cord and the outcome of clinical scores related to paralytic disease). Infection of mice with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} did not lead to changes in KGA or GLS2 expression in lumbar spinal cord grey matter (Figures 5A and 5B). Western blot analysis of spinal cord proteins confirmed the histological findings. Infection of mice with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} did not lead to changes in expression of phosphate-activated KGA or GLS2 and memantine treatments did not affect glutaminase expression (Figure 5C). To confirm these *in vivo* results, primary murine CNS cultures were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} and treated with memantine or vehicle. Expression of KGA and GLS2 by immunofluorescence and immunohistochemistry revealed that it was restricted to neurons with no changes in the level of expression of both enzymes at 24 hpi for both virus (Figures 5A and 5B). We have previously made sure that the treatment of sham-infected mice with 3 μg/g of memantine, or murine primary cultures of CNS with 20 μM of memantine did not affect the basal level expression of KGA and GLS2 compared to vehicle (control) treatment (Data not shown).

Astrocytes and microglial cells may contribute to an excess of glutamate release by expressing glutaminase. Mice infected by either virus showed significant GFAP expression ($^{###}P<0.001$) compared to sham-infected mice, as previously shown (42) and memantine treatment did not attenuate this astrocytic activation (Figure 5C). However, mice infected by either virus showed significant ($^{##}P<0.01$ and $^{#}P<0.05$) microglial cell activation (as monitored by Mac-2 expression) compared to sham-infected mice, which was significantly ($^{*}P<0.05$) more increased following infection with rOC/U_{S241} compared to rOC/ATCC, as previously shown (42). Memantine significantly ($^{*}P<0.05$) attenuated this microglial cell activation in mice infected by rOC/U_{S241} (Figure 5C).

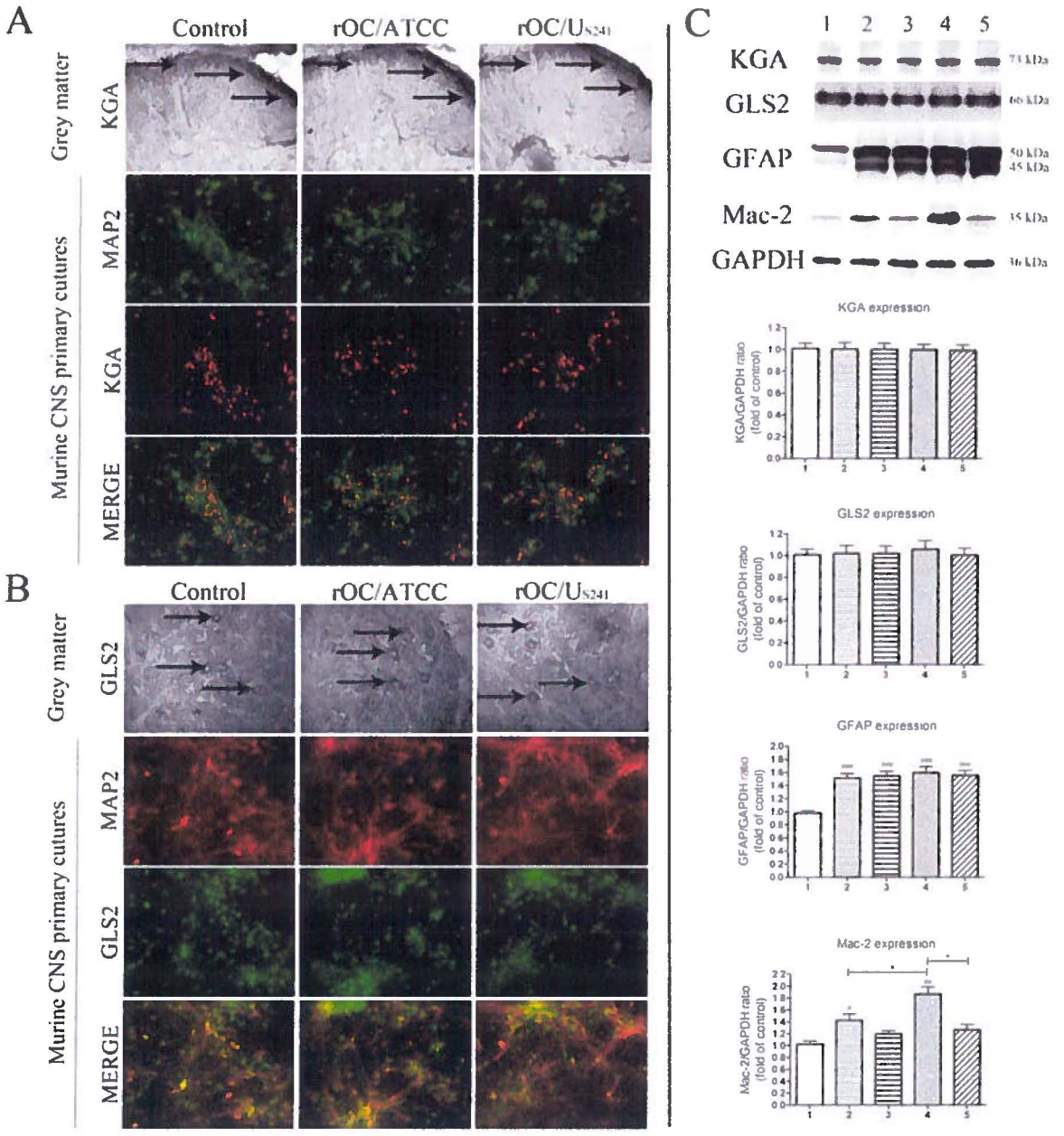


Figure 5. Increase of extracellular glutamate levels is not a result of an increase of expression of phosphate-activated glutaminase. Detection of phosphate-activated kidney-type (KGA) or liver-type (GLS2) glutaminase in lumbar spinal cord grey matter (GM) segments in infected mice treated with memantine or vehicle at 10 DPI. Murine primary cultures of CNS cells infected with reference wild-type (rOC/ATCC) or S-mutant (rOC/U_{S241}) virus and treated with memantine (20 μM) or vehicle (medium). Immunofluorescence revealed no changes in (A) KGA or **(B)** GLS2 activation at 24 h.p.i. in lumbar spinal cord grey matter and in murine primary CNS cell cultures following infection by either virus. **(C)**

Semi-quantitative Western blot analysis of spinal cord proteins confirmed that activation of KGA and GLS2 was not modulated and that astrogliosis (significant increase in GFAP expression) and microglial cells activation (increase in Mac-2 expression) occurred compared to sham-infected mice. Memantine treatment significantly reduced Mac-2 expression in mice infected with rOC/U_{S241} compared to rOC/ATCC-treated mice. Data are represented as a mean ± SEM. (n=3). Stastistical significance: $^{###}P<0.001$; $^{##}P<0.01$ and $^{#}P<0.05$ for comparison to sham-infected mice (Dukey's test); $^{*}P<0.05$ for comparison between groups of memantine treated- or non-treated infected mice (Dukey's test). **1:** Sham-infected mice + vehicle; **2**: rOC/ATCC + vehicle; **3**: rOC/ATCC + 3 µg/g memantine; **4**: rOC/U_{S241} + vehicle; **5**: rOC/U_{S241} + 3 µg/g memantine. Magnification, x400. Results are representative of three independent experiments.

Expression of glutamine synthetase (GS) and glutamate transporter (GLT-1) are down-regulated in mice infected with rOC/U_{S241} and partially restored following treatment with memantine. Groups of three BALB/c mice infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} treated with memantine or vehicle were sacrificed and evaluated by immunohistochemistry for glutamine synthetase (GS) and glutamate transporter-1 (GLT-1) of lumbar spinal cord grey matter (GM) segments at 10 DPI. Glutamine synthetase (GS) staining was down-regulated in grey matter of mice infected with rOC/U_{S241} (Figure 6A). To confirm these *in vivo* results, primary cultures from murine CNS were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} (MOI = 1) and treated with memantine (20 μM) or vehicle (medium) and were assessed for GS expression by immunofluorescence at 24 hours post-infection. GS was exclusively expressed in astrocytes (GFAP marker) and was dramatically down-regulated in grey matter and in infected murine CNS cultures infected with rOC/U_{S241} and memantine treatment led to an increase in GS expression (Figure 6A). Western blot analysis of spinal cord proteins confirmed histological findings. Infection of mice with rOC/U_{S241} led to a significant ($^{\#\#}P<0.01$ and $^{**}P<0.01$) down-regulation of GS expression compared to sham-infected mice or rOC/ATCC-infected mice treated with vehicle. Memantine treatment significantly ($^{**}P<0.01$) led to an increase in GS expression (Figure 6B). Moreover, infection of mice with rOC/U_{S241} led to a significant ($^{\#\#}P<0.01$ and $^{**}P<0.01$) down-regulation of GLT-1 expression compared to sham-infected mice or rOC/ATCC-infected mice treated with vehicle, as previously shown (42). Memantine treatment led to a significant increase ($^{**}P<0.01$) of GLT-1 expression (Figure 6B). We have previously made sure that the treatment of sham-infected mice with 3 μg/g of memantine, or murine primary cultures of CNS with 20 μM of memantine did not affect the basal level expression of glutamine synthetase and GLT-1 compared to control treatment (Data not shown).

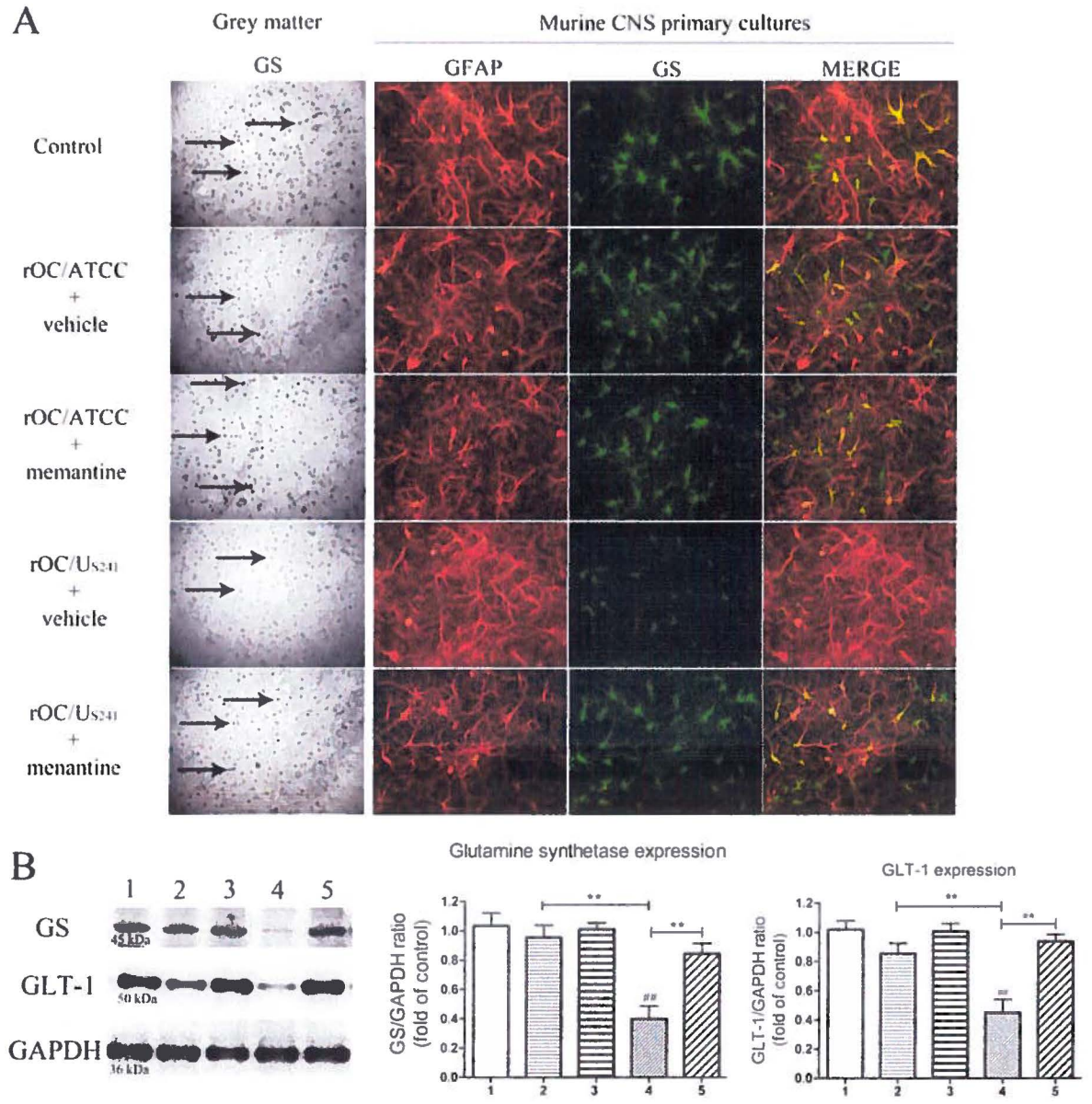


Figure 6. Expression of glutamine synthetase and glutamate transporter (GLT-1) are down-regulated in mice infected with S-mutant human coronavirus OC43 virus and partially restored following treatment with memantine. Glutamine synthetase (GS) was evaluated by immunohistochemistry in lumbar spinal cord grey matter (GM) segments of mice infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} and treated with memantine or vehicle at 10 DPI and by immunofluorescence at 24 hpi in murine primary cultures of CNS cells infected and treated with memantine (20 μM) or vehicle (medium). **(A)** Glutamine synthetase (GS) expression was dramatically down-regulated in grey matter and in murine primary cultures of CNS cells infected with the S-mutant virus (rOC/U_{S241}) and memantine

treatment partially restored GS expression. **(B)** Semi-quantitative Western blot analysis of spinal cord proteins confirmed the histological findings. Infection of mice with rOC/U_{S241} led to a significant down-regulaton of GS and GLT-1 expression that was significantly restored by memantine. Data are represented as a mean ± SEM. (n=3). Stastistical significance: $^{\#\#}P<0.01$ for comparison to sham-infected mice (Dukey's test); $^{**}P<0.01$ for comparison between groups of memantine treated- or non-treated infected mice (Dukey's test). **1**: Sham-infected mice + vehicle; **2**: rOC/ATCC + vehicle; **3**: rOC/ATCC + 3 μg/g memantine; **4**: rOC/U_{S241} + vehicle; **5**: rOC/U_{S241} + 3 μg/g memantine. Magnification = x 400. Results are representative of three independent experiments.

Daily treatment with memantine reduces neuronal dysfunction in mice infected by rOC/ATCC or rOC/U_{S241}. Spinal cords from mice infected by rOC/U_{S241} or rOC/ATCC and treated with memantine or vehicle were harvested at 10 DPI (peak of viral replication in spinal cord and outcome of motor dysfunctions and severe paralysis) to evaluate whether a neuronal alteration associated with excitotoxicity was underway in infected mice. Neuronal dysregulation was investigated by evaluating the axonal neurofilament phosphorylation state. Infection of mice with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} resulted in abnormal loss of soma nonphosphorylated NF-H immunoreactivity in the spinal cord grey matter (GM) compared to sham-infected mice. This modification in the phosphorylation state was more pronounced following infection with rOC/U_{S241} compared to rOC/ATCC (Figure 7, SMI 311 GM, white arrows). On the other hand, spinal cord white matter (WM) of mice infected with rOC/ATCC and rOC/U_{S241} showed an abnormal presence of nonphosphorylated NF-H immunoreactivity, and axonal swelling in WM was more evident following rOC/U_{S241} infection compared to rOC/ATCC (Figure 7, SMI 311 WM, dark arrows).

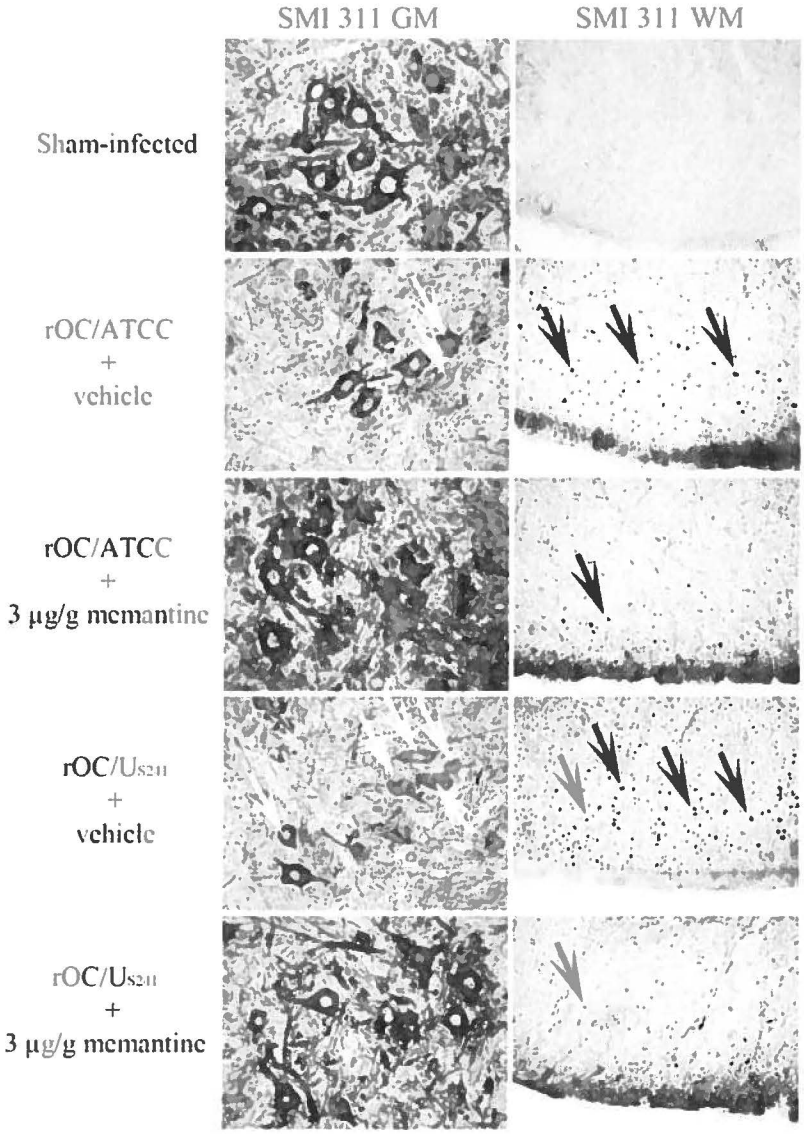


Figure 7. Daily treatment with a low dose of memantine reduces neuronal dysfunctions in infected mice. Groups of three BALB/c mice infected with reference wild-type (rOC/ATCC) or S-mutant (rOC/U_{S241}) virus and treated with vehicle or memantine (3µg/g) were sacrificed and evaluated by immunohistochemistry for neurofilament phosphorylation in the lumbar spinal cord grey and white matter segments (GM, WM, respectively) at 10 DPI compared to control. Following infection, GM showed a loss of normal nonphosphorylated NF immunoreactivity compared to sham-infected mice. This loss was more pronounced following rOC/U_{S241} infection compared to rOC/ATCC (white arrows). Spinal cord white matter (WM) of infected mice showed higher level of abnormal axonal nonphosphorylated NF-H with abnormal axonal swelling, which was more pronounced following infection by rOC/U_{S241} compared to

sham-infected mice (dark arrows) and rOC/ATCC. Magnification = x 400. Results are representative of two independent experiments with three mice per group.

Higher doses of memantine treatment attenuate viral replication in the central nervous system of infected mice. Because memantine treatment had a dose-response effect on different parameters, including mortality rates and body weight loss, and because memantine is a derivative of adamantane (a potential antiviral), we wished to evaluate whether the treatment may at some point affect the viral replication in the CNS. Our results show that daily treatment (over a period of 21 days) with higher doses of memantine (10 μg/g and above) significantly reduced, in a dose-dependent manner, viral replication of rOC/ATCC (*P<0.05 and **P<0.01) and rOC/U_{S241} (*P<0.05; **P<0.01 and ***P<0.001) in brains and spinal cords of infected mice (Figure 8A), indicative of an antiviral effect. However, dizocilpine treatment did not affect replication of either virus (Figure 8B).

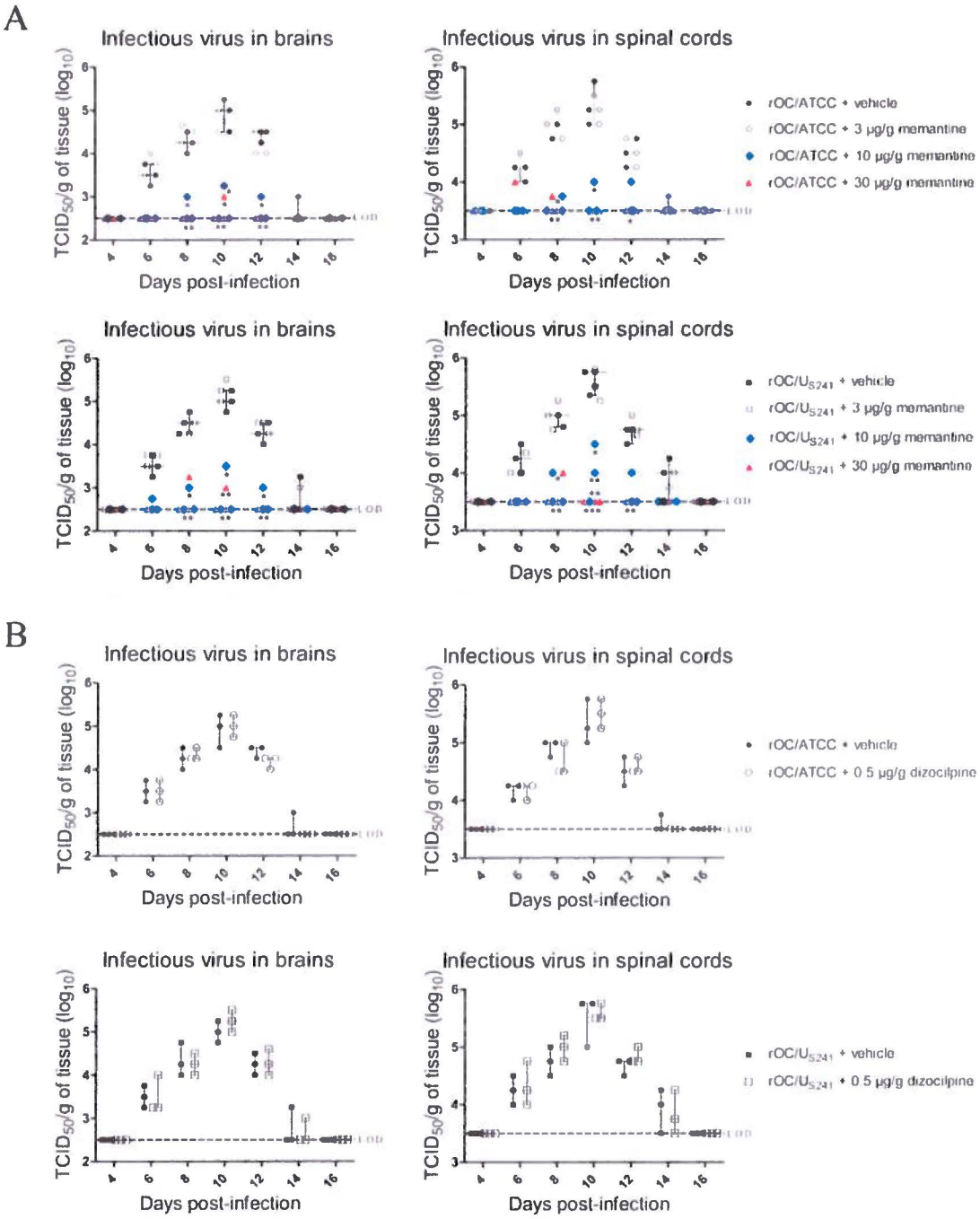


Figure 8. Daily treatment with high doses of memantine attenuates viral replication in the CNS of infected mice. Groups of three BALB/c mice infected with reference wild-type (rOC/ATCC) or S-mutant (rOC/U_{S241}) virus were sacrificed and evaluated for viral replication in brains and spinal cords every two days. **(A)** Memantine treatment reduced viral replication in brain and spinal cord of infected mice in a

dose-dependent manner (between 10μg/g and 30μg/g). **(B)** Dizocilpine treatment did not affect viral replication in brain and spinal cord of infected mice. Data are represented as a median with range (n=3). Statistical significance: *P<0.05; **P<0.01 and ***P<0.001 (Dukey's test) for comparison to control mice (infected mice treated only with vehicle) for a defined day post-infection. Each and every symbol on the graph represents a single mouse. LOD: limit of detection. Results are representative of two independent experiments.

Prophylactic transient treatment with memantine attenuates viral replication in the CNS of infected mice. Long term usage of high doses of memantine (daily treatment for 21 days) altered viral replication. In order to evaluate if a preventive treatment for a short period of time would also have the same effect, groups of mice were treated with memantine (5 μg/g) one day before viral infection and daily for only four days post-infection and viral replication in brains and spinal cords was evaluated every two days. This preventive use of memantine for a shorter period of time significantly (*$P<0.05$) reduced viral replication in brain and spinal cord of mice infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} (Figure 9).

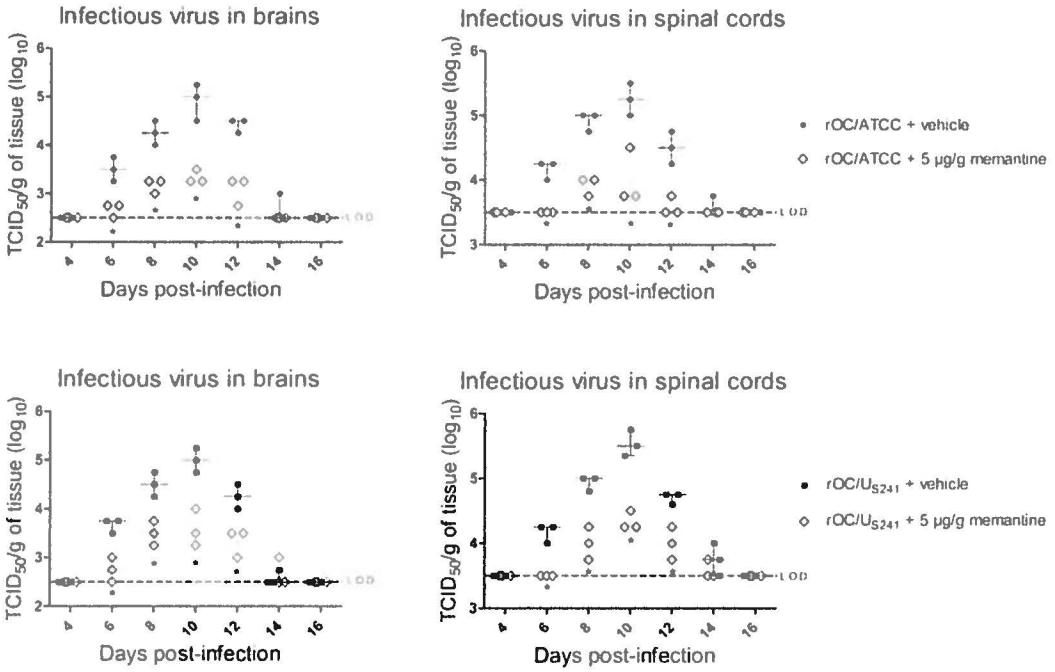


Figure 9. Prophylactic transient treatment with memantine attenuates viral replication in the CNS of infected mice. Groups of three BALB/c mice were treated with memantine (5 µg/g) one day before viral infection and daily for four days post-infection. Mice infected with reference wild-type (rOC/ATCC) or S-mutant (rOC/U_{S241}) virus were sacrificed and evaluated for viral replication in brains and spinal cords every two days. The preventive memantine treatment reduced viral replication in brain and spinal cord of infected mice. Data are represented as a median with range (n=3). Statistical significance: *P<0.05 (Dukey's test) for comparison to control mice (infected mice treated only with vehicle) for a defined day post-infection. Each and every symbol on the graph represents a single mouse. LOD: limit of detection. Results are representative of two independent experiments.

Memantine reduces viral replication in a NMDA-blockade-independent manner. In order to investigate the effect of memantine on HCoV-OC43 replication, primary cultures of mouse CNS cells (which express NMDA receptors, as verified by RT-PCR for the expression of NMDA-NR1 receptor subunit, Figure 10D) or the HRT-18 cell line (which does not express NMDA receptors, Figure 10D) were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} and treated with increasing non cytotoxic doses (data not shown) of memantine or dizocilpine. Memantine treatment of cells significantly reduced production of intra-and extracellular infectious virus in primary cultures of mouse CNS cells (*$P<0.05$ for 30 μM and **$P<0.01$ for 70 μM, Figure 10A) and HRT-18 cells (*$P<0.05$ for 30 μM and **$P<0.01$ for 70 μM, Figure 10B) compared to dizocilpine or PBS treated cells. To investigate whether memantine affected virus entry into cells, it was added to cell medium either before, during or after infection. Memantine treatment (70 μM) significantly reduced intra- and extracellular infectious virus production of rOC/ATCC and rOC/U_{S241} when administered after infection (*$P<0.05$) compared to control (PBS-treated infected cells) or when memantine treatment was added before or during infection (Figure 10C).

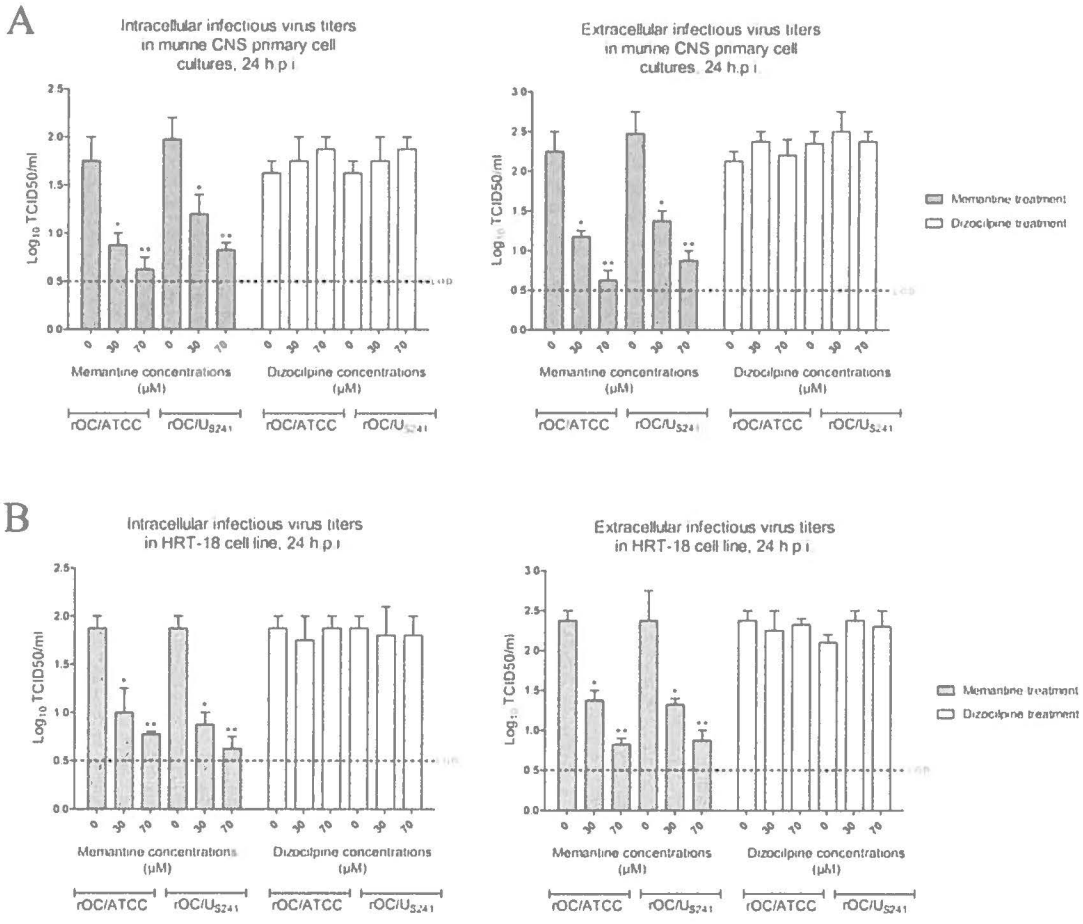

A
Intracellular infectious virus titers in murine CNS primary cell cultures, 24 h.p.i
Extracellular infectious virus titers in murine CNS primary cell cultures, 24 h.p.i
Log10 TCID50/ml
Memantine concentrations (μM)
Dizocilpine concentrations (μM)
rOC/ATCC
rOC/US241
Memantine treatment
Dizocilpine treatment
B
Intracellular infectious virus titers in HRT-18 cell line, 24 h.p.i
Extracellular infectious virus titers in HRT-18 cell line, 24 h.p.i
C
Infectious virus titers following treatment with memantine Before, During or After infection of murine CNS primary cell cultures, 16 h.p.i.
Control
B
D
A
Extracellular
Intracellular
D
MW
(-)
1
2
211 bp

Figure 10. High doses of memantine reduce viral replication in a NMDA-blockade-independent manner. Primary cultures of mouse CNS cells or the HRT-18 cell line infected with reference wild-type (rOC/ATCC) or S-mutant (rOC/U_{S241}) virus and treated with increasing doses of memantine or dizocilpine. Memantine treatment significantly reduced intra-and extracellular infectious virus titers in primary cultures of mouse CNS cells **(A)** and in the human epithelial HRT-18 cell line **(B)** compared to dizocilpine treatment and control (medium alone). Statistical significance: *$P<0.05$ and **$P<0.01$ (Dukey's test) for comparison between memantine- or dizocilpine-treated infected cells with PBS-treated infected cells. **(C)** Memantine treatment (70 μM) significantly reduced intra- and extracellular infectious virus titers when added after virus adsorption. Statistical significance: *$P<0.05$ (Dukey's test) for comparison between memantine- treated infected cells and control cells (PBS-treated infected cells). Results are representative of three independent experiments. **(D)** Expression of the NR1 subunit of the NMDA receptor was confirmed by RT-PCR in primary cultures of mouse CNS cells (column 1, 211 base pair fragment size). No expression was detected in the HRT-18 cell line (column 2). (-) is negative control for PCR.

DISCUSSION

We have recently published that a single point mutation in the surface spike (S) glycoprotein of human coronavirus OC43 (Y241H) modulates virus-induced neuropathology in a mouse model from an encephalitis to an MS-like paralytic disease related to glutamate excitotoxicity, with involvement of AMPA receptors (42). In the current study, we made use of two uncompetitive antagonists of NMDA receptors and demonstrate that these glutamate receptors are also involved in the neuropathology induced following infection of mice with HCoV-OC43. Moreover, we show that memantine protected mice from infection by having a dose-dependent effect on both neurological symptoms and viral replication.

Our results show that HCoV-OC43 infection causes a dysregulation of glutamate homeostasis that may lead to neuronal loss (neurodegeneration). The significant increase of extracellular glutamate level and LDH release shown in Fig. 4 underlines the importance of glutamate dysregulation after infection as shown in other virus infections (46-48). The fact that this increase is more significant following infection with rOC/U_{S241} compared to rOC/ATCC strongly suggests that the viral S glycoprotein is an important factor in this dysregulation. The observation that memantine treatment led to a significant decrease in the extracellular release of glutamate and LDH at 24 hours post-infection, shows that glutamate homeostasis is altered during infection and that it appears to involve NMDA receptors, leading to excitotoxicity.

Glutamate homeostasis relies on two different mechanisms in order to prevent excitotoxicity. In order to decipher the possible mechanism leading to an increase of extracellular glutamate following infection by HCoV-OC43, we first investigated the synthesis of glutamate (Fig. 5). HCoV-OC43 infects neurons as primary targets of infection in the murine CNS (11) and in human neuron/astrocyte co-cultures (49), and induces neuronal degeneration and eventual cell death. This could be associated with a stress that can disturb the phosphate-activated glutaminase enzyme expression responsible for the glutamate synthesis as it was shown in HIV-1-infected microglia (18). Our results (Fig. 5), show that expression of the two glutaminase isoforms found in the CNS (50) is not modified in spinal cord of mice and in primary cell cultures of mouse CNS infected by HCoV-OC43. Moreover, we show that expression of GFAP (an astrocyte marker) and Mac-2 (a marker of microglial cell activation) are upregulated following infection with HCoV-OC43 and that microglial activation is significantly increased following infection by the S-mutant (rOC/U_{S241}) compared to reference wild-type (rOC/ATCC) virus. Some studies have shown that, in some circumstances, astrocytes and microglial cells may express glutaminase and release glutamate (16-18, 51, 52). However, our results clearly show that neither astrocytes nor microglial cells expressed any detectable phosphate-activated glutaminase (Fig. 5). This strongly suggests that the increase of extracellular

glutamate release following infection by HCoV-OC43 is not a result of an increased expression of phosphate-activated glutaminase enzyme.

As previously reported, recycling of glutamate is also an important key factor for the physiological regulation of glutamate homeostasis to prevent excitotoxicity (53). In physiological conditions, glutamate homeostasis is in large part regulated by the glial glutamate transporter 1 (GLT-1), mainly expressed on astrocytes, which is responsible for up to 90% of the total glutamate clearance in adult CNS (54). As seen in Fig. 5, astrocytes are strongly activated following infection by either recombinant virus. However, expression of GLT-1 did not correlate with this activation associated with an increased number of astrocytes expressing high levels of GFAP, as previously shown (42). Indeed, the results presented in Fig. 6 show that GLT-1 expression was significantly down-regulated following rOC/U_{S241} infection compared to mice infected by rOC/ATCC or sham-infected mice. Interestingly, decreased expression of this transporter was reported in several neurological diseases, as well as in other viral models (35, 37, 55, 56). Of note, memantine treatment led to a major restoration of expression of the GLT-1 expression.

Glutamate homeostasis is also regulated by glutamine synthetase. Indeed, after re-uptake, glutamate is converted to glutamine by the astroglial enzyme glutamine synthetase (GS) (21, 22). Glutamine is then transported into nerve terminals and reconverted to glutamate for an eventual new glutamate-glutamine cycle (23). As shown in Fig. 6, GS expression was significantly down-regulated following rOC/U_{S241} infection compared to mice infected by rOC/ATCC or sham-infected mice and memantine treatment led to a major restoration of the GS expression.

We have previously reported that infection of mice by HCoV-OC43 led to the release of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1 and IL-6) in the spinal cord of infected mice, with a significant increase of IL-6 in mice infected with an S-mutant virus compared to reference wild-type virus (45). Pro-inflammatory cytokines such as IL-6 are known to down-regulate glutamate transporter GLT-1 expression (56-58), and GS expression (59, 60). In the present study, we show that the S-mutant virus rOC/U_{S241} led to significant microglia/macrophage activation, compared to what is observed with the wild-type reference virus (rOC/ATCC), and that treatment with memantine significantly reduced microglial cell activation, as previously reported (61, 62).

We show that the increased microglial/macrophage activation correlated with down-regulation of expression of the GLT-1 and GS (Figs. 5C and 6B). Our results suggest that memantine may prevent down-regulation of GLT-1 and GS expression by down-regulating microglial cell activation, which are responsible for major release of some pro-inflammatory molecules like IL-1, IL-6 and TNF-α that could act on disruption of glutamate homeostasis by down-regulating glutamate recycling (53, 63, 64).

Glutamate excitotoxicity may damage the cytoskeleton of axons and affect the axonal transport rate by disrupting the neurofilament phosphorylation state (65, 66). Signs of neuronal injury are monitored by a change in the NF phosphorylation state, which is characterized by a loss of nonphosphorylated NF in soma and an increase of nonphosphorylated NF in axons (67). Mice infected by rOC/U_{S24I} or rOC/ATCC also showed abnormal loss of soma nonphosphorylated NF-H in the grey matter (GM) and this was more evident following rOC/U_{S24I} infection. Moreover, spinal cord white matter (WM) of mice infected by rOC/U_{S24I} or rOC/ATCC presented abnormal axonal nonphosphorylated NF-H, which was also more evident following rOC/U_{S24I} infection, even leading to axonal beading and swelling (Fig. 7). It has already been reported that modifications in the phosphorylation state of neurofilaments does contribute to motor neuron disease, as observed in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), multiple sclerosis (MS) and following infection with Theiler's murine encephalomyelitis (TMEV), one animal model of MS (68, 69, 70). This abnormal disruption of NF-H phosphorylation state in axons and cell bodies observed following infection could lead to neuronal dysfunction, disruption of axonal transport with perturbations in neuronal transmission, which was demonstrated to account for motor disabilities (71). Daily treatment with memantine (3 μg/g) significantly reduced the imbalance in NF-H phosphorylation and also improved motor dysfunctions probably through both a direct effect on protection of neurons from glutamate over-activation on NMDA receptors (72), and an indirect effect by down-regulating microglial cell activation that release pro-inflammatory mediators or toxic molecules that may damage neurons (61, 62).

Memantine is an adamantane derivative. Some of these derivatives are used as drugs in human medicine and have antiviral properties like amantadine and rimantadine (against Influenza A virus (73)), tromantadine (against herpes simplex virus (74)) and bananin (against the SARS coronavirus (75)).

In order to explore the mode of action of memantine as an antiviral molecule, we made use of mouse primary CNS cultures (which express NMDA receptors) and of a human epithelial cell line (commonly used in the laboratory to amplify HCoV-OC43, which does not express NMDA receptors). The observation that memantine affects viral replication in both cell types, strongly suggests that memantine acts as an antiviral drug without involvement of NMDA receptors (Fig. 10A and B). Moreover, our observation that memantine shows a highly significant antiviral activity after primary infection of susceptible cells (Fig. 10C), indicates that it inhibits viral replication after virus attachment to the cell receptor, as was also shown for other adamantane derivatives. Indeed, amantadine and rimantadine, inhibit the early steps of uncoating of Influenza virus in endosomes (76, 77), tromantadine, which inhibits early steps in herpes simplex virus replication before macromolecular synthesis and a late event, such as assembly or release of virus (78) and bananin, which inhibits the helicase activities of SARS coronavirus (75). Memantine could act by inhibition of the ion channel activity of the HCoV-OC43

E protein such as amantadine and rimantadine do by binding the Influenza M2 proton channel (76, 77), or it could inhibit the ATPase activity of the HCoV-OC43 helicase as does bananin against the SARS coronavirus (75).

To our knowledge, our study shows the first evidence that memantine, widely used in humans to treat neurological diseases, shows antiviral properties against a human neuroinvasive and neurotropic virus. This novel action of memantine strongly suggests that it could be used as an antiviral agent in various neurological diseases with a viral involvement, such as herpes encephalitis, meningitis or neurological diseases for which the etiology could involve viruses, such as multiple sclerosis (79), Alzheimer's disease (80), and Parkinson's disease (81).

Moreover, as seen in Figure 9, the transient treatment with memantine (5 μg/g) significantly (*$P<0.05$) attenuates viral replication in the CNS of infected mice, which strongly suggests that memantine could be used as a prophylactic for a short period treatment in a tentative to control some viral outbreaks, as previously shown for other antiviral agents efficient against influenza virus (82).

In summary, we show that memantine improved clinical scores related to paralytic disease and motor disabilities by partially restoring the physiological NF phosphorylation state in S-mutant virus-infected mice. Moreover, memantine attenuates, in a dose-dependent manner, mortality rates and body weight loss and reduces viral replication in the central nervous system of HCoV-OC43 infected mice. Furthermore, glutamate recycling via the GLT-1 transporter and the GS enzyme, rather than glutamate synthesis, appears to be the key factor in glutamate homeostasis dysregulation that may lead to motor dysfunctions and paralytic disease induced in mice following infection by HCoV-OC43. Even though we are aware of the limitations of studying a human virus in a mouse model and we are interpreting the results with carefulness, we think that this approach is relevant and important to predict how a given virus could interact with human as shown for several other human viruses used in mice models (83-87). Our results also strongly suggest that memantine could be used both as a preventive and therapeutic antiviral agent against neuroinvasive and neurotropic human viruses that cause viral encephalitis, meningitis or neurological diseases in which the etiology could involve viruses. Further studies are underway to investigate both the role of inflammation on the down-regulation of glutamate recycling and the precise mechanism that triggers NMDA receptor-associated excitotoxicity and to identify the viral and cellular factors involved in the process following infection of mice by the human coronavirus OC43 and to understand how memantine plays such an important role in controlling both neurodegeneration and viral infection itself.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant No. MT-9203 from the Institute of Infection and Immunity (III) of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to Pierre J. Talbot, who is the holder of the Tier-1 (Senior) Canada Research Chair in Neuroimmunovirology award. Elodie Brison gratefully acknowledges a doctoral studentship from the Multiple Sclerosis Society of Canada.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Elodie BRISON: Expérimentation, analyse des données et rédaction du manuscrit.

Hélène Jacomy, Marc Desforges et Pierre Talbot: Discussions des données et correction du manuscrit.

REFERENCES

1. **Buchmeier MJ, Lane TE.** 1999. Viral-induced neurodegenerative disease. Curr. Opin. Microbiol. **2:**398-402.

2. **Talbot PJ, Jacomy H, Desforges M.** 2008. Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus, p. 313-324. *In* Perlman S, Gallagher T, Snilder EJ (ed.), The nidoviruses ASM Press, Washington, DC.

3. **Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus AD, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ, Bellini WJ.** 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science **300:**1394-1399.

4. **Riski H, Hovi T.** 1980. Coronavirus Infections of Man Associated with Diseases Other Than the Common Cold. J. Med. Virol. **6:**259-265.

5. **Forgie S, Marrie TJ.** 2009. Healthcare-Associated Atypical Pneumonia. Semin Resp Crit Care **30:**67-85.

6. **Yeh EA, Collins A, Cohen ME, Duffner PK, Faden H.** 2004. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. Pediatrics **113:**e73-76.

7. **Bonavia A, Arbour N, Yong VW, Talbot PJ.** 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. J. Virol. **71:**800-806.

8. **Arbour N, Cote G, Lachance C, Tardieu M, Cashman NR, Talbot PJ.** 1999. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. J. Virol. **73:**3338-3350.

9. **Arbour N, Ekande S, Cote G, Lachance C, Chagnon F, Tardieu M, Cashman NR, Talbot PJ.** 1999. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. J. Virol. **73:**3326-3337.

10. **Edwards JA, Denis F, Talbot PJ.** 2000. Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. J. Neuroimmunol. **108:**73-81.

11. **Jacomy H, Talbot PJ.** 2003. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. Virology **315**:20-33.

12. **Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ.** 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. J. Virol. **74**:8913-8921.

13. **Olney J.** 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids, p. 95-121. *In* McGeer EG, Olney JW, McGeer PL (ed.), Kainic acid as a tool in neurobiology. Raven Press, New York, NY.

14. **Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, Brown WD, Hacein-Bey L.** 2001. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. AJNR. Am. J. Neuroradiol. **22**:1813-1824.

15. **Aledo JC, Gomez-Fabre PM, Olalla L, Marquez J.** 2000. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. Mamm. Genome **11**:1107-1110.

16. **Kvamme E, Nissen-Meyer LS, Roberg BA, Torgner IA.** 2008. Novel form of phosphate activated glutaminase in cultured astrocytes and human neuroblastoma cells, PAG in brain pathology and localization in the mitochondria. Neurochem. Res. **33**:1341-1345.

17. **Shijie J, Takeuchi H, Yawata I, Harada Y, Sonobe Y, Doi Y, Liang J, Hua L, Yasuoka S, Zhou Y, Noda M, Kawanokuchi J, Mizuno T, Suzumura A.** 2009. Blockade of glutamate release from microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Tohoku J. Exp. Med. **217**:87-92.

18. **Huang Y, Zhao L, Jia B, Wu L, Li Y, Curthoys N, Zheng JC.** 2011. Glutaminase dysregulation in HIV-1-infected human microglia mediates neurotoxicity: relevant to HIV-1-associated neurocognitive disorders. J. Neurosci. **31**:15195-15204.

19. **Sattler R, Tymianski M.** 2000. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. J Mol Med (Berl) **78**:3-13.

20. **Tilleux S, Hermans E.** 2007. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. J. Neurosci. Res. **85**:2059-2070.

21. **Norenberg MD.** 1979. Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. J. Histochem. Cytochem. **27**:756-762.

22. **Norenberg MD, Martinez-Hernandez A.** 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. Brain Res. **161**:303-310.

23. **Albrecht J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Zielinska M, Aschner M.** 2010. Roles of glutamine in neurotransmission. Neuron Glia Biol **6:**263-276.

24. **Arundine M, Tymianski M.** 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. Cell Calcium **34:**325-337.

25. **Lees KR, Asplund K, Carolei A, Davis SM, Diener HC, Kaste M, Orgogozo JM, Whitehead J.** 2000. Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. GAIN International Investigators. Lancet **355:**1949-1954.

26. **Kemp JA, McKernan RM.** 2002. NMDA receptor pathways as drug targets. Nat. Neurosci. **5 Suppl:**1039-1042.

27. **Parsons CG, Stoffler A, Danysz W.** 2007. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. Neuropharmacology **53:**699-723.

28. **Lipton SA.** 2004. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics **1:**101-110.

29. **Dong XX, Wang Y, Qin ZH.** 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta pharmacologica Sinica **30:**379-387.

30. **Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL.** 2013. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. Eur. J. Pharmacol. **698:**6-18.

31. **Wilkinson D.** 2012. A review of the effects of memantine on clinical progression in Alzheimer's disease. Int. J. Geriatr. Psychiatry **27:**769-776.

32. **Starck M, Albrecht H, Pollmann W, Dieterich M, Straube A.** 2010. Acquired pendular nystagmus in multiple sclerosis: an examiner-blind cross-over treatment study of memantine and gabapentin. J. Neurol. **257:**322-327.

33. **Emre M, Tsolaki M, Bonuccelli U, Destee A, Tolosa E, Kutzelnigg A, Ceballos-Baumann A, Zdravkovic S, Bladstrom A, Jones R.** 2010. Memantine for patients with Parkinson's disease dementia or dementia with Lewy bodies: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet neurology **9:**969-977.

34. **Anitha M, Nandhu MS, Anju TR, Jes P, Paulose CS.** 2011. Targeting glutamate mediated excitotoxicity in Huntington's disease: neural progenitors and partial glutamate antagonist--memantine. Med. Hypotheses **76:**138-140.

35. **Blakely PK, Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL, Irani DN.** 2009. Disrupted glutamate transporter expression in the spinal cord with acute flaccid paralysis caused by West Nile virus infection. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **68:**1061-1072.

36. **Cisneros IE, Ghorpade A.** 2012. HIV-1, methamphetamine and astrocyte glutamate regulation: combined excitotoxic implications for neuro-AIDS. Curr HIV Res **10:**392-406.

37. **Fotheringham J, Williams EL, Akhyani N, Jacobson S.** 2008. Human herpesvirus 6 (HHV-6) induces dysregulation of glutamate uptake and transporter expression in astrocytes. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology **3:**105-116.

38. **Szymocha R, Akaoka H, Dutuit M, Malcus C, Didier-Bazes M, Belin MF, Giraudon P.** 2000. Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. J. Virol. **74:**6433-6441.

39. **Billaud JN, Ly C, Phillips TR, de la Torre JC.** 2000. Borna disease virus persistence causes inhibition of glutamate uptake by feline primary cortical astrocytes. J. Virol. **74:**10438-10446.

40. **Darman J, Backovic S, Dike S, Maragakis NJ, Krishnan C, Rothstein JD, Irani DN, Kerr DA.** 2004. Viral-induced spinal motor neuron death is non-cell-autonomous and involves glutamate excitotoxicity. J. Neurosci. **24:**7566-7575.

41. **St-Jean JR, Desforges M, Talbot PJ.** 2006. Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. Adv. Exp. Med. Biol. **581:**499-502.

42. **Brison E, Jacomy H, Desforges M, Talbot PJ.** 2011. Glutamate excitotoxicity is involved in the induction of paralysis in mice after infection by a human coronavirus with a single point mutation in its spike protein. J. Virol. **85:**12464-12473.

43. **St-Jean JR, Desforges M, Almazan F, Jacomy H, Enjuanes L, Talbot PJ.** 2006. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. J. Virol. **80:**3670-3674.

44. **Lambert F, Jacomy H, Marceau G, Talbot PJ.** 2008. Titration of human coronaviruses using an immunoperoxidase assay. Journal of visualized experiments : JoVE.

45. **Jacomy H, St-Jean JR, Brison E, Marceau G, Desforges M, Talbot PJ.** 2010. Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. J. Neurovirol. **16:**279-293.

46. **Power C, Moench T, Peeling J, Kong PA, Langelier T.** 1997. Feline immunodeficiency virus causes increased glutamate levels and neuronal loss in brain. Neuroscience **77:**1175-1185.

47. **Gupta S, Knight AG, Knapp PE, Hauser KF, Keller JN, Bruce-Keller AJ.** 2010. HIV-Tat elicits microglial glutamate release: role of NAPDH oxidase and the cystine-glutamate antiporter. Neurosci. Lett. **485:**233-236.

48. **Chen CJ, Ou YC, Chang CY, Pan HC, Liao SL, Chen SY, Raung SL, Lai CY.** 2012. Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF-alpha signaling and contributes to neuronal death. Glia **60:**487-501.

49. **Desforges M, Favreau DJ, Brison E, Desjardins J, Messen-Pinard M, Jacomy H, Talbot PJ.** 2013. Human coronavirus: respiratory pathogens revisited as infectious neuroinvasive, neurotropic, and neurovirulent agents, p. 93-121. *In* Singh SK, Ruzek D (ed.), Neuroviral Infections: Rna Viruses and Retroviruses. CRC PressI Llc, New York, NY.

50. **Kvamme E, Roberg B, Torgner IA.** 2000. Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain. Neurochem. Res. **25:**1407-1419.

51. **Hogstad S, Svenneby G, Torgner IA, Kvamme E, Hertz L, Schousboe A.** 1988. Glutaminase in neurons and astrocytes cultured from mouse brain: kinetic properties and effects of phosphate, glutamate, and ammonia. Neurochem. Res. **13:**383-388.

52. **Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A.** 2006. Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. J. Biol. Chem. **281:**21362-21368.

53. **Danbolt NC.** 2001. Glutamate uptake. Prog. Neurobiol. **65:**1-105.

54. **Anderson CM, Swanson RA.** 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia **32:**1-14.

55. **Wang Z, Pekarskaya O, Bencheikh M, Chao W, Gelbard HA, Ghorpade A, Rothstein JD, Volsky DJ.** 2003. Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. Virology **312:**60-73.

56. **Carmen J, Rothstein JD, Kerr DA.** 2009. Tumor necrosis factor-alpha modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. Brain Res. **1263:**143-154.

57. **Okada K, Yamashita U, Tsuji S.** 2005. Modulation of Na(+)-dependent glutamate transporter of murine astrocytes by inflammatory mediators. Journal of UOEH **27:**161-170.

58. **Prow NA, Irani DN.** 2008. The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis. J. Neurochem. **105:**1276-1286.

59. **Huang TL, O'Banion MK.** 1998. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha suppress dexamethasone induction of glutamine synthetase in primary mouse astrocytes. J. Neurochem. **71:**1436-1442.

60. **Zou J, Wang YX, Dou FF, Lu HZ, Ma ZW, Lu PH, Xu XM.** 2010. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. Neurochem. Int. **56:**577-584.

61. **Takeda K, Muramatsu M, Chikuma T, Kato T.** 2009. Effect of memantine on the levels of neuropeptides and microglial cells in the brain regions of rats with neuropathic pain. J. Mol. Neurosci. **39:**380-390.

62. **Wu HM, Tzeng NS, Qian L, Wei SJ, Hu X, Chen SH, Rawls SM, Flood P, Hong JS, Lu RB.** 2009. Novel neuroprotective mechanisms of memantine: increase in neurotrophic factor release from astroglia and anti-inflammation by preventing microglial activation. Neuropsychopharmacology **34:**2344-2357.

63. **Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC.** 2000. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. Neuroimmunomodulation **7:**153-159.

64. **Liao SL, Chen CJ.** 2001. Differential effects of cytokines and redox potential on glutamate uptake in rat cortical glial cultures. Neurosci. Lett. **299:**113-116.

65. **Ackerley S, Grierson AJ, Brownlees J, Thornhill P, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CCJ.** 2000. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. J. Cell Biol. **150:**165-175.

66. **Miller CCJ, Ackerley S, Brownlees J, Grierson AJ, Jacobsen NJO, Thornhill P.** 2002. Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. Cell. Mol. Life Sci. **59:**323-330.

67. **Shea TB, Chan WK, Kushkuley J, Lee S.** 2009. Organizational dynamics, functions, and pathobiological dysfunctions of neurofilaments. Results Probl. Cell Differ. **48:**29-45.

68. **Boylan K, Yang C, Crook J, Overstreet K, Heckman M, Wang Y, Borchelt D, Shaw G.** 2009. Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker. J. Neurochem. **111:**1182-1191.

69. **Schirmer L, Antel JP, Bruck W, Stadelmann C.** 2011. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. Brain Pathol. **21:**428-440.

70. **Tsunoda I, Kuang LQ, Libbey JE, Fujinami RS.** 2003. Axonal injury heralds virus-induced demyelination. Am. J. Pathol. **162:**1259-1269.

71. **Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J.** 2008. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. Mol. Neurobiol. **38:**27-65.

72. **Lipton SA.** 2007. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. Curr Drug Targets **8:**621-632.

73. **Cady SD, Wang J, Wu Y, DeGrado WF, Hong M.** 2011. Specific binding of adamantane drugs and direction of their polar amines in the pore of the influenza M2 transmembrane domain in lipid bilayers and dodecylphosphocholine micelles determined by NMR spectroscopy. J. Am. Chem. Soc. **133:**4274-4284.

74. **Ickes DE, Venetta TM, Phonphok Y, Rosenthal KS.** 1990. Tromantadine inhibits a late step in herpes simplex virus type 1 replication and syncytium formation. Antiviral Res. **14:**75-85.

75. **Tanner JA, Zheng BJ, Zhou J, Watt RM, Jiang JQ, Wong KL, Lin YP, Lu LY, He ML, Kung HF, Kesel AJ, Huang JD.** 2005. The adamantane-derived bananins are potent inhibitors of the helicase activities and replication of SARS coronavirus. Chem. Biol. **12:**303-311.

76. **Bukrinskaya AG, Vorkunova NK, Narmanbetova RA.** 1980. Rimantadine hydrochloride blocks the second step of influenza virus uncoating. Arch. Virol. **66:**275-282.

77. **Takeda M, Pekosz A, Shuck K, Pinto LH, Lamb RA.** 2002. Influenza a virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. J. Virol. **76:**1391-1399.

78. **Rosenthal KS, Sokol MS, Ingram RL, Subramanian R, Fort RC.** 1982. Tromantadine: inhibitor of early and late events in herpes simplex virus replication. Antimicrob. Agents Chemother. **22:**1031-1036.

79. **Tselis A.** 2011. Evidence for viral etiology of multiple sclerosis. Semin. Neurol. **31**:307-316.

80. **Grant WB, Campbell A, Itzhaki RF, Savory J.** 2002. The significance of environmental factors in the etiology of Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease : JAD **4**:179-189.

81. **Robinson R.** 2001. Viral Factors Explored in Etiology of Parkinson Disease. Neurology Today **1**:1-13.

82. **Ison MG.** 2013. Clinical use of approved influenza antivirals: therapy and prophylaxis. Influenza and other respiratory viruses **7 Suppl 1**:7-13.

83. **Fett C, DeDiego ML, Regla-Nava JA, Enjuanes L, Perlman S.** 2013. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. J. Virol. **87:** 6551-6559.

84. **Page C, Goicochea L, Matthews K, Zhang Y, Klover P, Holtzman MJ, Hennighausen L, Frieman M.** 2012. Induction of alternatively activated macrophages enhances pathogenesis during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. J. Virol. **86:** 13334-13349.

85. **Noçon AL, Ip JP, Terry R, Lim SL, Getts DR, Muller M, Hofer MJ, King NJ, Campbell IL.** 2013. The bacteriostatic protein lipocalin 2 is induced in the central nervous system with West Nile virus encephalitis. J. Virol. Epub ahead of print.

86. **Li XF, Deng YQ, Yang HQ, Zhao H, Jiang T, Yu XD, Li SH, Ye Q, Zhu SY, Wang HJ, Zhang Y, Ma J, Yu YX, Liu ZY, Li YH, Qin ED, Shi PY, Qin CF.** 2013. A chimeric dengue virus vaccine using Japanese encephalitis vaccine strain SA14-14-2 as backbone is immunogenic and protective against either parental virus in mice or nonhuman primates. J. Virol. Epub ahead of print.

87. **Mott KR, Zandian M, Allen SJ, Ghiasi H.** 2013. Role of interleukin-2 and herpes simplex virus 1 in central nervous system demyelination in mice. J. Virol. **87:** 12102-12109.

CHAPITRE III: DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Des virus portant des mutations ponctuelles dans la protéine S, acquises en infection persistante, induisent un changement de la neuropathologie viro-induite chez la souris

1.1 Données générales

Les coronavirus sont des virus à ARN qui sont sujets à un haut taux de mutations de leur génome du fait de la faible fidélité ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) (Denison *et al.*, 2011), ce qui permet la génération de plusieurs mutants, sélectionnés entre autres en fonction de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Des travaux du laboratoire ont montré que des mutations ont été observées dans le gène S suite au séquençage de l'ARN viral provenant de cultures de cellules neurales humaines représentatives du SNC, et dans le gène N de l'ARN viral provenant de cerveaux humains, suggérant une adaptation potentielle de HCoV-OC43 dans le SNC (Arbour *et al.*, 1999; Arbour *et al.*, 2000; St-Jean *et al.*, 2006).

Les mutations acquises qui ne sont pas létales pour le virus lui confèrent souvent un avantage adaptatif (Pond *et al.*, 2012). Dans cette thèse, nous nous intéressons particulièrement à la glycoprotéine de surface S. Étant donné que la protéine S est impliquée dans une multitude de fonctions, des mutations acquises dans cette protéine pourraient avoir un rôle dans la neuroinvasion, le neurotropisme et la neurovirulence du HCoV-OC43, mais également dans l'activation de différentes voies métaboliques cellulaires en réponse au stress de l'infection et dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte, favorisant ainsi le développement de maladies neurologiques chez l'humain.

Les premiers travaux sur l'étude des variations génétiques de HCoV-OC43 dans notre laboratoire ont montré que, suite à une infection persistante de lignées neurales représentatives du SNC (lignée d'oligodendrocytes, lignée neurogliale, lignée astrocytaire) par HCoV-OC43, de nombreuses mutations sont apparues dans le gène encodant la protéine S de virus isolés à différents passages cellulaires et beaucoup moins dans le gène des protéines N et HE, suggérant que la protéine S est en grande partie responsable de l'adaptation du virus à l'environnement cellulaire (St-Jean *et al.*, 2006). Parmi ces diverses mutations dans la protéine S, plusieurs étaient conservées à différents passages cellulaires, conférant possiblement des avantages adaptatifs au virus. Plus précisément, quatre mutations ponctuelles (D24Y, S83T, H183R, Y241H) se retrouvant de façon prédominante dans les virus isolés des différentes lignées neurales à différents passages cellulaires, étaient localisées dans le domaine présumé de liaison au

récepteur (DLR) cellulaire de la protéine S (St-Jean *et al.*, 2006). Ces mutations ont par la suite été insérées dans un clone infectieux de HCoV-OC43 (St-Jean *et al.*, 2006) afin d'en déterminer le rôle biologique *in vivo* dans un modèle murin. L'infection de souris par le coronavirus portant les quatre mutations ponctuelles dans la protéine S (D24Y, S83T, H183R, Y241H; virus recombinant nommé rOC/$U_{S24\text{-}241}$) induit une pathologie paralysante des membres postérieurs chez la souris, accompagnée de lésions de démyélinisation dans la moelle épinière comparé au virus de référence (nommé rOC/ATCC) qui induit une encéphalite. Le premier objectif de cette thèse de doctorat était de déterminer la ou lesquelles de ces mutations étaient nécessaires pour induire ce changement de pathologie en souris. Nous avons montré que le virus recombinant portant seulement la mutation ponctuelle Y241H dans la protéine S (nommé rOC/U_{S241}) était capable d'induire une modification de neuropathologie, d'une encéphalite à une pathologie paralysante des membres postérieurs accompagnée parfois de lésions de démyélinisation dans la moelle épinière comparé au virus de référence. Le rôle des mutations dans la protéine S dans la modulation de la neuropathologie en souris est discuté plus en détail ci-dessous.

1.2 Protéine S, neuroinvasion et dissémination

La neuroinvasion caractérise la capacité d'un pathogène à pénétrer dans le SNC à partir de sites périphériques (voir chapitre *1.2.1 Voies d'entrée pour les pathogènes dans le système nerveux central*) car les pathogènes n'ont pas d'accès direct au SNC à partir de l'extérieur environnant, à moins d'un traumatisme lésionnel ou lors d'une chirurgie (Pulzova *et al.*, 2009). Le HCoV-OC43 possède la capacité intrinsèque de se rendre au SNC suite à une infection périphérique (Arbour *et al.*, 2000; St-Jean *et al.*, 2004), et la protéine S, déterminant principal du tropisme, joue certainement un rôle dans ce phénomène. Plusieurs hypothèses sont possibles en ce qui concerne le mode d'adaptation et de neuroinvasion du virus au SNC. Soit, le virus pourrait utiliser les voies respiratoires supérieures comme site primaire périphérique pour se répliquer puis se rendre au SNC ou bien, le virus pourrait emprunter directement le nerf olfactif ou d'autres nerfs crâniens situés au niveau des voies respiratoires supérieures pour se rendre au SNC. Les pathogènes peuvent également entrer dans le SNC par la voie hématogène en utilisant des cellules comme véhicule. En effet, les coronavirus humains 229E et le SARS ont la capacité d'infecter des monocytes in vitro, ce qui pourrait leur conférer un moyen potentiel d'entrer au SNC (Collins, 2002; Law *et al.*, 2005) mais nos résultats suggèrent que HCoV-OC43 n'utilise pas cette voie de part leur incapacité à infecter les monocytes (Desforges *et al.*, 2007). Le site d'adaptation de HCoV-OC43 dans l'hôte n'est pas connu, on ignore si le virus s'adapte tout d'abord aux voies respiratoires supérieures lui permettant ensuite de migrer au SNC, ou si le virus migre directement au SNC par exemple chez des patients immunologiquement plus

faibles et s'adapte ensuite au SNC. Une étude en faveur de la première hypothèse (adaptation en périphérie d'abord) a montré que, suite à une inoculation intramusculaire d'un réovirus, ce dernier était capable de se rendre au SNC et que la protéine de surface (nommée sigma) était probablement impliqué dans ce potentiel neuroinvasif, car la protéine sigma est reconnue comme déterminant du tropisme neuronal du réovirus de type 3 (Mann *et al.*, 2002). De plus, dans la sous-famille des *alphaherpèsvirinae*, il a été montré que les glycoprotéines gB et gD du virus herpès de type 1 et du virus de la pseudorage, sont impliquées dans la neuroinvasion du virus (Mettenleiter, 2003). En effet, chez ces virus, une dizaine de glycoprotéines sont produites pour former l'enveloppe virale, et la délétion de certaines glycoprotéines (dont gB et gD) affecte les capacités neuroinvasives de ces virus (Mettenleiter, 2003). Enfin, une troisième étude a montré que l'état de glycosylation de la protéine d'enveloppe du virus du Nil Occidental influence la neuroinvasion chez la souris (Beasley *et al.*, 2005). En effet, la comparaison des protéines d'enveloppe d'une souche du virus du Nil Occidental, hautement virulente avec un fort potentiel neuroinvasif, avec une souche moins virulente et moins neuroinvasive a montré que les capacités neuroinvasives du virus était dépendante, entre autre, de l'état de glycosylation de la glycoprotéine d'enveloppe, et qu'une altération de cette glycosylation affectait la stabilité du virus (Shirato *et al.*, 2004; Beasley *et al.*, 2005). Fait à noter, la glycoprotéine S de HCoV-OC43 est une protéine hautement glycosylée (Mounir *et al.*, 1992), et on peut donc penser que l'acquisition de certaines mutations dans la protéine de surface pourrait modifier l'état de glycosylation de cette protéine et moduler le potentiel neuroinvasif du virus. Dans notre modèle d'étude, les mutations acquises suite à l'infection persistante de lignées de cellules neurales humaines représentatives du SNC, ne modulent pas les capacités neuroinvasives de HCoV-OC43. En effet, les virus recombinants portant les quatre mutations prédominantes décrites précédemment (rOC/$U_{S24\text{-}241}$) ou la seule mutation ponctuelle Y241H (rOC/U_{S241}) dans la protéine S ont les mêmes capacités neuroinvasives que le virus de référence, car suite à une inoculation intranasale du virus chez des souris BALB/c, le virus se réplique et la protéine N est détectable par immunohistochimie dans le bulbe olfactif et dans le cortex 3 jours post-infection (Jacomy *et al.*, 2010). Cependant, il est possible que ces mutations ponctuelles affectent l'affinité du virus pour les neurones de l'épithélium olfactif ainsi que la vitesse de dissémination du virus jusqu'au bulbe olfactif. En effet, nous avons montré que le virus rOC/$U_{S24\text{-}241}$ a une capacité de dissémination plus importante que le virus de référence à l'intérieur du SNC, de par la détection de particules infectieuses dans la moelle épinière à 3 jours post-infection comparé au virus de référence, détectable à partir de 5 jours post-infection (Jacomy *et al.*, 2010). De plus, lors du pic de réplication viral (10 jours post-infection) le virus rOC/$U_{S24\text{-}241}$ montrait un titre viral dix fois plus élevé dans la moelle épinière comparé au virus de référence (Jacomy *et al.*, 2010). L'acquisition de mutations ponctuelles dans la protéine S peut donc influencer les capacités neuroinvasives du virus en modulant l'affinité de la protéine S pour les neurones de l'épithélium olfactif ainsi que la vitesse de dissémination du virus au SNC

et ainsi contribuer au développement de maladies neurologiques. Enfin, une hypothèse possible quant à la conformation de la glycoprotéine S, serait que la présence de mutations dans cette protéine pourrait induire un repliement de cette protéine plus rapide et plus efficace, augmentant le bourgeonnement du virus, et donc sa vitesse de dissémination au SNC.

1.3 Protéine S et neurotropisme

Le neurotropisme défini l'habileté d'un pathogène à infecter des cellules du système nerveux central ou périphérique. La protéine S des coronavirus, et particulièrement la sous-unité S1, est le principal déterminant du tropisme (Taguchi, 1995a) et permet donc au virus de reconnaitre un récepteur cellulaire spécifique, de le lier et d'initier une cascade de réactions qui mènera ultimement à la pénétration du virus chez la cellule cible (Cullen, 2001; Gallagher *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2004). Cependant, selon l'espèce de coronavirus, la séquence en acides aminés et la localisation du DLR ainsi que sa spécificité à reconnaitre différents récepteurs peuvent varier. La localisation du DLR de HCoV-OC43 n'est pas exactement définie. Toutefois, d'après des données non-publiées nous savons que la région située entre les acides aminée 16 et 334 de la sous-unité S1 permet de reconnaitre et d'interagir avec les acides sialiques 9-O-acétylés, et que l'absence d'expression de ce type d'acide sialique à la surface cellulaire empêche toute infection par HCoV-OC43 en culture cellulaire. Des mutations dans le DLR peuvent donc affecter l'affinité de la protéine S avec son récepteur, voire même le tropisme du virus. Le SARS-CoV fourni un excellent exemple de l'implication de la protéine S comme déterminant dans l'adaptation et le franchissement de la barrière d'espèces, la relation entre l'acquisition de mutations dans la protéine de surface de plusieurs virus à ARN et l'interaction avec le récepteur cellulaire a été établie (Baranowski *et al.*, 2001; Graham *et al.*, 2010). Le récepteur cellulaire de HCoV-OC43 n'est pas encore identifié à ce jour, mais nous avons montré que le neurone est la cible principale de l'infection par HCoV-OC43 chez la souris (Jacomy *et al.*, 2003), en culture primaire mixte du SNC murin (Jacomy *et al.*, 2006) et en co-culture de neurones-astrocytes humains (Desforges *et al.*, 2013b). Chez la souris, HCoV-OC43 est détectable dans différentes structures du cerveau à part le cervelet. Il a récemment été montré que le cervelet n'exprime pas ou très peu de la forme d'acides sialiques 9-O-acétylés pouvant être reconnus par la protéine S du virus (Langereis, 2011), ce qui renforce l'idée que ces acides sialiques sont essentiels pour l'infection par HCoV-OC43 au SNC. Dans notre modèle d'étude, les mutations ponctuelles acquises suite à l'infection persistante de lignées de cellules neurales humaines représentatives du SNC, ne modulent pas le neurotropisme de HCoV-OC43. En effet, les virus recombinants portant quatre (rOC/$U_{S24\text{-}241}$) ou une seule mutation (rOC/U_{S241}) dans la protéine S infectent les neurones comme cible principale tout comme le virus de référence, *in vivo* en souris et *in vitro* en culture primaire mixte du SNC murin. Même si ces mutations

sont situées dans le domaine de reconnaissance des acides sialiques 9-O-acétylés, des données préliminaires en biochimie structurale suggèrent que seules les mutations ponctuelles S83T et H183R joueraient un rôle dans la bonne reconnaissance des acides sialiques par la protéine S. Les lésions de démyélinisation induite par le virus recombinant portant la mutation ponctuelle Y241H (rOC/U_{S241}) dans la protéine de surface ne seraient donc pas dues à un changement de tropisme cellulaire des neurones vers les oligodendrocytes, mais possiblement reliées soit à un effet "inside-out" (Tsunoda *et al.*, 2002) où la dégénération du neurone mène ensuite à une dégénération des oligodendrocytes, ou soit à un effet toxique de molécules pro-inflammatoires ou du glutamate sur les oligodendrocytes (Tsunoda *et al.*, 2002) (discuté plus en détail en deuxième partie de discussion).

Le clivage protéolytique de protéines membranaires ou secrétées comme des précurseurs d'hormones, des neuropeptides, des facteurs de coagulation, est une modification post-traductionnelle courante qui joue un rôle important dans une variété de processus biologiques (Duckert *et al.*, 2004). Le même processus a été identifié chez certains virus, où le clivage de la glycoprotéine d'enveloppe est un facteur crucial dans la détermination du tropisme de par la capacité du virus à infecter la cellule cible. Le concept d'une activation protéolytique de la glycoprotéine de surface et de son importance pour la fusion avec la membrane cellulaire a été tout d'abord établi pour le virus de Sendai (Homma *et al.*, 1973). Dépendant de l'espèce coronavirale, il y aura clivage ou non de la protéine S suite à la liaison à son récepteur, menant à un changement conformationnel de cette protéine virale (de Haan *et al.*, 2008; Matsuyama *et al.*, 2009). Le but du clivage de la protéine S est de permettre le repliement de la sous-unité S2 et l'exposition des domaines de fusion dont le peptide de fusion (PF) et les régions répétées « *Heptad Repeats* » (HR1 et HR2) à la membrane plasmique de la cellule cible afin de permettre la fusion membranaire (Matsuyama *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2003). Cependant, le clivage et la libération de la sous-unité S2 ne seraient pas essentiels à la fusion des membranes et à l'entrée du virus. La protéine S du coronavirus murin MHV-A59, MHV-JHM, et du coronavirus bovin possèdent des sites de clivage protéolytiques au motif RRAHRR, RRARR et RRSRR respectivement (Schmidt *et al.*, 1987; Kunkel *et al.*, 1993). La protéine S de ATCC HCoV-OC43 (souche de référence) possèderait plutôt un motif de type RRSRG qui ne serait pas clivé *in vitro* et il a été démontré que la protéine S de HCoV-OC43 n'a pas besoin d'être clivée pour initier une infection (Kunkel et al., 1993). Cependant, des données non publiées du laboratoire montrent que certains isolats cliniques humains de souches circulantes contemporaines de HCoV-OC43 provenant d'expectorations du haut tractus respiratoire possèdent un site de clivage par la furine (ou autres proprotéines convertases) dans la protéine S au motif RRSRR, qui pourrait représenter une adaptation virale au niveau de la protéine S et pourrait mener à un clivage de celle-ci en ayant un impact sur le tropisme du virus par modulation de la fusion membranaire et donc sur l'infectivité du virus.

L'hypothèse proposée serait que la protéine S de la souche ATCC de HCoV-OC43 aurait perdu sa capacité à être clivée par la furine suite à une adaptation en culture cellulaire (de Haan *et al.*, 2008). De plus, il se pourrait que lors du clivage de la protéine S, une partie de celle-ci soit libre dans le milieu extracellulaire et pourrait alors exercer un effet toxique qui pourrait mener par exemple à l'activation du système immunitaire ou à l'activation de voies métaboliques cellulaire en réponse à un stress. En effet, il est connu que la glycoprotéine S des coronavirus peut à elle seule induire un stress au RE menant à l'activation de la UPR (Versteeg *et al.*, 2007). C'est également le cas de la protéine gp120 du VIH, qui est directement toxique envers les neurones (Kanmogne *et al.*, 2002).

1.4 Protéine S et réponse aux protéines mal repliées

Plusieurs stress cellulaires, comme un débalancement des flux de Ca^{2+}, une altération des statuts d'oxydo-réduction des protéines de la cellule, l'accumulation et/ou l'agglomération de protéines au sein du RE et une infection virale peuvent interférer avec les processus de synthèse ou de conformation protéique chez la cellule. Le réticulum endoplasmique (RE) est le compartiment dans lequel les protéines sont repliées avec l'aide de protéines chaperonnes puis amenées à maturation par des modifications post-traductionnelles. Quand le repliement des protéines est inhibé ou qu'il se fait mal, des voies de signalisation sont activées et ont pour buts de diminuer la biosynthèse des protéines afin de réduire l'accumulation de ces protéines dans la lumière du RE, d'augmenter la biosynthèse des protéines chaperonnes, d'augmenter la biosynthèse des protéines impliquées dans la machinerie de dégradation des protéines associées au RE et d'aider ce dernier à rétablir son homéostasie calcique entre autre (Zhang *et al.*, 2006). Cet ensemble de voies de signalisation qui est une réponse adaptative physiologique de la cellule à l'accumulation de protéines mal repliées s'appelle "*Unfolded Protein Response*" ou UPR. Il est connu que la glycoprotéine S des coronavirus peut à elle seule induire un stress au RE menant à l'activation de la UPR (Versteeg *et al.*, 2007). Des travaux du laboratoire ont montré que la voie UPR était induite de façon significativement plus importante suite à l'infection d'une lignée neuronale humaine par un variant du HCoV-OC43 portant les deux mutations ponctuelles H183R, Y241H dans la protéine S (nommé rOC/$U_{S183\text{-}241}$) comparé à l'infection par le virus de référence et que le titre infectieux intracellulaire du virus rOC/$U_{S183\text{-}241}$ était dix fois plus important que celui du virus de référence (Favreau *et al.*, 2009). De plus, des résultats non publiés montrent que le virus portant la mutation ponctuelle Y241H dans la protéine S s'accumule également de façon plus importante (titre infectieux intracellulaire de dix fois supérieur au virus de référence) dans les cellules infectées provenant de cultures primaires du SNC murin, comparé au virus de référence (Annexe 1). Bien que le mécanisme d'induction de ce phénomène par la protéine S ne soit pas clairement défini, des mutations dans la protéine S pourraient

altérer la conformation ou le processus de glycosylation de celle-ci, menant à un stress cellulaire et une augmentation d'induction de la UPR (Favreau *et al.*, 2009; Favreau *et al.*, 2012). Cependant, des études récentes ont montré que le transport de vésicules entre le RE et le ERGIC se fait *via* les microtubules (Zanetti *et al.*, 2012). Étant donné que l'infection de neurones par HCoV-OC43 déstabilise le cytosquelette des neurones via une dérégulation de l'état de phosphorylation des neurofilaments, il est possible que le virus affecte la stabilité des microtubules, qui sont également des fibres constitutives du cytosquelette, affectant ainsi le trafic du virus et induisant donc une accumulation de la protéine S qui pourrait altérer également le repliement de cette protéine et induire un stress à la cellule. L'activation de la UPR peut mener à l'induction de la mort cellulaire programmée (Fribley *et al.*, 2009). Concernant la neurodégénérescence induite suite à l'infection par HCoV-OC43, des travaux du laboratoire ont montré que l'infection de cultures primaires du SNC murine et d'une lignée cellulaire de type neuroblastome (LA-N-5 humaine différenciée) par HCoV-OC43 induit l'activation d'une mort cellulaire programmée accompagnée de l'activation de la caspase 3 entre autre (Jacomy *et al.*, 2006; Favreau *et al.*, 2012). De plus, l'infection de la lignée cellulaire LA-N-5 par le virus contenant deux mutations dans la protéine S (rOC/$U_{S183\text{-}241}$) induit une mortalité cellulaire plus importante comparé au virus de référence (rOC/ATCC) (Favreau *et al.*, 2009; Favreau *et al.*, 2012). Bien que la UPR soit tout d'abord activée afin d'éliminer le stress au RE, si celui-ci ne peut être résorbé, la UPR participe alors à l'induction de la mort cellulaire et potentiellement au développement de maladies neurodégénératives (Wang *et al.*, 2012), tout comme dans notre modèle d'étude où l'induction de la UPR pourrait mener à une dégénérescence neuronale (Favreau *et al.*, 2009; Favreau *et al.*, 2012).

1.5 Protéine S et système immunitaire

Tel que mentionné précédemment, la protéine S participe à l'activation de la UPR, qui peut mener à des pathologies neurologiques si cette activation est non-contrôlée. Il a été montré que le stress au RE permet l'activation de voies inflammatoires (Garg *et al.*, 2012; Hasnain *et al.*, 2012). En effet, il a été montré qu'un stress chronique ou sévère au RE peut induire, en plus de l'activation d'enzymes et de facteurs de transcription, l'activation de voies inflammatoires (entre autres en augmentant l'expression d'IL-6, d'IL-23 et d'IFN-γ) et affecter la présentation antigénique par le CMH de classe I et II (Hasnain *et al.*, 2012). De plus, il a été montré que l'expression de la protéine S du coronavirus murin MHV et humain SARS-CoV, induit un stress au RE et stimule la réponse inflammatoire innée en augmentant la transcription du gène codant la chimiokine CXCL2 (Versteeg et al., 2007). Enfin, une étude a montré que le stress au RE suite à l'infection par le SARS-CoV induit une régulation à la baisse du récepteur de l'IFN

de type I, ce qui atténue la réponse à l'IFN de type I, qui a un rôle antiviral essentiel (Minakshi *et al.*, 2009). Des mutations au sein de la protéine S de HCoV-OC43 menant à une accumulation accrue de cette protéine et de virions infectieux à l'intérieur des cellules infectées (possiblement au RE), pourraient donc moduler la réponse inflammatoire via un stress au RE.

De plus, la glycoprotéine S est une protéine fortement reconnue par le système immunitaire, qui induit une production d'anticorps neutralisants et l'activation de lymphocytes T cytotoxiques, ce qui lui confère un rôle important au niveau de la pathogenèse virale (Wentworth, 2007). Les anticorps peuvent reconnaitre à la fois les particules virales libres, en reconnaissant des protéines structurales externes telles que les glycoprotéines d'enveloppe ou les protéines externes de capside, et les cellules infectées et sont responsables de la neutralisation virale ou de la lyse des cellules infectées (Wentworth, 2007). L'acquisition de mutations dans la protéine S pourrait moduler sa reconnaissance par l'hôte et engendrer une réponse immunitaire exacerbée, qui, si elle est non-contrôlée, pourrait engendrer des effets secondaires néfastes au SNC.

Dans notre modèle, nous avons montré que l'infection de souris par rOC/$U_{S24\text{-}241}$ (virus à 4 mutations dans la protéine S) ou rOC/U_{S241} (une seule mutation) induit une activation microgliale (et une activation astrocytaire, dans le cas de rOC/$U_{S24\text{-}241}$) significativement plus importante comparé au virus de référence (Jacomy *et al.*, 2010; Brison *et al.*, 2011). De plus, l'infection de souris par rOC/$U_{S24\text{-}241}$ est accompagnée d'une plus grande expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et de la chimiokine MCP-1 (*CCL2*) et est associée avec une augmentation significative de l'infiltration de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ dans le SNC par rapport au virus de référence (Jacomy *et al.*, 2010). Il est donc raisonnable de spéculer que cette inflammation viro-induite peut, soit résulter d'un effet direct des mutations de la protéine S sur la reconnaissance par le système immunitaire et l'induction de la réponse immunitaire, ou bien d'un effet indirect via l'activation de la UPR, qui va induire un stress au RE et moduler la réponse inflammatoire (entre autre en modulant l'expression de certaines cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires).

Dans certains cas, l'acquisition de mutations dans la protéine de surface peut engendrer une variation génétique de cette protéine qui va permettre au virus de d'échapper au système immunitaire, notamment aux anticorps neutralisants et d'ainsi pouvoir persister dans son hôte. Malgré que l'ARN de HCoV-OC43 puisse être détecté jusqu'à un an post-infection chez les souris infectées (Jacomy *et al.*, 2006) ou même dans des échantillons post-mortem de cerveau humains (Arbour *et al.*, 2000), on ne connait pas de mécanismes qui pourraient permettre à HCoV-OC43 de persister dans son hôte et d'éventuellement se réactiver. Chez le coronavirus MHV, il semble que le niveau de persistance est déterminé en grande partie

par le système immunitaire, plus particulièrement par l'immunité humorale. Ce phénomène est supporté par l'accumulation et la rétention de lymphocytes B spécifiques au virus suite à l'élimination virale qui survient suite à une infection aigue (Stohlman *et al.*, 2002). En effet, il a été montré que les lymphocytes B spécifiques de MHV-JHM sont recrutés dans le SNC après que la majorité du virus ait été éliminé. Les lymphocytes B s'accumulent dans le SNC même quand la population des lymphocytes T commence à décliner, et sont retenus dans le SNC durant la persistance virale afin de prévenir la réactivation du virus (Stohlman *et al.*, 2002). Des mutations dans les protéines virales de surface peuvent permettre au virus d'échapper à la reconnaissance par les anticorps. Le cas le plus connu est celui du virus Influenza qui mute continuellement, ce qui lui permet d'échapper à la reconnaissance par les anticorps (van de Sandt *et al.*, 2012). C'est le cas également pour la protéine gp120 du VIH, qui, par variation antigénique peut échapper à une reconnaissance par le système immunitaire (Evans *et al.*, 2001). De plus, une étude a montré un rôle des sucres impliqués dans la glycosylation dans l'échappement au système immunitaire du VIH (Reitter *et al.*, 1998). Des mutations dans la protéine S de HCoV-OC43 pourrait avoir un rôle direct (ou indirect via l'état de glycosylation de S, si des mutations se retrouvaient dans des sites de glycosylation) dans le fait que le virus puisse échapper au système immunitaire, dans l'induction d'une infection latente, où il pourrait se réactiver et se répliquer occasionnellement suite à un stress ou à un état affaibli de l'hôte. Cependant, dans notre modèle, les quatre mutations identifiées dans la protéine S (virus à 4 mutations dans la protéine S: rOC/$U_{S24\text{-}241}$) ne concernent pas de sites de glycosylation de type N-X-S ou N-X-T.

Enfin, des mutations dans la protéine de surface peuvent induire un phénomène de mimétisme moléculaire et déclencher ainsi des mécanismes d'auto-immunité. C'est le cas pour certains virus comme l'herpes simplex où des lymphocytes T reconnaissent à la fois des épitopes des protéines de surface de HSV-1 et des antigènes de la cornée dans un modèle murin (Zhao *et al.*, 1998); le virus EBV, où des anticorps reconnaissant à la fois la protéine EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen) et des auto-antigènes associés au lupus (Poole *et al.*, 2006); le virus de la dengue où des anticorps reconnaissent à la fois des protéines virales (enveloppe et core) et des facteurs de coagulation (Lin *et al.*, 2011). Concernant HCoV-OC43, des études ont montré que le virus de référence de HCoV-OC43 peut partager des épitopes antigéniques communs avec des protéines de la myéline chez l'humain. Ces épitopes communs semblent pouvoir être reconnus par des lymphocytes T autoréactifs isolés de patients atteints de SEP qui présentent une réaction croisée à la fois face au virus et face à des antigènes de la myéline. Ceci suggère que le virus de référence de HCoV-OC43 pourrait déclencher une pathologie auto-immunitaire, mais l'implication d'une protéine virale en particulier n'est pas connue (Boucher *et al.*, 2007). Des mutations dans la protéine de surface de HCoV-OC43 pourraient donc avoir un impact majeur sur la reconnaissance et l'activation du

système immunitaire et ainsi exacerber le phénomène d'autoimmunité et contribuer au développement de maladies neurologiques chez l'homme.

1.6 Protéine S et neurovirulence

La neurovirulence désigne le caractère pathogène, nocif et violent d'un microorganisme, c'est à dire sa capacité à causer une pathologie au SNC détectable par des observations histologiques et/ou cliniques, voire la mort de l'hôte (Notkins *et al.*, 1986) . La protéine S joue un rôle dans la pathogenèse induite par les coronavirus (Gallagher, 2001). La plupart des connaissances sur le rôle de la protéine S dans la neuropathogenèse ont été obtenues à partir d'études sur le coronavirus murin MHV où le remplacement la protéine S de MHV-A59 (neurovirulence modérée) par celle de MHV-JHM (neurovirulence importante) mène à la production d'une souche recombinante de MHV-A-59 possédant une neurovirulence accrue (Phillips *et al.*, 1999) ainsi qu'une dissémination au SNC plus importante (Phillips *et al.*, 2002). Néanmoins, d'autres protéines, dont entre autre la protéine de la nucléocapside N, sont également des facteurs impliqués dans la neurovirulence chez MHV (Cowley *et al.*, 2010). La neurovirulence désigne le caractère pathogène, nocif et violent d'un microorganisme au sein du système nerveux.

Dans notre modèle, nous avons montré que l'infection de souris par le coronavirus portant les quatre mutations ponctuelles dans la protéine S (D24Y, S83T, H183R, Y241H; nommé rOC/$U_{S24\text{-}241}$) induit une pathologie paralysante des membres postérieurs chez la souris, accompagnée d'un taux de mortalité de 80% comparé au virus de référence qui induit une encéphalite avec 10-15% de mortalité (Jacomy *et al.*, 2010). L'étude de l'impact biologique de différentes combinaisons de mutations suggère un effet synergique des mutations dans le taux de mortalité des souris infectées par HCoV-OC43 portant une, deux ou quatre mutations dans la protéine S (Brison *et al.*, 2011). Le virus portant les quatre mutations ponctuelles se dissémine plus rapidement, se réplique de façon plus importante dans la moelle épinière (dix fois plus de virus infectieux détecté dans la moelle épinière lors du pic d'infection virale) et induit une inflammation plus importante comparé au virus de référence (Jacomy *et al.*, 2011). Le virus à une seule mutation (rOC/U_{S241}), quant à lui, induit également une pathologie paralysante des membres postérieurs chez la souris et une activation des microglies plus importante comparé au virus de référence mais avec un taux de mortalité similaire au virus de référence (10 à 15 %) (Brison *et al.*, 2011). De plus, le taux de réplication de rOC/U_{S241} dans le SNC est semblable au virus de référence, comparé à rOC/$U_{S24\text{-}241}$ (virus à 4 mutations) qui se réplique de façon plus importante dans la moelle épinière (Jacomy *et al.*, 2010; Brison *et al.*, 2011). Concernant la neurodégénérescence induite suite à l'infection par HCoV-OC43, des travaux

du laboratoire ont montré que l'infection de cultures primaires du SNC murine et de la lignée neuronale humaine LA-N-5 par HCoV-OC43 induit l'activation d'une mort cellulaire programmée accompagnée de l'activation de la caspase 3 entre autre (Jacomy *et al.*, 2006; Favreau *et al.*, 2012). De plus, l'infection de la lignée LA-N-5 par le virus contenant deux mutations dans la protéine S ($rOC/U_{S183-241}$) induit une mortalité cellulaire plus importante comparé au virus de référence (rOC/ATCC) (Favreau *et al.*, 2009; Favreau *et al.*, 2012), et l'infection de cultures primaires du SNC murine par le virus contenant la mutation ponctuelle Y241H (rOC/U_{S241}) induit également une mortalité cellulaire plus importante comparé au virus de référence (rOC/ATCC) (Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013).

Enfin, comme mentionné précédemment, l'infection par un variant du HCoV-OC43 portant les deux mutations ponctuelles H183R, Y241H dans la protéine S (nommé $rOC/U_{S183-241}$) ou par le virus portant la mutation ponctuelle Y241H dans la protéine S (rOC/U_{S241}) provoque une accumulation de virus dans la cellule infectée (Favreau *et al.*, 2009) (Annexe 1). Il se pourrait donc que les mutations acquises dans la protéine S de HCoV-OC43 favorisent seulement une plus grande production de particules virales intracellulaires, favorisant alors l'accumulation d'autres protéines virales telles HE et E, pouvant induire une certaine cytotoxicité. En effet, des résultats préliminaires du laboratoire concernant l'expression ectopique de la protéine HE de HCoV-OC43 suggèrent que cette protéine exerce un effet cytotoxique, et il a été montré que la protéine E de plusieurs coronavirus (SARS et MHV) peut agir en tant que viroporine et pourrait participer à l'induction de mort cellulaire (Madan *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2007). Ainsi, l'accumulation intracellulaire de protéines virales autres que S pourraient en elles-mêmes induire un effet cytotoxique plus important suite à une infection par les mutants de la protéine S du HCoV-OC43 décrits plus avant.

En conclusion, l'adaptation de HCoV-OC43, en particulier au sein de la protéine S, pourrait réguler de nombreux facteurs, comme la modulation de la dissémination et de la réplication virale, la modulation d'activation du système immunitaire, la modulation du stress cellulaire entre autres au niveau de la UPR et de l'induction de la mort cellulaire, qui peuvent conduire à une modification de la neuropathologie viro-induite chez la souris.

2. L'excitotoxicité glutamatergique est impliquée dans le développement d'une neuropathologie paralysante suite à l'infection par HCoV-OC43

2.1 Données générales

Ces travaux de thèse ont montré que la modification de neuropathologie, d'une encéphalite à une pathologie paralysante des membres postérieurs suite à l'infection par rOC/U_{S241} comparé au virus de référence, implique le processus d'excitotoxicité glutamatergique. De plus, la pathologie paralysante des membres postérieurs est parfois accompagnée parfois de lésions de démyélinisation dans la moelle épinière. En effet, certaines souris présentant une paralysie des membres postérieurs vont se rétablir, contrairement à certaines souris qui vont demeurer paralysées et où des lésions de démyélinisation pourront être mises en évidence dans la moelle épinière à partir d'un mois post-infection (Jacomy *et al.*, 2010; Brison *et al.*, 2011). C'est pourquoi il est intéressant de penser que l'infection par HCoV-OC43 est un modèle de neurodégénérescence "inside-out" où l'on assiste tout d'abord à une dégénérescence neuronale suivie ensuite d'une démyélinisation chez les souris paralysées à long terme. Ce point est discuté plus loin.

L'utilisation d'antagonistes des récepteurs AMPA (GYKI-52466) ou des récepteurs NMDA (mémantine ou dizocilpine) améliore les scores cliniques reliés à la pathologie paralysante et aux problèmes moteurs chez la souris infectée par rOC/U_{S241} et protège le SNC de dysfonctionnements neuronaux, illustré par la restauration de l'état de phosphorylation des neurofilaments (Brison *et al.*, 2011; Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). De plus, nous avons montré que l'expression du transporteur glial du glutamate (GLT-1), essentiel dans la régulation de l'homéostasie du glutamate, est régulée à la baisse suite à l'infection par rOC/U_{S241} et que le traitement au GYKI-52466 ou par la mémantine restaure significativement son niveau d'expression (Brison *et al.*, 2011; Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). En regard de l'inflammation au SNC, le traitement des souris infectées par le GYKI-52466 ou la mémantine réduit le niveau d'activation des microglies activées, ce qui pourrait conduire à une meilleure régulation de l'homéostasie du glutamate dans le SNC (Brison *et al.*, 2011; Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). Enfin, nous avons montré que la mémantine, médicament couramment utilisée chez l'homme pour le traitement de maladies neurologiques comme l'Alzheimer, le Parkinson et la SEP, montre un effet antiviral contre HCoV-OC43 lorsqu'il est utilisé à de plus fortes doses (Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). Tous ces points sont discutés plus en détails ci-dessous.

2.2 Excitotoxicité, problèmes moteurs et paralysie

L'excitotoxicité glutamatergique est impliquée dans plusieurs maladies neurologiques impliquant entre autres des problèmes moteurs. En effet, l'excitotoxicité est impliquée dans la SLA (Van Den Bosch *et al.*, 2006), dans la SEP (Gonsette, 2008), ou suite à une infection par le virus du Nil Occidental (Blakely

et al., 2009) ou par le virus Sindbis (Darman *et al.*, 2004). De plus, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs AMPA ou NMDA permet une atténuation des troubles de motricité dans ces pathologies (Bolton *et al.*, 2006; Prow *et al.*, 2008; Cheah *et al.*, 2010). Dans notre modèle d'étude nous avons montré que le traitement quotidien avec un antagoniste des récepteurs AMPA (GYKI-52466, 3µg/g) ou des récepteurs NMDA (mémantine, 3 µg/g ou dizocilpine, 0.5 µg/g) améliore les scores cliniques reliés aux problèmes moteurs et à la paralysie des membres postérieurs chez la souris infectée par rOC/U_{S241}. Les problèmes moteurs, suivis parfois d'une paralysie totale des membres postérieurs peuvent d'abord provenir d'un dysfonctionnement neuronal, suivi dans certains cas d'une dégénérescence neuronale. Ceci peut donner lieu à une dégénérescence subséquente des oligodendrocytes et donc à des lésions de démyélinisation de type "inside-out". D'un autre côté, la mort des oligodendrocytes peut survenir avant la dégénérescence neuronale et cette situation est appelée démyélinisation "outside-in" (Tsunoda *et al.*, 2002). Dans notre modèle, les souris infectées par rOC/U_{S241} développent des problèmes moteurs à partir de 9 jours post-infection et commencent à récupérer à partir de 15 jours post-infection. Certaines souris ne récupèrent que partiellement des problèmes moteurs ou demeurent paralysées, et des lésions de démyélinisation dans la moelle épinière peuvent être visualisées à partir d'un mois post-infection. Un des aspects utilisé pour évaluer les dysfonctions neuronales est d'évaluer l'état de phosphorylation des neurofilaments (NF), filaments intermédiaires du cytosquelette neuronal impliqués dans le développement et la stabilité des axones matures, ainsi que dans la régulation du transport axonal et dans la transmission des impulsions électriques le long des axones (Petzold, 2005). Durant le développement du SNC, le glutamate est impliqué dans le développement et la morphologie du cytosquelette neuronal, plus particulièrement via l'activation du récepteur NMDA (Wilson *et al.*, 1998; Fiumelli *et al.*, 2008). Il a été montré que le glutamate peut mener à l'activation des kinases MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et ERK (Extracellular signal-regulated kinase) ainsi que de phosphatases via entre autre l'activation des récepteurs ANPA et NMDA et via le taux de calcium intracellulaire (Wang *et al.*, 2007), qui, lorsque la balance kinase/phosphatase est perturbée, peut favoriser l'aggrégation des NF, et ralentir le transport axonal, notamment via l'activation du récepteur NMDA (Ackerley *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2005; Sanelli *et al.*, 2007). Dans notre modèle, l'infection par HCoV-OC43 induit une perte de détection de NF-H non phosphorylés dans le corps cellulaire des neurones ainsi qu'une déphosphorylation anormale des NF-H dans les axones, phénomène qui est plus marqué suite à l'infection par rOC/U_{S241} comparé à rOC/ATCC (Brison *et al.*, 2011; Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). De plus, ceci suggère que le transport axonal pourrait être perturbé dans les axones. En effet, la détection de protéines virales, suite à l'infection de cultures primaires murines du SNC par HCoV-OC43, montre une structure axonale typique en « collier de perles » (Jacomy *et al.*, 2006), ce qui suggère une perturbation de ce transport. De plus, les oligodendrocytes peuvent exprimer des récepteurs au glutamate de type AMPA et

NMDA. En effet, dans des conditions physiologiques, le glutamate joue un rôle dans les processus de différenciation de cellules souches multipotentes adultes et de myélinisation axonale (Cavaliere *et al.*, 2012). Cependant, dans des conditions pathologiques le glutamate peut également exercer un effet toxique direct sur ces cellules et induire des lésions de démyélinisation (Bakiri *et al.*, 2009). Dans notre modèle, les lésions de démyélinisation sont observées un mois post-infection, suite à la réplication virale et aux problèmes moteurs, ce qui suggère une neuropathologie de type "inside-out", où la démyélinisation est une conséquence de la neurodégénérescence plutôt qu'une cause; modèle également proposé pour les infections par HIV, HTLV-1 ou TMEV (Tsunoda *et al.*, 2002).

2.3 Glutamate et inflammation

L'excitotoxicité glutamatergique mène en général à une augmentation de l'inflammation suite à différents processus. Tout d'abord, la mort de cellules neuronales par excitotoxicité induit un relargage du pool intracellulaire de glutamate, ce qui augmente la concentration extracellulaire et amplifie le phénomène d'excitotoxicité si le neurotransmetteur n'est pas recyclé adéquatement. De plus, le glutamate agit comme molécule chimio-attractive pour les microglies, les lymphocytes et les polynucléaires neutrophiles (Liu *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2011; Boldyrev *et al.*, 2012). Les cellules immunitaires comme les microglies, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques, sont également capables de sécréter du glutamate dans le SNC, et donc d'amplifier le phénomène d'excitotoxicité ainsi que de moduler la réponse lymphocytaire (Noda *et al.*, 1999; Collard *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012). Enfin le glutamate est également capable de moduler la perméabilité de la BHE (Ballabh *et al.*, 2004). Il semble donc exister un cercle vicieux entre le glutamate et l'inflammation, car des molécules pro-inflammatoires peuvent également réguler à la baisse le recyclage du glutamate et donc amplifier la boucle d'excitotoxicité (détaillée plus loin dans la discussion). Enfin, comme décrit précédemment, l'activation exacerbée de la voie UPR permet d'augmenter l'inflammation (Garg et al., 2012; Hasnain et al., 2012) et des études récentes ont montré que l'activation de la UPR a un rôle dans la régulation du trafic des récepteurs AMPA à la membrane cellulaire (Shim *et al.*, 2004; Vandenberghe *et al.*, 2005). Dans notre modèle nous avons montré que l'infection de souris par HCoV-OC43 induit une astrogliose ainsi qu'une microgliose au SNC et que l'activation des microglies est significativement plus importante suite à l'infection par rOC/U_{S241} comparé à rOC/ATCC (Brison *et al.*, 2011; Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). On sait aussi que l'infection de cultures primaires du SNC murin induit une augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire accompagnée d'une mortalité cellulaire significativement plus importante suite à l'infection par rOC/U_{S241} comparé à rOC/ATCC (Brison *et al.*,

2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). Il est raisonnable de penser que la mortalité cellulaire accrue suite à l'infection par rOC/U_{S241} libère un pool important de glutamate dans le milieu extracellulaire, ce qui active également de façon plus importante des cellules immunitaires, qui pourraient à leur tour libérer du glutamate (capacité des microglies à secréter du glutamate) ou des facteurs pro-inflammatoires ayant un effet négatif sur le recyclage du glutamate et donc amplifier la boucle de toxicité du glutamate. De plus, l'infection par rOC/U_{S241} pourrait induire une activation de la UPR plus importante comparée à rOC/ATCC, ce qui pourrait résulter en un trafic plus important des récepteurs ionotropes du glutamate à la membrane plasmique des neurones et augmenter la vulnérabilité de ces cellules au glutamate. Nous avons montré que le traitement par l'antagoniste des récepteurs AMPA (GYKI-52466, 3 µg/g) ou NMDA (mémantine, 3 µg/g) permet de réduire l'activation microgliale suite à l'infection de souris par HCoV-OC43. Il est raisonnable de penser que cette réduction d'inflammation résulte de l'effet protecteur du GYKI-52466 et de la mémantine contre la mort neuronale. De plus, les microglies peuvent exprimer des récepteurs de type AMPA et NMDA, impliqués entre autre dans l'effet chimio-attractant du glutamate, donc le traitement par le GYKI-52466 et la mémantine pourraient avoir un effet direct sur la diminution de l'activation des microglies en bloquant les récepteurs AMPA ou NMDA (Liu *et al.*, 2009; Domercq *et al.*, 2013). Le glutamate semble donc être un facteur important dans le développement de l'inflammation et donc dans le développement de maladies neurologiques.

2.4 HCoV-OC43 n'affecte pas la synthèse de glutamate

La voie principale de synthèse du glutamate s'effectue *via* deux types de glutaminase (LGA: liver-type glutaminase; KGA: Kidney-type glutaminase), et une dérégulation de la synthèse de glutamate peut venir perturber son homéostasie et induire l'excitotoxicité. L'expression de la glutaminase peut être augmentée dans certaines maladies neurologiques telles que l'épilepsie et la schizophrénie (Bruneau *et al.*, 2005; Eid *et al.*, 2007) et également suite à l'infection par le VIH (Erdmann *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2008). La concentration intracellulaire de phosphate est importante pour contrôler l'activation de la glutaminase. De plus une variété de composants peut affecter la liaison du phosphate à la glutaminase. En effet, des intermédiaires du cycle de Krebs, des dérivés de l'acétyl-CoA (molécule à haut potentiel d'hydrolyse, qui est au centre d'un carrefour métabolique) et le calcium favorisent la phosphorylation de la glutaminase, tandis que le NH_4^+, produit de réaction de la glutaminase, l'AMPc, le GMPc ont des effets inhibiteurs de l'activation de la glutaminase (Kvamme *et al.*, 2000). Dans notre modèle, nous avons montré qu'il n'y a pas de changement dans l'expression de la glutaminase activée suite à l'infection de souris ou de cultures primaires du SNC murin que ce soit par le virus de référence (rOC/ATCC) ou par le virus rOC/U_{S241}

(Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). De plus, comme mentionné dans le paragraphe précédent, dans certaines conditions pathologiques, les microglies ont la capacité de secréter du glutamate via la glutaminase. Toutefois, cela ne semble pas être le cas dans notre modèle puisqu'aucune expression de glutaminase activée n'a pu être mise en évidence dans les microglies par immunohistochimie dans les moelles épinières ou dans les cultures primaires du SNC murin suite à l'infection par HCoV-OC43. L'augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire suite à l'infection par HCoV-OC43 ne semble donc pas résulter d'un dérèglement de la synthèse de glutamate.

2.5 HCoV-OC43 affecte la recapture et le recyclage de glutamate

La recapture et le recyclage du glutamate sont des étapes essentielles dans la régulation de l'homéostasie du glutamate. La recapture du glutamate est effectuée principalement par les astrocytes via le transporteur du glutamate GLT-1. Ce transporteur est exprimé à la baisse dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer (Mookherjee *et al.*, 2011), dans l'épilepsie (Proper *et al.*, 2002), dans un modèle d'étude de la SEP (Mitosek-Szewczyk *et al.*, 2008), dans la SLA (Heath *et al.*, 2002), et suite à l'infection par le HHV-6 (Fotheringham *et al.*, 2008), par le virus du Nil Occidental (Blakely *et al.*, 2009), par le VIH (Wang *et al.*, 2003) et par le HTLV-1 (Szymocha *et al.*, 2000). Dans notre modèle nous avons montré que l'expression du transporteur du glutamate GLT-1 est significativement régulée à la baisse suite à l'infection de souris par rOC/U_{S241} comparé à rOC/ATCC et que le traitement par l'antagoniste des récepteurs AMPA (GYKI-52466, 3 μg/g) ou NMDA (mémantine, 3 μg/g) permet une restauration significative de l'expression de ce transporteur (Brison *et al.*, 2011; Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). De plus, nous avons récemment montré que l'infection de souris par HCoV-OC43 mène à une expression accrue de cytokines comme l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α, avec une augmentation significative d'expression d'IL-6 suite à l'infection par rOC/$U_{S24\text{-}241}$ (HCoV-OC43 avec 4 mutations dans la protéine de surface) comparé à rOC/ATCC (Jacomy *et al.*, 2010) et certaines cytokines comme l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α sont reconnues pour réguler à la baisse l'expression du transporteur GLT-1(Okada *et al.*, 2005; Prow *et al.*, 2008; Carmen *et al.*, 2009). Il est donc raisonnable de penser que le traitement par l'antagoniste des récepteurs AMPA (GYKI-52466, 3 μg/g) ou NMDA (mémantine, 3 μg/g) permet une restauration significative de l'expression du GLT-1 *via* une diminution de l'activation des microglies et donc une diminution potentielle de l'expression de cytokines qui ont un effet négatif sur le transport du glutamate pour le recyclage.

Une fois le glutamate recapté, il est transformé en glutamine via la glutamine synthétase astrocytaire. La glutamine est ensuite libérée dans le milieu extracellulaire et recaptée par les terminaisons

axonale pour être retransformée en glutamate par la glutaminase neuronale. L'expression de la glutamine synthétase est régulée à la baisse dans certaines maladies neurologiques comme dans la maladie d'Alzheimer (Le Prince *et al.*, 1995), dans l'épilepsie (Rosati *et al.*, 2013), dans la SEP (Werner *et al.*, 2001), et suite à l'infection par le VIH (Porcheray *et al.*, 2006) ou le HTLV-1 (Akaoka *et al.*, 1996). Dans notre modèle nous avons montré que l'expression de la glutamine synthétase est significativement régulée à la baisse suite à l'infection de souris par rOC/U_{S24I} comparé à rOC/ATCC et que le traitement par l'antagoniste des récepteurs NMDA (mémantine, 3 µg/g) permet une restauration significative de l'expression de cette enzyme (Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). Tout comme pour le transporteur du glutamate GLT-1, certaines cytokines comme l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α sont reconnues pour réguler à la baisse l'expression de la glutamine synthétase (Huang *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2010). De plus, la glutamine synthétase utilise l'ammonium produit par diverses réactions pour transformer le glutamate en glutamine, donc une baisse d'expression de la glutamine synthétase va induire une accumulation d'ammonium dans la cellule, qui a été démontré comme ayant un rôle dans la régulation à la baisse du transporteur du glutamate GLT-1 (Butterworth, 2001). Il est donc raisonnable de penser que, tout comme pour le transporteur GLT-1, le traitement par l'antagoniste des récepteurs AMPA (GYKI-52466, 3 µg/g) ou NMDA (mémantine, 3 µg/g) permet une restauration significative de l'expression de la glutamine synthétase *via* une diminution de l'activation des microglies et donc une diminution potentielle de l'expression de cytokines comme l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α, qui ont un effet négatif sur le transport du glutamate pour le recyclage. De plus, cette restauration partielle de l'expression de la glutamine synthétase permet une meilleure régulation de l'homéostasie de l'ammonium (Butterworth, 2001), atténuant ainsi son effet négatif sur l'expression du transporteur GLT-1.

2.6 Excitotoxicité et virulence

Comme décrit tout au long de la discussion, l'homéostasie du glutamate peut être dérégulée à différents niveaux. En effet, une augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate peut (1) être une conséquence de la mort cellulaire qui permet la libération de leur pool intracellulaire de glutamate, ou (2) résulter d'une synthèse accrue ou d'un défaut dans la capture et le recyclage du glutamate. La virulence du HCoV-OC43 liée au processus d'excitotoxicité peut donc résulter de ces différents facteurs ainsi que de l'inflammation induite par l'infection virale ou par le glutamate lui-même. Le développement d'antagonistes des récepteurs AMPA ou NMDA est une part importante de la recherche pour comprendre et traiter les nombreuses maladies neurologiques impliquant l'excitotoxicité. Une étude a montré qu'en plus d'atténuer les problèmes moteurs associés à l'infection, le blocage des récepteurs

AMPA de souris infectées par le virus Sindbis, atténue le taux de mortalité qui passe de 100% à 30% (Nargi-Aizenman *et al.*, 2004) et que cette amélioration de la survie n'est pas due à une altération de la réplication virale (Nargi-Aizenman *et al.*, 2004) mais à une diminution de l'inflammation (Greene *et al.*, 2008). Dans notre modèle, le traitement de souris infectées par HCoV-OC43 par un antagoniste des récepteurs AMPA (GYKI-52466, 3 μg/g) ou des récepteurs NMDA (mémantine, 3 μg/g) diminue l'activation microgliale mais n'affecte pas le taux de mortalité des souris (20% suite à l'infection par rOC/U_{S241} comparé à 10-15% pour rOC/ATCC) (Brison *et al.*, 2011; Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). Par contre, nous avons montré que des doses croissantes de mémantine (5, 10 et 30 μg/g) permettent d'atténuer ou d'abolir totalement les scores cliniques reliés à la pathologie paralysante, le taux de mortalité et la perte de poids des souris infectées par rOC/ATCC ou rOC/U_{S241} de manière dépendante de la dose (Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). L'évaluation de la charge virale au SNC montre que les doses croissantes de mémantine (5, 10 et 30 μg/g) atténuent la réplication virale su SNC. La mémantine est un des dérivés de l'adamantane, permettant la synthèse de divers composés pharmacologiques. Certains autres de ces dérivés sont utilisés comme médicament en médecine et montrent également des propriétés antivirales, comme l'amantadine et la rimantadine (inhibent la réplication virale du virus Influenza A (Cady *et al.*, 2011)), la tromantadine (inhibe la réplication virale du virus herpès simplex (Ickes *et al.*, 1990)), et le bananin (inhibe la réplication virale du SARSr-CoV (Tanner *et al.*, 2005)). En utilisant une approche de culture cellulaire, nous avons montré que l'inhibition de la réplication virale de HCoV-OC43 par la mémantine est indépendante du blocage des récepteurs NMDA car la mémantine inhibe la réplication virale de HCoV-OC43 sur des cellules exprimant ou non le récepteur NMDA à leur surface (Brison *et al.*, 2013, soumis à Journal of Virology, octobre 2013). Ce n'est donc pas le fait de bloquer le récepteur NMDA qui influencerait sur la capacité du virus à infecter la cellule. De plus, la mémantine montre une activité antivirale après l'étape d'adsorption du virus sur les cellules, indiquant que cette molécule inhibe la réplication virale après l'attachement, comme démontré pour l'amantadine et la rimantadine, qui inhibent la décapsidation du virus influenza dans les endosomes (Bukrinskaya *et al.*, 1980; Takeda *et al.*, 2002), la tromantadine, qui inhibe les phases précoces de la réplication virale du virus herpès simplex avant la synthèse de macromolécules ou des phases tardives comme l'assemblage et la relâche du virus (Rosenthal *et al.*, 1982) et le bananin qui inhibe l'activité hélicase du SARS-CoV (Tanner *et al.*, 2005). Peut-être que la mémantine pourrait agir comme ces diverses molécules dérivées d'adamantane, en exerçant un effet sur le canal ionique de la protéine de membrane d'enveloppe E, perturbant ainsi la stabilité ou la décapsidation virale. En effet, l'amantadine et la rimantadine sont connues pour perturber le canal ionique de la protéine M2 du virus influenza essentielle dans la réplication virale en jouant un rôle dans le maintient des concentrations ioniques et du pH cellulaire lors de l'entrée et lors de la maturation virale (Cady *et al.*,

2008). La mémantine pourrait également altérer le processus de glycosylation, tout comme démontré pour la tromantadine sur le virus de l'herpès simplex (Ickes *et al.*, 1990). Enfin la mémantine pourrait également moduler l'activité ATPase de l'hélicase et donc la réplication virale de HCoV-OC43 tout comme démontré pour le SARS-CoV (Tanner *et al.*, 2005).

À notre connaissance, il s'agit de la première étude associant des propriétés antivirales à la mémantine et cette action suggère que cette molécule pourrait être utilisée comme agent antiviral contre des virus impliqués dans des maladies neurologiques.

3. Conclusion

En conclusion, le coronavirus respiratoire humain OC43 est un virus neurotrope et neuroinvasif possédant des propriétés neurovirulentes chez la souris, et potentiellement chez l'homme, et dont la cellule cible principale au SNC est le neurone. Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que l'excitotoxicité glutamatergique est impliquée dans la neuropathologie paralysante induite par un variant de HCoV-OC43 contenant une mutation ponctuelle dans la glycoprotéine de surface acquise suite à une infection persistante, ce qui pourrait représenter une éventuelle adaptation virale chez l'humain. De plus, nos travaux démontrent que l'acquisition de mutations ponctuelles dans la protéine de surface peut exacerber l'inflammation, et que certaines molécules issues de cette réaction de défense immunitaire peuvent perturber le recyclage du glutamate via le transporteur du glutamate GLT-1 et via la glutamine synthétase. Depuis des années, les recherches pharmacologiques se sont penchées sur la synthèse d'antagonistes des récepteurs NMDA car ce sont ces récepteurs qui permettent une entrée excessive de calcium dans le neurone post-synaptique. Depuis peu, les recherches s'intensifient pour développer des antagonistes des récepteurs AMPA, car il apparait évident qu'une diminution de l'activation de ces récepteurs permettrait d'atténuer la dépolarisation membranaire du neurone post-synaptique et donc l'activation des récepteurs NMDA. Finalement nos résultats montrent un effet antiviral de la mémantine dépendant de la dose. Ce nouveau mode d'action de la mémantine suggère que cette molécule pourrait être utilisée comme agent antiviral contre des virus causant des encéphalites ou potentiellement impliqués dans des maladies neurologiques chez l'humain dont l'étiologie n'est pas connue. Cette thèse permet donc de mieux comprendre les interactions complexes qui existent entre le virus HCoV-OC43, les cellules du SNC et l'inflammation.

4. Perspectives

En perspective, tout en restant dans le domaine des neurotransmetteurs, et plus particulièrement dans l'excitotoxicité glutamatergique, il serait tout d'abord intéressant d'évaluer le profil d'expression de différentes sous-unités des récepteurs AMPA et NMDA suite à l'infection par HCoV-OC43. En effet, certaines sous-unités des récepteurs ionotropes au glutamate sont reconnues pour être plus perméables au calcium, potentialisant ainsi l'effet excitotoxique du glutamate, et pour être particulièrement exprimées dans certaines maladies neurologiques présentant des symptômes similaires à ce que l'on voit suite à l'infection par HCoV-OC43. La présence de la sous-unité GluR2 rend le récepteurs AMPA très peu perméables au calcium, et une diminution de l'expression de cette sous-unité permet une entrée accrue de calcium dans le neurone qui peut mener à l'excitotoxicité glutamatergique (Tanaka *et al.*, 2000). Les sous-unités NR2A et NR2B sont également impliquées dans le développement de maladies neurologiques car leur présence augmente la perméabilité du récepteur au calcium (Cull-Candy *et al.*, 2011).

Dans les travaux présentés dans cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux récepteurs ionotropes du glutamate. Toutefois, il serait intéressant d'investiguer le rôle des récepteurs métabotropes suite à l'infection par HCoV-OC43. Ces récepteurs participent à la modulation lente de l'excitabilité et ils peuvent également interagir avec les récepteurs NMDA assurant à la fois la mise en place de cascades enzymatiques, mais aussi faire le lien entre les récepteurs NMDA et le cytosquelette des synapses et avec les dispositifs de transport des protéines (Heidinger *et al.*, 2002). En effet, des antagonistes des récepteurs métabotropes mGluR5, ou des activateurs des récepteurs métabotropes mGluR4 (récepteurs qui modulent l'immunité adaptative, limitant ainsi la neuroinflammation (Fallarino *et al.*, 2010)) semblent donner des résultats prometteurs dans le traitement de la maladie de Parkinson (Johnson *et al.*, 2009).

Il serait intéressant d'étudier le métabolisme du GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, suite à l'infection par HCoV-OC43. Tout d'abord le GABA est synthétisé à partir du glutamate via l'enzyme glutamate décarboxylase. Le rôle principal du GABA est d'atténuer l'action excitatrice liée au glutamate (Petroff, 2002). Un déficit fonctionnel du GABA a été montré dans l'épilepsie et l'autisme (Sgado *et al.*, 2011), dans la maladie d'Alzheimer (Limon *et al.*, 2012) et dans la schizophrénie (Coyle, 2004). Il est possible que dans notre modèle, le métabolisme du GABA soit altéré, favorisant ainsi l'action excitatrice du glutamate et l'induction de l'excitotoxicité.

Ensuite, l'inflammation, défense immunitaire initiée suite à divers stimuli, peut avoir de graves conséquences si elle n'est pas contrôlée. De plus, certaines molécules pro-inflammatoires peuvent avoir de

multiples rôles quant à l'expression d'une multitude de protéines essentielles au bon fonctionnement du SNC. Il serait nécessaire d'investiguer plus en détails la neuroinflammation suite à l'infection par HCoV-OC43 (virus de référence et variants d'adaptation), incluant non seulement la réponse immunitaire innée et adaptative (cellules activées, infiltrantes, cytokines pro- et anti-inflammatoires) mais aussi d'autres molécules secondaires comme par exemple la production de réactifs oxygénés, l'activité de la PLA2 et la production d'acide arachidonique qui peuvent moduler entre autre la capacité du transport du glutamate pour le recyclage (Zerangue *et al.*, 1995; Amara *et al.*, 2002). Ceci permettrait de renforcer les liens entre l'inflammation et la dérégulation de certaines voies métaboliques au SNC pouvant mener à des maladies neurologiques.

Enfin, concernant la biologie du virus HCoV-OC43, il serait intéressant d'avancer les connaissances sur le site de liaison au récepteur, ce qui permettrait de mieux comprendre l'effet de l'acquisition de mutations ponctuelles dans ce domaine particulier de la protéine suite à la persistance du virus. En effet, d'après des données en cours, nous savons que la région située entre les acides aminés 16 et 334 de la sous-unité S1 de la protéine de surface permet de reconnaître et d'interagir avec les acides sialiques 9-O-acétylés, et que l'absence d'expression de ce type d'acide sialique à la surface cellulaire empêche toute infection par HCoV-OC43 en culture cellulaire. Des mutations dans la protéine de surface pourraient altérer la conformation et/ou la capacité d'interaction de la protéine S avec un récepteur cellulaire, ce qui pourrait influencer la capacité du virus à infecter la cellule hôte. Cette capacité de la protéine S du virus OC43 à se lier à la cellule hôte peut être mesurée par des expériences de liaison ligand/récepteur en biologie cellulaire comme démontré pour le virus influenza (Chu *et al.*, 2004) qui interagit d'ailleurs avec certains types d'acides sialiques afin d'infecter les cellules-cibles. Ce genre d'expérience pourrait être réalisé avec le virus HCoV-OC43 en comparant la liaison du virus de référence à celle de virus contenant des mutations ponctuelles dans la protéine S. De plus, la technique de résonance plasmonique de surface (*Surface plasmon resonance*), technique biochimique qui mesure par exemple la variation de l'indice de réfraction au voisinage de l'interface quand un ligand se fixe sur un récepteur, a d'ailleurs été utilisée par le docteur James Rini, un collaborateur de l'université de Toronto, pour démontrer l'interaction de la région 16-334 de la protéine S du virus HCoV-OC43 avec les acides sialiques 9-O-acétylés. Ces expériences ont été réalisées en étudiant la protéine S de type sauvage ou contenant des mutations ponctuelles et des données préliminaires suggèrent que la présence des 4 mutations ponctuelles dans la protéine S préalablement décrites (D24Y, S83T, H183R, Y241H) augmenteraient l'affinité de liaison de HCoV-OC43 pour les acides sialiques 9-O-acétylés.

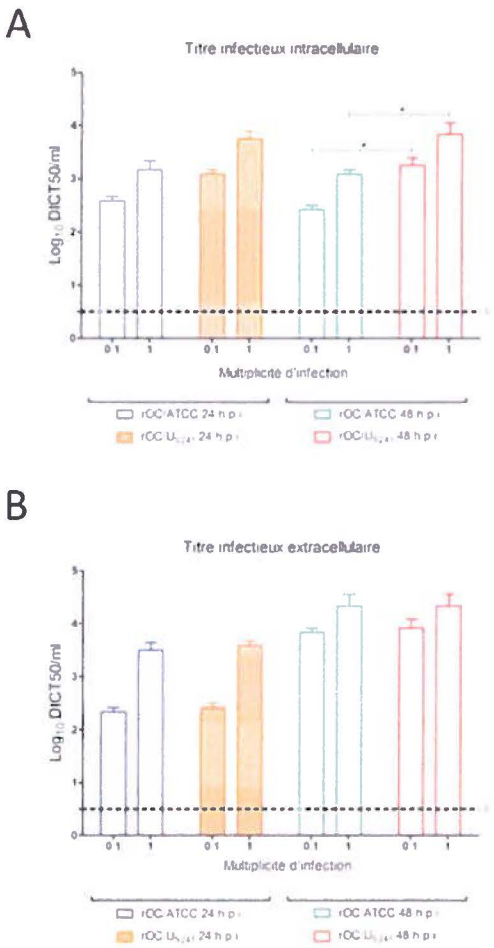
De plus, dans les résultats présentés dans cette thèse nous nous sommes intéressés particulièrement aux dysfonctions neuronales qui ont lieu lors du pic de réplication viral, mais il serait

intéressant d'investiguer plus en détails le phénomène de démyélinisation qui peut être détecté à partir d'un mois post-infection chez les souris infectées par rOC/U_{S241}. En effet, cette démyélinisation peut résulter d'une perte neuronale importante (phénomène "inside-out"), ou bien d'un mécanisme de mimétisme moléculaire, ou encore de l'effet néfaste des microglies, ou de leurs produits de sécrétion, présents dans ces zones. Étant donné que HCoV-OC43 peut persister dans le SNC de souris ou chez l'humain, il serait intéressant d'évaluer la capacité, le lieu et les mécanismes de persistance de HCoV-OC43, qui pourrait engendrer des lésions de démyélinisation s'il y a réactivation virale et/ou inflammation chronique.

La connaissance de la biologie du virus ainsi que son interaction avec le SNC et l'inflammation pourrait aider au développement de stratégies antivirales ainsi que de permettre de mieux comprendre certaines pathologies neurologiques à potentielle étiologie virale.

ANNEXES

Annexe 1.



Annexe 1. Titre infectieux intra et extracellulaire suite à l'infection de cultures primaires du SNC murines par HCoV-OC43.

Titrage de virus infectieux suite à l'infection de cultures primaires du SNC murines mixtes par rOC/ATCC ou rOC/U_{S241} à deux multiplicités d'infection différentes (MOI 0.1 et 1) à 24 et à 48h post-infection. Résultat représentatif de trois expériences indépendantes. **A.** Le titre infectieux intracellulaire de rOC/U_{S241} est dix fois supérieur à celui du virus de référence rOC/ATCC, à 48 heures post-infection. **B.** Il n'y a pas de différence significative du titre infectieux extracellulaire suite à l'infection de cultures primaires murines par rOC/U_{S241} comparé à rOC/ATCC. Significativité: *P<0.05 (Test Dukey).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ackerley, S., A.J. Grierson, J. Brownlees, P. Thornhill, B.H. Anderton, P.N. Leigh, C.E. Shaw, and C.C. Miller. 2000. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. J. Cell Biol., 150:165-176.

Afonso, P.V., S. Ozden, M.C. Cumont, D. Seilhean, L. Cartier, P. Rezaie, S. Mason, S. Lambert, M. Huerre, A. Gessain, P.O. Couraud, C. Pique, P.E. Ceccaldi, and I.A. Romero. 2008. Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. PLoS Pathog., 4: e1000205.

Akaoka, H., H. Hardin-Pouzet, A. Bernard, B. Verrier, M.F. Belin, and P. Giraudon. 1996. Imbalanced expression of glutamate-glutamine cycle enzymes induced by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein in cultivated astrocytes. J. Virol., 70: 8727-8736.

Alexaki, A., and B. Wigdahl. 2008. HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. PLoS Pathog., 4: e1000215.

Alfahad, T., and A. Nath. 2013. Retroviruses and amyotrophic lateral sclerosis. Antiviral Res. 99:180-187.

Almazan, F., C. Galan, and L. Enjuanes. 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. J. Virol., 78: 12683-12688.

Almeida, J.D., and D.A. Tyrrell. 1967. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. J. Gen. Virol., 1: 175-178.

Alvarez, J.I., R. Cayrol, and A. Prat. 2011. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. Biochim. Biophys. Acta., 1812: 252-264.

Amara, S.G., and A.C. Fontana. 2002. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. Neurochem. Int., 41: 313-318.

Amor, S., F. Puentes, D. Baker, and P. van der Valk. 2010. Inflammation in neurodegenerative diseases. Immunology, 129: 154-169.

Anderson, C.M., and R.A. Swanson. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia, 32: 1-14.

Andre, V.M., C. Cepeda, and M.S. Levine. 2010. Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. CNS Neurosci. Ther., 16: 163-178.

Antar, A.A., J.L. Konopka, J.A. Campbell, R.A. Henry, A.L. Perdigoto, B.D. Carter, A. Pozzi, T.W. Abel, and T.S. Dermody. 2009. Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. Cell Host Microbe, 5: 59-71.

Aoshi, T., S. Koyama, K. Kobiyama, S. Akira, and K.J. Ishii. 2011. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. Curr. Opin. Virol., 1: 226-232.

Aravalli, R.N., P.K. Peterson, and J.R. Lokensgard. 2007. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. J. Neuroimmune Pharmacol., 2: 297-312.

Arbour, N., G. Cote, C. Lachance, M. Tardieu, N.R. Cashman, and P.J. Talbot. 1999. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. J. Virol. 73: 3338-3350.

Arbour, N., R. Day, J. Newcombe, and P.J. Talbot. 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. J. Virol. 74: 8913-8921.

Arbour, N., S. Ekande, G. Cote, C. Lachance, F. Chagnon, M. Tardieu, N.R. Cashman, and P.J. Talbot. 1999b. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. J. Virol. 73: 3326-3337.

Arundine, M., and M. Tymianski. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. Cell Calcium 34: 325-337.

Atkins, G.J., S. McQuaid, M.M. Morris-Downes, S.E. Galbraith, S. Amor, S.L. Cosby, and B.J. Sheahan. 2000. Transient virus infection and multiple sclerosis. Rev. Med. Virol., 10: 291-303.

Bailey, O.T., A.M. Pappenheimer, F.S. Cheever, and J.B. Daniels. 1949. A Murine Virus (Jhm) Causing Disseminated Encephalomyelitis with Extensive Destruction of Myelin : II Pathology. J. Exp. Med., 90: 195-212.

Bakiri, Y., V. Burzomato, G. Frugier, N.B. Hamilton, R. Karadottir, and D. Attwell. 2009. Glutamatergic signaling in the brain's white matter. Neuroscience, 158: 266-274.

Ballabh, P., A. Braun, and M. Nedergaard. 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. Neurobiol. Dis., 16: 1-13.

Bano, D., K.W. Young, C.J. Guerin, R. Lefeuvre, N.J. Rothwell, L. Naldini, R. Rizzuto, E. Carafoli, and P. Nicotera. 2005. Cleavage of the plasma membrane Na+/Ca2+ exchanger in excitotoxicity. Cell, 120: 275-285.

Baranowski, E., C.M. Ruiz-Jarabo, and E. Domingo. 2001. Evolution of cell recognition by viruses. Science, 292: 1102-1105.

Beasley, D.W., M.C. Whiteman, S. Zhang, C.Y. Huang, B.S. Schneider, D.R. Smith, G.D. Gromowski, S. Higgs, R.M. Kinney, and A.D. Barrett. 2005. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. J. Virol., 79: 8339-8347.

Bechmann, I., J. Goldmann, A.D. Kovac, E. Kwidzinski, E. Simburger, F. Naftolin, U. Dirnagl, R. Nitsch, and J. Priller. 2005. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. FASEB J., 19: 647-649.

Ben-Ari, Y. 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. Neuroscience, 14: 375-403.

Bender, S.J., and S.R. Weiss. 2010. Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 5: 336-354.

Billaud, J.N., C. Ly, T.R. Phillips, and J.C. de la Torre. 2000. Borna disease virus persistence causes inhibition of glutamate uptake by feline primary cortical astrocytes. J. Virol., 74: 10438-10446.

Binder, G.K., and D.E. Griffin. 2003. Immune-mediated clearance of virus from the central nervous system. Microbes Infect.,5: 439-448.

Blakely, P.K., B.K. Kleinschmidt-DeMasters, K.L. Tyler, and D.N. Irani. 2009. Disrupted glutamate transporter expression in the spinal cord with acute flaccid paralysis caused by West Nile virus infection. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 68: 1061-1072.

Blau, D.M., and K.V. Holmes. 2001. Human coronavirus HCoV-229E enters susceptible cells via the endocytic pathway. Adv. Exp. Med. Biol., 494: 193-198.

Bogaert, E., C. d'Ydewalle, and L. Van Den Bosch. 2010. Amyotrophic lateral sclerosis and excitotoxicity: from pathological mechanism to therapeutic target. CNS Neurol. Disord. Drug Targets, 9: 297-304.

Boldyrev, A.A., E.A. Bryushkova, and E.A. Vladychenskaya. 2012. NMDA receptors in immune competent cells. Biochemistry, 77: 128-134.

Bolton, C., and C. Paul. 2006. Glutamate receptors in neuroinflammatory demyelinating disease. Mediators Inflamm., 2006: 93684.

Bonavia, A., N. Arbour, V.W. Yong, and P.J. Talbot. 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. J. Virol., 71: 800-806.

Bosch, B.J., R. van der Zee, C.A. de Haan, and P.J. Rottier. 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., F. Denis, P. Duquette, and P.J. Talbot. 2001. Generation from multiple sclerosis patients of long-term T-cell clones that are activated by both human coronavirus and myelin antigens. Adv. Exp. Med. Biol., 494: 355-362.

Boucher, A., M. Desforges, P. Duquette, and P.J. Talbot. 2007. Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. Clin. Immunol., 123: 258-267.

Bradley, J., S.R. Carter, V.R. Rao, J. Wang, and S. Finkbeiner. 2006. Splice variants of the NR1 subunit differentially induce NMDA receptor-dependent gene expression. J. Neurosci., 26: 1065-1076.

Breslin, J.J., I. Mork, M.K. Smith, L.K. Vogel, E.M. Hemmila, A. Bonavia, P.J. Talbot, H. Sjostrom, O. Noren, and K.V. Holmes. 2003. Human coronavirus 229E: receptor binding domain and neutralization by soluble receptor at 37 degrees C. J. Virol., 77: 4435-4438.

Brian, D.A., and R. Baric. 2005. Coronavirus genome structure and replication. In Coronavirus replication and reverse genetics. Ed.: Enjuanes, L. Springer, pp 1-30.

Brison, E., H. Jacomy, M. Desforges, and P.J. Talbot. 2011. Glutamate excitotoxicity is involved in the induction of paralysis in mice after infection by a human coronavirus with a single point mutation in its spike protein. J. Virol., 85: 12464-12473.

Bruneau, E.G., R.E. McCullumsmith, V. Haroutunian, K.L. Davis, and J.H. Meador-Woodruff. 2005. Increased expression of glutaminase and glutamine synthetase mRNA in the thalamus in schizophrenia. Schizophr. Res., 75: 27-34.

Bukrinskaya, A.G., N.K. Vorkunova, and R.A. Narmanbetova. 1980. Rimantadine hydrochloride blocks the second step of influenza virus uncoating. Arch. Virol., 66: 275-282.

Butterworth, R.F. 2001. Glutamate transporter and receptor function in disorders of ammonia metabolism. Ment. Retard. Dev. D. R., 7: 276-279.

Cady, S.D., and M. Hong. 2008. Amantadine-induced conformational and dynamical changes of the influenza M2 transmembrane proton channel. Proc. Natl. Acad. Sci., 105: 1483-1488.

Cady, S.D., J. Wang, Y. Wu, W.F. DeGrado, and M. Hong. 2011. Specific binding of adamantane drugs and direction of their polar amines in the pore of the influenza M2 transmembrane domain in lipid bilayers and dodecylphosphocholine micelles determined by NMR spectroscopy. J. Am. Chem. Soc. 133: 4274-4284.

Callow, K.A. 1985. Effect of specific humoral immunity and some non-specific factors on resistance of volunteers to respiratory coronavirus infection. J. Hyg., 95: 173-189.

Carmen, J., J.D. Rothstein, and D.A. Kerr. 2009. Tumor necrosis factor-alpha modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. Brain Res., 1263: 143-154.

Casiraghi, C., K. Dorovini-Zis, and M.S. Horwitz. 2011. Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. J. Neuroimmunol., 230: 173-177.

Caudle, W.M., and J. Zhang. 2009. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. Exp. Neurol., 220: 230-233.

Cavaliere, F., O. Urra, E. Alberdi, and C. Matute. 2012. Oligodendrocyte differentiation from adult multipotent stem cells is modulated by glutamate. Cell Death Dis., 3: e268.

Chan, R.W., and L.L. Poon. 2013. The emergence of human coronavirus EMC: how scared should we be? MBio., 4: e00191-00113.

Chapagain, M.L., S. Verma, F. Mercier, R. Yanagihara, and V.R. Nerurkar. 2007. Polyomavirus JC infects human brain microvascular endothelial cells independent of serotonin receptor 2A. Virology, 364: 55-63.

Cheah, B.C., S. Vucic, A.V. Krishnan, and M.C. Kiernan. 2010. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. Curr. Med. Chem., 17: 1942-1199.

Cheever, F.S., J.B. Daniels, and et al. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. J. Exp. Med., 90: 181-210.

Chen, C.J., Y.C. Ou, C.Y. Chang, H.C. Pan, S.L. Liao, S.Y. Chen, S.L. Raung, and C.Y. Lai. 2012. Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF-alpha signaling and contributes to neuronal death. Glia, 60: 487-501.

Chu, V.C., and G.R. Whittaker. 2004. Influenza virus entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 18153-18158.

Chung, R.S., G.H. McCormack, A.E. King, A.K. West, and J.C. Vickers. 2005. Glutamate induces rapid loss of axonal neurofilament proteins from cortical neurons in vitro. Exp. Neurol., 193: 481-488.

Cisneros, I.E., and A. Ghorpade. 2012. HIV-1, methamphetamine and astrocyte glutamate regulation: combined excitotoxic implications for neuro-AIDS. Curr. HIV Res., 10: 392-406.

Clay, C.C., D.S. Rodrigues, Y.S. Ho, B.A. Fallert, K. Janatpour, T.A. Reinhart, and U. Esser. 2007. Neuroinvasion of fluorescein-positive monocytes in acute simian immunodeficiency virus infection. J. Virol., 81: 12040-12048.

Collard, C.D., K.A. Park, M.C. Montalto, S. Alapati, J.A. Buras, G.L. Stahl, and S.P. Colgan. 2002. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. J. Biol. Chem., 277: 14801-14811.

Collins, A.R. 2002. In vitro detection of apoptosis in monocytes/macrophages infected with human coronavirus. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 9: 1392-1395.

Coulter, D.A., and T. Eid. 2012. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. Glia, 60: 1215-1226.

Cowley, T.J., S.Y. Long, and S.R. Weiss. 2010. The murine coronavirus nucleocapsid gene is a determinant of virulence. J. Virol., 84: 1752-1763.

Coyle, J.T. 2004. The GABA-glutamate connection in schizophrenia: which is the proximate cause? Biochem. Pharmacol., 68: 1507-1514.

Coyne, C.B., K.S. Kim, and J.M. Bergelson. 2007. Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. EMBO J., 26: 4016-4028.

Cristallo, A., F. Gambaro, G. Biamonti, P. Ferrante, M. Battaglia, and P.M. Cereda. 1997. Human coronavirus polyadenylated RNA sequences in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. New Microbiol., 20: 105-114.

Cull-Candy, S., S. Brickley, and M. Farrant. 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. Curr. Opin. Neurobiol., 11: 327-335.

Cullen, B.R. 2001. Journey to the center of the cell. Cell, 105: 697-700.

Curanovic, D., and L. Enquist. 2009. Directional transneuronal spread of alpha-herpesvirus infection. Future Virol., 4: 591.

Dales, S. 1995. Factors controlling coronavirus infections and disease of the central nervous system. A review. Adv. Exp. Med. Biol., 380: 13-22.

Dallasta, L.M., L.A. Pisarov, J.E. Esplen, J.V. Werley, A.V. Moses, J.A. Nelson, and C.L. Achim. 1999. Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. Am. J. Pathol., 155: 1915-1927.

Danbolt, N.C. 2001. Glutamate uptake. Prog. Neurobiol., 65: 1-105.

Daniel, C., R. Anderson, M.J. Buchmeier, J.O. Fleming, W.J. Spaan, H. Wege, and P.J. Talbot. 1993. Identification of an immunodominant linear neutralization domain on the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein and evidence that it forms part of complex tridimensional structure. J. Virol., 67: 1185-1194.

Darman, J., S. Backovic, S. Dike, N.J. Maragakis, C. Krishnan, J.D. Rothstein, D.N. Irani, and D.A. Kerr. 2004. Viral-induced spinal motor neuron death is non-cell-autonomous and involves glutamate excitotoxicity. J. Neurosci., 24: 7566-7575.

Das Sarma, J., L. Fu, S.R. Weiss, and E. Lavi. 2001. Demyelination determinants in the S gene of MHV. Adv. Exp. Med. Biol., 494: 133-137.

Davies, H.A., and M.R. Macnaughton. 1979. Comparison of the morphology of three coronaviruses. Arch. Virol., 59: 25-33.

de Groot, R.J., S.C. Baker, R.S. Baric, L. Enjuanes, K.V. Holmes, S. Perlman, L. Poon, P.J.M. Rottier, P.J. Talbot, P.C.Y. Woo, and J. Ziebuhr. 2012. In Virus taxonomy: ninth report of the International

Committee on Taxonomy of Viruses. Ed.: King, A. M. Q., Adams M. J., Lefkowitz, E. Elsevier, pp 783-1196.

de Groot, R.J., S.C. Baker, R.S. Baric, C.S. Brown, C. Drosten, L. Enjuanes, R.A. Fouchier, M. Galiano, A.E. Gorbalenya, Z.A. Memish, S. Perlman, L.L. Poon, E.J. Snijder, G.M. Stephens, P.C. Woo, A.M. Zaki, M. Zambon, and J. Ziebuhr. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. J. Virol., 87:7790-7792.

de Haan, C.A., Z. Li, E. te Lintelo, B.J. Bosch, B.J. Haijema, and P.J. Rottier. 2005. Murine coronavirus with an extended host range uses heparan sulfate as an entry receptor. J. Virol., 79: 14451-14456.

de Haan, C.A., M. Smeets, F. Vernooij, H. Vennema, and P.J. Rottier. 1999. Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. J. Virol., 73: 7441-7452.

de Haan, C.A., K. Stadler, G.J. Godeke, B.J. Bosch, and P.J. Rottier. 2004. Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. J. Virol., 78: 6048-6054.

de Haan, C.A.M., B.J. Haijema, P. Schellen, P.W. Schreur, E.T. Lintelo, H. Vennema, and P.J.M. Rottier. 2008. Cleavage of group 1 coronavirus spike proteins: How furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation. J. Virol., 82: 6078-6083.

de Monasterio-Schrader, P., O. Jahn, S. Tenzer, S.P. Wichert, J. Patzig, and H.B. Werner. 2012. Systematic approaches to central nervous system myelin. Cell. Mol. Life Sci., 69: 2879-2894.

Deane, R., and B.V. Zlokovic. 2007. Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. 4: 191-197.

Delmas, B., J. Gelfi, R. L'Haridon, L.K. Vogel, H. Sjostrom, O. Noren, and H. Laude. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. Nature, 357: 417-420.

Denison, M.R., R.L. Graham, E.F. Donaldson, L.D. Eckerle, and R.S. Baric. 2011. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. RNA biol., 8: 270-279.

Desforges, M., J. Desjardins, C. Zhang, and P.J. Talbot. 2013a. The acetyl-esterase activity of the hemagglutinin-esterase protein of human coronavirus OC43 strongly enhances the production of infectious virus. J. Virol., 87: 3097-3107.

Desforges, M., D.J. Favreau, E. Brison, J. Desjardins, M. Messen-Pinard, H. Jacomy, and P.J. Talbot. 2013b. Human coronavirus: respiratory pathogens revisited as infectious neuroinvasive, neurotropic, and neurovirulent agents. In Neuroviral Infections: Rna Viruses and Retroviruses. Ed.: S.K. Singh, and D. Ruzek. CRC PressI Llc, pp 93-121.

Desforges, M., T.C. Miletti, M. Gagnon, and P.J. Talbot. 2007. Activation of human monocytes after infection by human coronavirus 229E. Virus Res., 130: 228-240.

Domercq, M., N. Vazquez-Villoldo, and C. Matute. 2013. Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. Front. Cellular Neurosci., 7: 49.

Drevets, D.A., and P.J. Leenen. 2000. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. Microbes Infect., 2: 1609-1618.

Duckert, P., S. Brunak, and N. Blom. 2004. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. Protein Eng. Des. Sel., 17: 107-112.

Eid, T., J. Hammer, E. Runden-Pran, B. Roberg, M.J. Thomas, K. Osen, S. Davanger, P. Laake, I.A. Torgner, T.S. Lee, J.H. Kim, D.D. Spencer, O.P. Ottersen, and N.C. de Lanerolle. 2007. Increased expression of phosphate-activated glutaminase in hippocampal neurons in human mesial temporal lobe epilepsy. Acta Neuropathol., 113: 137-152.

Erdmann, N., J. Zhao, A.L. Lopez, S. Herek, N. Curthoys, T.D. Hexum, T. Tsukamoto, D. Ferraris, and J. Zheng. 2007. Glutamate production by HIV-1 infected human macrophage is blocked by the inhibition of glutaminase. J. Neurochem., 102: 539-549.

Evans, D.T., and R.C. Desrosiers. 2001. Immune evasion strategies of the primate lentiviruses. Immunol. Rev., 183: 141-158.

Fallarino, F., C. Volpi, F. Fazio, S. Notartomaso, C. Vacca, C. Busceti, S. Bicciato, G. Battaglia, V. Bruno, P. Puccetti, M.C. Fioretti, F. Nicoletti, U. Grohmann, and R. Di Marco. 2010. Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation. Nat. Med., 16: 897-902.

Fang, X., L. Ye, K.A. Timani, S. Li, Y. Zen, M. Zhao, H. Zheng, and Z. Wu. 2005. Peptide domain involved in the interaction between membrane protein and nucleocapsid protein of SARS-associated coronavirus. J. Biochem. Mol. Biol., 38: 381-385.

Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Trends Immunol., 28: 138-145.

Favreau, D.J., M. Desforges, J.R. St-Jean, and P.J. Talbot. 2009. A human coronavirus OC43 variant harboring persistence-associated mutations in the S glycoprotein differentially induces the unfolded protein response in human neurons as compared to wild-type virus. Virology, 395: 255-267.

Favreau, D.J., M. Meessen-Pinard, M. Desforges, and P.J. Talbot. 2012. Human coronavirus-induced neuronal programmed cell death is cyclophilin d dependent and potentially caspase dispensable. J. Virol., 86: 81-93.

Fazakerley, J.K., and M.J. Buchmeier. 1993. Pathogenesis of virus-induced demyelination. Adv. Virus Res., 42: 249-324.

Fiumelli, H., I.M. Riederer, J.L. Martin, and B.M. Riederer. 2008. Phosphorylation of neurofilament subunit NF-M is regulated by activation of NMDA receptors and modulates cytoskeleton stability and neuronal shape. Cell Motil. Cytoskeleton, 65: 495-504.

Fotheringham, J., E.L. Williams, N. Akhyani, and S. Jacobson. 2008. Human herpesvirus 6 (HHV-6) induces dysregulation of glutamate uptake and transporter expression in astrocytes. J. Neuroimmune Pharmacol., 3: 105-116.

Fribley, A., K. Zhang, and R.J. Kaufman. 2009. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. Methods Mol. Biol., 559: 191-204.

Fu, B.M. 2012. Experimental methods and transport models for drug delivery across the blood-brain barrier. Curr. Pharm. Biotechnol., 13: 1346-1359.

Fu, L., D.M. Gonzales, J. Das Sarma, and E. Lavi. 2004. A combination of mutations in the S1 part of the spike glycoprotein gene of coronavirus MHV-A59 abolishes demyelination. J. Neurovirol., 10: 41-51.

Fujinami, R.S., M.G. von Herrath, U. Christen, and J.L. Whitton. 2006. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. Clin. Microbiol. Rev., 19: 80-94.

Gallagher, T.M., and M.J. Buchmeier. 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. Virology, 279: 371-374.

Garg, A.D., A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Vandenabeele, D.V. Krysko, and P. Agostinis. 2012. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? Trends Mol. Med., 18: 589-598.

Gelinas, A.M., M. Boutin, A.M. Sasseville, and S. Dea. 2001. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. Virus Res., 76: 43-57.

Gonsette, R.E. 2008. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. J. Neurol. Sci., 274: 48-53.

Gonzales-Scarano, F. 2002. Viral persistence. In Viral pathogenesis and immunity. Ed.: Nathanson N., pp 114-129.

Gotow, T. 2000. Neurofilaments in health and disease. Med. electron microsc., 33: 173-199.

Graham, R.L., and R.S. Baric. 2010. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. J. Virol., 84: 3134-3146.

Gralinski, L.E., S.L. Ashley, S.D. Dixon, and K.R. Spindler. 2009. Mouse adenovirus type 1-induced breakdown of the blood-brain barrier. J. Virol., 83: 9398-9410.

Greene, I.P., E.Y. Lee, N. Prow, B. Ngwang, and D.E. Griffin. 2008. Protection from fatal viral encephalomyelitis: AMPA receptor antagonists have a direct effect on the inflammatory response to infection. Proc. Natl. Acad. Sci., 105: 3575-3580.

Griffin, D.E. 2003. Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. Nat. Rev. Immunol., 3: 493-502.

Griffiths, M.R., P. Gasque, and J.W. Neal. 2010. The regulation of the CNS innate immune response is vital for the restoration of tissue homeostasis (repair) after acute brain injury: a brief review. Int. J. Inflam., 2010: 151097.

Gruslin, E., S. Moisan, Y. St-Pierre, M. Desforges, and P.J. Talbot. 2005. Transcriptome profile within the mouse central nervous system and activation of myelin-reactive T cells following murine coronavirus infection. J. Neuroimmunol., 162: 60-70.

Guyton, A.C. 1989. Anatomie et physiologie du système nerveux. Traduction et adaptation de l'anglais. Québec: Décarie éditeur inc., 423 pp.

Haberland, C. 2007. Clinical neuropathology: text and color atlas. Demos Medical Publishing, New York. 324 pp.

Haijema, B.J., H. Volders, and P.J. Rottier. 2003. Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. J. Virol., 77: 4528-4538.

Hamo, L., S.A. Stohlman, M. Otto-Duessel, and C.C. Bergmann. 2007. Distinct regulation of MHC molecule expression on astrocytes and microglia during viral encephalomyelitis. Glia, 55: 1169-1177.

Hamre, D., and J.J. Procknow. 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121: 190-193.

Haring, J., and S. Perlman. 2001. Mouse hepatitis virus. Curr. Opin. Microbiol., 4: 462-466.

Hasnain, S.Z., R. Lourie, I. Das, A.C. Chen, and M.A. McGuckin. 2012. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. Immunol. Cell Biol., 90: 260-270.

Hatterer, E., N. Davoust, M. Didier-Bazes, C. Vuaillat, C. Malcus, M.F. Belin, and S. Nataf. 2006. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. Blood, 107: 806-812.

Hawkins, R.A. 2009. The blood-brain barrier and glutamate. Am. J. Clin. Nutr., 90: 867S-874S.

Heath, P.R., and P.J. Shaw. 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve, 26: 438-458.

Hegyi, A., and A.F. Kolb. 1998. Characterization of determinants involved in the feline infectious peritonitis virus receptor function of feline aminopeptidase N. J. Gen. Virol., 79: 1387-1391.

Heidinger, V., P. Manzerra, X.Q. Wang, U. Strasser, S.P. Yu, D.W. Choi, and M.M. Behrens. 2002. Metabotropic glutamate receptor 1-induced upregulation of NMDA receptor current: mediation through the Pyk2/Src-family kinase pathway in cortical neurons. J. Neurosci., 22: 5452-5461.

Hingley, S.T., I. Leparc-Goffart, and S.R. Weiss. 1998. The mouse hepatitis virus A59 spike protein is not cleaved in primary hepatocyte and glial cell cultures. Adv. Exp. Med. Biol., 440: 529-535.

Hofmann, H., and S. Pohlmann. 2004. Cellular entry of the SARS coronavirus. Trends Microbiol., 12: 466-472.

Hofmann, H., K. Pyrc, L. van der Hoek, M. Geier, B. Berkhout, and S. Pohlmann. 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. Proc. Natl. Acad. Sci., 102: 7988-7993.

Holland, J.J., S.I.T. Kennedy, B.L. Semler, C.L. Jones, L. Roux, and E.A. Grabau. 1980. Defective interfering RNA viruses and the host-cell response. In Comprehensive virology. Springer, pp 137-192.

Homma, M., and M. Ouchi. 1973. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. 3. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. J. Virol., 12: 1457-1465.

Honjo, K., R. van Reekum, and N.P. Verhoeff. 2009. Alzheimer's disease and infection: do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease? Alzheimer's Dement., 5: 348-360.

Houtman, J.J., and J.O. Fleming. 1996a. Dissociation of demyelination and viral clearance in congenitally immunodeficient mice infected with murine coronavirus JHM. J. Neurovirol., 2: 101-110.

Houtman, J.J., and J.O. Fleming. 1996b. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. J. Neurovirol., 2: 361-376.

Hu, S., W.S. Sheng, L.C. Ehrlich, P.K. Peterson, and C.C. Chao. 2000. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. Neuroimmunomodulation, 7: 153-159.

Huang, T.L., and M.K. O'Banion. 1998. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha suppress dexamethasone induction of glutamine synthetase in primary mouse astrocytes. J. Neurochem., 71: 1436-1442.

Hugon, J., J.M. Vallat, and M. Dumas. 1996. [Role of glutamate and excitotoxicity in neurologic diseases]. Rev. Neurol., 152: 239-248.

Iacono, K.T., L. Kazi, and S.R. Weiss. 2006. Both spike and background genes contribute to murine coronavirus neurovirulence. J. Virol., 80: 6834-6843.

Ickes, D.E., T.M. Venetta, Y. Phonphok, and K.S. Rosenthal. 1990. Tromantadine inhibits a late step in herpes simplex virus type 1 replication and syncytium formation. Antiviral Res., 14: 75-85.

Ito, N., E.C. Mossel, K. Narayanan, V.L. Popov, C. Huang, T. Inoue, C.J. Peters, and S. Makino. 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. J. Virol., 79: 3182-3186.

Jacomy, H., J.R. St-Jean, E. Brison, G. Marceau, M. Desforges, and P.J. Talbot. 2010. Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. J. Neurovirol., 16: 279-293.

Jacomy, H., and P.J. Talbot. 2003. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. Virology, 315: 20-33.

Jacomy, H., and P.J. Talbot. 2006. HCoV-OC43-induced apoptosis of murine neuronal cells. Adv. Exp. Med. Biol., 581: 473-478.

Jang, H., D.A. Boltz, R.G. Webster, and R.J. Smeyne. 2009. Viral parkinsonism. Biochim. Biophys. Acta., 1792: 714-721.

Jeffers, S.A., S.M. Tusell, L. Gillim-Ross, E.M. Hemmila, J.E. Achenbach, G.J. Babcock, W.D. Thomas, Jr., L.B. Thackray, M.D. Young, R.J. Mason, D.M. Ambrosino, D.E. Wentworth, J.C. Demartini, and K.V. Holmes. 2004. CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. Proc. Natl. Acad. Sci., 101: 15748-15753.

Johnson, K.A., P.J. Conn, and C.M. Niswender. 2009. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. CNS Neurol. Disord. Drug Targets, 8: 475-491.

Kandel, E.R., J.H. Schwartz, and T.M. Jessell. 2000. Principles of neural science, 4th Edition. McGraw-Hill New York, 1760 p.

Kanmogne, G.D., R.C. Kennedy, and P. Grammas. 2002. HIV-1 gp120 proteins and gp160 peptides are toxic to brain endothelial cells and neurons: possible pathway for HIV entry into the brain and HIV-associated dementia. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 61: 992-1000.

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

Kettenmann, H., U.K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky. 2011. Physiology of microglia. Physiol. Rev., 91: 461-553.

Kreutzberg, G.W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci., 19: 312-318.

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

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

Kunkel, F., and G. Herrler. 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., and P.S. Masters. 2003. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. J. Virol., 77: 4597-4608.

Kvamme, E., B. Roberg, and I.A. Torgner. 2000. Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain. Neurochem. Res., 25: 1407-1419.

Kyuwa, S., K. Yamaguchi, Y. Toyoda, and K. Fujiwara. 1991. Induction of self-reactive T cells after murine coronavirus infection. J. Virol., 65: 1789-1795.

La Spada, A.R. 2009. Memantine strikes the perfect balance. Nat. Med., 15: 1355-1356.

Lachance, C., N. Arbour, N.R. Cashman, and P.J. Talbot. 1998. Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by human coronavirus 229E. J. Virol., 72: 6511-6519.

Ladeby, R., M. Wirenfeldt, D. Garcia-Ovejero, C. Fenger, L. Dissing-Olesen, I. Dalmau, and B. Finsen. 2005. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. Brain Res. Rev., 48: 196-206.

Lai, M.M., and D. Cavanagh. 1997. The molecular biology of coronaviruses. Adv. Virus Res., 48: 1-100.

Langereis, M.A. 2011. Thesis: Viral hemagglutinin-esterases: Mediators of dynamic virion-glycan interactions. In Utrecht University, Amsterdam. 174 p.

Lauring, A.S., and R. Andino. 2010. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. PLoS Pathog., 6: e1001005.

Law, H.K., C.Y. Cheung, H.Y. Ng, S.F. Sia, Y.O. Chan, W. Luk, J.M. Nicholls, J.S. Peiris, and Y.L. Lau. 2005. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. Blood, 106: 2366-2374.

Le Prince, G., P. Delaere, C. Fages, T. Lefrancois, M. Touret, M. Salanon, and M. Tardy. 1995. Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. Neurochem. Res., 20: 859-862.

Lewicki, D.N., and T.M. Gallagher. 2002. Quaternary structure of coronavirus spikes in complex with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule cellular receptors. J. Biol. Chem., 277: 19727-19734.

Li, D., W.B. Lott, K. Lowry, A. Jones, H.M. Thu, and J. Aaskov. 2011a. Defective interfering viral particles in acute dengue infections. PloS one, 6: e19447.

Li, M.H., K. Inoue, H.F. Si, and Z.G. Xiong. 2011b. Calcium-permeable ion channels involved in glutamate receptor-independent ischemic brain injury. Acta Pharmacol. Sin., 32: 734-740.

Li, W., J. Sui, I.C. Huang, J.H. Kuhn, S.R. Radoshitzky, W.A. Marasco, H. Choe, and M. Farzan. 2007. The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2. Virology, 367: 367-374.

Liao, Y., J.P. Tam, and D.X. Liu. 2006. Viroporin activity of SARS-CoV E protein. Adv. Exp. Med. Biol., 581: 199-202.

Libbey, J.E., and R.S. Fujinami. 2011. Neurotropic viral infections leading to epilepsy: focus on Theiler's murine encephalomyelitis virus. Future Virol., 6: 1339-1350.

Lim, K.P., and D.X. Liu. 2001. The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. J. Biol. Chem., 276: 17515-17523.

Limon, A., J.M. Reyes-Ruiz, and R. Miledi. 2012. Loss of functional GABA(A) receptors in the Alzheimer diseased brain. Proc. Natl. Acad. Sci., 109: 10071-10076.

Lin, M.T., D.R. Hinton, N.W. Marten, C.C. Bergmann, and S.A. Stohlman. 1999. Antibody prevents virus reactivation within the central nervous system. J. Immunol., 162: 7358-7368.

Lin, Y.S., T.M. Yeh, C.F. Lin, S.W. Wan, Y.C. Chuang, T.K. Hsu, H.S. Liu, C.C. Liu, R. Anderson, and H.Y. Lei. 2011. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. Exp. Biol. Med., 236: 515-523.

Lipton, H., and D. Gilden. 1996. Viral diseases of the central nervous system: persistent infections. Viral pathogenesis. Ed.: N. Nathanson, P. Lippincott-Raven, pp 853-867.

Lipton, H.L., Z. Liang, S. Hertzler, and K.N. Son. 2007. A specific viral cause of multiple sclerosis: one virus, one disease. Ann. Neurol., 61: 514-523.

Lipton, S.A. 2006. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. Nat. Rev. Drug Discover., 5: 160-170.

Liu, G.J., R. Nagarajah, R.B. Banati, and M.R. Bennett. 2009. Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. Eur. J. Neurosci., 29: 1108-1118.

Liu, X., C. Hunter, H.R. Weiss, and O.Z. Chi. 2010. Effects of blockade of ionotropic glutamate receptors on blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. Neurol. Sci., 31: 699-703.

Lu, W., and K.W. Roche. 2012. Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. Curr. Opin. Neurobiol., 22: 470-479.

Luscher, C., and R.C. Malenka. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). Cold Spring Harb. Perspect.Biol. 4: a005710.

Macnaughton, M.R., H.J. Hasony, M.H. Madge, and S.E. Reed. 1981. Antibody to virus components in volunteers experimentally infected with human coronavirus 229E group viruses. Infect. Immun., 31: 845-849.

Madan, V., J. Garcia Mde, M.A. Sanz, and L. Carrasco. 2005. Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. FEBS Lett., 579: 3607-3612.

Makino, S., J.G. Keck, S.A. Stohlman, and M.M. Lai. 1986. High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. J. Virol., 57: 729-737.

Mann, M.A., K.L. Tyler, D.M. Knipe, and B.N. Fields. 2002. Type 3 reovirus neuroinvasion after intramuscular inoculation: viral genetic determinants of lethality and spinal cord infection. Virology, 303: 213-221.

Maragakis, N.J., and J.D. Rothstein. 2004. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. Neurobiol. Dis., 15: 461-473.

Marquez, J., M. Tosina, V. de la Rosa, J.A. Segura, F.J. Alonso, J.M. Mates, and J.A. Campos-Sandoval. 2009. New insights into brain glutaminases: beyond their role on glutamatergic transmission. Neurochem. Int., 55: 64-70.

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

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

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

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

Matthews, A.E., S.R. Weiss, and Y. Paterson. 2002. Murine hepatitis virus--a model for virus-induced CNS demyelination. J. Neurovirol. 8: 76-85

Matute, C. 2011. Glutamate and ATP signalling in white matter pathology. J. Anat., 219: 53-64.

McCullumsmith, R.E., J. Hammond, A. Funk, and J.H. Meador-Woodruff. 2012. Recent advances in targeting the ionotropic glutamate receptors in treating schizophrenia. Curr. Pharm. Biotechnol., 13: 1535-1542.

McIntosh, K., J.H. Dees, W.B. Becker, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock. 1967. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. Proc. Natl. Acad. Sci., 57: 933-940.

Mekhail, M., G. Almazan, and M. Tabrizian. 2012. Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: a review. Prog. Neurobiol., 96: 322-339.

Meldrum, B.S. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. J. Nutr., 130: 1007S-1015S.

Mettenleiter, T.C. 2003. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. Virus Res., 92: 197-206.

Minakshi, R., K. Padhan, M. Rani, N. Khan, F. Ahmad, and S. Jameel. 2009. The SARS Coronavirus 3a protein causes endoplasmic reticulum stress and induces ligand-independent downregulation of the type 1 interferon receptor. PloS one, 4: e8342.

Mitosek-Szewczyk, K., G. Sulkowski, Z. Stelmasiak, and L. Struzynska. 2008. Expression of glutamate transporters GLT-1 and GLAST in different regions of rat brain during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroscience, 155: 45-52.

Monaco, M.C., W.J. Atwood, M. Gravell, C.S. Tornatore, and E.O. Major. 1996. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. J. Virol., 70: 7004-7012.

Mookherjee, P., P.S. Green, G.S. Watson, M.A. Marques, K. Tanaka, K.D. Meeker, J.S. Meabon, N. Li, P. Zhu, V.G. Olson, and D.G. Cook. 2011. GLT-1 loss accelerates cognitive deficit onset in an Alzheimer's disease animal model. J. Alzheimer's Dis. 26: 447-455.

Mori, I., Y. Nishiyama, T. Yokochi, and Y. Kimura. 2005. Olfactory transmission of neurotropic viruses. J. Neurovirol., 11: 129-137.

Mounir, S., and P.J. Talbot. 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. J. Gen. Virol., 73: 2731-2736.

Muir, K.W. 2006. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. Curr. Opin. Pharmacol., 6: 53-60.

Nag, S. 2011. Morphology and properties of astrocytes. In The Blood-Brain and Other Neural Barriers. Springer, pp 69-100.

Nal, B., C. Chan, F. Kien, L. Siu, J. Tse, K. Chu, J. Kam, I. Staropoli, B. Crescenzo-Chaigne, N. Escriou, S. van der Werf, K.Y. Yuen, and R. Altmeyer. 2005. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. J. Gen. Virol., 86: 1423-1434.

Nargi-Aizenman, J.L., M.B. Havert, M. Zhang, D.N. Irani, J.D. Rothstein, and D.E. Griffin. 2004. Glutamate receptor antagonists protect from virus-induced neural degeneration. Ann. Neurol., 55: 541-549.

Navas-Martin, S., S.T. Hingley, and S.R. Weiss. 2005. Murine coronavirus evolution *in vivo*: functional compensation of a detrimental amino acid substitution in the receptor binding domain of the spike glycoprotein. J. Virol., 79: 7629-7640.

Navas, S., S.H. Seo, M.M. Chua, J. Das Sarma, E. Lavi, S.T. Hingley, and S.R. Weiss. 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., and S.R. Weiss. 2003. Murine coronavirus-induced hepatitis: JHM genetic background eliminates A59 spike-determined hepatotropism. J. Virol., 77: 4972-4978.

Neumann, H., I.M. Medana, J. Bauer, and H. Lassmann. 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. Trends Neurosci. 25:313-319.

Nicholls, D.G., L. Johnson-Cadwell, S. Vesce, M. Jekabsons, and N. Yadava. 2007. Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. J. Neurosci. Res., 85: 3206-3212.

Nicoll, M.P., J.T. Proenca, and S. Efstathiou. 2012. The molecular basis of herpes simplex virus latency. FEMS Microbiol. Rev., 36: 684-705.

Noda, M., H. Nakanishi, and N. Akaike. 1999. Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. Neuroscience, 92: 1465-1474.

Notkins, A.L., and M.B. Oldstone. 1986. Concepts in viral pathogenesis II. New York, NY; Springer-Verlag New York Inc., United States. 420 pp.

Oby, E., and D. Janigro. 2006. The blood-brain barrier and epilepsy. Epilepsia, 47: 1761-1774.

Okada, K., U. Yamashita, and S. Tsuji. 2005. Modulation of Na(+)-dependent glutamate transporter of murine astrocytes by inflammatory mediators. J. UOEH., 27: 161-170.

Olney, J.W. 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science, 164: 719-721.

Ontiveros, E., T.S. Kim, T.M. Gallagher, and S. Perlman. 2003. Enhanced virulence mediated by the murine coronavirus, mouse hepatitis virus strain JHM, is associated with a glycine at residue 310 of the spike glycoprotein. J. Virol., 77: 10260-10269.

Ortego, J., D. Escors, H. Laude, and L. Enjuanes. 2002. Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. J. Virol., 76: 11518-11529.

Owen, R.T. 2013. Perampanel: a novel antiepileptic for the adjunctive treatment of refractory partial onset seizures. Drugs Today, 49: 23-31.

Owens, G.P., D. Gilden, M.P. Burgoon, X. Yu, and J.L. Bennett. 2011. Viruses and multiple sclerosis. Neuroscientist, 17: 659-676.

Pacheco, R., H. Oliva, J.M. Martinez-Navio, N. Climent, F. Ciruela, J.M. Gatell, T. Gallart, J. Mallol, C. Lluis, and R. Franco. 2006. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. J. Immunol., 177: 6695-6704.

Palmada, M., and J.J. Centelles. 1998. Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. Front. Biosci., 3: d701-718.

Paoletti, P., and J. Neyton. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Curr. Opin. Pharmacol., 7: 39-47.

Paulose, C., K. Amee, and J. Anu. 2007. Neurotransmitter Functional Role in Neurodegenerative Diseases: human Health. In Environment and human health. Ed.: P. Natarajan, C.S. Paulose, I.S. Bright Singh, and K. Pillai Raji, pp 19-26.

Pedemonte, E., G. Mancardi, D. Giunti, A. Corcione, F. Benvenuto, V. Pistoia, and A. Uccelli. 2006. Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases. Pharmacol. Ther., 111: 555-566.

Peiris, J.S., Y. Guan, and K.Y. Yuen. 2004. Severe acute respiratory syndrome. Nat. Med., 10: S88-97.

Perry, E.K. 1991. Neurotransmitters and diseases of the brain. Br. J. Hosp. Med., 45: 73-83.

Petroff, O.A. 2002. GABA and glutamate in the human brain. Neuroscientist, 8: 562-573.

Petzold, A. 2005. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. J. Neurol. Sci., 233: 183-198.

Phillips, J.J., M. Chua, S.H. Seo, and S.R. Weiss. 2001a. Multiple regions of the murine coronavirus spike glycoprotein influence neurovirulence. J. Neurovirol., 7: 421-431.

Phillips, J.J., M.M. Chua, E. Lavi, and S.R. Weiss. 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., M.M. Chua, G.F. Rall, and S.R. Weiss. 2002. Murine coronavirus spike glycoprotein mediates degree of viral spread, inflammation, and virus-induced immunopathology in the central nervous system. Virology, 301: 109-120.

Phillips, J.J., and S.R. Weiss. 2001b. MHV neuropathogenesis: the study of chimeric S genes and mutations in the hypervariable region. Adv. Exp. Med. Biol., 494: 115-119.

Pond, S.L., B. Murrell, and A.F. Poon. 2012. Evolution of viral genomes: interplay between selection, recombination, and other forces. Methods Mol. Biol., 856: 239-272.

Poole, B.D., R.H. Scofield, J.B. Harley, and J.A. James. 2006. Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. Autoimmunity, 39: 63-70.

Popova, R., and X. Zhang. 2002. The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. Virology, 294: 222-236.

Porcheray, F., C. Leone, B. Samah, A.C. Rimaniol, N. Dereuddre-Bosquet, and G. Gras. 2006. Glutamate metabolism in HIV-infected macrophages: implications for the CNS. American journal of physiology. Cell physiology, 291: C618-626.

Proper, E.A., G. Hoogland, S.M. Kappen, G.H. Jansen, M.G. Rensen, L.H. Schrama, C.W. van Veelen, P.C. van Rijen, O. van Nieuwenhuizen, W.H. Gispen, and P.N. de Graan. 2002. Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. Brain, 125: 32-43.

Prow, N.A., and D.N. Irani. 2008. The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis. J. Neurochem., 105: 1276-1286.

Przedborski, S., H. Mitsumoto, and L.P. Rowland. 2003. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis research. Curr. Neurol. Neurosci. Rep., 3: 70-77.

Pulzova, L., M.R. Bhide, and K. Andrej. 2009. Pathogen translocation across the blood-brain barrier. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 57: 203-213.

Ramonet, D., M.J. Rodriguez, K. Fredriksson, F. Bernal, and N. Mahy. 2004. *In vivo* neuroprotective adaptation of the glutamate/glutamine cycle to neuronal death. Hippocampus, 14: 586-594.

Reitter, J.N., R.E. Means, and R.C. Desrosiers. 1998. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. Nat. Med., 4: 679-684.

Revett, T.J., G.B. Baker, J. Jhamandas, and S. Kar. 2013. Glutamate system, amyloid ss peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. J. Psychiatry Neurosci., 38: 6-23.

Ribeiro, F.M., M. Paquet, S.P. Cregan, and S.S. Ferguson. 2010. Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease. CNS Neurol. Disord. Drug Targets, 9: 574-595.

Rogawski, M.A. 2011. Revisiting AMPA receptors as an antiepileptic drug target. Epilepsy Curr., 11: 56-63.

Romo-Gonzalez, T., A. Chavarria, and H.J. Perez. 2012. Central nervous system: a modified immune surveillance circuit? Brain. Behav. Immun., 26: 823-829.

Ronnback, L., and E. Hansson. 2004. On the potential role of glutamate transport in mental fatigue. J. Neuroinflammation, 1:22.

Rosati, A., P.L. Poliani, A. Todeschini, M. Cominelli, D. Medicina, M. Cenzato, E.L. Simoncini, S.M. Magrini, M. Buglione, S. Grisanti, and A. Padovani. 2013. Glutamine synthetase expression as a valuable marker of epilepsy and longer survival in newly diagnosed glioblastoma multiforme. Neuro-oncology, 15: 618-625.

Rosenthal, K.S., M.S. Sokol, R.L. Ingram, R. Subramanian, and R.C. Fort. 1982. Tromantadine: inhibitor of early and late events in herpes simplex virus replication. Antimicrob. Agents Chemother., 22: 1031-1036.

Roth-Cross, J.K., H. Stokes, G. Chang, M.M. Chua, V. Thiel, S.R. Weiss, A.E. Gorbalenya, and S.G. Siddell. 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., K. Nakamura, P. Schellen, H. Volders, and B.J. Haijema. 2005. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. J. Virol., 79: 14122-14130.

Rowe, C.L., S.C. Baker, M.J. Nathan, and J.O. Fleming. 1997. Evolution of mouse hepatitis virus: detection and characterization of spike deletion variants during persistent infection. J. Virol., 71: 2959-2969.

Rowley, N.M., K.K. Madsen, A. Schousboe, and H. Steve White. 2012. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. Neurochem. Int., 61: 546-558.

Saeki, K., N. Ohtsuka, and F. Taguchi. 1997. Identification of spike protein residues of murine coronavirus responsible for receptor-binding activity by use of soluble receptor-resistant mutants. J. Virol., 71: 9024-9031.

Sakka, L., G. Coll, and J. Chazal. 2011. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. Eur. Ann. otorhinolaryngol. Head Neck Dis., 128: 309-316.

Salinas, S., G. Schiavo, and E.J. Kremer. 2010. A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. Nat. Rev. Microbiol., 8: 645-655.

Salmi, A., B. Ziola, T. Hovi, and M. Reunanen. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. Neurology, 32: 292-295.

Sanelli, T., W. Ge, C. Leystra-Lantz, and M.J. Strong. 2007. Calcium mediated excitotoxicity in neurofilament aggregate-bearing neurons in vitro is NMDA receptor dependant. J. Neurol. Sci., 256: 39-51.

Santucci, D.M., and S. Raghavachari. 2008. The effects of NR2 subunit-dependent NMDA receptor kinetics on synaptic transmission and CaMKII activation. PLoS Comput Biol., 4: e1000208.

Schelle, B., N. Karl, B. Ludewig, S.G. Siddell, and V. Thiel. 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. J. Virol., 79: 6620-6630.

Schmidt, I., M. Skinner, and S. Siddell. 1987. Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM. J. Gen. Virol., 68: 47-56.

Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J. Leukoc. Biol., 75: 163-189.

Schwegmann-Wessels, C., and G. Herrler. 2006. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. Glycoconj. J., 23: 51-58.

Sgado, P., M. Dunleavy, S. Genovesi, G. Provenzano, and Y. Bozzi. 2011. The role of GABAergic system in neurodevelopmental disorders: a focus on autism and epilepsy. Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol., 3: 223-235.

Shen, X., and G. Xu. 2009. Role of IL-1beta on the glutamine synthetase in retinal Muller cells under high glucose conditions. Curr. Eye Res., 34: 727-736.

Shim, J., T. Umemura, E. Nothstein, and C. Rongo. 2004. The unfolded protein response regulates glutamate receptor export from the endoplasmic reticulum. Mol. Biol. Cell, 15: 4818-4828.

Shirato, K., H. Miyoshi, A. Goto, Y. Ako, T. Ueki, H. Kariwa, and I. Takashima. 2004. Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. J. Gen. Virol., 85: 3637-3645.

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

Spooren, W., T. Ballard, F. Gasparini, M. Amalric, V. Mutel, and R. Schreiber. 2003. Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. Behav. Pharmacol., 14: 257-277.

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

St-Jean, J.R., M. Desforges, and P.J. Talbot. 2006b. Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. Adv. Exp. Med. Biol., 581: 499-502.

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

Stadler, K., V. Masignani, M. Eickmann, S. Becker, S. Abrignani, H.D. Klenk, and R. Rappuoli. 2003. SARS: beginning to understand a new virus. Nat. Rev. Microbiol., 1: 209-218.

Stauber, R., M. Pfleiderera, and S. Siddell. 1993. Proteolytic cleavage of the murine coronavirus surface glycoprotein is not required for fusion activity. J. Gen. Virol., 74: 183-191.

Stevenson, A., D.M. Yates, C. Manser, K.J. De Vos, A. Vagnoni, P.N. Leigh, D.M. McLoughlin, and C.C. Miller. 2009. Riluzole protects against glutamate-induced slowing of neurofilament axonal transport. Neurosci. Lett., 454: 161-164.

Stewart, J.N., S. Mounir, and P.J. Talbot. 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. Virology, 191: 502-505.

Stohlman, S.A., C. Ramakrishna, S.I. Tschen, D.R. Hinton, and C.C. Bergmann. 2002. The art of survival during viral persistence. J. Neurovirol., 8 Suppl 2: 53-58.

Sturman, L.S., K.V. Holmes, and J. Behnke. 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. J. Virol., 33: 449-462.

Supekar, V.M., C. Bruckmann, P. Ingallinella, E. Bianchi, A. Pessi, and A. Carfi. 2004. Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. Proc. Natl. Acad. Sci., 101: 17958-17963.

Szymocha, R., H. Akaoka, M. Dutuit, C. Malcus, M. Didier-Bazes, M.F. Belin, and P. Giraudon. 2000. Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. J. Virol., 74: 6433-6441.

Tabata, T., and M. Kano. 2004. Calcium dependence of native metabotropic glutamate receptor signaling in central neurons. Mol. Neurobiol., 29: 261-270.

Taguchi, F. 1995a. The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding. J. Virol., 69: 7260-7263.

Taguchi, F., H. Kubo, H. Takahashi, and H. Suzuki. 1995b. Localization of neurovirulence determinant for rats on the S1 subunit of murine coronavirus JHMV. Virology, 208: 67-74.

Takeda, M., A. Pekosz, K. Shuck, L.H. Pinto, and R.A. Lamb. 2002. Influenza a virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. J. Virol., 76: 1391-1399.

Talbot, P.J., D. Arnold, and J.P. Antel. 2001. Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 253: 247-271.

Talbot, P.J., J.S. Paquette, C. Ciurli, J.P. Antel, and F. Ouellet. 1996. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. Ann. Neurol., 39: 233-240.

Tan, Y.J., S.G. Lim, and W. Hong. 2005. Characterization of viral proteins encoded by the SARS-coronavirus genome. Antiviral Res., 65: 69-78.

Tanaka, H., S.Y. Grooms, M.V. Bennett, and R.S. Zukin. 2000. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. Brain Res., 886: 190-207.

Tanaka, K., K. Watase, T. Manabe, K. Yamada, M. Watanabe, K. Takahashi, H. Iwama, T. Nishikawa, N. Ichihara, T. Kikuchi, S. Okuyama, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto, and K. Wada. 1997. Epilepsy

and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. Science, 276: 1699-1702.

Tanner, J.A., B.J. Zheng, J. Zhou, R.M. Watt, J.Q. Jiang, K.L. Wong, Y.P. Lin, L.Y. Lu, M.L. He, H.F. Kung, A.J. Kesel, and J.D. Huang. 2005. The adamantane-derived bananins are potent inhibitors of the helicase activities and replication of SARS coronavirus. Chem. Biol., 12: 303-311.

Tian, C., N. Erdmann, J. Zhao, Z. Cao, H. Peng, and J. Zheng. 2008. HIV-infected macrophages mediate neuronal apoptosis through mitochondrial glutaminase. J. Neurochem., 105: 994-1005.

Traynelis, S.F., L.P. Wollmuth, C.J. McBain, F.S. Menniti, K.M. Vance, K.K. Ogden, K.B. Hansen, H. Yuan, S.J. Myers, and R. Dingledine. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol. Rev., 62: 405-496.

Trotti, D., N.C. Danbolt, and A. Volterra. 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? Trends Pharmacol. Sci., 19: 328-334.

Tsai, C.W., S.C. Chang, and M.F. Chang. 1999. A 12-amino acid stretch in the hypervariable region of the spike protein S1 subunit is critical for cell fusion activity of mouse hepatitis virus. J. Biol. Chem., 274: 26085-26090.

Tsunoda, I., and R.S. Fujinami. 2002. Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. Springer Semin. Immunopathol., 24: 105-125.

Tuomanen, E. 1996. Entry of pathogens into the central nervous system. FEMS Microbiol. Rev., 18: 289-299.

Tyler, K.L., and N. Nathanson. 2001. Pathogenesis of viral infection. In Fundamental virology. D.M. Ed.: Knipe. pp 199-243.

Tyrrell, D.A., S. Cohen, and J.E. Schlarb. 1993. Signs and symptoms in common colds. Epidemiol. Infect., 111: 143-156.

Urushitani, M., T. Nakamizo, R. Inoue, H. Sawada, T. Kihara, K. Honda, A. Akaike, and S. Shimohama. 2001. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca(2+) overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca(2+) influx. J. Neurosci. Res., 63: 377-387.

Vabret, A., J. Dina, E. Brison, J. Brouard, and F. Freymuth. 2009. [Human coronaviruses]. Pathol. Biol., 57: 149-160.

van de Sandt, C.E., J.H. Kreijtz, and G.F. Rimmelzwaan. 2012. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. Viruses, 4: 1438-1476.

Van Den Bosch, L., P. Van Damme, E. Bogaert, and W. Robberecht. 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Biochim. Biophys. Acta, 1762: 1068-1082.

Vandenberghe, W., R.A. Nicoll, and D.S. Bredt. 2005. Interaction with the unfolded protein response reveals a role for stargazin in biosynthetic AMPA receptor transport. J. Neurosci., 25: 1095-1102.

Vartiainen, N., T. Tikka, R. Keinanen, P.H. Chan, and J. Koistinaho. 1999. Glutamatergic receptors regulate expression, phosphorylation and accumulation of neurofilaments in spinal cord neurons. Neuroscience, 93: 1123-1133.

Verma, S., M. Kumar, U. Gurjav, S. Lum, and V.R. Nerurkar. 2010. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. Virology, 397: 130-138.

Versteeg, G.A., P.S. van de Nes, P.J. Bredenbeek, and W.J. Spaan. 2007. The coronavirus spike protein induces endoplasmic reticulum stress and upregulation of intracellular chemokine mRNA concentrations. J. Virol., 81: 10981-10990.

Vilhardt, F. 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. Int. J. Biochem. Cell Biol., 37: 17-21.

Virtanen, J.O., and S. Jacobson. 2012. Viruses and multiple sclerosis. CNS Neurol. Disord. Drug Targets, 11: 528-544.

Wadiche, J.I., S.G. Amara, and M.P. Kavanaugh. 1995. Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. Neuron, 15: 721-728.

Wake, H., A.J. Moorhouse, and J. Nabekura. 2011. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. Neuron Glia Biol. 7: 47-53.

Wang, J.Q., E.E. Fibuch, and L. Mao. 2007. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. J. Neurochem., 100: 1-11.

Wang, S., and R.J. Kaufman. 2012. The impact of the unfolded protein response on human disease. J. Cell Biol., 197: 857-867.

Wang, Z., O. Pekarskaya, M. Bencheikh, W. Chao, H.A. Gelbard, A. Ghorpade, J.D. Rothstein, and D.J. Volsky. 2003. Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. Virology, 312: 60-73.

Watanabe, R., H. Wege, and V. ter Meulen. 1983. Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. Nature, 305: 150-153.

Weber, J. 2001. The pathogenesis of HIV-1 infection. Br. Med. Bull., 58: 61-72.

Wentworth, D.E., and K.V. Holmes. 2007. Coronavirus binding and entry. Coronaviruses: molecular and cellular biology. Ed.: V. Thiel. Caister Academic Press, pp 3-32.

Werner, P., D. Pitt, and C.S. Raine. 2000. Glutamate excitotoxicity: a mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis? J. Neural Transm. Suppl., 375-385.

Werner, P., D. Pitt, and C.S. Raine. 2001. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. Ann. Neurol., 50: 169-180.

Wilkins, A., H. Majed, R. Layfield, A. Compston, and S. Chandran. 2003. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. J. Neurosci., 23: 4967-4974.

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

Wilson, M.T., and C.H. Keith. 1998. Glutamate modulation of dendrite outgrowth: alterations in the distribution of dendritic microtubules. J. Neurosci. Res., 52: 599-611.

Wong, D., K. Dorovini-Zis, and S.R. Vincent. 2004. Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. Exp. Neurol., 190: 446-455.

Wright, T.L. 2006. Introduction to chronic hepatitis B infection. Am. J. Gastroenterol., 101 Suppl 1: S1-6.

Wu, G.F., A.A. Dandekar, L. Pewe, and S. Perlman. 2000. CD4 and CD8 T cells have redundant but not identical roles in virus-induced demyelination. J. Immunol., 165: 2278-2286.

Xu, Y., J. Zhu, Y. Liu, Z. Lou, F. Yuan, D.K. Cole, L. Ni, N. Su, L. Qin, X. Li, Z. Bai, J.I. Bell, H. Pang, P. Tien, G.F. Gao, and Z. Rao. 2004. Characterization of the heptad repeat regions, HR1 and HR2, and design of a fusion core structure model of the spike protein from severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. Biochemistry, 43: 14064-14071.

Xue, H., and C.J. Field. 2011. New role of glutamate as an immunoregulator via glutamate receptors and transporters. Front. Biosci. 3: 1007-1020.

Ye, Y., and B.G. Hogue. 2007. Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly. J. Virol., 81: 3597-3607.

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

Yokomori, K., L.R. Banner, and M.M. Lai. 1991. Heterogeneity of gene expression of the hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronaviruses. Virology, 183: 647-657.

Zanetti, G., K.B. Pahuja, S. Studer, S. Shim, and R. Schekman. 2012. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. Nat Cell Biol 14: 20-28.

Zelus, B.D., J.H. Schickli, D.M. Blau, S.R. Weiss, and K.V. Holmes. 2003. Conformational changes in the spike glycoprotein of murine coronavirus are induced at 37 degrees C either by soluble murine CEACAM1 receptors or by pH 8. J. Virol., 77: 830-840.

Zerangue, N., J.L. Arriza, S.G. Amara, and M.P. Kavanaugh. 1995. Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. J. Biol. Chem., 270: 6433-6435.

Zhang, K., and R.J. Kaufman. 2006. Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. Handb. Exp. Pharmacol. 69-91.

Zhao, Z.S., F. Granucci, L. Yeh, P.A. Schaffer, and H. Cantor. 1998. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. Science, 279: 1344-1347.

Ziebuhr, J., E.J. Snijder, and A.E. Gorbalenya. 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. J. Gen. Virol., 81: 853-879.

Zou, J., Y.X. Wang, F.F. Dou, H.Z. Lu, Z.W. Ma, P.H. Lu, and X.M. Xu. 2010. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. Neurochem. Int., 56: 577-584.

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

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

LISTE DES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

LISTE DES PUBLICATIONS

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, AND P.J. TALBOT. «Novel treatment with neuroprotective and antiviral properties against a neuroinvasive human respiratory virus». (Manuscript en révision pour Journal of Virology).

M. DESFORGES, A. LE COUPANEC, **É. BRISON**, M. MEESSEN-PINARD, AND P. J. TALBOT. (2013) « Neuroinvasive and neurotropic human respiratory coronaviruses: potential neurovirulent agents in humans.» in: Advances in Experimental Medicine and Biology (sous presse).

M. DESFORGES, A. LE COUPANEC, **É. BRISON**, M. MEESSEN-PINARD, AND P. J. TALBOT. (2013) « Coronavirus humains respiratoires neuroinvasifs et neurotropes : agents neurovirulents potentiels.» Virologie (sous presse).

DESFORGES, M., D.J. FAVREAU, **É. BRISON**, J. DESJARDINS, M. MEESSEN-PINARD, H. JACOMY, AND P.J. TALBOT (2013) «Human coronaviruses : respiratory pathogens revisited as infectious neuroinvasive, neurotropic and neurovirulent agents.» In: Neuroviral Infections : RNA viruses and retroviruses. Singh, S.K. and Ruzek, D., eds., ISBN 978-1-4665-6720-7, Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., Chap. 5, pp. 93-120 (invité).

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, AND P.J. TALBOT (2011) «Glutamate excitotoxicity is involved in the induction of paralysis in mice after infection by a human coronavirus with a single point mutation in its spike protein.» J. Virol. 85: 12464-12473 (sélectionnée pour mise en valeur, «Spotlight», comme une des cinq publications les plus méritoires de l'édition du journal).

TALBOT, P.J., M. DESFORGES, **É. BRISON**, AND H. JACOMY (2011) «Coronaviruses as encephalitis-inducing infectious agents.» In: Non-Flavivirus Encephalitis. Tkachev, S., ed., Intech – Open Access Publisher. ISBN 978-953-307-307-720-8. Chap. 9, pp.185-202 (invité).

JACOMY, H., J.R. ST-JEAN, **É. BRISON**, G. MARCEAU, M. DESFORGES, AND P.J. TALBOT (2010) «Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus oc43 modulate disease in balb/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination.» J. Neurovirol. 16: 279-293.

LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2013) «A human respiratory coronavirus infection induces motor dysfunctions and paralysis through glutamate excitotoxicity.» Conférence annuelle de la Société canadienne des microbiologistes, Ottawa, Canada, 17-21 juin 2013.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2012) «Glutamate excitotoxicity is involved in motor dysfonctions and paralysis following infection by a human respiratory coronavirus.» 11th International Symposium of Neurovirology, Grand Hyatt New York, New York, 29 mai-2 juin 2012.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2012) «Glutamate excitotoxicity is involved in motor dysfonctions and paralysis following infection by a human respiratory coronavirus.» 7th Neuroinflammation Symposium, Residence Hall, McGill University, Montréal, Québec, 11 mai 2012.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, et P.J. TALBOT (2011) «Implication de l'excitotoxité glutamatergique dans le développement d'une neuropathologie paralytique induite par un coronavirus respiratoire humain.» Congrès Armand-Frappier 2011, Hôtel Estérel Suites et Spa, Estérel, Québec, 17-19 novembre 2011.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2011) «Human coronavirus OC43-induced paralysis in mice is mediated by glutamate excitotoxicity.» 12th International Nidovirus Symposium, Traverse City, Michigan, U.S.A., 4-8 juin 2011.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2010) «Modulation of human coronavirus-induced neuropathology from encephalitis to demyelination.» 5th Neuroinflammation Symposium, Residence Hall, McGill University, Montréal, Québec, 21 mai 2010.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, et P.J. TALBOT (2010) «D'une infection respiratoire à une neuropathologie démyélinisante : un rôle important pour la protéine de surface d'un coronavirus humain.» 78ième congrès annuel de l'Association francophone pour le savoir, Université de Montréal, Montréal, Québec, 10-14 mai 2010.

LISTE DES COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2013) «Glutamate excitotoxicity is involved in motor dysfunctions and paralysis following infection by a human respiratory coronavirus.» 8th Neuroinflammation Symposium, Residence Hall, McGill University, Montréal, Québec, 6 juin 2013.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2012) «Glutamate excitotoxicity is involved in motor dysfonctions and paralysis following infection by a human respiratory coronavirus.» 11th International Symposium of Neurovirology, Grand Hyatt New York, New York, New York, 29 mai – 2 juin 2012.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2012) «Glutamate excitotoxicity is involved in motor dysfonctions and paralysis following infection by a human respiratory coronavirus.» Biotech City 10th Anniversary Symposium, Université de Montréal à Laval, Laval, Québec, 2-3 mai 2012.

TALBOT, P.J., D.J. FAVREAU, **É. BRISON**, M. MEESSEN-PINARD, H. JACOMY, and M. DESFORGES (2011) «Persistence-associated single amino acid residues on the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 influence human neuronal response and neurovirulence in mice.» 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 11 – 16 septembre 2011.

JACOMY, H., N.G. SEIDAH, R. DAY, **É. BRISON**, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2011) «Single amino acid spike protein mutants of human coronavirus OC43 increase or abolish neurovirulence in mice.» 12th International Nidovirus Symposium, Traverse City, Michigan, U.S.A., 4-8 juin 2011.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2011) «Glutamate excitotoxiciy mediates human coronavirus-induced paralysis in mice.» 6th Neuroinflammation Symposium, Residence Hall, McGill University, Montréal, Québec, 13 mai 2011.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2010) « Modulation of human coronavirus-induced neuropathology from encephalitis to demyelination in a MS-relevant animal model. » The Canadian endMS research conference. The Fairmont Chateau Whistler, Whistler, British Columbia, 6-9 décembre 2010.

TALBOT, P.J., J.R. ST-JEAN, **É. BRISON**, G. MARCEAU, M. DESFORGES, and H. JACOMY (2010) « Viral persistence – associated mutations in a surface protein of a human coronavirus modulate disease in mice from encephalitis to flaccid paralysis and inflammatory demyelination. » 10th International Congress of Neuroimmunology, Sitges, Barcelona, Spain, 26-30 octobre 2010.

BRISON, É., H. JACOMY, M. DESFORGES, et P.J. TALBOT (2009) «D'une infection respiratoire à une pathologie démyélinisante : un rôle important pour la protéine de surface du coronavirus humain OC43.» Congrès Armand-Frappier 2009, Château Bromont, Bromont, Québec, 5-7 novembre 2009.

JOURNAL OF VIROLOGY, Dec. 2011, p. 12464–12473 Vol. 85, No. 23
0022-538X/11/$12.00 doi:10.1128/JVI.05576-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Glutamate Excitotoxicity Is Involved in the Induction of Paralysis in Mice after Infection by a Human Coronavirus with a Single Point Mutation in Its Spike Protein[▽]

Elodie Brison, Hélène Jacomy, Marc Desforges, and Pierre J. Talbot*

Laboratory of Neuroimmunovirology, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Received 30 June 2011/Accepted 15 September 2011

Human coronaviruses (HCoV) are recognized respiratory pathogens, and some strains, including HCoV-OC43, can infect human neuronal and glial cells of the central nervous system (CNS) and activate neuroinflammatory mechanisms. Moreover, HCoV-OC43 is neuroinvasive, neurotropic, and neurovirulent in susceptible mice, where it induces chronic encephalitis. Herein, we show that a single point mutation in the viral spike (S) glycoprotein (Y241H), acquired during viral persistence in human neural cells, led to a hind-limb paralytic disease in infected mice. Inhibition of glutamate excitotoxicity using a 2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propranoic acid (AMPA) receptor antagonist (GYKI-52466) improved clinical scores related to the paralysis and motor disabilities in S mutant virus-infected mice, as well as protected the CNS from neuronal dysfunctions, as illustrated by restoration of the phosphorylation state of neurofilaments. Expression of the glial glutamate transporter GLT-1, responsible for glutamate homeostasis, was downregulated following infection, and GYKI-52466 also significantly restored its steady-state expression level. Finally, GYKI-52466 treatment of S mutant virus-infected mice led to reduced microglial activation, which may lead to improvement in the regulation of CNS glutamate homeostasis. Taken together, our results strongly suggest an involvement of excitotoxicity in the paralysis-associated neuropathology induced by an HCoV-OC43 mutant which harbors a single point mutation in its spike protein that is acquired upon persistent virus infection.

Coronaviruses form a family of ubiquitous enveloped RNA viruses that induce respiratory, enteric, and neurological diseases in several species (10). Human coronaviruses (HCoV) are respiratory pathogens responsible for upper and lower respiratory tract infections (49) and for severe acute respiratory syndrome (SARS) (41). Possible involvement of HCoV other than SARS-CoV in more serious human pathologies was recently reviewed (49). Indeed, HCoV have been associated over the years with the development of pneumonia, myocarditis, and meningitis (16, 39) and occasionally acute disseminated encephalitis (54). We have previously demonstrated that HCoV are neuroinvasive in humans, can infect and persist in human neural cells, and can activate glial cells to produce proinflammatory mediators (3–5, 8, 14). Moreover, we have shown that wild-type reference strain HCoV-OC43 has neuroinvasive properties in mice, leading to chronic encephalitis (25) with accompanying disabilities (23). Given that murine coronavirus (mouse hepatitis virus [MHV]), a strain structurally related to HCoV-OC43, can cause neurodegenerative and neuroinflammatory disease in mice and rats (10), we hypothesized that HCoV-OC43 might be associated with neuroinflammatory and/or neurodegenerative human diseases. We have recently reported that a viral variant with four point mutations in its surface spike (S) glycoprotein, acquired during viral persistence in human neural cells (48), led to a drastically modified virus-induced neuropathology in BALB/c mice, characterized by a multiple sclerosis (MS)-like flaccid paralysis and inflammatory demyelination (24).

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter of the central nervous system (CNS) that is involved in several neurophysiological functions. A disruption of its homeostasis can damage neurons, which may eventually lead to cell death (30). This pathological process, designated excitotoxicity, is able to induce degeneration of neural cells following an excessive stimulation of glutamate on its specific ionotropic receptors, 2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propranoic acid receptor (AMPAr) and *N*-methyl-D-aspartic acid receptor (NMDAr) (35). Activation of these receptors results in neural Ca^{2+} influx, which can mediate excitotoxicity by the means of a cascade of events involving free radical production, mitochondrial dysfunction, and the activation of several enzymes involved in normal cell development and function, resulting in damage to the cell membrane, cytoskeleton, and DNA (42). Interestingly, excitotoxicity was reported to be involved in several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease and MS, in humans (13). Glutamate reuptake is necessary for the regulation of physiological extracellular glutamate concentrations and is mediated mainly by high-affinity sodium-dependent transporters. At least five different glutamate transporters expressed on neuronal or glial cells (GLT-1, GLAST, EAAC1, EAAT4, and EAAT5) have been well characterized (12), and up to 90% of the total glutamate reuptake in the adult CNS is achieved by the glutamate transporter 1 (GLT-1), expressed mainly on astrocytes (50). In several neurological diseases, disruption of the GLT-1 expression level

* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Neuroimmunovirology, INRS-Institut Armand Frappier, 513 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7. Phone: (450) 687-5010, ext. 4300. Fax: (450) 686-5501. E-mail: pierre.talbot@iaf.inrs.ca.

▽ Published ahead of print on 28 September 2011.

was reported to be associated with alteration in glutamate uptake (52).

Glutamate excitotoxicity can damage the cytoskeleton of axons *in vivo*, which may result in the slowing of axonal transport (1, 31). Neurofilaments (NF) are intermediate filaments constituting the neuron cytoskeleton and are involved in the stability of mature axons and the regulation of axonal transport rate. In physiological conditions, the heavy neurofilament proteins (NF-H) are predominantly phosphorylated in axons and nonphosphorylated in neuronal soma and dendrites (19). A shift of this NF phosphorylation state, which is represented by a loss of nonphosphorylated NF in soma and an increase of nonphosphorylated NF in axons, is a sign of neuronal injury (44). Evaluation of the NF phosphorylation state is a useful tool to monitor progressive axonal disabilities, considering that the NF-H protein phosphorylation state has been shown to be a biomarker in neurodegeneration (37). We have already demonstrated that the NF-H phosphorylation state was altered following HCoV-OC43 infection of mice (24).

In the present study, we demonstrate that only a single point mutation (Y241H) in the spike glycoprotein (S) of HCoV-OC43 is sufficient for the induction of motor dysfunctions and a paralytic disease in infected mice. Furthermore, infection of mice with this HCoV-OC43 S mutant induced a significantly strong neuronal dysfunction and a significant decrease in the expression of the glutamate transporter GLT-1 on astrocytes compared to those seen with sham and wild-type-virus infection. Therefore, the virus-induced pathological process appears to be driven by a glutamate excitotoxic mechanism, as blockade of the AMPA receptor attenuated clinical scores (CS) related to the virus-induced paralysis and motor disabilities, partially restored the physiological NF phosphorylation state and GLT-1 expression, and reduced microglial cell activation.

MATERIALS AND METHODS

Viruses. The wild-type reference HCoV-OC43 virus (VR759) was obtained in the 1980s from the American Type Culture Collection (ATCC). The recombinant virus of HCoV-OC43 (rOC/ATCC) was generated using the full-length cDNA clone pBAC-OC43^{FL} and displayed the same phenotypic properties as the wild-type virus, as previously described (47). This recombinant virus was used as the reference control virus for all experiments. We introduced into the spike glycoprotein of HCoV-OC43 one or two point mutations at a time, the D24Y and S83T mutations (corresponding recombinant virus designated rOC/U_{S24-83}), the H183R and Y241H mutations (corresponding recombinant virus designated rOC/$U_{S183-241}$), the H183R mutation (corresponding recombinant virus designated rOC/U_{S183}), or the Y241H mutation (corresponding recombinant virus designated rOC/U_{S241}); mutations were introduced into the full-length cDNA clone pBAC-OC43^{FL} by site-directed mutagenesis using a QuikChange Multi site-directed mutagenesis kit (Stratagene) as recommended by the supplier. Each cDNA clone was transfected into BHK-21 cells, amplified by two passages in the HRT-18 cell line, and sequenced to make sure that only the introduced H183R and/or Y241H mutation was present and that no other mutations appeared.

Survival curves and clinical scores. Female BALB/c mice (Jackson Laboratories) aged 22 days postnatal (dpn) were inoculated by the intracerebral (i.c.) route with $10^{2.5}$ 50% tissue culture infective doses ($TCID_{50}$) of recombinant virus, as previously described (24). Groups of 10 mice infected by each recombinant virus were observed on a daily basis over a period of 21 days postinfection (dpi), and survival and clinical scores related to motor dysfunctions were evaluated. Mice infected with rOC/U_{S241} which presented motor dysfunctions were evaluated and scored according to a scale based on experimental allergic encephalitis (EAE) clinical score (CS) evaluation (0 to 1, normal, with no clinical signs; 1.5 to 2, partial hind-limb paralysis, with a walk close to ground level; 2.5 to 3.5, complete hind-limb paralysis; 4 to 5, moribund state and death).

Infectious-virus assays. For each experimental condition, groups of three infected BALB/c mice were selected randomly every 2 days and dissected to monitor infectious-virus production in brains and spinal cords. Tissues were processed for the presence and quantification of infectious virus by an indirect immunoperoxidase assay as previously described (27).

AMPA receptor antagonist. The specific noncompetitive AMPA receptor antagonist GYKI-52466 [1-(4-aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine hydrochloride] was obtained from Tocris Bioscience and dissolved in Hanks' balanced salt solution (HBSS; Invitrogen) at a final concentration of 300 μg/ml of HBSS (46). To investigate the effect of treatment with GYKI-52466, two groups of 10 BALB/c mice infected with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} were treated intraperitoneally with 3 mg/kg body weight of GYKI-52466 at 12 h postinfection and then twice daily for 3 weeks or with only 100 μl of HBSS (vehicle), to normalize experimental stress conditions, twice daily over a period of 3 weeks. To verify the noncytotoxic effect of the GYKI-52466 solution, sham-infected mice received the same dose of AMPA receptor antagonist. As described in the literature, this pharmacological dose has been reported to have no behavioral effects and to induce neuroprotective actions (20, 40).

Immunohistochemistry. Groups of three BALB/c mice either sham infected or infected with each virus and treated with GYKI-52466 antagonist or vehicle were selected randomly and perfused with a solution of 4% paraformaldehyde at 10 dpi, which corresponds to the peak of viral replication in the spinal cord and the outcome of clinical scores related to paralytic disease. Lumbar segments from spinal cords were cryoprotected in 30% (wt/vol) sucrose, frozen at −20°C, and processed for sets of 8-μm section size with a cryostat (HM 525; Microm). Axonal damage was investigated by assessing the heavy neurofilament (NF-H) phosphorylation state. Tissue sections were incubated with a mouse anti-nonphosphorylated neurofilament monoclonal antibody (MAb) (SMI 311, 1/1,000; Covance), a mouse anti-phosphorylated neurofilament MAb (SMI 312, 1/1,000; Covance), or Mac-2 rat MAb (1/200; ATCC, Cedarlane) for 2 h at room temperature. Tissue sections were then washed and incubated with a secondary anti-mouse or anti-rat biotinylated antibody, before being revealed with an ABC Vectastain kit (Vector Laboratories) as previously described (24). Double staining for astrocytes and glutamate transporter GLT-1 fluorescence was investigated with the primary antibodies polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1/1,000; Dako) and goat anti-glutamate transporter GLT-1 (K-16 sc-31582, 1/500; Santa Cruz Biotechnology). Spinal cord sections were blocked with horse serum in phosphate-buffered saline (PBS) 1× for 1 h at room temperature. Following incubation with both primary antibodies for 2 h at room temperature, sections were washed and then incubated in the dark for 2 h at room temperature with the secondary fluorescent antibodies Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1/1,000; Invitrogen) and Alexa Fluor 568 anti-goat (1/1,000; Invitrogen). After final PBS 1× washes, tissue sections were incubated for 5 min at room temperature with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1/100; Polysciences Inc.) and then mounted with Immuno-mount and observed under a fluorescence microscope.

Protein extraction and Western blot analysis. Spinal cords from groups of three mice selected randomly were homogenized in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 50 Mm Tris, pH 7.4, 1% [vol/vol] NP-40, 0.25% [wt/vol] sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) supplemented with the protease cocktail inhibitor (catalog no. P8340; Sigma). Lysates were cleared by centrifugation for 5 min at 4°C at 17,000 × *g*, and supernatants were aliquoted and stored at −80°C. A bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Novagen) was used to determine protein concentration, according to the manufacturer's protocol. Proteins (10 μg per sample) were separated on a Novex NuPage 4-to-12% gradient gel (Invitrogen) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P transfer membrane; Millipore) with a Bio-Rad Trans-Blot semidry transfer cell apparatus. Membranes were blocked with Tris-buffered saline containing 1% (vol/vol) Tween (TBS-T) and 5% (wt/vol) nonfat milk at 4°C overnight, and then membranes were incubated with polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1/2,000; Dako), guinea pig anti-glutamate transporter GLT-1 MAb (AB1783, 1/1,000; Millipore), Mac-2 rat MAb (1/100; ATCC, Cedarlane), or rabbit anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (1/1,000; Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. Membranes were washed three times with TBS-T and then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody anti-rabbit (1/1,000; GE Healthcare UK), anti-guinea pig (1/1,000; Millipore), or anti-rat (1/1,000; Kirkegaard & Perry Laboratories) coupled to horseradish peroxidase (HRP); detection was made by chemiluminescence using a Bio-Rad Immun-Star HRP substrate kit. Band detection and semiquantification were made using the GeneSnap software from a Chemi Genius Syngene apparatus. Analysis of variance (ANOVA) tests followed by *post hoc* Tukey's analysis were performed to

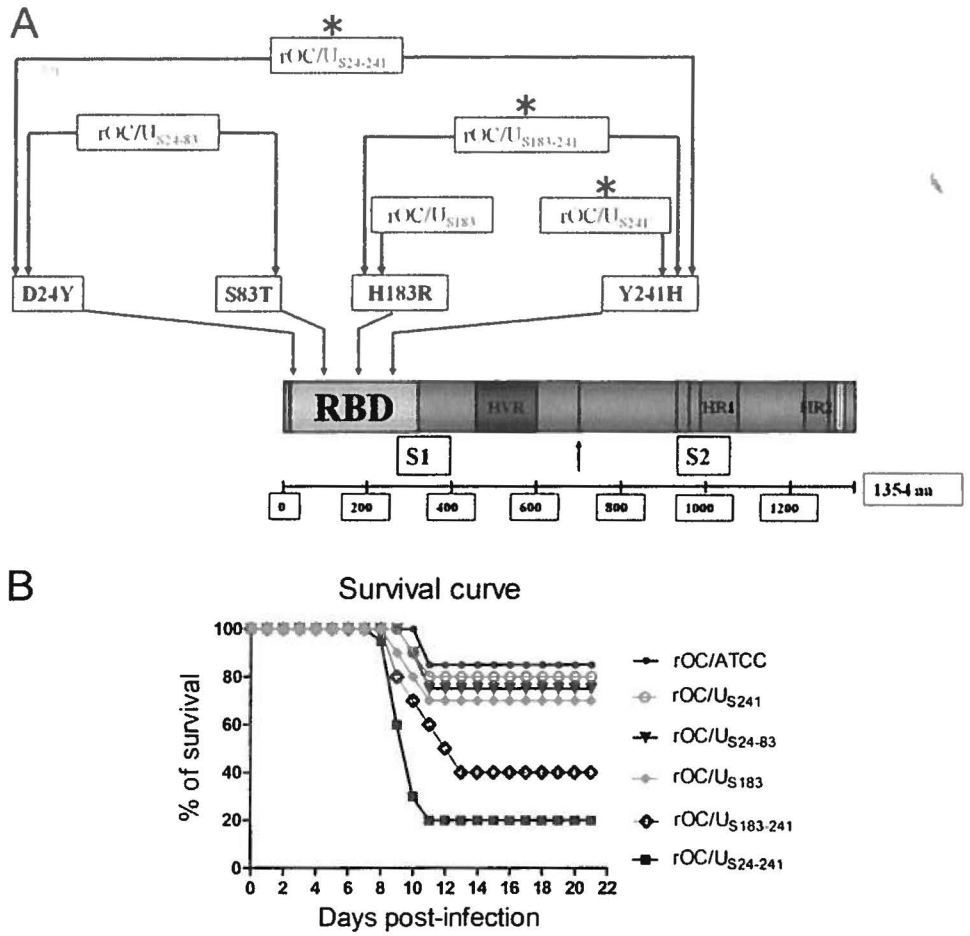


FIG. 1. Schematic representation of the point mutations introduced within the viral spike glycoprotein and associated neurovirulence of the different recombinant viruses in mice. (A) Schematic representation of the main structural domains of the S protein of HCoV-OC43 and the approximate locations of the four point mutations D24Y, S83T, H183R, and Y241H. These mutations were introduced into the viral genome to generate rOC/U$_{S24-241}$ (24). Alternatively, only pairs of mutations were introduced to generate rOC/U$_{S24-83}$ and rOC/U$_{S183-241}$. Finally, one single mutation was introduced at a time to generate rOC/U$_{S183}$ and rOC/U$_{S241}$. Asterisks indicate recombinant viruses which induced a paralytic disease following infection. RBD, putative cell receptor-binding domain; HVR, hypervariable region; HR, heptad repeat region; aa, amino acids. (B) Survival curves following intracerebral inoculation of the different HCoV-OC43 recombinants harboring various mutations in the S protein compared to that following inoculation with reference rOC/ATCC virus. Whereas infection of mice with the reference virus rOC/ATCC induced 15% mortality, mice infected with rOC/U$_{S24-241}$ showed a mortality rate of 80%. The relative survival rates of mice infected by different viruses containing one, two, or four mutations in the spike protein suggest a synergic effect of these mutations on mortality rate. Results are representative of three independent experiments.

determine the statistical significances in the differences in protein expression between different groups of mice, using SPSS software version 16.0.

RESULTS

BALB/c mice infected with HCoV-OC43 containing the Y241H mutation in the spike glycoprotein (rOC/U$_{S241}$) develop a hind-limb paralytic disease. We recently showed that a viral variant bearing four point mutations in the spike (S) glycoprotein (D24Y, S83T, H183R, and Y241H), acquired during viral persistence in human neural cells (48), led to a modified virus-induced neuropathology in BALB/c mice compared to that caused by the reference HCoV-OC43 (rOC/ATCC) virus. This modified pathology was characterized by an MS-like flaccid paralysis, with areas of demyelination in the spinal cord, whereas mice infected by HCoV-OC43 (rOC/ATCC) exhibited only encephalitis (24). In order to further pinpoint the viral molecular determinants responsible for this modulation of virus-induced neuropathogenesis, we generated recombinant viruses that contained two S mutations at a time: D24Y and S83T (designated rOC/U$_{S24-83}$) or H183R and Y241H (designated rOC/U$_{S183-241}$) (Fig. 1A). Like in infection with virus containing the four mutations described above, infection of BALB/c mice by rOC/U$_{S183-241}$ led to a paralytic disease, with small areas of demyelination in the spinal cord, whereas rOC/U$_{S24-83}$ induced encephalitis like rOC/ATCC. In order to investigate whether only one of the remaining mutations, either H183R or Y241H, was sufficient to induce the paralytic disease in mice, we generated recombinant viruses that harbored only one mutation at a time, either H183R (designated rOC/U$_{S183}$) or Y241H (designated rOC/U$_{S241}$) (Fig. 1A). Whereas BALB/c mice infected with rOC/U$_{S183}$ developed an encephalitis similar to what was observed after

rOC/ATCC infection, mice infected with rOC/U_{S241} presented motor dysfunctions and paralytic disease. Neurovirulence of all recombinant viruses was evaluated following intracerebral inoculation of BALB/c mice (Fig. 1B). The survival curves of mice infected by the recombinant viruses bearing one, two, or four point mutations within the viral spike glycoprotein suggested a synergistic effect of these mutations on the mortality rate. Histological examination of infected CNS cells revealed that the primary target cell of the infection by all of these recombinant viruses (rOC/$U_{S183-241}$, rOC/U_{S183}, and rOC/U_{S241}) remained the neurons (data not shown), as previously described for rOC/$U_{S24-241}$ and rOC/ATCC (24). The rOC/U_{S241} recombinant virus was associated with motor dysfunctions in infected mice. Therefore, we conclude that the Y241H single mutation was necessary and sufficient to generate the observed paralytic phenotype and focused the rest of the study on this recombinant virus to evaluate the involvement of this single Y241H mutation in paralytic disease, in comparison to the reference virus rOC/ATCC.

To determine whether the difference in pathology induced by rOC/U_{S241} and the reference virus rOC/ATCC could be related to differences in kinetics of replication in the CNS, brains and spinal cords were harvested and infectious-virus titers were assayed every 2 days for a period of 22 dpi. Even though both viruses replicated to similar extents in the CNS and the highest level of infectious virions were found at 10 dpi in brains as well as in spinal cords, rOC/U_{S241} remained in the spinal cord for a longer period of time than rOC/ATCC. Indeed, infectious rOC/U_{S241} virus was still detectable at 15 dpi, whereas rOC/ATCC infectious virus was never detectable beyond 12 dpi (Fig. 2). Even though viral persistence was not evaluated, we have already reported that viral RNA of wild-type reference HCoV-OC43 (ATCC VR759) (23) and recombinant viruses rOC/ATCC (which has exactly the same genomic sequence as the virus ATCC VR759) and rOC/$U_{S24-241}$ (24) persists in mice for several months postinfection.

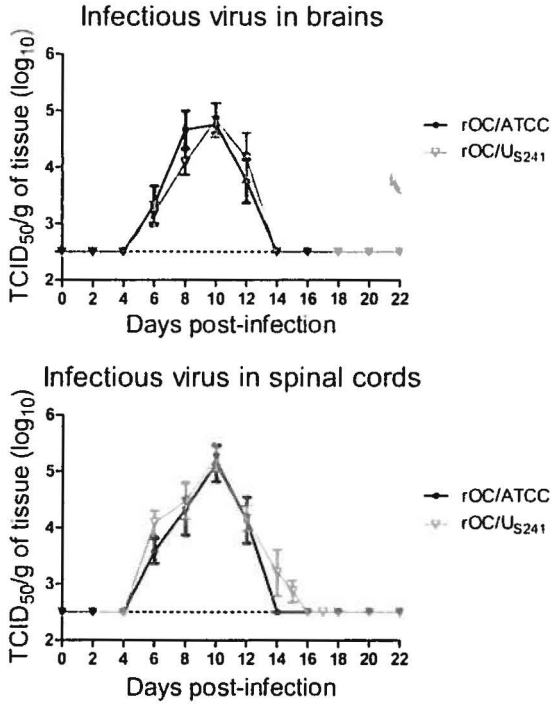


FIG. 2. Infectious-virus production measured in the CNS of infected mice. The kinetics of infectious-virus production in brains and spinal cords was evaluated every 2 days for 22 dpi. Both viruses replicated to similar levels, with the same kinetics in brains, and the highest levels of infectious virions were found at 10 dpi in brains as well as in spinal cords. Recombinant virus rOC/U_{S241} was cleared less rapidly from the spinal cord, as infectious virus was repeatedly detected for up to 15 dpi. Results are representative of two independent experiments, and error bars represent standard errors of the means (SEM).

AMPA receptor antagonist (GYKI-52466) treatment attenuates mouse motor dysfunctions and severe paralysis induced following infection by rOC/U_{S241}. In order to characterize a possible involvement of excitotoxicity in rOC/U_{S241}-induced hind-limb paralysis, mice infected by rOC/U_{S241} were treated with the AMPA receptor antagonist GYKI-52466 or vehicle (HBSS). GYKI-52466 treatment did not affect the survival rate of mice infected by either rOC/ATCC or rOC/U_{S241} (Fig. 3A), but it attenuated clinical scores related to motor dysfunctions and paralytic disease induced following rOC/U_{S241} infection (Fig. 3B). Indeed, fewer mice presented mild paralysis (CS, 1.5 to 2), and they recovered more rapidly when treated with GYKI-52466, than control vehicle-treated mice. Moreover, whereas 20 to 30% of mice infected by the rOC/U_{S241} virus and treated with vehicle presented severe paralysis (CS, 2.5 to 3.5), only 5 to 10% of the mice treated with GYKI-52466 (with the exception of 12 to 13 dpi) fell into this category (Fig. 3B). Furthermore, recovery was more rapid following treatment with GYKI-52466. The worst symptoms of motor dysfunctions were observed at 10 dpi, and symptoms disappeared totally in the following 6 days of GYKI-52466 treatment, whereas motor disability persisted in vehicle-treated mice. Indeed, as early as 18 dpi, surviving mice infected and treated with AMPA antagonist recovered completely, with no more detectable motor CS. On the other hand, 20% of the infected mice treated with vehicle only still presented severe paralysis (CS, 2.5 to 3.5) at 21 dpi. Viral replication in brains and spinal cords was assessed in mice infected by rOC/U_{S241} or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle. For both recombinant viruses, treatment with GYKI-52466 did not modify viral replication (Fig. 3C).

AMPA receptor antagonist treatment reduces neuronal dysfunction in mice infected by rOC/U_{S241}. Spinal cords from mice infected by rOC/U_{S241} or rOC/ATCC and treated with the AMPA receptor antagonist (GYKI-52466) or vehicle were harvested at 10 dpi (time of motor dysfunctions and severe paralysis) to evaluate whether a neuronal alteration associated with excitotoxicity was under way in infected mice. Neuronal dysregulation was investigated by evaluating the axonal neurofilament phosphorylation state. Using SMI 311, an antibody against nonphosphorylated NF-H proteins, we found that infection of mice with rOC/ATCC and rOC/U_{S241} resulted in abnormal loss of soma nonphosphorylated NF-H in the spinal cord gray matter (GM) compared to the result for sham-infected mice. This modification in the phosphorylation state was much more pronounced following infection with rOC/U_{S241} than following infection with rOC/ATCC (Fig. 4, SMI 311 GM). On the other hand, spinal cord white matter (WM) of mice infected with rOC/ATCC and rOC/

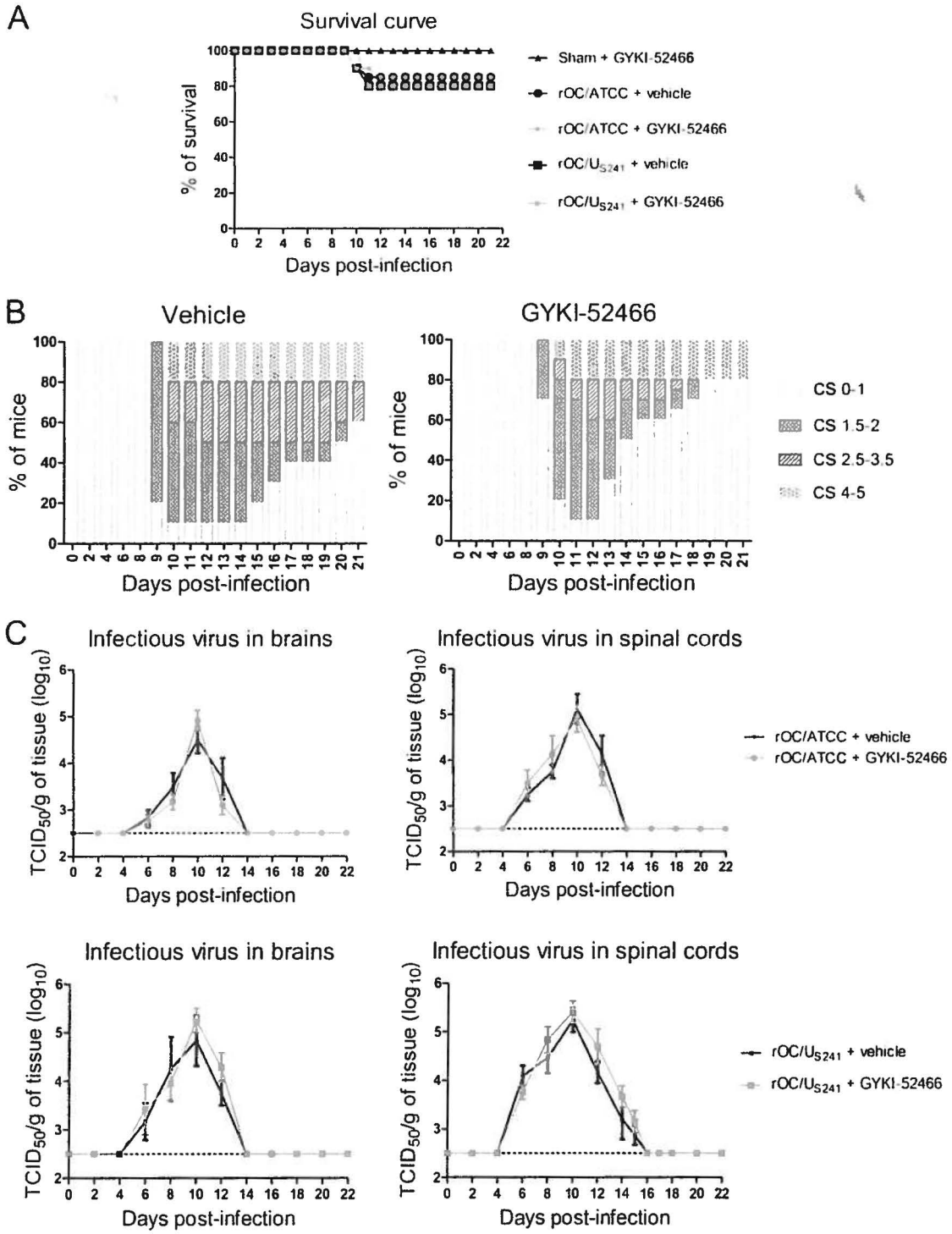


FIG. 3. AMPA receptor antagonist GYKI-52466 treatment attenuates motor dysfunctions in infected mice without modifying neurovirulence or viral replication. (A) Survival curves of mice infected by rOC/U$_{S241}$ or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle. GYKI-52466 treatment did not change the rate of survival of mice following infection by either virus. Results with sham-infected mice treated with GYKI-52466 alone illustrated that AMPA treatment was not toxic under the condition used. Results are representative of two independent experiments. (B) Effect of GYKI-52466 treatment on motor clinical scores in mice infected by rOC/U$_{S241}$ and treated with GYKI-52466 or vehicle. GYKI-52466 treatment attenuated clinical scores related to mild (CS, 1.5 to 2) or severe (CS, 2.5 to 3.5) paralysis for mice infected by rOC/U$_{S241}$, compared to scores for mice treated only with vehicle. Twenty to 30% of mice infected and treated with vehicle presented CS of severe paralysis (CS, 2.5 to 3.5), whereas only 5 to 10% of mice treated with GYKI-52466 fell into this category. The CS of motor dysfunction completely disappeared at 18 dpi in GYKI-52466-treated mice, whereas 20% of mice infected and treated with vehicle only still presented severe paralysis (CS, 2.5 to 3.5) at 21 dpi. Mice that presented mild paralysis (CS, 1.5 to 2) were fewer and recovered more rapidly when treated with GYKI-52466. Results are representative of three independent experiments. (C) Infectious-virus titers in the CNS of mice infected by rOC/U$_{S241}$ or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle. For both recombinant viruses, viral replication (kinetics and total amount of infectious virus) was not affected following GYKI-52466 treatment. Results are representative of two independent experiments, and error bars represent SEM.

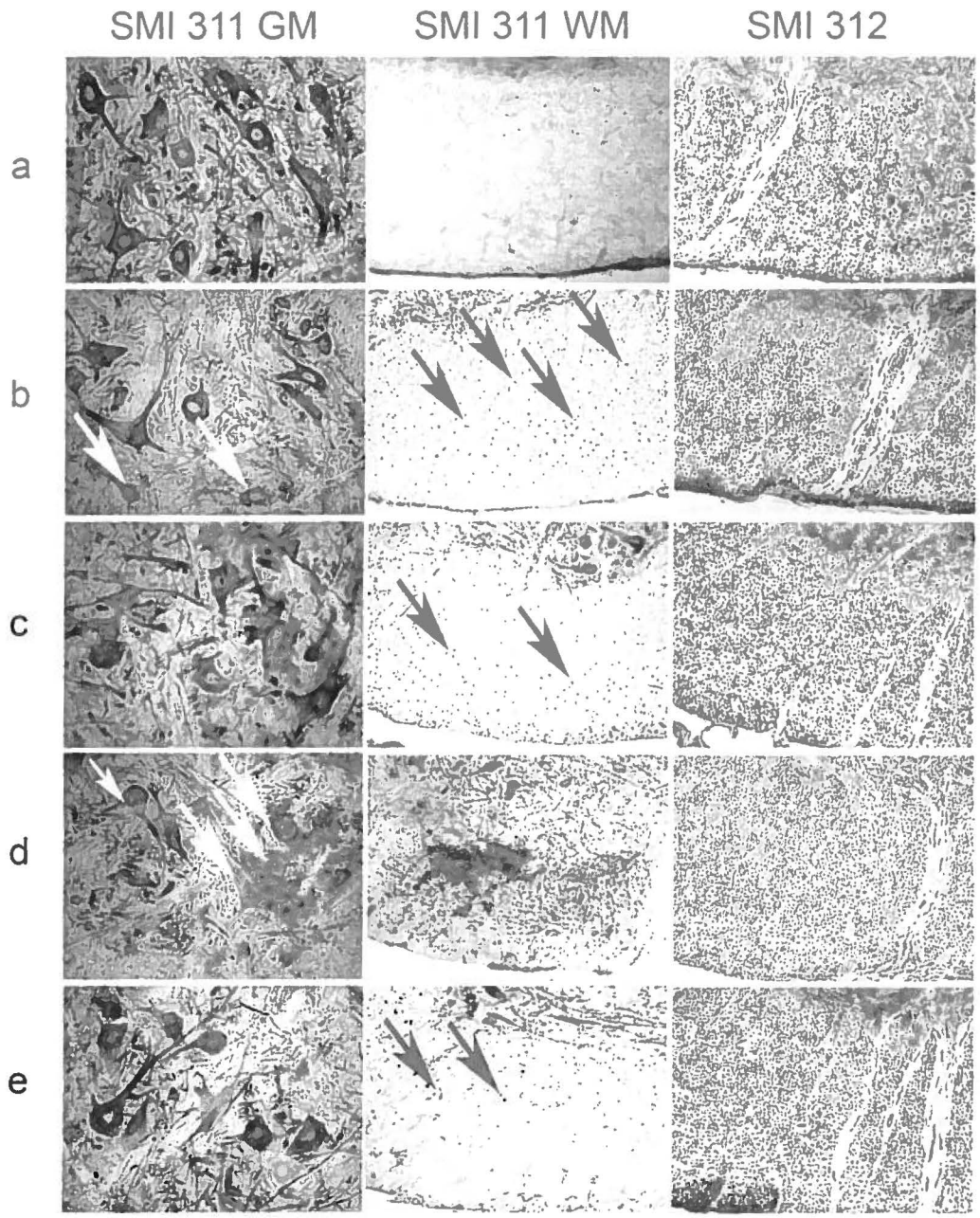


FIG. 4. AMPA receptor antagonist treatment reduces neuronal dysfunction, as observed by the phosphorylation state of heavy neurofilaments in mice infected with rOC/U_{S241}. Immunohistochemistry of lumbar spinal cord gray and white matter segments from mice infected with rOC/U_{S241} or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle at 10 dpi. In the normal spinal cord (a), SMI 311 stained the neurofilament of neuronal soma and dendrites. Following infection with rOC/ATCC or rOC/U_{S241} (b or d, respectively), GM presented less SMI 311 neuronal soma staining, illustrating a loss of normal nonphosphorylated NF in GM compared to that for sham-infected mice (a), which was more pronounced following rOC/U_{S241} infection than following rOC/ATCC infection (light arrows). Interestingly, spinal cord white matter of mice infected with rOC/ATCC (b) or rOC/U_{S241} (d) showed higher levels of abnormal axonal nonphosphorylated NF-H, with abnormal axonal swelling, which was more pronounced following infection by rOC/U_{S241} than following sham infection (a) (dark arrows). Staining with SMI 312 showed a low level of phosphorylated NF-H in WM axons following infection by rOC/U_{S241} compared to that following rOC/ATCC or sham infection. GYKI-52466 treatment of mice infected with rOC/ATCC (c) or rOC/U_{S241} (e) partially restored the physiological NF-H phosphorylation state. (a) Sham-infected mice plus vehicle; (b) rOC/ATCC-infected mice plus vehicle; (c) rOC/ATCC-infected mice plus GYKI-52466; (d) rOC/U_{S241}-infected mice plus vehicle; (e) rOC/U_{S241}-infected mice plus GYKI-52466. Magnification, ×400. Results are representative of two independent experiments with three mice per group.

U_{S241} showed an abnormal presence of nonphosphorylated NF-H, and axonal swelling in WM was more important following rOC/U_{S241} infection than following rOC/ATCC infection (Fig. 4, SMI 311 WM). Staining with SMI 312 antibodies against phosphorylated NF-H proteins showed a low level of axonal phosphorylated NF in the spinal cord white matter following infection by rOC/U_{S241}, compared to the level for rOC/ATCC- or sham-infected mice. Moreover,

GYKI-52466 treatment of mice infected by both recombinant viruses partially restored the physiological NF-H phosphorylation state.

GLT-1 expression is downregulated in mice infected by rOC/U_{S241} and upregulated following AMPA receptor antagonist treatment. The astrocytic receptor GLT-1 is responsible for 90% of glutamate recapture. Consequently, as glutamate excitotoxicity may be due to a problem in this recapture, we decided to evaluate the expression of GLT-1 on spinal cord astrocytes. Spinal cords were harvested at 10 dpi, and GLT-1 expression was evaluated by immunofluorescence and Western blotting. Infection by both viruses led to significant astrocyte activation compared to that for sham-infected mice treated with vehicle (Fig. 5A and B) ($P < 0.001$). Even though a greater number of GFAP-positive astrocytes were detected following infection, glial GLT-1 expression was significantly downregulated in mice infected by rOC/U_{S241} ($P < 0.01$), as revealed by immunofluorescence analysis (Fig. 5A) and confirmed by Western blotting (Fig. 5B), compared to levels in rOC/ATCC- and sham-infected mice. However, treatment with GYKI-52466 led to partial restoration of GLT-1 expression in mice infected by rOC/U_{S241} ($P < 0.01$), as shown by immunofluorescence and Western blotting (Fig. 5A and B).

Treatment with AMPA receptor antagonist reduces microglial activation. Microglia are often activated during glutamate excitotoxicity. Therefore, microglial activation in the spinal cords of infected mice was evaluated by immunohistochemistry and Western blotting at 10 dpi. Mice infected by both viruses presented a significant activation of microglia/macrophages in the spinal cord, whereas in sham-infected mice, these cells were not activated under normal physiological conditions. Moreover, rOC/U_{S241} infection led to a drastically significant increase ($P < 0.05$) in the activation of microglial cells compared to that seen with rOC/ATCC infection, as revealed by quantitation of Mac-2 expression on Western blots (Fig. 6A and B). Treatment with GYKI-52466 reduced activation of microglia/macrophages (Mac-2 expression) in mice infected with rOC/U_{S241} ($P < 0.05$), but the level of microglial activation did not return to the basal level of sham-infected animals.

DISCUSSION

We have previously shown that four mutations in the spike (S) glycoprotein of HCoV-OC43 (D24Y, S83T, H183R, and Y241H) modulate disease in infected BALB/c mice from an encephalitis to a flaccid paralysis and eventual demyelination (24). The aim of the present study was to determine whether only one of these four mutations was sufficient to induce hind-limb paralysis in mice and to determine the mechanism underlying this virus-induced neuropathology. Making use of a series of recombinant viruses produced with our infectious clone pBAC-OC43^{FL} (47), we were able to identify a single point mutation (Y241H) in the HCoV-OC43 S glycoprotein that is necessary and sufficient for induction of hind-limb paralysis in infected BALB/c mice without affecting viral neurovirulence or the kinetics of viral replication in brain compared to those seen with rOC/ATCC.

Even though in some viral models of CNS infection, blockade of excitotoxicity results in a decrease in mortality of infected mice (21), we showed that treatment with an AMPA antagonist affected neither the survival rate of mice nor the viral replication in mice infected by either HCoV-OC43 variant (rOC/ATCC or rOC/U_{S241}). However, the number of mice presenting motor dysfunctions or severe paralysis induced by the rOC/U_{S241} variant decreased in the presence of the AMPA antagonist GYKI-52466, and mice recovered more rapidly from motor disability than infected mice treated with vehicle alone. These results strongly suggest that glutamate excitotoxicity is involved in the pathological process leading to motor dysfunction without any direct association with viral replication, which is not modified by the treatment with the AMPA antagonist.

Mice infected by rOC/U_{S241} or rOC/ATCC showed abnormal loss of soma nonphosphorylated NF-H in the gray matter (GM), and this was more important following rOC/U_{S241} infection. Moreover, spinal cord white matter (WM) of mice infected by rOC/U_{S241} or rOC/ATCC presented abnormal axonal nonphosphorylated NF-H, which was also more important following rOC/U_{S241} infection, even leading to axonal beading and swelling. It has already been reported that modifications in the phosphorylation state of neurofilaments contribute to motor neuron disease, as seen in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and multiple sclerosis (MS) (9, 43). This abnormal disruption of the NF-H phosphorylation state in the axon and cell body observed following infection could lead to neuronal dysfunction, i.e., disruption of axonal transport with perturbations in neuronal transmission, which has been demonstrated to account for motor disabilities (36). Treatment with GYKI-52466 significantly reduced the imbalance of the NF-H phosphorylation state and also improved motor dysfunctions. This is consistent with the fact that glutamate excitotoxicity causes damage to the cytoskeleton of axons *in vivo* and that the administration of AMPA antagonist attenuated axonal damages (18). Moreover, glutamate excitotoxicity was shown to be involved in the slowing of axonal transport (1, 22, 31), which could account for axonal swelling observed. As neurons are the main target of HCoV-OC43 infection, viral replication in neurons may induce neuronal stress that can lead to a dysregulation of glutamate metabolism and homeostasis (glutamate synthesis, release, recycling), as already shown in other neurotropic viral models (26, 33, 51). Indeed, it was reported that human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can upregulate glutaminase expression in infected macrophages (15) and that the HIV-1 viral Tat protein increases neuronal glutamate exocytosis (32). Moreover, other studies have shown that the astrocytic glutamate transporter GLT-1 was downregulated in viral models involving Sindbis virus or HIV (11, 53). Furthermore, excessive stimulation of glutamate on its specific receptors is known to induce degeneration of neural cells and to lead to neurodegenerative diseases (13).

Under physiological conditions, glutamate homeostasis is regulated in large part by glial glutamate transporter 1 (GLT-1), expressed mainly on astrocytes, which is responsible for up to 90% of the total glutamate clearance in the adult CNS (2). We showed a significant activation of astrocytes following infection by both viruses. However, the expression of GLT-1 did not correlate with this activation being associated with an increased number of astrocytes expressing high levels of GFAP. Indeed, the results presented in Fig. 5 show that GLT-1 transporter expression was significantly downregulated following

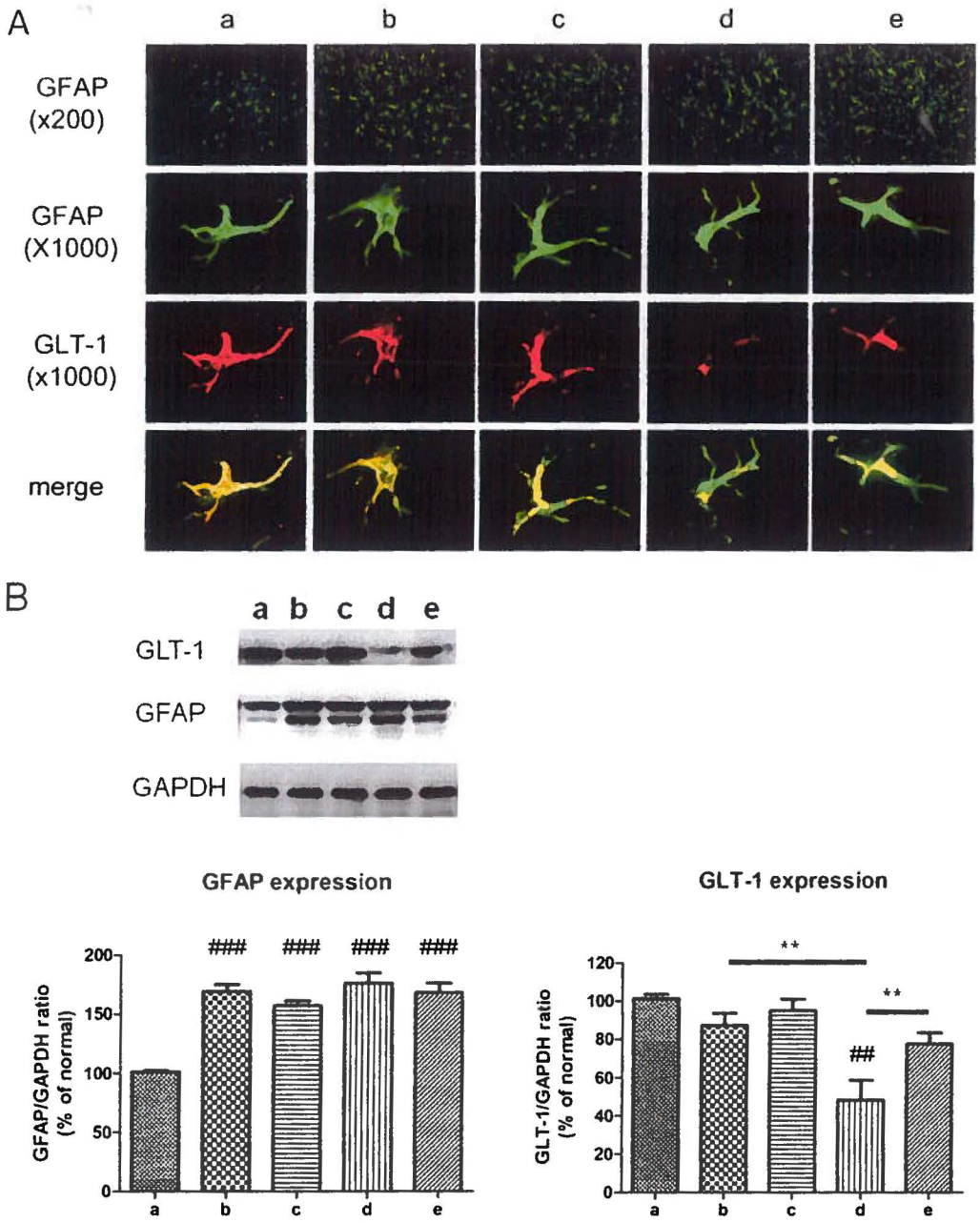


FIG. 5. Expression of GLT-1 is downregulated in mice infected with rOC/U_{S241} and partially restored following treatment with AMPA receptor antagonist. (A) Immunofluorescence analysis of lumbar spinal cord segments of gray matter from mice infected by rOC/ATCC or rOC/U_{S241} and treated with vehicle (b and d) or GYKI-52466 (c and e) at 10 dpi. Infected mice (b and d) presented an increased number of activated astrocytes compared to that seen with sham-infected mice (a), as well as a downregulation of GLT-1 staining which was more pronounced following rOC/U_{S241} infection (d) than following rOC/ATCC infection (b). Treatment with GYKI-52466 led to partial restoration of GLT-1 expression levels (c and e). Results are representative of two independent experiments with three mice per group. (B) Western blotting strengthened histological data. Mice infected by both recombinants showed significant (###, $P < 0.001$) GFAP expression compared to that for sham-infected mice. GLT-1 expression was significantly downregulated in mice infected by rOC/U_{S241} (d) (##, $P < 0.01$) compared to the level in mice infected by rOC/ATCC (b) or control (a). Treatment with GYKI-52466 led to significant upregulation of GLT-1 expression in mice infected by rOC/U_{S241} (**, $P < 0.01$) compared to that in mice infected by rOC/ATCC or control. Note that following infection of mice with HCoV-OC43, an additional band of GFAP is detected at 45 kDa, which is suggested to represent a proteolytic fragment derived from the 50-kDa band. Results are expressed as percentages of control (sham-infected mice plus vehicle [a]), and data are represented as means ± SEM ($n = 3$). (a) Sham-infected mice plus vehicle; (b) rOC/ATCC-infected mice plus vehicle; (c) rOC/ATCC-infected mice plus GYKI-52466; (d) rOC/U_{S241}-infected mice plus vehicle; (e) rOC/U_{S241}-infected mice plus GYKI-52466. Results are representative of three independent experiments.

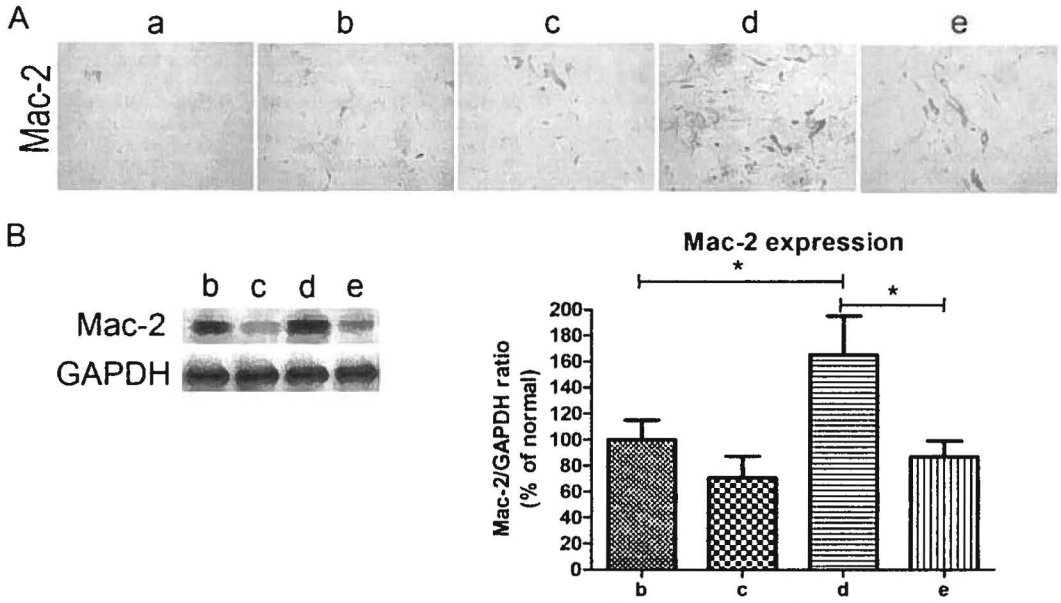


FIG. 6. Treatment with AMPA receptor antagonist reduced microglial activation. (A) Immunohistochemical staining of activated microglia, using Mac-2 antibody in mice infected with rOC/U_{S241} or rOC/ATCC and treated with GYKI-52466 or vehicle at 10 dpi. The spinal cord gray matter ventral horn from infected mice demonstrated a significant activation of microglia/macrophages following infection by both viruses. Treatment with GYKI-52466 reduced microglia/macrophage activation in mice infected by rOC/U_{S241}. Magnification, ×400. Results are representative of two independent experiments with three mice per group. (B) Western blotting of spinal cord proteins confirmed the histological finding. Infection of mice by rOC/U_{S241} led to significant (*, $P < 0.05$) increased activation of microglial cells (Mac-2 staining) compared to that in mice infected by rOC/ATCC, and GYKI-52466 treatment attenuated microglial cell activation in mice infected by rOC/U_{S241} (*, $P < 0.05$). These results are expressed as percentages of the reference value, with 100% representing mice infected by rOC/ATCC and treated with vehicle (b), as microglial cell activation was undetectable in sham-infected animals (a). Data are represented as means ± SEM ($n = 3$). (a) Sham-infected mice plus vehicle; (b) rOC/ATCC-infected mice plus vehicle; (c) rOC/ATCC-infected mice plus GYKI-52466; (d) rOC/U_{S241}-infected mice plus vehicle; (e) rOC/U_{S241}-infected mice plus GYKI-52466. Results are representative of three independent experiments.

rOC/U_{S241} infection compared to that following rOC/ATCC or sham infection. Interestingly, treatment with GYKI-52466 led to a partial restoration of expression of the GLT-1 transporter, although expression always remained inferior to basal levels. This incomplete restoration may account for the remaining motor dysfunctions observed. It was demonstrated that GLT-1 knockout mice undergo seizures and death as a result of excitotoxicity caused by too-elevated extracellular glutamate concentrations (50). Moreover, decreased expression of this transporter has been reported in several neurological diseases, as well as in viral models (7, 17).

We have previously reported that infection of mice by HCoV-OC43 led to the release of several proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor alpha [TNF-α], interleukin-1 [IL-1], and IL-6), with a significant increase of IL-6 in mice infected with an S mutant virus (24). These cytokines are known to downregulate glutamate transporter GLT-1 expression (11, 34, 38). In the present study, we show that the mutant virus rOC/U_{S241} (which harbors a single S point mutation, Y241H) led to significant microglia/macrophage activation compared to what is observed with the reference virus and that treatment with the AMPA antagonist partially reduced microglial cell activation. Moreover, our results (Fig. 6) also indicate that the increased microglia/macrophage activation correlated with the GLT-1 downregulated expression. Previous studies have demonstrated that microglia/macrophages can sense extracellular glutamate concentration via AMPA receptors on their membrane and that glutamate acts as a chemokine for these cells (29). Furthermore, activated microglia/macrophages are a significant source of glutamate that can induce excitotoxic neuronal cell death (6). These results suggest that, in our model, the role of astrocytes is to rescue neurons from excitotoxicity by regulating glutamate homeostasis, whereas activation of microglia/macrophages may exert excitotoxicity by downregulating GLT-1 expression via the release of some cytokines or by releasing glutamate, as previously described (28). This is consistent with a previous study that showed that microglia/macrophages can release glutamate and that blockade of glutamate release from activated microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice (45).

In summary, our study suggests that persistence-acquired mutations in the S glycoprotein of a human coronavirus (HCoV-OC43), which represents a possible viral adaptation within the CNS, could be involved in the development of neurological disorders in humans and that a single such point mutation is sufficient to modulate virus-induced neuropathology from an encephalitis to an MS-like neuropathology that involves glutamate excitotoxicity in a mouse model. Deciphering the underlying mechanisms of HCoV-OC43 interaction with the central nervous system should lead to a better understanding of potentially pathological consequences of this infection, as well as the importance of viral determinants in the process. Future studies will investigate the mechanism of action of both viruses (rOC/ATCC and rOC/U_{S241}) regarding glutamate synthesis, release, and uptake in order to better

understand the exact role of excitotoxicity and its pathological consequences following HCoV-OC43 infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant no. MT-9203 from the Institute of Infection and Immunity (III) of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to Pierre J. Talbot, who is the holder of the Tier-1 (Senior) Canada Research Chair in Neuroimmunovirology award. Elodie Brison acknowledges a doctoral studentship from the Multiple Sclerosis Society of Canada.

We thank Dominique J. Favreau for his valuable help with the treatment of data related to Western blot analysis and for statistical analysis.

REFERENCES

1. **Ackerley, S., et al.** 2000. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. J. Cell Biol. **150**:165–176.
2. **Anderson, C. M., and R. A. Swanson.** 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia **32**:1–14.
3. **Arbour, N., et al.** 1999. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. J. Virol. **73**:3338–3350.
4. **Arbour, N., R. Day, J. Newcombe, and P. J. Talbot.** 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. J. Virol. **74**:8913–8921.
5. **Arbour, N., et al.** 1999. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. J. Virol. **73**:3326–3337.
6. **Barger, S. W., M. E. Goodwin, M. M. Porter, and M. L. Beggs.** 2007. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. J. Neurochem. **101**:1205–1213.
7. **Blakely, P. K., B. K. Kleinschmidt-DeMasters, K. L. Tyler, and D. N. Irani.** 2009. Disrupted glutamate transporter expression in the spinal cord with acute flaccid paralysis caused by West Nile virus infection. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **68**:1061–1072.
8. **Bonavia, A., N. Arbour, V. W. Yong, and P. J. Talbot.** 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. J. Virol. **71**:800–806.
9. **Boylan, K., et al.** 2009. Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker. J. Neurochem. **111**:1182–1191.
10. **Buchmeier, M. J., and T. E. Lane.** 1999. Viral-induced neurodegenerative disease. Curr. Opin. Microbiol. **2**:398–402.
11. **Carmen, J., J. D. Rothstein, and D. A. Kerr.** 2009. Tumor necrosis factor-alpha modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. Brain Res. **1263**:143–154.
12. **Danbolt, N. C.** 2001. Glutamate uptake. Prog. Neurobiol. **65**:1–105.
13. **Dong, X. X., Y. Wang, and Z. H. Qin.** 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacol. Sin. **30**:379–387.
14. **Edwards, J. A., F. Denis, and P. J. Talbot.** 2000. Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. J. Neuroimmunol. **108**:73–81.
15. **Erdmann, N., et al.** 2009. *In vitro* glutaminase regulation and mechanisms of glutamate generation in HIV-1 infected macrophages. J. Neurochem. **109**: 551–561.
16. **Forgie, S., and T. J. Marrie.** 2009. Healthcare-associated atypical pneumonia. Semin. Respir. Crit. Care Med. **30**:67–85.
17. **Fotheringham, J., E. L. Williams, N. Akhyani, and S. Jacobson.** 2008. Human herpesvirus 6 (HHV-6) induces dysregulation of glutamate uptake and transporter expression in astrocytes. J. Neuroimmune Pharmacol. **3**:105–116.
18. **Fowler, J. H., E. McCracken, D. Dewar, and J. McCulloch.** 2003. Intracerebral injection of AMPA causes axonal damage in vivo. Brain Res. **991**:104–112.
19. **Gotow, T.** 2000. Neurofilaments in health and disease. Med. Electron Microsc. **33**:173–199.
20. **Goulton, C. S., A. R. Patten, J. R. Kerr, and D. S. Kerr.** 2010. Pharmacological preconditioning with GYKI 52466: a prophylactic approach to neuroprotection. Front. Neurosci. **4**:54.
21. **Greene, I. P., E. Y. Lee, N. Prow, B. Ngwang, and D. E. Griffin.** 2008. Protection from fatal viral encephalomyelitis: AMPA receptor antagonists have a direct effect on the inflammatory response to infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**:3575–3580.
22. **Hiruma, H., T. Katakura, S. Takahashi, T. Ichikawa, and T. Kawakami.** 2003. Glutamate and amyloid beta-protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms. J. Neurosci. **23**:8967–8977.
23. **Jacomy, H., G. Fragoso, G. Almazan, W. E. Mushynski, and P. J. Talbot.** 2006. Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. Virology **349**:335–346.
24. **Jacomy, H., et al.** 2010. Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. J. Neurovirol. **16**:279–293.
25. **Jacomy, H., and P. J. Talbot.** 2003. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. Virology **315**:20–33.
26. **Kaul, M., G. A. Garden, and S. A. Lipton.** 2001. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. Nature **410**:988–994.
27. **Lambert, F., H. Jacomy, G. Marceau, and P. J. Talbot.** 2008. Titration of human coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, by an indirect immunoperoxidase assay. Methods Mol. Biol. **454**:93–102.
28. **Liang, J., et al.** 2008. Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity. Brain Res. **1210**: 11–19.
29. **Liu, G. J., R. Nagarajah, R. B. Banati, and M. R. Bennett.** 2009. Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. Eur. J. Neurosci. **29**:1108–1118.
30. **Mark, L. P., et al.** 2001. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. Am. J. Neuroradiol. **22**:1813–1824.
31. **Miller, C. C., et al.** 2002. Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. Cell. Mol. Life Sci. **59**:323–330.
32. **Musante, V., et al.** 2010. The HIV-1 viral protein Tat increases glutamate and decreases GABA exocytosis from human and mouse neocortical nerve endings. Cereb. Cortex **20**:1974–1984.
33. **Nargi-Aizenman, J. L., and D. E. Griffin.** 2001. Sindbis virus-induced neuronal death is both necrotic and apoptotic and is ameliorated by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. J. Virol. **75**:7114–7121.
34. **Okada, K., U. Yamashita, and S. Tsuji.** 2005. Modulation of Na(+)-dependent glutamate transporter of murine astrocytes by inflammatory mediators. J. UOEH **27**:161–170.
35. **Olney, J. W.** 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids, p. 95–121. *In* E. G. McGeer, J. W. Olney, and P. L. McGeer (ed.), Kainic acid as a tool in neurobiology. Raven Press, New York, NY.
36. **Perrot, R., R. Berges, A. Bocquet, and J. Eyer.** 2008. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. Mol. Neurobiol. **38**:27–65.
37. **Petzold, A.** 2005. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. J. Neurol. Sci. **233**:183–198.
38. **Prow, N. A., and D. N. Irani.** 2008. The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis. J. Neurochem. **105**:1276–1286.
39. **Riski, H., and T. Hovi.** 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. J. Med. Virol. **6**:259–265.
40. **Rorick-Kehn, L. M., J. C. Hart, and D. L. McKinzie.** 2005. Pharmacological characterization of stress-induced hyperthermia in DBA/2 mice using metabotropic and ionotropic glutamate receptor ligands. Psychopharmacology **183**:226–240.
41. **Rota, P. A., et al.** 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science **300**:1394–1399.
42. **Sattler, R., and M. Tymianski.** 2000. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. J. Mol. Med. **78**:3–13.
43. **Schirmer, L., J. P. Antel, W. Bruck, and C. Stadelmann.** 2011. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. Brain Pathol. **21**:428–440.
44. **Shea, T. B., W. K. Chan, J. Kushkuley, and S. Lee.** 2009. Organizational dynamics, functions, and pathobiological dysfunctions of neurofilaments. Results Probl. Cell Differ. **48**:29–45.
45. **Shijie, J., et al.** 2009. Blockade of glutamate release from microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Tohoku J. Exp. Med. **217**:87–92.
46. **Solyom, S., and I. Tarnawa.** 2002. Non-competitive AMPA antagonist of 2,3-benzodiazepine type. Curr. Pharm. Des. **8**:913–939.
47. **St-Jean, J. R., et al.** 2006. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. J. Virol. **80**:3670–3674.
48. **St-Jean, J. R., M. Desforges, and P. J. Talbot.** 2006. Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. Adv. Exp. Med. Biol. **581**: 499–502.
49. **Talbot, P. J., H. Jacomy, and M. Desforges.** 2008. Pathogenesis of human coronaviruses other than severe acute respiratory syndrome coronavirus, p. 313–324. *In* S. Perlman, T. Gallagher, and E. J. Snijder (ed.), Nidoviruses. ASM Press, Washington, DC.
50. **Tanaka, K., et al.** 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. Science **276**:1699–1702.
51. **Tian, C., et al.** 2008. HIV-infected macrophages mediate neuronal apoptosis through mitochondrial glutaminase. J. Neurochem. **105**:994–1005.
52. **Tilleux, S., and E. Hermans.** 2007. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. J. Neurosci. Res. **85**:2059–2070.
53. **Wang, Z., et al.** 2003. Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. Virology **312**:60–73.
54. **Yeh, E. A., A. Collins, M. E. Cohen, P. K. Duffner, and H. Faden.** 2004. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. Pediatrics **113**:e73–e76.