

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

**DÉMONSTRATION DU NEUROTROPISME ET DE LA
NEUROINVASION DES CORONAVIRUS HUMAINS**

Par
Nathalie Arbour

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

14 juin 1999

© droits réservés de Nathalie Arbour, 1999

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
SOMMAIRE.....	xi
PRÉFACE.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.0 LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL.....	6
1.1 Les composantes.....	6
1.2 Les neurones.....	6
1.3 Les astrocytes.....	7
1.4 Les oligodendrocytes.....	8
1.5 Les microglies.....	9
1.6 La barrière hémato-encéphalique.....	11
1.7 Voies d'entrée pour les pathogènes dans le système nerveux central.....	12
1.8 Définitions.....	13
2.0 LES CORONAVIRUS.....	15
2.1 Nomenclature.....	15
2.2 Propriétés structurelles.....	15
2.3 Protéines structurales.....	16
2.4 Protéines non structurales.....	17
2.5 Cycle réplicatif.....	18
2.6 Infection chez les rongeurs.....	21
2.6.1 Description des pathologies induites.....	21
2.6.2 Implications des réponses immunitaires dans les pathologies du système nerveux central.....	23
2.6.3 Persistance virale <i>in vivo</i>	25
2.6.4 Persistance virale <i>in vitro</i>	26
2.7 Infections chez les primates	26
2.8 Pathologies associées aux coronavirus humains.....	27
2.9 Les réponses immunitaires contre les coronavirus humains...28	
2.10 Les coronavirus humain et le système nerveux central	29
3.0 PERSISTANCE VIRALE.....	32
3.1 Caractéristiques.....	32
3.2 Critères nécessaires à la persistance virale.....	32
3.2.1 Cytolyse limitée.....	32
3.2.2 Maintien du génome viral.....	33

3.2.3 Évasion du système immunitaire.....	33
3.3 Virus persistants dans le système nerveux central.....	35
4.0 AUTOIMMUNITÉ.....	36
4.1 Absence de tolérance contre certains antigènes du soi.....	36
4.2 Mimétisme moléculaire.....	37
4.3 Relargage d'antigènes du soi.....	38
4.4 Virus associés à des maladies auto-immunitaires humaines.....	39
4.5 Implication de la persistance virale.....	40
5.0 LA SCLÉROSE EN PLAQUES	42
5.1 Description clinique	42
5.2 Description pathologique.....	42
5.3 Prévalence.....	43
5.4 Facteurs génétiques.....	44
5.5 Association à une étiologie virale	45
5.6 Traitement.....	51
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	53
CHAPITRE 2 : SUSCEPTIBILITÉ DES CELLULES NEURALES AUX CORONAVIRUS HUMAINS.....	54
Résumé article I.....	55
Article I : ACUTE AND PERSISTENT INFECTION OF HUMAN NEURAL CELL LINES BY HUMAN CORONAVIRUS OC43.....	57
Abstract.....	58
Introduction.....	59
Materials and methods.....	63
Results.....	68
Discussion.....	75
References.....	83
Résumé article II.....	105
Article II : PERSISTENT INFECTION OF HUMAN OLIGODENDROCYTIC AND NEUROGLIAL CELL LINES BY HUMAN CORONAVIRUS 229E.....	106
Abstract.....	107
Introduction.....	108
Materials and methods.....	112
Results.....	117
Discussion.....	124
References.....	133
CHAPITRE 3 : NEUROINVASION ET NEUROTROPISME DES CORONAVIRUS HUMAINS ET LIEN POSSIBLE AVEC LA SCLÉROSE EN PLAQUES.....	153

Résumé article III.....	154
Article III : NEUROINVASION BY HUMAN RESPIRATORY CORONAVIRUSES AND ASSOCIATION WITH MULTIPLE SCLEROSIS	156
Abstract.....	157
Introduction.....	158
Materials and methods.....	162
Results.....	168
Discussion.....	174
References.....	181
 CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	206
1.0 SUSCEPTIBILITÉ DES CELLULES NEURALES AUX CORONAVIRUS HUMAINS.....	207
1.1 Susceptibilité à des infections coronavirales.....	207
1.2 Modifications du fragment N-terminal du gène S durant des infections persistantes.....	210
1.3 Implications de la persistance virale.....	215
1.0 NEUROINVASION ET NEUROTROPISME DES CORONAVIRUS HUMAINS ET LIEN POSSIBLE AVEC LA SCLÉROSE EN PLAQUES	220
2.1 Observations dans les cerveaux humains.....	220
2.2 Implications de la présence virale dans le système nerveux central.....	222
2.3 Mécanismes possibles de persistance	225
2.4 Mécanismes de démyélinisation.....	226
2.5 Lien avec la sclérose en plaques.....	228
 CONCLUSION.....	232
 REMERCIEMENTS	236
 BIBLIOGRAPHIE.....	238
 ANNEXE I : LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS...	270
 ANNEXE II : TIRÉS À PART DES ARTICLES.....	274

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1:	Association de virus avec la sclérose en plaques	48
------------	--	----

CHAPITRE 2; ARTICLE I

Tableau 1 :	RT-PCR and sequencing primers	102
Tableau 2:	Susceptibility of neural cell lines to acute and persistent infection by HCoV-OC43	103
Tableau 3 :	Characterization of sequence changes in S1 during persistent HCoV-OC43 infection	104

ARTICLE II

Tableau 1 :	RT-PCR and sequencing primers	150
Tableau 2:	Susceptibility of neural cell lines to acute and persistent infection by HCoV-229E	151
Tableau 3 :	Characterization of sequence changes in S1 during persistent HCV-OC43 infection	152

CHAPITRE 3; ARTICLE III

Tableau 1 :	Primers used to amplify HCoV-229E and HCoV-OC43 nucleocapsid protein and myelin basic protein genes	193
Tableau 2 :	Description of MS patients from which autopsy brain samples were used and summary of HCoV RT-PCR results	194
Tableau 3:	Description of non-MS patients from which autopsy brain samples were used and summary of HCoV RT-PCR results	195
Tableau 4 :	Information concerning histological localization positive signals in patients' brains	197

Tableau 5 :	Statistical analysis of detection of HCoV in human brain samples by RT-PCR- Southern hybridization	198
Tableau 6 :	Sequencing of HCoV-OC43 amplicons from human brains	199

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE1;

Figure 1 :	Stratégie de transcription et traduction de l'ARN coronaviral	20
------------	---	----

CHAPITRE 2; ARTICLE I

Figure 1:	Detection of human coronavirus antigens by indirect immunofluorescence on cells acutely infected by HCoV-OC43	92
Figure 2:	Detection of human coronavirus antigens by indirect immunofluorescence on cells persistently infected by HCoV-OC43	94
Figure 3:	Cytopathic effects of a persistent HCoV-OC43 infection on MO3.13 cells	96
Figure 4:	Yield of infectious virions from persistent HCoV-OC43 infections of various neural cell lines	98
Figure 5:	Detection of the N protein gene by RT-PCR during persistent HCoV-OC43 infection of various cell lines	100

ARTICLE II

Figure 1 :	Detection of HCoV antigens by indirect immunofluorescence on cells acutely infected by the 229E strain	142
Figure 2:	Detection of HCoV antigens by indirect immunofluorescence on cells persistently infected by the 229E strain	144
Figure 3:	Yield of infectious virions from persistent HCoV-229E infections of different cell lines	146
Figure 4:	Detection of the N protein gene by RT-PCR during persistent HCoV-229E infection of various cell lines	148

CHAPITRE 3; ARTICLE III

Figure 1:	Examples of results of RT-PCR-Southern hybridization using RNA extracted from human brains	200
Figure 2:	Northern hybridization for HCoV-OC43 on RNA extracted from human brains	202
Figure 3:	Photomicrographs showing <i>in situ</i> hybridization for HCoV-OC43 RNA in a human brain section	204

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	acide désoxyribonucléique
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	acide ribonucléique messager
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
E:	petite protéine de la membrane
GFAP:	protéine acide fibrillaire gliale ("glial fibrillary acidic protein")
GM-CSF:	facteur stimulant de colonies des granulocytes et macrophages ("granulocyte and macrophage colony stimulating factor")
HE:	protéine hémagglutinine-estérase
HHV-6:	virus de l'herpès humain 6 ("human herpes virus 6")
HCoV:	coronavirus humain(s) ("human coronaviruses")
HCoV-229E:	souche 229E de coronavirus humain
HCoV-OC43:	souche OC43 de coronavirus humain
ICAM-1 :	molécule d'adhésion cellulaire intercellulaire 1 ("intercellular cell adhesion molecule-1")
IFN- β :	interféron β
IFN- γ :	interféron γ
IL-1:	interleukine-1
IL-3:	interleukine-3
IL-4:	interleukine-4
IL-6:	interleukine-6
IL-15:	interleukine-15
kb:	kilobases
kDa:	kiloDaltons
LCMV:	virus de la chorioméningite lymphocytaire ("lymphocytic choriomeningitis virus")
M:	protéine de la membrane

MBP:	protéine basique de la myéline ("myelin basic protein")
MHV:	virus de l'hépatite murine ("murine hepatitis virus")
N:	protéine de la nucléocapside
NK:	cellule(s) tueuse(s) naturelle(s) ("natural killer cell")
NO:	oxyde nitrique ("nitric oxide")
NOS-2:	synthase d'oxyde nitrique 2 ("nitric oxide synthase 2")
PBS:	tampon salin phosphaté ("phosphate buffered saline")
PLP:	protéine protéolipidique ("proteolipidic protein")
RT-PCR:	transcription inverse couplée à la polymérisation en chaîne ("reverse-transcription polymerase chain reaction")
S:	protéine de surface
Souris SCID :	souris ayant une déficience immunitaire combinée sévère ("severe combined immunodeficiency")
SIDA :	syndrome de l'immunodéficience acquise
SNC:	système nerveux central
TGEV:	virus de la gastro-entérite transmissible du porc
TGF- β :	facteur de croissance transformant bêta ("transforming growth factor")
Th1:	cellules T auxiliaires de type 1 ("T helper 1")
Th2:	cellules T auxiliaires de type 2 ("T helper 2")
TNF:	facteur nécrosant des tumeurs ("tumor necrosis factor")
VCAM-1 :	molécule d'adhésion cellulaire vasculaire ("vascular cell adhesion molecule-1")
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine

SOMMAIRE

Les coronavirus murins sont neurotropes chez les rongeurs et les primates non humains, car ils infectent des cellules neurales. Ils sont aussi neuroinvasifs, car ils peuvent pénétrer le système nerveux central (SNC) de ces hôtes à la suite d'une inoculation périphérique. De plus, certaines souches neuroadaptées de coronavirus murins, lorsqu'inoculées de façon intracérébrale ou intranasale, sont neurovirulents car ils induisent une encéphalomyélite chronique accompagnée d'une persistance virale et d'une démyélinisation chez les souris et les rats. Ces pathologies sont utilisées comme modèle pour élucider la pathogenèse de maladies démyélinisantes humaines telle la sclérose en plaques. La neuropathologie induite par les coronavirus murins est influencée par plusieurs éléments, dont des facteurs génétiques de l'hôte, et des caractéristiques génétiques des virus.

Les coronavirus humains sont impliqués dans approximativement 30 % des rhumes. Toutefois, des observations à partir du système nerveux central de patients atteints de sclérose en plaques, telle la détection de particules coronaviriformes, de protéines coronavirales et d'acide ribonucléique coronaviral, et l'isolement de coronavirus, suggèrent l'association possible de ces virus avec cette maladie démyélinisante. De plus, des cultures primaires de cellules neurales humaines sont susceptibles à une infection par les coronavirus humains. L'ensemble de ces observations suggère que ces virus puissent être neurotropes, neuroinvasifs et neurovirulents.

Dans le but de caractériser la susceptibilité des cellules du système nerveux ou cellules neurales aux coronavirus humains, nous avons caractérisé des infections persistantes de lignées neurales humaines par les deux souches prototypes de coronavirus humains : OC43 et 229E.

L'expression d'antigène viraux, ainsi que la production de virions infectieux ont été détectées dans toutes les lignées infectées de façon persistante, et ce, pendant une période approximative de 130 jours de culture. Une lignée neuronale et une lignée oligodendrocytaire ont été infectées de façon persistante par la souche 229E des coronavirus humains. Par contre, la souche OC43 a infecté de façon persistante deux lignées astrocytaires, une lignée neuronale et une lignée oligodendrocytaire. Nous avons aussi séquencé la région putative S1 du gène de la glycoprotéine des spicules à la fin des infections persistantes et l'avons comparé à la séquence du virus initial. L'infection persistante par le coronavirus humain 229E n'a pas induit de modification importante sur ce gène. Toutefois, de nombreuses mutations ont été observées pour la souche OC43, et ce, dans toutes les lignées infectées de façon persistante. Certains de ces changements ont été détectés dans une partie des clones séquencés pour la souche OC43, suggérant l'émergence de quasi-espèces au cours de l'infection. Les deux souches de coronavirus humains peuvent donc persister dans des lignées neurales humaines.

Comme deuxième objectif, nous avons évalué le neurotropisme et la neuroinvasion de ces virus chez l'être humain. Nous avons caractérisé la présence de coronavirus humains dans des cerveaux de personnes décédées et avons vérifié si cette présence était associée à un diagnostic de sclérose en plaques. Des échantillons provenant de quatre-vingt-dix donneurs ont été testés pour la présence d'acide ribonucléique viral par une réaction de transcription inverse couplée à une réaction de polymérisation en chaîne et détectée par une hybridation de type Southern. Quarante-huit pour cent de tous les donneurs se sont avérés positifs pour une des souches de coronavirus humains. Spécifiquement, 44 % des donneurs ont été positifs pour la souche 229E et 23 % pour la souche OC43. Une prévalence plus élevée et statistiquement significative du coronavirus

humain OC43 a été observée chez les patients atteints de sclérose en plaques en comparaison avec les témoins. Une telle association n'a pas été décelée pour la souche 229E. De plus, des mutations ponctuelles dans un segment du gène de la protéine de la nucléocapside de la souche virale OC43 ont été détectées de façon spécifique dans des cerveaux humains. Des expériences d'hybridation *in situ* ont confirmé la réPLICATION de la souche OC43 dans les tissus de cerveaux humains. Les deux souches de coronavirus humains sont donc neuroinvasifs.

Les travaux présentés dans cette thèse suggèrent fortement que les coronavirus humains puissent être neurotropes et neuroinvasifs. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour associer ces virus à une pathologie humaine. Néanmoins, l'association préférentielle de la souche virale OC43 avec des patients atteints de sclérose en plaques, de même que la grande diversité de cellules neurales potentiellement infectées de façon persistante par cette souche virale, et enfin, les nombreuses mutations surgissant au cours de telles infections, suggèrent que certains coronavirus puissent démontrer une neurovirulence.

PRÉFACE

Les travaux de cette thèse sont présentés sous forme de trois publications. La contribution de chacun des auteurs est présentée ici, dans le but de bien dégager la contribution personnelle de l'auteure de cette thèse. Deux de ces articles ont déjà été acceptés pour publication dans un journal scientifique avec comité de lecture pour parution au mois d'avril de cette année. Le troisième article a été soumis pour évaluation au mois de mars. Le docteur Pierre Talbot a dirigé l'ensemble de ces travaux. Il a fourni les encadrements scientifique et monétaire qui ont permis l'accomplissement des travaux présentés dans cette thèse. Il est, et ce à juste titre, l'auteur senior de toutes ces publications.

Les publications I et II présentent les résultats obtenus des infections aiguës et persistantes, par les coronavirus humains OC43 et 229E, de lignées neurales humaines immortalisées. Parmi les coauteurs, les docteurs Marc Tardieu et Neil Cashman ont fourni respectivement les lignées cellulaires suivantes: la lignée microgliale CHME-5 et la lignée oligodendrocytaire MO3.13, qui ont été utilisées dans ces études. Monsieur Claude Lachance et mesdames Sophie Ékandé et Geneviève Côté ont participé à l'obtention de ces résultats dans le cadre de leurs travaux de maîtrise tandis que madame Fanny Chagnon effectuait un stage de premier cycle dans le laboratoire. Monsieur Claude Lachance a réalisé les expériences d'infections aiguës et persistantes par les deux souches de coronavirus humains des lignées CHME-5 et GL-15. Ces deux lignées n'ont pas démontré d'infection persistante par les virus 229E et OC43. Madame Geneviève Côté a réalisé les cinétiques d'infection aiguë par le coronavirus OC43 sur les lignées neurales U-87 MG, U-373 MG, H4, SK-N-SH, MO3.13 et Te671, et a aussi effectué des expériences préliminaires d'infections persistantes qui ne sont pas présentées dans cette thèse. Madame Sophie Ékandé a réalisé les cinétiques d'infection aiguë par le virus 229E sur les

lignées neurales: U-87 MG, U-373 MG, H4, SK-N-SH, MO3.13 et Te671. Tandis que madame Fanny Chagnon a effectué des dosages de titres infectieux des infections aiguës par le virus 229E. Toutes les autres expériences présentées dans ces deux publications ont été effectuées par l'auteure de cette thèse. Ceci inclut pour les infections aiguës, la caractérisation de l'ARN viral et de l'expression d'antigènes viraux et pour les infections persistantes le suivi des titres infectieux, de l'expression d'antigènes et d'ARN viraux ainsi que le séquençage d'ARN viraux. La rédaction des publications, a aussi été réalisée par l'auteure de cette thèse sous la supervision du docteur Pierre Talbot.

L'article III aborde la neuroinvasion des coronavirus humains dans les cerveaux humains et son lien possible avec la sclérose en plaques. Le docteur Robert Day a permis l'apprentissage et l'application par l'auteure de la technique d'hybridation *in situ* et d'hybridation de type Northern. De plus, il a agi comme consultant dans l'interprétation des résultats obtenus par hybridation *in situ*. Le docteur Jia Newcombe nous a fourni des échantillons de cerveaux pour les expériences de transcription inverse couplée à la polymérisation en chaîne ainsi que des lames de cerveaux pour les expériences d'hybridation *in situ*. Elle a aussi contribué aux discussions scientifiques dans le cadre de l'analyse des résultats. Toutes les expériences présentées dans cette publication ont été effectuées par l'auteure de cette thèse, de même que la rédaction de la publication, sous la supervision du docteur Pierre Talbot.

Au cours de ces travaux de doctorat, l'auteure de cette thèse a aussi contribué à des publications portant sur les résultats obtenus par d'autres membres du laboratoire du docteur Pierre Talbot. Une copie des tirés-à-part de ces publications est placée en annexe. Des travaux portant sur la susceptibilité des cellules neurales en cultures primaires aux coronavirus humains ont été effectués par monsieur Aurelio Bonavia, dans le cadre de

ses travaux de maîtrise. L'auteure de cette thèse a effectué des expériences complémentaires d'infection d'astrocytes foetaux, de même qu'elle a enseigné à monsieur Bonavia la technique de transcription inverse couplée à la polymérisation en chaîne (RT-PCR) et l'hybridation de type Southern pour la détection d'ARN viral. L'application de différentes techniques de détection de coronavirus humains pour une éventuelle détection de tels virus dans des échantillons humains a été effectuée par le docteur Jacques Sizun, qui était de passage dans le laboratoire du docteur Pierre Talbot dans le cadre d'une sabbatique. L'auteure de cette thèse a formé le docteur Sizun pour effectuer la technique de RT-PCR pour la détection des deux souches prototypes de coronavirus humains et a aussi participé à la conception des expériences. Enfin, les travaux de maîtrise de monsieur Claude Lachance consistaient en la démonstration de l'utilisation du récepteur cellulaire CD13 par le coronavirus humain 229E comme voie d'entrée lors d'infection de cellules neurales immortalisées. L'auteure de cette thèse a contribué aux idées scientifiques de ces travaux quant à l'application de la technique de cytométrie en flux pour la détection de ce récepteur cellulaire. L'auteure de cette thèse a aussi contribué à la rédaction des trois publications émanant de ces travaux et de la conception des figures. Ces travaux ne seront pas décrits dans cette thèse.

INTRODUCTION

Les coronavirus murins causent des gastro-entérites, des hépatites et des encéphalites aiguës. Certaines souches neuroadaptées de ces virus, lorsqu'inoculées de façon intracérébrale ou intranasale, induisent une encéphalomyélite chronique accompagnée d'une persistance virale et d'une démyélinisation chez les souris et les rats. La pathogenèse de cette maladie chez les rongeurs est influencée par plusieurs éléments, dont des facteurs génétiques de l'hôte, tels l'état du système immunitaire, des caractéristiques génétiques des virus, et la dose et la voie d'inoculation des virus. Les coronavirus murins sont neurotropes chez les rongeurs, car ils infectent des cellules neurales. Ils sont aussi neuroinvasifs, car ils peuvent pénétrer le système nerveux central (SNC) à la suite d'une inoculation périphérique. Finalement, ils sont aussi neurovirulents, car ils induisent une pathologie du SNC détectable par des signes cliniques. Des expériences ont aussi été tentées sur des primates non humains avec ces virus. Les coronavirus murins ont causé une encéphalite chez ces animaux. De plus, ils ont infecté certains types cellulaires du SNC et ont pénétré le SNC à la suite d'une inoculation périphérique. Les coronavirus murins sont par conséquent aussi neurotropes, neuroinvasifs et neurovirulents chez les primates non humains.

Les coronavirus humains causent approximativement 30 % des rhumes. Deux souches prototypes sont connus: OC43 et 229E. D'autres pathologies ont aussi été associées de façon circonstancielle avec ces deux virus. Des observations à partir du SNC de patients atteints de sclérose en plaques, tels la détection de virions ayant l'aspect de coronavirus, l'isolement de coronavirus, la détection de protéines coronavirales et d'acide ribonucléique coronaviral, suggèrent l'implication de ces virus dans cette maladie démyélinisante. Le potentiel neurotrophe de ces virus a été abordé par la démonstration de l'infection de cultures primaires neurales humaines. De plus, une lignée d'astrocytome a été infectée de façon persistante pendant une vingtaine de jours par une souche de coronavirus humain. L'ensemble de ces observations suggère l'implication des coronavirus humains dans des pathologies du SNC humain comme cela a été observé pour le coronavirus murin chez les rongeurs.

et les primates non humains. Des expériences sont nécessaires pour mieux éclaircir le potentiel neurotrophe, neuroinvasif et neurovirulent de ces virus chez l'humain. De plus, la sclérose en plaques est une maladie démyélinisante dont l'étiologie n'a pas encore été élucidée.

À la suite de l'analyse des observations publiées, nous avons émis les hypothèses suivantes. 1- Certains coronavirus humains seraient neurotropes. 2- Une infection coronavirale persistante pourrait être impliquée dans l'étiologie de la sclérose en plaques soit dans l'induction ou le développement de cette maladie. Dans le but de vérifier ces hypothèses, nous avons évalué et caractérisé des infections persistantes de lignées neurales humaines par les deux souches prototypes de coronavirus humains. L'expression de génome et d'antigène viraux, ainsi que la production de virions infectieux ont été suivies pendant une période approximative de 130 jours de culture. Étant donné la courte longévité des cultures primaires, de telles expériences n'auraient pu être effectuées avec celles-ci. Comme autre objectif, nous avons caractérisé la présence de coronavirus humains dans des cerveaux de personnes décédées et avons vérifié si cette présence était associée à un diagnostic de sclérose en plaques. Des échantillons provenant de quatre-vingt-dix donneurs ont été testés pour la présence d'acide ribonucléique viral par une réaction de transcription inverse couplée à une réaction de polymérisation en chaîne et détectée par une hybridation de type Southern. Des expériences d'hybridation de type Northern et d'hybridation *in situ* ont aussi été réalisées pour détecter la présence de génomes viraux.

Dans les prochaines pages, apparaît d'abord un premier chapitre de revue de littérature générale touchant le système nerveux central, les coronavirus, la persistance virale, l'auto-immunité et la sclérose en plaques. Ensuite, le chapitre 2 traite de la caractérisation de la susceptibilité de lignées neurales immortalisées aux coronavirus humains OC43 et 229E, et présente les résultats obtenus sous forme de deux articles scientifiques déjà acceptés pour publication. Le troisième chapitre aborde la neuroinvasion et le neurotropisme

des coronavirus humains et du lien possible avec la sclérose en plaques. Un article scientifique soumis pour publication présente les résultats obtenus avec les échantillons de cerveaux humains. Finalement, dans le quatrième et dernier chapitre, apparaît une discussion générale des résultats des trois articles scientifiques présentés.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

1.1 Les composantes

Le système nerveux central (SNC) est constitué de l'encéphale et de la moelle épinière. L'encéphale, contenu dans la boîte crânienne, comprend le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral, alors que la moelle épinière est située dans le canal vertébral (Guyton, 1989). Le liquide céphalo-rachidien remplit les ventricules dans le cerveau et entoure les surfaces extérieures de l'encéphale et de la moelle épinière, faisant en sorte que le SNC flotte dans un liquide, le protégeant des contre-coups soudains (Guyton, 1989). Le liquide céphalo-rachidien est sécrété par les plexus choroïdes (Guyton, 1989). La substance, ou matière, blanche constituée de fibres nerveuses myélinisées est située au centre de l'encéphale et en périphérie de la moelle épinière. La matière grise quant à elle contient surtout les corps des neurones et est située en périphérie de l'encéphale et au centre de la moelle épinière (Guyton, 1989).

1.2 Les neurones

Le neurone constitue l'unité de base du système nerveux qui permet la réception et la conduction de l'influx nerveux. Les neurones existent dans une grande variété de forme et de taille. Ils ont tous en commun: un corps cellulaire qui contient le noyau cellulaire; un axone qui est un prolongement unique s'étendant du corps cellulaire et enfin, des dendrites qui sont des ramifications arborescentes (Guyton, 1989). Les neurones ont la capacité de créer un potentiel d'action ou un influx nerveux. Le potentiel d'action se propage spontanément tout au long de la membrane cellulaire. Il permet de transmettre un message, une information sensitive ou un ordre moteur (Guyton, 1989). Les messages arrivent à un neurone par ses dendrites, qui amènent le message au corps cellulaire. Le corps cellulaire analyse les messages et en produit de nouveaux, lesquels cheminent le long de l'axone (Guyton, 1989).

Les neurones peuvent être le type de cellule cible des infections virales. Certains virus tels le virus Sindbis et le virus de la poliomyélite infectent les neurones de leur hôte. Le virus Sindbis peut même causer l'apoptose de ces cellules (Griffin, 1998). Le virus de la rougeole, est neuroinvasif et, infecte plusieurs types cellulaires dont les neurones (McQuaid *et al.*, 1998). Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) induit la démence chez plusieurs patients atteints de SIDA. Les neurones, même s'ils ne sont pas infectés ou seulement très rarement par ce virus, subissent des dommages dus à la présence du virus dans le SNC (Lipton, 1998). Les macrophages et microglies infectés de même que les astrocytes activés lors de l'infection du SNC par le VIH sécrètent des excitants et des neurotoxines tels l'acide arachidonique, le facteur activateur des plaquettes, des radicaux libres, du glutamate, de la quinolinate, et des amines (Lipton, 1998) qui affectent les neurones. Ainsi, les neurones peuvent être affectés directement et indirectement par les infections virales du SNC.

1.3 Les astrocytes

Les astrocytes représentent le type cellulaire le plus important en nombre dans le SNC. Ces cellules forment des protubérances qui sont en contact avec les vaisseaux sanguins et qui contribuent à la barrière hémato-encéphalique en induisant la formation de jonctions serrées entre les cellules endothéliales (Aschner, 1998). Les astrocytes sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie dans le SNC via plusieurs activités (Aschner, 1998). Ils sont impliqués dans la régulation du métabolisme de glycogène (Aschner, 1998). Ces cellules produisent plusieurs facteurs tels 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 (Vincent *et al.*, 1998). Ces cellules ont une contribution primordiale dans le métabolisme de neurotransmetteurs (GABA et glutamate entre autres) et de fonctions biochimiques (Vincent *et al.*, 1998). Les astrocytes contribuent à maintenir le microenvironnement autour des neurones en régulant la composition ionique de l'espace extracellulaire (Vincent *et al.*, 1998).

Les astrocytes peuvent être impliqués dans les réponses de l'hôte aux infections. En effet, ces cellules ont aussi la capacité de sécréter des molécules inflammatoires telles: 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 les colonies des granulocytes et macrophages (GM-CSF), l'interféron- γ (IFN- γ), le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α), l'oxyde nitrique (NO), et des prostaglandines (Aschner, 1998; Vincent *et al.*, 1998). De plus, des études *in vitro* ont démontré qu'on peut induire l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II sur ces cellules. Les astrocytes seraient ainsi capables de présenter les antigènes. Toutefois, le niveau d'expression de CMH de classe II est inférieur à celui retrouvé sur les microglies activées (Aschner, 1998; Vincent *et al.*, 1998). De plus, les astrocytes semblent moins efficaces pour présenter des antigènes aux cellules T que les microglies (Aloisi *et al.*, 1998). Les astrocytes participent au mécanisme de réparation, car ils peuvent proliférer et ainsi remplir les espaces laissés par la destruction de cellules neurales, formant une cicatrice gliale (Vincent *et al.*, 1998).

Ces cellules sont dans un état activé au cours de maladies neurodégénératives telles la démence associée au SIDA, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose en plaques (Chao *et al.*, 1996), suggérant leur implication dans ces maladies.

1.4 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont responsables de la production de la gaine de myéline qui entoure les axones dans le SNC. Cette gaine est un prolongement de la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes. Cette membrane multicouche est riche en lipides et relativement stable (Cuzner et Norton, 1996). Elle isole les axones et augmente la conduction des axones (Cuzner et Norton, 1996). La myéline compose environ 50 % de la matière blanche du SNC (Cuzner et Norton, 1996). Plusieurs protéines ont été détectées dans cette

membrane lipidique. La protéine protéolipidique (PLP) et la protéine basique de la myéline (MBP) en sont les principales constituantes protéiques. L'enzyme 2',3' nucléotide cyclique 3'-phosphodiestérase (CNP), la glycoprotéine associée à la myéline (MAG), la glycoprotéine myéline-oligodendrocyte (MOG), la glycoprotéine oligodendrocyte-myéline (OMgp) et la protéine spécifique à la myéline et aux oligodendrocytes (MOSP), sont aussi détectées dans la myéline (Cuzner et Norton, 1996).

La myéline du SNC est particulièrement sensible à l'attaque par les espèces oxygénées réactives (Cuzner et Norton, 1996). De plus, la gaine de myéline et les oligodendrocytes sont susceptibles aux effets néfastes du TNF- α et de la lymphotoxine- α (Aschner, 1998, Ledeen et Chakraborty, 1998). Antel et collaborateurs (1998) ont démontré que les oligodendrocytes, qui n'expriment pas le CMH de classe II, sont susceptibles à une lyse n'impliquant pas les molécules du CMH, mais plutôt des cellules immunitaires exprimant le marqueur CD56, caractéristique des cellules de type Natural Killer.

1.5 Les microglies

Les microglies sont dérivées de la moelle osseuse au cours du développement foetal et se rendent jusqu'au SNC (Gehrman et al., 1995). Elles représentent l'équivalent fonctionnel des macrophages dans d'autres tissus (Gehrman et al., 1995). Ces cellules représentent entre cinq et quinze pour cent des cellules du SNC (Kreutzberg, 1996). Les microglies démontrent différents stades d'activation tout comme les macrophages (Gehrman et al., 1995). Ces cellules semblent être les premières dans le SNC à répondre à des attaques de toutes sortes. L'activation des microglies est un facteur clé dans la défense du parenchyme neural au cours des maladies infectieuses, de l'inflammation, des traumas, des ischémies, des tumeurs du cerveau et de la neurodégénération (Kreutzberg, 1996). L'activation de ces cellules peut survenir avant même que des changements neuropathologiques ne soient détectables (Gehrman et al., 1995). Plusieurs facteurs potentiels pourraient

activer ou faire proliférer les microglies *in vivo*, entre autres certaines cytokines: l'interleukine-4 (IL-4), l'IL-3, le GM-CSF, l'IFN- γ , et le TGF- β (Gehrman et al., 1995). Plusieurs activités immunitaires ont été attribuées à ces cellules activées, à l'image des macrophages activés. 1- Une augmentation de l'expression de molécules du CMH de classe II et de classe I a été observée *in vivo* sur ces cellules à la suite de l'administration de faibles doses de cytokines inflammatoires (Gehrman et al., 1995; Kreutzberg, 1996). Ayant une plus grande expression de ces molécules présentatrices, elles pourraient présenter des antigènes aux lymphocytes T activés. 2- Les microglies activées peuvent relâcher plusieurs médiateurs tels des cytokines: le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, le TGF- β ; des intermédiaires oxygénés, du NO et des protéases (Gehrman et al., 1995; Kreutzberg, 1996). 3- Ces cellules ont la capacité de phagocytter, permettant de détruire les micro-organismes envahissant et d'enlever les débris potentiellement dommageables (Gehrman et al., 1995; Kreutzberg, 1996). 4- Elles ont un pouvoir cytotoxiques accru après leur activation (Gehrman et al., 1995). 5- Elles expriment des molécules immunitaires telles le récepteur Fc pour les anticorps, le récepteur 3 du complément, les molécules de co-stimulation B7-1 (CD80), des molécules d'adhésion (Gehrman et al., 1995; Kreutzberg, 1996).

Les microglies ont été impliquées dans diverses pathologies du SNC. Ces cellules traitées à l'IFN- γ et à la protéine β -amyloïde, accumulée lors de la maladie d'Alzheimer, produisent des intermédiaires nitrogénés et du TNF- α , menant à des dommages aux neurones environnants (Meda et al., 1995). De plus, certains auteurs ont suggéré que l'acteur principal causant la démyélinisation observée chez les patients atteints de la sclérose en plaques puisse être la microglie activée qui sécrète et relâche des facteurs toxiques pour la myéline (Sriram et Rodriguez, 1997).

1.6 La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique représente l'interface entre le sang, qui apporte les éléments nutritifs au cerveau, et le cerveau, qui requiert l'homéostasie de son environnement pour un fonctionnement adéquat (Wolburg et Risau, 1995). Plusieurs structures isolent le SNC du reste de l'organisme. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins qui sillonnent le cerveau forment des jonctions très serrées limitant le passage entre celles-ci. De plus, la pinocytose est limitée au niveau des cellules endothéliales du SNC en comparaison avec les endothéliums des vaisseaux sanguins situés ailleurs. L'épithélium des plexus choroïdes forme une barrière entre le liquide céphalo-rachidien et le sang. De même, les tanocytes, des cellules épendymales spécialisées, forment une barrière entre le sang et le liquide céphalo-rachidien au niveau des organes circonventriculaires. Une barrière formée par le neurothélium, des cellules de la couche arachnoïde, protège le cerveau d'un contact direct avec le sang au niveau de la dure mère (Wolburg et Risau, 1995).

Les cellules endothéliales du cerveau ont besoin d'un apport constant de leur microenvironnement pour maintenir la fonction de barrière hémato-encéphalique (Wolburg et Risau, 1995). Les astrocytes peuvent induire les propriétés de barrière hémato-encéphalique à des cellules endothéliales non neurales *in vivo* (Janzer et Raff, 1987). Elles représentent une des sources du microenvironnement nécessaire.

La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique peut être influencée par certaines molécules. Des cytokines, telles le TNF, l'IL-1, et l'IL-6, et le NO augmentent la perméabilité de cette barrière (Wolburg et Risau, 1995; De Vries *et al.*, 1997). Chez des patients atteints de pathologies du SNC, par exemple la sclérose en plaques, une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique a été observée (Sharief et Thompson, 1992; Wolburg et Risau, 1995; Tuomanen, 1996).

Dans des conditions physiologiques normales, la barrière hémato-encéphalique permet le passage de lymphocytes T activés dans le SNC, mais restreint le passage d'autres cellules immunes tels les lymphocytes B et les macrophages (Aschner, 1998). Toutefois, en réponse à des réactions d'inflammation aiguë, des cellules périphériques tels les lymphocytes B, les granulocytes et les cellules tueuses naturelles (NK) sont recrutées dans le parenchyme du SNC (Aschner, 1998). En effet, les cellules endothéliales du cerveau sont capables d'exprimer des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) qui sont impliquées dans la migration de lymphocytes à travers la barrière hémato-encéphalique (De Vries *et al.*, 1997).

1.7 Voies d'entrée pour les pathogènes dans le système nerveux central

Les pathogènes peuvent utiliser différentes voies pour pénétrer dans le SNC (Tuomanen, 1996). 1- Ils peuvent traverser l'épithélium des plexus choroïdes et se retrouver dans le liquide céphalorachidien. Certains pathogènes tels le virus Sendai et le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) ciblent directement les plexus choroïdes (Tuomanen, 1996). De plus, les cellules épendymales, qui couvrent les ventricules du cerveau et le canal central de la moelle épinière, sont susceptibles à plusieurs infections virales (virus influenza, virus herpès simplex, virus varicelle-zona, virus des oreillons) (Del Bigio, 1995). 2- Les pathogènes peuvent aussi entrer via l'épithélium des capillaires du cerveau et se retrouver dans le parenchyme du cerveau. Cette voie d'entrée serait utilisée par des picornavirus, des togavirus et des bunyavirus (Tyler et Gonzalez-Scarano, 1997). 3- D'autres virus, par exemple le virus de la rougeole, peuvent pénétrer le SNC en utilisant des cellules leucocytaires comme véhicules. Une augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhésion telle ICAM-1 et VCAM-1 a été observée sur les cellules endothéliales à la suite d'infections (Del Bigio, 1995; Tuomanen, 1996). De plus, les lymphocytes T activés sécrètent des cytokines qui augmentent l'expression de telles molécules. Cela peut permettre aux cellules leucocytaires

infectées d'augmenter leur adhésion aux cellules endothéliales et faciliter leur pénétration dans le SNC (Tuomanen, 1996; Tyler et Gonzalez-Scarano, 1997).

4- Les virus peuvent utiliser le transport rétrograde via les axones des nerfs. Le virus de la rage et le virus herpès simplex sont des exemples de ce type de transport viral (Tyler et Gonzalez-Scarano, 1997). 5- Les neurones olfactifs se ramifient dans la muqueuse des narines et pénètrent directement dans le bulbe olfactif du cerveau (Tyler et Gonzalez-Scarano, 1997). Il semble que seuls les signaux sensoriels olfactifs parviennent jusqu'au cortex cérébral sans être relayés. Ce passage direct permet la transmission de virus des narines au SNC. Le coronavirus murin et le virus de la stomatite vésiculaire peuvent utiliser cette voie pour pénétrer le SNC (Tyler et Gonzalez-Scarano, 1997). Ainsi, les virus neuroinvasifs peuvent utiliser plusieurs voies pour pénétrer le SNC.

1.8 Définitions

Avant de poursuivre plus avant, il est nécessaire de définir certains termes relatifs aux infections virales du SNC. La neuroinvasion caractérise la capacité des virus à pénétrer le SNC à partir de sites périphériques (Stroop, 1994; Tyler et Gonzalez-Scarano, 1997). Il n'y a pas d'accès direct pour les pathogènes au cerveau à partir de l'extérieur. Différentes voies d'entrée sont possibles, tel qu'il a été discuté plus haut. Des virus pourraient se retrouver dans le SNC sans pour autant infecter des cellules neurales, par exemple lors d'infection de cellules leucocytaires qui ont ensuite pénétré dans le SNC. Le neurotropisme définit l'habileté des virus à infecter des cellules du SNC ou du système nerveux périphérique (Stroop, 1994; Tyler et Gonzalez-Scarano, 1997). Et enfin, la neurovirulence réfère à la capacité des virus à causer une pathologie au SNC détectable par des observations histologiques et/ou cliniques (Stroop, 1994). Il est tout à fait possible que des virus infectent des cellules du SNC sans pour autant créer des effets pathologiques. On peut ici donner l'exemple du virus de la rougeole (Katayama et al., 1995) et du virus polyome JC (White et al., 1992) qui ont été détectés dans des cerveaux de patients qui ne démontraient aucune

pathologie neurologique. Ces termes seront utilisés tout au cours de cette thèse selon la définition donnée ici.

2.0 LES CORONAVIRUS

2.1 Nomenclature

Les coronavirus font partie de l'ordre des *Nidovirales* (Cavanagh *et al.*, 1997; Enjuanes *et al.*, 1999), de la famille des *Coronaviridae* et du genre *Coronavirus* (Lai et Cavanagh, 1997). Ils sont divisés en trois groupes antigéniques sur la base d'observations obtenues à l'aide d'anticorps monoclonaux et du séquençage de certaines de leurs protéines (Lai et Cavanagh, 1997). Dans le premier groupe antigénique on retrouve: le virus de la gastro-entérite transmissible du porc (TGEV), le coronavirus félin (FCoV), le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV), le coronavirus canin (CCoV), le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV), et le coronavirus humain 229E (HCoV-229E). Le deuxième groupe antigénique comprend le virus de l'hépatite murine (MHV), le coronavirus bovin (BCoV), le coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43), le virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine (HEV) et le coronavirus de dinde (TCoV). Le troisième groupe est composé d'un seul membre, le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) (Lai et Cavanagh, 1997; Enjuanes *et al.*, 1999).

2.2 Propriétés structurelles

Les coronavirus possèdent un génome d'acide ribonucléique (ARN), simple brin de polarité positive d'environ 27 à 32 kilobases (kb), qui en fait la plus longue molécule d'ARN connue. Ce génome enrobé de protéines N forme la nucléocapside qui se trouve dans une enveloppe pléomorphe d'un diamètre approximatif de 120 nm (Lai et Cavanagh, 1997). Les protéines des spicules (S) projettent à la surface de l'enveloppe virale et forment ainsi une structure ressemblant à une couronne autour de l'enveloppe. On retrouve aussi d'autres protéines structurales sur l'enveloppe : la protéine de la membrane (M) et une autre petite protéine (E). Certaines souches de coronavirus appartenant au groupe antigénique II tels les virus MHV, BCoV, HCoV-OC43, HEV et TCoV, possèdent une protéine supplémentaire, l'hémagglutinine-estérase (HE). Cette

dernière n'est pas essentielle au cycle répliquatif viral (Lai et Cavanagh, 1997). Par contre, elle contribue à la neuropathogenèse virale en influençant le tropisme viral et la vitesse de propagation du virus (Yokomori *et al.*, 1992; Yokomori *et al.*, 1995).

2.3 Protéines structurales

Chez les coronavirus murins, les virus de l'hépatite murine (MHV), la protéine S a été étudiée en détail. Cette protéine est clivée chez certains coronavirus. Elle se présente alors sous forme d'un complexe d'environ 180 kilodaltons (kDa) formé de deux régions, S1 (partie N-terminale de la protéine S) et S2 (partie C-terminale de la protéine S). Cette protéine fortement glycosylée (Mounir et Talbot, 1993b; Lai et Cavanagh, 1997) est responsable de l'attachement au récepteur cellulaire (Dveksler *et al.*, 1991; Yokomori et Lai, 1992). Elle est impliquée dans la formation de syncytiums lors de l'infection (Collins *et al.*, 1982). La protéine S est une des premières cibles du système immunitaire de l'hôte lors d'une infection coronavirale. La production d'anticorps (Collins *et al.*, 1982; Talbot *et al.*, 1984; Wege *et al.*, 1988; Daniel *et al.*, 1993) et la présence de lymphocytes T cytotoxiques activés dirigés contre des épitopes présents sur cette protéine (Castro et Perlman, 1995; Bergmann *et al.*, 1996) ont été observés. Une immunisation par cette protéine ou seulement par certains peptides issus de celle-ci, protège les animaux contre une épreuve virale avec le MHV (Talbot *et al.*, 1988; Daniel et Talbot, 1990). Elle est la protéine structurale démontrant le plus grand nombre de variations génétiques, particulièrement dans sa région N-terminale ou S1 (Lai et Cavanagh, 1997). Des déterminants de neurovirulence ont été localisés sur la portion S1 de cette protéine (Dalziel *et al.*, 1986; Fleming *et al.*, 1987; Gallagher *et al.*, 1990; Matsubara *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992a; Taguchi *et al.*, 1995).

La protéine M quant à elle joue un rôle dans l'assemblage et le bourgeonnement au niveau des membranes intracellulaires des virions (Sturman *et al.*, 1980; Mounir et Talbot, 1992; Lai et Cavanagh, 1997). La

protéine E est essentielle pour l'assemblage des virions (Bos *et al.*, 1996; Vennema *et al.*, 1996). Une protection partielle de l'ARN génomique contre les ribonucléases est fournie par la protéine de la nucléocapside (N). Cette protéine pourrait aussi être impliquée dans la synthèse d'ARN viral (Compton *et al.*, 1987). Des réponses immunitaires protectrices sont aussi dirigées contre la protéine de la nucléocapside (Körner *et al.*, 1991) et la protéine M (Fleming *et al.*, 1989; Mobley *et al.*, 1992; Xue *et al.*, 1995).

2.4 Protéines non structurales

Le gène *pol* situé à l'extrémité 5' du génome coronaviral contient 2 cadres de lectures et couvre près des deux tiers du génome. Le premier cadre de lecture contient trois motifs distincts identifiés par une analyse informatisée de sa séquence: une ou deux protéases à cystéines similaires à la papaïne; une protéase similaire à la chymotrypsine des picornavirus; et enfin, un facteur de croissance riche en cystéine. L'activité protéolytique des protéases à cystéines similaires à la papaïne a été démontrée expérimentalement (Baker *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1993; Bonilla *et al.*, 1995; Bonilla *et al.*, 1997; Herold *et al.*, 1998) de même que l'activité de la protéase similaire à la chymotrypsine des picornavirus (Lu *et al.*, 1995; Ziebuhr *et al.*, 1995; Heusipp *et al.*, 1997). Le deuxième cadre de lecture de ce gène se superpose de quelques nucléotides sur le premier et est dans un cadre de lecture -1 comparativement au premier. Il contient les domaines associés à la synthèse d'ARN: une ARN polymérase dépendante d'ARN, un domaine liant les nucléosides triphosphates et ayant une activité hélicase, ainsi qu'un domaine en forme de doigt de zinc liant les nucléotides (Lai et Cavanagh, 1997).

Une grande hétérogénéité est observée entre les coronavirus au niveau du nombre et de la localisation génomique de protéines non structurales (Mounir et Talbot, 1993a). La fonction de nombreuses protéines non structurales n'a pas été élucidée. Pour les coronavirus MHV, HCoV-OC43 et BCoV, un cadre de lecture situé entre le gène *pol* et le gène de

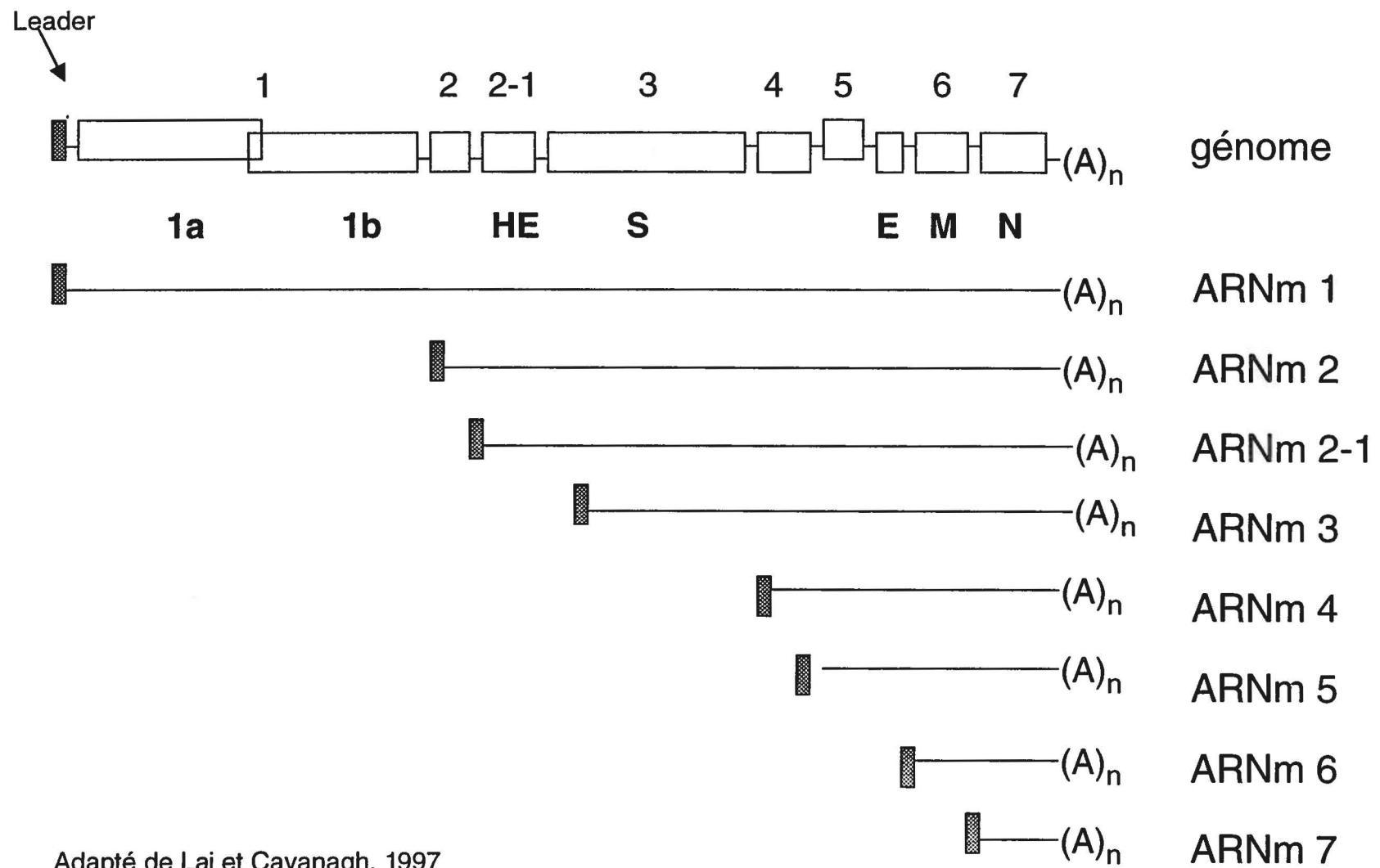
l'hémagglutinine-estérase, code pour une petite protéine (approximativement 30 kDa) détectée dans le cytoplasme de cellules infectées, mais dont la fonction reste encore une énigme (Bredenbeek *et al.*, 1990; Cox *et al.*, 1991; Labonté *et al.*, 1995). D'autres cadres de lecture ont été détectés entre le gène de la protéine S et de la protéine E, par contre aucune fonction n'a été attribuée à ces potentielles protéines non structurales. Une homologie de cinq acides aminés a été détectée entre la protéine putative du cadre de lecture 4b, situé entre les gènes des protéines E et M du HCoV-229E et la MBP (Jouvenne *et al.*, 1992; Chagnon *et al.*, 1998). Cette protéine non structurale a été détectée par cytométrie en flux dans des cellules infectées par le virus HCoV-229E (Chagnon *et al.*, 1998).

2.5 Cycle répliquatif

Lors de l'infection, le coronavirus s'attache tout d'abord à la cellule cible. Le récepteur cellulaire utilisé par le MHV fait partie de la sous-famille des glycoprotéines biliaires (bgp) et est un homologue de la famille des antigènes carcino-embryonnaires (Dveksler *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1991). Le récepteur utilisé par le HCoV-229E est l'aminopeptidase N ou CD13 (Delmas *et al.*, 1992; Yeager *et al.*, 1992; Lachance *et al.*, 1998). Le HCoV-OC43, quant à lui, se lie aux résidus d'acide sialique (Künkel et Herrler, 1993). Il a été démontré que le HCoV-OC43 peut se lier au CMH de classe I chez l'humain. Par contre, l'utilisation de cette molécule comme voie d'entrée n'a pas été clairement démontrée (Collins, 1994). Une molécule supplémentaire est sans doute utilisée par le HCoV-OC43 comme récepteur (Lai et Cavanagh, 1997). Les particules virales semblent pénétrer la cellule par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique cellulaire ou par endocytose (Lai et Cavanagh, 1997). La nucléocapside se retrouve alors dans le cytoplasme cellulaire. Les mécanismes de décapsidation ne sont pas encore élucidés.. Le cycle répliquatif des coronavirus s'amorce ensuite dans la cellule infectée et il semble surtout cytoplasmique (Lai et Cavanagh, 1997).

Une ARN polymérase dépendante d'ARN est traduite à partir du premier gène sur le génome viral. Elle est responsable de la synthèse du brin négatif du génome viral, de la synthèse des brins d'ARN messagers (ARNm) et des copies du génome en utilisant le brin négatif comme gabarit. Les ARNm sont au nombre de 6 à 8 selon l'espèce et la souche de coronavirus et sont de tailles différentes. Le plus petit ARNm contient seulement le cadre de lecture en 3' du génome alors que le deuxième plus petit contient un cadre de lecture additionnel en 5', et ainsi de suite jusqu'au plus long ARNm de même taille que l'ARN génomique. En général, chaque cadre de lecture est représenté par un ARNm qui débute par un signal consensus en 5', de 60 à 90 nucléotides, dérivé de l'extrémité 5' du génome. Seul le cadre de lecture en 5' présent sur l'ARNm est traduit. On retrouve dans l'ordre 5'→3' sur le génome viral les cadres de lecture suivants: l'ARN polymérase; l'hémagglutinine-estérase (lorsque présente); la protéine des spicules (S); la petite protéine de la membrane (E); la protéine de la membrane (M); et enfin la protéine de la nucléocapside (N). Certains cadres de lecture codant pour des protéines non structurales putatives se situent entre les cadres de lecture des protéines: S et E; E et M; et M et N, de même qu'à l'extrémité 3' du génome coronaviral. Le cadre de lecture codant pour la protéine de la nucléocapside se retrouve sur tous les ARNm coronaviraux étant donné sa localisation à l'extrémité 3' du génome viral. (Lai et Cavanagh, 1997). Les ARNm viraux sont traduits en utilisant la machinerie cellulaire et certaines protéines subissent des modifications telles que glycosylation (protéines S et M) et phosphorylation (protéine N). Les protéines N s'associent à l'ARN génomique pour former la nucléocapside. Cette dernière interagit avec les protéines de l'enveloppe (S, M, E, et HE dans certains cas) insérées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil pré-Golgi. Les particules virales bourgeonnent dans le réticulum endoplasmique et le complexe Golgi, sont transportées via les compartiments de l'appareil de Golgi et ensuite relâchées à l'extérieur de la cellule (Lai et Cavanagh, 1997).

Figure 1: Stratégie de transcription et traduction de l'ARN coronaviral



Adapté de Lai et Cavanagh, 1997

2.6 Infection chez les rongeurs

2.6.1 Description des pathologies induites

Les coronavirus murins peuvent induire une variété de maladies chez la souris, par exemple des hépatites et des gastro-entérites. Nous nous attarderons davantage à l'encéphalomyélite et la démyélinisation de la matière blanche causées par des souches neuroadaptées du MHV. Cette maladie viro-induite du SNC est utilisée comme modèle animal de maladies démyélinisantes telle la sclérose en plaques.

Des souches neurotropes du MHV peuvent utiliser plusieurs voies pour atteindre le SNC de ces hôtes. A la suite d'une inoculation intranasale, ils peuvent entrer dans le cerveau via le nerf olfactif et se répandre dans le SNC des souris (Lavi *et al.*, 1988; Perlman *et al.*, 1990; Barnett et Perlman, 1993). De plus, les systèmes lymphatique et sanguin sont aussi des véhicules utilisés par ces virus pour atteindre le SNC (Barthold et Smith, 1992). Les MHV peuvent donc être neuroinvasifs et atteindre le SNC à la suite d'une primo-infection à un site périphérique telles la voie nasale et la voie sanguine.

A la suite d'une infection intranasale ou intracérébrale avec la souche JHM du MHV, la majorité des souris susceptibles à l'infection telles les BALB/c et les C57BL/6, développent une encéphalomyélite rapide et fatale. Cette pathologie est caractérisée par l'infection de neurones, d'oligodendrocytes et d'astrocytes avec des dommages importants à de larges sections des systèmes olfactif et limbique (Lavi *et al.*, 1988; Fazakerley et Buchmeier, 1993; Dales et Anderson, 1995). Un faible pourcentage des souris survit à l'encéphalomyélite aiguë et développe une maladie démyélinisante chronique caractérisée par une attaque de la matière blanche et des épisodes de démyélinisation (Fazakerley et Buchmeier, 1993; Dales et Anderson, 1995). Par contre, des souches de souris résistantes telles les souris SJL/J ne sont pas susceptibles à l'infection par ce même virus. Les différences génétiques entre les souris résistantes et les souris susceptibles sont basées sur un polymorphisme du

gène des glycoprotéines biliaires utilisées comme récepteur par le MHV. Ces différences se reflètent par une sensibilité des neurones et des macrophages à l'infection virale (Knobler *et al.*, 1981; Chen *et al.*, 1995). De plus, l'adsorption du virus et la formation de syncytiums sont facilitées par certains allèles du gène des glycoprotéines biliaires (Rao *et al.*, 1997; Zelus *et al.*, 1998). Des facteurs génétiques de l'hôte sont aussi impliqués dans la pathogenèse observée à la suite d'une infection coronavirale chez les rats (Watanabe *et al.*, 1987).

Des souches neuroatténues ont été développées par différents laboratoires. Des infections par ces souches ne résultent pas en une encéphalomyélite fatale, mais dans le développement d'une maladie neurologique, caractérisée par une infiltration dans le SNC de cellules mononucléaires et une démyélinisation chronique (Wege *et al.*, 1988; Fazakerley *et al.*, 1992; Dales et Anderson, 1995). Les souches atténues se répandent lentement dans le SNC de l'hôte, avec un faible taux d'infection des neurones, la majorité des cellules infectées faisant partie de la glie. Selon différentes procédures expérimentales, les infections par certaines souches de coronavirus murin, dont le MHV-JHM, causent diverses maladies neurologiques chez l'hôte, qui varient entre l'encéphalomyélite aiguë, la démyélinisation chronique et une infection persistante non apparente (Compton *et al.*, 1993). La démyélinisation induite par les MHV a servi de modèle pour des maladies similaires chez l'humain, par exemple la sclérose en plaques.

Nous pouvons conclure de ces nombreuses observations que les coronavirus murins sont neurotropes, c'est-à-dire qu'ils peuvent infecter les cellules du SNC. Ils sont aussi neuroinvasifs, car à partir d'une infection en périphérie, ils peuvent se rendre jusqu'au SNC. Finalement, on peut les qualifier de neurovirulents, car ils induisent une pathologie au niveau du SNC, détectable par des signes cliniques et histopathologiques chez les rongeurs.

2.6.2 Implications des réponses immunitaires dans les pathologies du système nerveux central

Les réponses immunitaires dans le SNC à la suite d'une infection par le coronavirus murin jouent un grand rôle dans la pathogenèse de la démyélinisation et de l'encéphalomyélite observées. On peut observer dans le SNC des souris infectées par le MHV-JHM, une intense infiltration de lymphocytes et de macrophages (Dörries *et al.*, 1991; Williamson *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992b). Des lymphocytes T CD4+ ou CD8+, ou des anticorps spécifiques pour le virus peuvent protéger l'animal d'une épreuve virale fatale avec le virus JHM (Buchmeier *et al.*, 1984; Stohlman *et al.*, 1986; Perlman *et al.*, 1987; Stohlman *et al.*, 1988; Fleming *et al.*, 1989; Yamaguchi *et al.*, 1991; Stohlman *et al.*, 1995a). Ces observations suggèrent que plusieurs composantes du système immunitaire sont impliquées dans la réponse immunitaire antivirale. Un seul de ces constituants cellulaires ou humoraux peut protéger l'animal contre une épreuve virale. Par contre, en l'absence d'un d'entre eux, l'élimination du virus peut être ralentie ou compromise (Williamson et Stohlman, 1990; Pearce *et al.*, 1994; Stohlman *et al.*, 1995a). Houtman et Fleming (1996a) ont récemment utilisé plusieurs souches congénitales de souris immunodéficientes pour discriminer les apports de différents constituants de la réponse immunitaire dans l'élimination du virus et dans la démyélinisation. Des souris C57Bl/6 immunocompétentes ont éliminé le virus, mais ont montré une importante démyélinisation. Par contre, des souris SCID n'ont pas éliminé le virus et n'ont pas développé de démyélinisation. Une démyélinisation accompagnée d'une élimination partielle du virus a été observée chez les souris *nude*. Les processus de démyélinisation et d'élimination du virus n'impliquent pas les mêmes composantes du système immunitaire. La démyélinisation induite par le MHV peut se développer en l'absence de cellules T CD8+ et de molécules du CMH de classe I (Gombold *et al.*, 1995; Houtman et Fleming, 1996a). L'expression de CMH de classe II ne semble pas non plus nécessaire à l'observation d'une démyélinisation chez les souris infectées par MHV-JHM (Houtman et Fleming, 1996a).

Des molécules sécrétées par les cellules du système immunitaire jouent aussi un rôle dans cette pathogenèse. Une accumulation de cytokines de type T auxiliaire 1 (Th1) et T auxiliaire 2 (Th2) a été observée dans le SNC des souris infectées par le MHV-JHM (Parra *et al.*, 1997). Les astrocytes sont une cible de choix pour les infections coronavirales lorsque l'animal souffre de la maladie chronique (Perlman et Ries, 1987). En effet, ces cellules infectées sont activées tel qu'il a été démontré par une augmentation de l'expression de l'antigène de la protéine acidique gliale fibrillaire (GFAP) (Sun *et al.*, 1995). Dans la moelle épinière d'animaux, ayant des lésions de démyélinisation et étant infectés de façon chronique par le MHV, une augmentation de l'expression des molécules suivantes a été observée : le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et la synthase d'oxyde nitrique 2 (NOS-2) (Sun *et al.*, 1995). Stohlman et collègues (1995b) ont démontré que le rôle du TNF- α dans la maladie induite par une infection chronique par le MHV ne serait pas primordial. L'administration d'anticorps anti-TNF n'a pas amélioré l'encéphalomyélite et la démyélinisation observées suite à l'infection par le MHV. L'interleukine-10 (IL-10) ne serait pas requise pour l'élimination des virus, mais serait impliquée dans la régulation des réponses inflammatoires observées dans le SNC (Lin *et al.*, 1998). La cytolysé effectuée via la perforine serait, quant à elle, impliquée dans l'élimination du virus, mais elle n'est pas essentielle à celle-ci (Lin *et al.*, 1997). Plusieurs autres mécanismes sont sans doute potentiellement impliqués dans la démyélinisation chronique du SNC des rongeurs lors d'infection par le MHV. La dissection détaillée de l'implication des acteurs dans la démyélinisation de ce modèle animal pourrait fournir des informations précieuses pour les maladies démyélinisantes humaines.

Des réponses auto-immunitaires induites par une infection coronavirale pourraient provoquer une démyélinisation chez les individus infectés même en l'absence de virus détectables. En effet, il a été observé qu'une infection par le MHV-JHM induit des lymphocytes T anti-protéine basique de la myéline chez des rats infectés (Watanabe *et al.*, 1983). De plus, un transfert adoptif de ces lymphocytes à des rats non sensibilisés induit une maladie similaire à

l'encéphalite allergique expérimentale ayant pour cible la MBP (Watanabe *et al.*, 1983). Une augmentation de la fréquence de cellules T autoréactives a aussi été observée chez des souris infectées par le MHV (Kyuwa *et al.*, 1991).

2.6.3 Persistance virale *in vivo*

Comme de nombreux virus, les coronavirus murins démontrent une capacité à persister dans un animal à la suite d'une infection aiguë. Le coronavirus murin persiste pour au moins une année sous forme d'ARN, les protéines virales et les virions n'étant pas détectables, chez les souris souffrant d'une démyélinisation chronique au niveau du SNC (Fleming *et al.*, 1994). Le génome des MHV évolue durant une infection persistante du SNC de la souris. Des mutations et délétions ont été observées dans les gènes codants pour les protéines S et N au cours d'une infection persistante de 42 jours (Adami *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1997a). La structure secondaire de l'ARN codant pour la protéine S du MHV favorise des recombinaisons de part et d'autre de certaines structures en forme d'épingle à cheveux. Cette organisation structurelle contribue à la génération de variants montrant une partie du gène de cette protéine délétée (Rowe *et al.*, 1997b). Une variété de séquences a été détectée au sein du même animal subissant une infection persistante par le MHV, suggérant l'émergence de quasi-espèces (Adami *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1997a). Stühler et collaborateurs ont analysé la variabilité de séquences coronavirales retrouvées dans des cerveaux de rats Lewis infectés par un variant de MHV-JHM (1997). Ils ont démontré une stabilité génétique ne suggérant pas une distribution en quasi-espèces lors d'une infection persistante chez le rat. Les quasi-espèces peuvent être définies comme une population de variants reliés ensemble phylogénétiquement et qui sont observés dans une seule population de cellules ou un seul individu (Smith *et al.*, 1997). L'émergence de quasi-espèces pourrait être influencée par l'hôte, expliquant les divergences observées entre la souris et le rat. D'autre part, des changements dans un épitope reconnu par des cellules T CD8+, situé dans la région hypervariable du gène S, ont été observés de façon spécifique chez les souris ayant développé des symptômes cliniques (Pewe *et al.*, 1996). Ces

résultats suggèrent que des variants viraux échappent à la reconnaissance par des cellules T cytotoxiques (CTL), ce qui permet l'augmentation de la réPLICATION virale dans le SNC et le développement de la maladie.

2.6.4 Persistance virale *in vitro*

Une grande variété génétique au niveau du gène S a été observée parmi les isolats de MHV obtenus de la culture *in vitro* (Parker *et al.*, 1989; La Monica *et al.*, 1991). Lors d'infection persistante *in vitro* par le MHV, des mutations ont aussi été détectées dans une région 5' non traduite du génome viral (Chen et Baric, 1995). Dans ce dernier cas, ces mutations ont induit une augmentation de la traduction du gène *pol*, impliqué dans la transcription et réPLICATION virales (Chen et Baric, 1995). Des études *in vitro* de persistance par les coronavirus murins ont démontré que les cellules infectées de façon persistante résistent à une surinfection par le MHV, mais pas par d'autres virus tels le virus Semliki Forest et le virus de la stomatite vésiculaire (Sawicki *et al.*, 1995). Le milieu de culture des cellules infectées de façon persistante ne contient pas de molécule inhibitrice tel l'IFN (Sawicki *et al.*, 1995). De plus, une expression épigénétique ou instable du récepteur pour le MHV semble contribuer à l'établissement d'infection persistante par le MHV dans des cellules murines transformées (Sawicki *et al.*, 1995; Chen et Baric, 1996). Le tropisme de virus isolés après de longues périodes de persistance est modifié par rapport à celui du virus initial (Schickli *et al.*, 1997). Certains auteurs ont même suggéré l'utilisation de récepteur alternatif par des variants de MHV pour infecter des cellules exprimant faiblement ou pas du tout le récepteur habituel, mentionné plus haut (Schickli *et al.*, 1997). Ces expériences suggèrent une adaptation de la part des virus, mais aussi des cellules au cours de l'infection persistante (Chen et Baric, 1996).

2.7 Infection chez les primates

Les coronavirus murins peuvent aussi causer des pathologies du SNC chez les primates non humains. Deux espèces de primates, des singes verts

d'Afrique et des singes hiboux ("Owl monkey"), ont été inoculées de façon intracérébrale avec le MHV-JHM et avec l'isolat SD obtenu à partir d'un cerveau de patient atteint de sclérose en plaques. Ces deux virus ont causé une encéphalite et une démyélinisation chez les animaux infectés. Les virus se sont répliqués et disséminés dans le SNC de ces primates (Murray *et al.*, 1992b). La même équipe a par la suite démontré qu'un isolat de MHV-JHM peut se rendre jusqu'au SNC des primates à partir de sites périphériques. De l'ARN viral ou des antigènes viraux ont été détectés dans les vaisseaux sanguins et les régions périvasculaires du SNC caractérisées par de l'inflammation et de l'oedème (Cabirac *et al.*, 1994). Les astrocytes sont une des cellules cibles lors d'infection intracérébrale chez les primates (Murray *et al.*, 1997). Plus de 150 jours après une inoculation intracérébrale chez ces animaux, des régions de démyélinisation et de gliose ont été observées (Murray *et al.*, 1997). Les coronavirus murins sont par conséquent neurotropes, neuroinvasifs et neurovirulents chez les primates non humains.

2.8 Pathologies associées aux coronavirus humains

Au cours des dernières décennies, plusieurs associations circonstancielles ont été soulevées dans la littérature scientifique entre les coronavirus humains (HCoV) et certaines pathologies. Ces virus ont tout d'abord été isolés à partir des voies respiratoires (Hamre et Procknow, 1966; McIntosh *et al.*, 1967). Les souches 229E et OC43 sont les souches prototypes de HCoV (Myint, 1994). Ces virus, lorsque réinoculés de façon intranasale à des patients sains, induisent les symptômes du rhume: éternuements, malaise généralisé, mal de tête, décharge nasale et petit mal de gorge (Tyrrell *et al.*, 1993). En fait, les HCoV sont associés avec approximativement 30 % des rhumes (Myint, 1994). Les pics d'infection surviennent au cours des mois d'hiver et du printemps. La souche OC43 et la souche 229E sont dominantes à tour de rôle dans une population. Les femmes seraient plus susceptibles aux infections coronavirales que les hommes (Monto *et al.*, 1975; Callow, 1985).

Les HCoV ont aussi été associés à d'autres pathologies. Chez les enfants atteints d'asthme, les coronavirus seraient responsables d'environ 30 % des épisodes de sifflements respiratoires (Bende *et al.*, 1989; Myint, 1995). La détection des HCoV lors d'infections respiratoires nosocomiales chez les nouveau-nés prématurés a été rapportée (Sizun *et al.*, 1995). Au cours d'entérocolites chez les nouveau-nés, des coronavirus humains ont été mis en évidence (Chany *et al.*, 1982). Une association avec des exacerbations d'asthme (Nicholson *et al.*, 1993) et des péricardites (Riski et Hovi, 1980) a aussi été rapportée. D'autres équipes ont associé ces virus à des pancréatites, des thyroïdites, des néphropathies et des mononucléoses infectieuses (Apostolov et Spasic, 1975; Arnold *et al.*, 1981). Des particules ayant l'aspect de coronavirus ont été détectées dans les fèces de patients atteints de diarrhées (Beards *et al.*, 1984; Mortensen *et al.*, 1985). Il a même été possible dans certains cas de propager ces virus *in vitro* (Resta *et al.*, 1985). Des analyses à l'aide de sérum polyclonaux dirigés contre ces virus entériques ont démontré une ressemblance antigénique entre les coronavirus entériques et le HCoV-OC43 (Gerna *et al.*, 1984). Hormis les infections des voies respiratoires causant les symptômes du rhume, aucune de ces associations n'a encore été confirmée par plusieurs laboratoires.

2.9 Les réponses immunitaires contre les coronavirus humains

Un inhibiteur non spécifique de l'infectivité des virus HCoV-OC43 et BCV a été détecté dans le sérum humain ainsi que dans celui de plusieurs autres mammifères. Son efficacité a été vérifiée lors d'infection de souris par le HCoV-OC43 (Debiaggi *et al.*, 1986) et il est possible que ce facteur empêche la virémie systémique de ce virus chez l'humain (Myint, 1994).

La majorité des individus âgés de plus de cinq ans sont séropositifs pour la présence d'anticorps anti-HCoV (Myint, 1994). Des anticorps anti-HCoV surtout dirigés contre la protéine S ont été détectés dans le sérum de personnes ayant subi une infection expérimentale par le HCoV-229E

(Macnaughton *et al.*, 1981). Les anticorps circulant et les anticorps dans les muqueuses ont été associés à la protection contre l'infection et à l'atténuation des symptômes. Seuls les anticorps de type immunoglobuline A ont semblé raccourcir la période de relâchement de virions (Callow, 1985). La réponse immunitaire induite lors de la primo-infection ne protège pas l'individu contre une deuxième infection par le même virus (Callow, 1985; Callow *et al.*, 1990; Myint, 1995). Des lymphocytes humains ont démontré une activité cytotoxique dépendante d'anticorps dirigée contre des cellules infectées par le virus HCoV-229E, impliquant probablement des immunoglobulines de type G (Holmes *et al.*, 1986). Des lymphocytes T de type CD4+, dirigés contre des HCoV, particulièrement dirigés contre les protéines S et N de HCoV-229E dans certains cas (Spencer *et al.*, 1995), ont été obtenus à partir du sang périphérique de plusieurs donneurs (Talbot *et al.*, 1996; Boucher *et al.*, 1998). Toutefois, leur implication dans les réponses anti-virales n'a pas été élucidée. Plusieurs aspects des réponses immunitaires dirigées contre les HCoV n'ont pas été explorés.

L'administration prophylactique d'interféron α -2b a diminué la durée et la sévérité des symptômes induits par une infection intranasale par le HCoV-229E (Turner *et al.*, 1986) suggérant que cette cytokine peut avoir un effet bénéfique dans le cas de rhumes causés par ce virus.

2.10 Les coronavirus humains et le système nerveux central

Les HCoV ont été détectés sous diverses formes dans le SNC humain. En 1976, Tanaka et collaborateurs rapportaient la présence de particules ayant une morphologie similaire aux coronavirus dans le cerveau d'un patient décédé, atteint de sclérose en plaques (Tanaka *et al.*, 1976). Ensuite, une autre équipe a isolé des coronavirus (isolats nommés SD et SK) à partir de cerveaux de patients atteints de sclérose en plaques (Burks *et al.*, 1980). Une présence préférentielle d'anticorps dirigés contre les deux souches de HCoV a été observée chez des patients atteints de sclérose en plaques comparativement à

des témoins, suggérant une production locale d'anticorps au niveau du SNC (Salmi *et al.*, 1982). Toutefois, une autre équipe n'a pas détecté de différences significatives pour le taux d'anticorps anti-HCoV dans le liquide céphalo-rachidien entre les témoins normaux et les patients atteints de sclérose en plaques (Fleming *et al.*, 1988). Certains ont rapporté la présence préférentielle de tels anticorps contre la souche OC43 chez des patients atteints de la maladie de Parkinson (Fazzini *et al.*, 1992). Par contre, les anticorps antiviraux présents en périphérie sont présents en quantité comparable chez des témoins sains et des patients atteints de sclérose en plaques (Madden *et al.*, 1981a; Hovanec et Flanagan, 1983; Johnson-Lussenburg et Zheng, 1987; Fleming *et al.*, 1988).

Janet Stewart, du laboratoire du docteur Pierre Talbot, a démontré, au cours de ses travaux de maîtrise, par des réactions de transcription inverse couplée à la polymérisation en chaîne (RT-PCR), la présence d'ARN du HCoV-229E dans quatre des onze patients atteints de sclérose en plaques testés et aucun des onze témoins testés (Stewart *et al.*, 1992). Cristallo et collaborateurs (1997) ont analysé par RT-PCR les ARN polyadénylés extraits du liquide céphalo-rachidien de vingt patients atteints de sclérose en plaques et dix patients atteints d'autres maladies neurologiques. L'ARN de HCoV-OC43 a été détecté dans dix des patients atteints de sclérose en plaques et dans neuf des patients atteints d'autres maladies neurologiques. HCoV-229E quant à lui a été détecté dans sept des patients atteints de sclérose en plaques et deux des patients atteints d'autres maladies neurologiques (Cristallo *et al.*, 1997). Ces auteurs ont séquencé des fragments d'ADN complémentaire dérivés des ARN vitaux isolés du liquide céphalo-rachidien. Ils ont détecté des variations dans la séquence correspondant au cadre de lecture de la protéine de la nucléocapside du HCoV-OC43, démontrant ainsi un mélange dans la population virale du liquide céphalo-rachidien. Aucune association significative n'a toutefois pu être faite quant à la présence préférentielle de coronavirus. Murray et collaborateurs (1992a) ont ciblé par hybridation *in situ* douze cerveaux de patients atteints de sclérose en plaques avec des sondes pour les

coronavirus humains, murin, porcin, et bovin. Ils ont détecté des signaux positifs spécifiques pour les MHV dans les douze cerveaux de patients atteints de sclérose en plaques testés. Parmi ces douze patients, cinq se sont avérés positifs avec la sonde HCoV-OC43. Cette équipe a aussi détecté des antigènes coronaviraux avec des anticorps dirigés contre le MHV au niveau de plaques actives de démyélinisation chez deux patients atteints de sclérose en plaques (Murray *et al.*, 1992a). Les auteurs ont par conséquent conclu que les coronavirus détectés étaient sans doute similaires au MHV, surtout au niveau de la région 3' du génome viral qui a servi à construire les sondes.

Étant donné la détection de HCoV à partir d'échantillons du SNC par plusieurs laboratoires, le caractère neurotrophe de ces virus devait être abordé plus en profondeur. Aurelio Bonavia, étudiant à la maîtrise du laboratoire du docteur Talbot, a infecté des cultures primaires neurales humaines avec les deux souches prototypes de coronavirus humains: OC43 et 229E. Les astrocytes fœtaux et adultes, de même que les microglies adultes ont été infectés par le HCoV-OC43 tel qu'il a été détecté par un test d'immunofluorescence indirect. Dans le cas du virus HCoV-229E, l'infection n'a pu être détectée par cette même technique. Par contre, à la suite d'une infection, des tests de RT-PCR révélés par une hybridation de type Southern ont montré la présence d'ARN viral de cette souche dans des astrocytes fœtaux, dans des microglies adultes et dans des cultures mixtes d'oligodendrocytes et d'astrocytes adultes (Bonavia *et al.*, 1997). Les HCoV ont par conséquent la capacité d'infecter des cellules neurales, suggérant un neurotropisme pour ces virus. De plus, la possibilité d'infection persistante de cellules neurales a été abordée par la démonstration d'infection persistante d'une durée de 28 jours dans une lignée de glioblastome humain par le virus OC43 (Collins et Sorensen, 1986). Le neurotropisme, la neuroinvasion et la neurovirulence des HCoV restent encore à explorer, mais les observations relevées ici suggèrent que de telles caractéristiques soient attribuables à ces virus dits respiratoires.

3.0 PERSISTANCE VIRALE

3.1 Caractéristiques

Une infection virale aiguë qui progresse et qui n'est pas éliminée par le système immunitaire devient une infection persistante. Trois patrons de persistance virale sont observés (Lipton et Gilden, 1997). Une infection *persistante latente* est caractérisée par le maintien des informations génétiques du virus dans la cellule hôte en absence de production de virions et de traduction de protéines virales. Cette infection latente peut potentiellement être réactivée et conduire à la production de virions. Par exemple, le virus herpès simplex demeure sous forme latente dans les neurones sensitifs et peut être réactivé chez certaines personnes. Une infection *persistante chronique défective* est caractérisée par la production de protéines virales sans assemblage de virions. Ce type d'infection persistante semble commun chez les virus à ARN enveloppés (Lipton et Gilden, 1997). Les virus à ARN, contrairement aux virus à ADN, doivent surmonter une difficulté supplémentaire; en effet les cellules hôtes ne peuvent fournir les fonctions nécessaires pour répliquer l'ARN (Ahmed *et al.*, 1997). 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 (Ahmed *et al.*, 1997). Enfin, une production continue de virions infectieux est observée lors des infections *persistantes dites chroniques*.

3.2 Critères nécessaires à la persistance virale

3.2.1 Cytolyse limitée

Certaines conditions sont nécessaires à l'établissement de la persistance virale. L'infection ne doit pas causer la lyse de toutes les cellules infectées (de la Torre et Oldstone, 1996). Certains virus peuvent être lytiques pour certains types cellulaires, sans l'être pour d'autres. Par exemple, le VIH semble être plus lytique pour les lymphocytes T que pour les monocytes/macrophages (Ahmed *et al.*, 1997). Les neurones sensitifs sont non permisifs pour le virus herpès

simplex, ne permettant pas la production de virions. Le virus persiste dans ce type de cellule, car il n'en cause pas la lyse. De plus, ce virus prévient l'apoptose des neurones infectés, sauvegardant sa survie dans la cellule hôte (de la Torre et Oldstone, 1996).

3.2.2 Maintien du génome viral

Des mécanismes sont mis en oeuvre pour permettre au génome viral d'être maintenu dans la cellule cible. Les rétrovirus incorporent leur génome sous forme d'ADN dans le génome de l'hôte. Le génome viral est de cette façon répliqué avec les chromosomes cellulaires. Les virus à ADN ont développé plusieurs stratégies pour maintenir leur génome dans une cellule hôte pour de longues périodes. Certains *Herpesviridae* maintiennent leur génome sous forme d'une molécule circulaire épisomale. De cette façon, la machinerie cellulaire peut répliquer cet ADN viral (Ahmed *et al.*, 1997). Comme mentionné précédemment, les virus à ARN ne peuvent compter sur la machinerie cellulaire pour répliquer leur génome. Ces virus vont en général exprimer les protéines nécessaires à la réplication de leur génome (Ahmed *et al.*, 1997). Un virus à ARN semble utiliser la stratégie de transformer son génome en ADN. Klenerman et collaborateurs (1997) ont démontré qu'une transcriptase inverse spécifique à l'hôte génère des ADN complémentaires à l'ARN viral du LCMV. C'est sous forme d'ADN que ce virus pourrait persister (Klenerman *et al.*, 1997).

3.2.3 Évasion du système immunitaire

Le virus qui persiste doit éviter la détection et l'élimination par le système immunitaire (Oldstone, 1989; de la Torre et Oldstone, 1996). En fait, les virus ont développé plusieurs stratégies pour éviter la surveillance immunitaire de l'hôte (Ahmed *et al.*, 1997). Certains virus infectent des sites dits "immunologiquement privilégiés". Les réponses immunitaires sont moins importantes dans certains sites tel le SNC. Par exemple le virus herpès simplex, le virus varicelle-zona, le virus de la rougeole et le virus de la rubéole persistent

dans les neurones qui sont des cellules n'exprimant pas ou peu de molécules du CMH, évitant ainsi la présentation des antigènes viraux par la cellule infectée (Ahmed *et al.*, 1997). D'autres virus restreignent l'expression de leurs gènes au minimum, ainsi peu de protéines virales peuvent être reconnues par le système immunitaire. C'est le cas entre autres du virus herpès simplex dans les neurones et le virus VIH dans les lymphocytes T inactivés (Ahmed *et al.*, 1997). Une variation antigénique rapide, surtout à des sites critiques pour la reconnaissance par des anticorps ou des lymphocytes T est aussi utilisée par certains virus pour échapper à la reconnaissance (Ahmed *et al.*, 1997). L'émergence de variants au cours d'infection par le VIH ou le virus de l'hépatite C témoigne de la grande diversité antigénique que peuvent développer ces virus pour échapper à la reconnaissance immunitaire. La suppression de molécules de surface nécessaires à la reconnaissance par les lymphocytes T est un autre mécanisme possible. Les adénovirus, le cytomégalovirus et le virus herpès simplex suppriment l'expression de molécules du CMH de classe I (Ahmed *et al.*, 1997). L'interférence avec la présentation d'antigène a aussi été observée. Une protéine du virus de l'herpès simplex peut interagir avec des molécules appelées les transporteurs associés à la maturation des antigènes pour la présentation (TAP) pour inhiber la présentation par les molécules du CMH de classe I (Ahmed *et al.*, 1997). Des molécules virales peuvent aussi nuire à l'action de cytokines antivirales. L'adénovirus produit des protéines qui protègent la cellule infectée contre la lyse par le TNF et d'autres qui bloquent l'activité de l'IFN- γ (de la Torre et Oldstone, 1996). Le virus Epstein-Barr synthétise une protéine qui mime l'IL-10 et qui bloque la synthèse d'IL-2 et d'IFN- γ (Ahmed *et al.*, 1997). L'induction de la tolérance immunologique a aussi été induite par certains virus. Une déletion clonale ou une anergie de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre le virus de l'hépatite B a été observées chez des porteurs de ce virus (Ahmed *et al.*, 1997). Certains virus se répandent de cellule en cellule par la formation de syncytiums. Le virus de la rougeole est défectif au niveau de sa protéine M lorsqu'il persiste dans le SNC et cause la panencéphalite sous-aiguë sclérosante. Des particules virales infectieuses ne sont pas produites. Par contre, le virus défectif réussit à infecter

d'autres cellules par contact de cellule à cellule (Ahmed *et al.*, 1997). Ainsi, les virus ont développé diverses stratégies pour éviter d'être éliminés par le système immunitaire et ainsi pouvoir demeurer pour de longues périodes chez l'hôte.

3.3 Virus persistants dans le système nerveux central

Le SNC est un environnement idéal pour l'établissement d'infections persistantes (de la Torre et Oldstone, 1996). Les réponses immunitaires sont limitées en partie à cause des faibles niveaux d'expression de molécules du CMH dans des conditions normales. De plus, la barrière hémato-encéphalique restreint le passage de cellules immunes. Le réseau complexe de connexions intercellulaires permet le transport de virus via les axones et dendrites sur de longues distances (de la Torre et Oldstone, 1996). De plus, les caractéristiques métaboliques des cellules hautement spécialisées dans le SNC imposent des restrictions à la réPLICATION virale (de la Torre et Oldstone, 1996). La capacité de plusieurs virus à persister dans des cellules neurales *in vivo* a déjà été démontrée. Les virus de la famille des Herpesviridae sont bien connus pour leur capacité à persister. Comme mentionné précédemment, le virus herpès simplex et le virus de la varicelle-zona persistent dans les neurones sensoriels. Le virus de la rougeole, le virus de la rubéole et le virus de la maladie Borna persistent aussi dans les neurones (Lipton et Gilden, 1997). Le polyomavirus JC, le virus de la rougeole et le virus de la maladie Borna persistent dans les oligodendrocytes du SNC (Lipton et Gilden, 1997). Certaines pathologies découlent d'ailleurs du site de persistance des virus. Les virus JC et de la rougeole causent chez certaines personnes des maladies démyélinisantes étant donné leur localisation dans les cellules productrices de myéline, les oligodendrocytes. Le VIH persiste dans les microglies (Lipton et Gilden, 1997). Le virus HTLV-1 quant à lui persiste dans les astrocytes (Lipton et Gilden, 1997). Tous les types cellulaires du SNC peuvent donc être la cible potentielle d'infections persistantes virales.

4.0 AUTOIMMUNITÉ

4.1 Absence de tolérance contre certains antigènes du soi

Le système immunitaire doit établir et maintenir une absence de réponse contre les antigènes du soi tout en étant capable de générer une réponse immunitaire contre des antigènes dérivés des pathogènes. La tolérance des cellules T est obtenue par la sélection négative dans le thymus contre des antigènes du soi qui sont exprimés au-dessus d'un seuil critique sur les cellules épithéliales thymiques ou sur les cellules du système lymphopoïétique. Les antigènes du soi exprimés dans des organes périphériques vont induire une délétion clonale seulement s'ils sont transportés jusqu'au thymus en quantité suffisante ou s'ils sont exprimés sur les cellules mobiles du tissu périphérique lymphoïde (Aichele *et al.*, 1996). La tolérance centrale reste incomplète à cause, d'une part, de l'absence de certains antigènes du soi dans le thymus (Aichele *et al.*, 1996), et d'autre part parce que l'affinité et l'avidité des récepteurs T (TCR) ne sont pas suffisantes pour le complexe formé de la molécule du CMH et de certains peptides du soi (Barnaba, 1996). Il n'y a pas de tolérance des cellules T pour les antigènes du soi des organes périphériques, localisés dans des sites séquestrés, ou qui sont exprimés sous un seuil critique; ces antigènes sont ignorés (Aichele *et al.*, 1996).

L'activation de lymphocytes T par des cellules présentatrices d'antigènes est dépendante de l'engagement du récepteur des lymphocytes T avec une molécule du CMH adéquate, présentant un épitope reconnu, mais aussi de la costimulation impliquant les molécules B7. En absence de cette costimulation, les lymphocytes T ne répondent pas et subissent plutôt une anergie antigène-dépendante (Miller et Basten, 1996). De plus, les lymphocytes T CD4+ sont impliqués dans la régulation de l'amplification et de la délétion de cellules immunes, particulièrement des lymphocytes CD8+ (Frasca *et al.*, 1998). Ces mécanismes de régulation favorisent une tolérance périphérique à des antigènes (Frasca *et al.*, 1998).

Toutefois, si des antigènes du soi entrent dans les tissus lymphoïdes à un certain moment dans la vie de l'individu, ils seront traités par le système immunitaire de la même façon que les antigènes étrangers dérivés des agents infectieux (Aichele *et al.*, 1996). Les lymphocytes T autoréactifs restent non activés et sans danger aussi longtemps que ces antigènes du soi ne sont pas présentés par des cellules présentatrices d'antigène de façon efficace et en présence des facteurs de costimulation nécessaires (Aichele *et al.*, 1996; Miller et Basten, 1996).

4.2 Mimétisme moléculaire

Le mimétisme moléculaire représente un des mécanismes par lequel des virus peuvent déclencher l'auto-immunité (Oldstone, 1987; von Herrath *et al.*, 1996; Oldstone 1998). Dans ce cas, le virus partage des déterminants antigéniques avec des antigènes du soi. La réponse immunitaire déclenchée en réponse au virus permet l'activation de lymphocytes, qui une fois activés, dirigeront leur action contre le virus étranger, mais aussi contre des antigènes du soi en raison de la similitude linéaire ou conformationnelle entre ces antigènes (von Herrath *et al.*, 1996). Wucherpfennig et Strominger (1995) ont démontré que des clones de lymphocytes T anti-MBP obtenus à partir de patients atteints de sclérose en plaques reconnaissent aussi des peptides de divers virus: herpès simplex, Epstein-Barr, adénovirus, influenza A. Des anticorps ou des lymphocytes T qui ont des réactions croisées entre des antigènes de pathogènes et des protéines du soi ont été détectés chez plusieurs patients atteints de maladies auto-immunes (Talbot *et al.*, 1996; von Herrath *et al.*, 1996). Par exemple, des lymphocytes T dirigés contre la décarboxylase glutamate et le virus Coxsackie (Atkinson *et al.*, 1994; Oldstone, 1998) ont été détectés chez les patients atteints de diabète sucré insulinodépendant.

L'induction de l'auto-immunité par un mimétisme moléculaire peut survenir à la suite d'une infection aiguë. Le processus auto-immunitaire peut

être enclenché par les réponses immunitaires dirigées contre l'agent infectieux. Le système immunitaire peut être efficace à éliminer l'infection, mais l'activation de cellules autoréactives peut être maintenue même après la disparition de l'agent initiateur (Steinman et Oldstone, 1997; Oldstone, 1998). Comme mentionné dans la section précédente, les lymphocytes autoréactifs ne représentent aucun danger tant et aussi longtemps qu'ils demeurent inactifs. Toutefois, la réponse antivirale peut activer ces clones.

Des modèles animaux ont démontré l'implication potentielle d'infections virales dans l'induction de maladie auto-immunitaire via un mécanisme de mimétisme moléculaire. Des anticorps et des lymphocytes T ayant des réactions croisées entre des antigènes viraux et des antigènes du soi ont été rapporté dans plusieurs cas (Fujinami *et al.*, 1983; Fujinami et Oldstone, 1985; Fujinami *et al.*, 1988). Des animaux transgéniques exprimant des protéines virales du virus LCMV dans les cellules β des îlots de Langerhans ou les oligodendrocytes ont été utilisés comme modèle. L'infection par le virus exprimant le même gène, a activé chez ces animaux des lymphocytes T autoréactifs qui ont éliminé l'infection virale. Toutefois, comme conséquence de l'expression du transgène, une maladie auto-immunitaire localisée à l'organe exprimant les protéines virales a été observée. Une maladie démyélinisante dans le cas où des oligodendrocytes exprimaient le transgène, et un diabète sucré insulinodépendant dans le cas où des cellules β des îlots de Langerhans exprimaient le transgène, ont été observés (Ohashi *et al.*, 1991; Oldstone *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1996).

4.3 Relargage d'antigènes du soi

Les infections virales peuvent induire une réponse immunitaire chronique et inefficace, donc une élimination lente du virus, accompagnée de destruction importante de tissus infectés, due à la cytolysé viro-induite ou à l'immunopathologie induite par les cellules T cytotoxiques. Ce type d'infection cause le relargage de quantités importantes d'antigènes du soi (Aichele *et al.*, 1996). Ces antigènes du soi ainsi relargués sont transportés dans les organes

lymphoïdes. Ils sont alors présentés par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Cette présentation antigénique peut activer les cellules B et T autoréactives. Étant donné la destruction tissulaire, une propagation d'épitopes ou de déterminants ("epitope or determinant spreading") peut s'observer ou encore la présentation d'antigènes qui sont habituellement cryptiques peut maintenant s'effectuer (Aichele *et al.*, 1996; Oldstone, 1998).

Les réponses inflammatoires induites en réponses à l'infection virale, par exemple la sécrétion de cytokine IFN- γ et de TNF- α , augmentent l'expression de molécules du CMH, de molécules d'adhésion et de molécules costimulatrices, favorisant ainsi la présentation d'antigène et la migration de cellules immunitaires activées (Barnaba, 1996). De plus, ces réponses augmentent aussi l'expression de protéases cellulaires qui peuvent à leur tour favoriser l'émergence d'épitopes cryptiques habituellement non présentés (Opdenakker et Van Damme, 1994; Barnaba, 1996). Des clones de lymphocytes T ayant infiltré le foie de patients atteints d'hépatite chronique due au virus de l'hépatite B ou au virus de l'hépatite C ont été analysés. Un faible pourcentage des lymphocytes était spécifique pour les virus; certains clones réagissaient aux protéines du foie (albumine et transferrine). Par contre, la majorité des cellules T recrutées dans le foie par les cytokines inflammatoires, n'étaient pas spécifiques à ces antigènes (Barnaba, 1996). Voici donc un exemple où l'infection virale avait déclenché chez des patients une inflammation chronique dans leur foie, ayant pour conséquence le recrutement de plusieurs cellules immunes. Les virus peuvent interférer, ou dérégler le système immunitaire et, par ce fait, augmenter et promouvoir l'induction de la réactivité contre des antigènes du soi.

4.4 Virus associés à des maladies auto-immunitaires humaines

Plusieurs maladies auto-immunes ont été observées chez l'humain. Les mécanismes d'induction n'ont pas encore été clairement élucidés. Toutefois, des virus ont été proposés comme agent initiateur de ces maladies. Voici

quelques exemples de virus qui ont été associés à des maladies auto-immunitaires humaines. Le virus Epstein-Barr a été associé à la polyarthrite rhumatoïde (Ferraro et Newkirk, 1993), au syndrome de Sjögren (Saito *et al.*, 1989), au lupus érythémateux disséminé (Vaughan *et al.*, 1995) et à l'anémie aplastique (Kaplan *et al.*, 1992). Le virus Coxsackie B a été associé au diabète sucré insulinodépendant (Di Rosa et Barnaba, 1998). Le virus de l'hépatite C a été associé à la cryoglobulinémie (Ferri *et al.*, 1991) et à des hépatites auto-immunitaires (Czaja *et al.*, 1993). Dans certains cas, le mimétisme moléculaire pourrait être le mécanisme menant à l'induction de l'auto-immunité. Par exemple une protéine du virus Coxsackie B et un épitope de la décarboxylase du glutamate partagent une similarité de séquence (Oldstone, 1998). Toutefois, des réactions croisées de lymphocytes T ou d'anticorps qui reconnaissent à la fois un épitope viral et un épitope du soi n'ont pas été rapportées dans la majorité de ces maladies auto-immunes.

4.5 Implication de la persistance virale

Des infections virales peuvent briser la tolérance périphérique au soi et maintenir une auto-immunité par plusieurs mécanismes (Di Rosa et Barnaba, 1998). Des infections virales aiguës, de courte durée peuvent induire des phénomènes d'auto-immunité, qui habituellement se résorbent lorsque le virus est éliminé de l'hôte. C'est le cas du syndrome Guillain-Barré, de la vasculite, de la cryoglobulinémie (Di Rosa et Barnaba, 1998). Les infections aiguës ne peuvent soutenir un processus auto-immun en raison de l'inflammation limitée. Une fois le virus éliminé, les réponses immunitaires sont régulées à la baisse. Par contre, d'autres infections aiguës peuvent provoquer des phénomènes d'auto-immunité à long terme. Cela a été observé dans des modèles animaux impliquant un mécanisme de mimétisme moléculaire (Oldstone, 1998). Par contre, lorsque l'infection virale induit une auto-immunité par d'autres mécanismes nécessitant la présence constante de l'agent initiateur, des infections persistantes ont plus souvent été mises en cause.

Les infections virales persistantes peuvent induire une inflammation chronique ou des crises d'inflammation récurrentes. L'inflammation permet la régulation à la hausse d'une multitude de molécules impliquées dans les réponses immunes: les molécules du CMH, les molécules d'adhésion, les molécules de costimulation (B7-1, B7-2) sur les cellules présentatrices d'antigènes, les protéases impliquées dans la maturation des peptides pour la présentation d'antigènes (Di Rosa et Barnaba, 1998). De plus, le relâchement d'épitopes cryptiques dû à la cytolysé viro-induite ou aux réponses immunitaires sera maintenu durant toute la durée de l'infection persistante (Di Rosa et Barnaba, 1998). Cela a pour effet de maintenir le phénomène d'auto-immunité. Les infections persistantes virales perpétuent l'établissement de l'immunopathologie, en raison de leur capacité à induire une inflammation chronique ou une inflammation récurrente (Di Rosa et Barnaba, 1998). Le virus Coxsackie B a été détecté chez les patients atteints du diabète sucré insulinodépendant, autant chez les patients nouvellement diagnostiqués que chez les patients souffrant de cette maladie depuis longtemps (Di Rosa et Barnaba, 1998). Ces observations suggèrent que le virus persiste au sein de l'hôte et que la réponse immune n'a pas l'éliminé de façon efficace. On peut supposer que sa présence contribue à maintenir un certain niveau d'inflammation et d'activation du système immunitaire. L'élucidation des mécanismes de persistance virale et des possibilités de freiner ces infections permettra sans doute de contrôler certaines maladies auto-immunitaires.

5.0 LA SCLÉROSE EN PLAQUES

5.1 Description clinique

Les symptômes cliniques de la sclérose en plaques sont très variables. Des anomalies aux niveaux visuel, moteur, sensoriel et de l'autonomie sont observées. Chez plusieurs patients, on peut observer un ou plusieurs des symptômes suivants: des tremblements, de la dysarthrie (difficulté de la parole due à une paralysie ou à un spasme des organes de la phonation), du nystagmus (mouvements involontaires saccadés du globe oculaire), des pertes sensorielles, une faiblesse, une ataxie (incoordination des mouvements volontaires) de la démarche et du tronc, des troubles de la vessie et de l'intestin, des crampes, et une paralysie spasmodique (Paty et Ebers, 1998). La sévérité des symptômes et des signes cliniques est associée à la localisation des régions endommagées dans le SNC. Il y a plusieurs types de sclérose en plaques. 1- La forme *rechutes et rémissions*: les patients ont des attaques avec des rémissions successives et ont peu ou pas de déficit neurologique résiduel entre les attaques. Toutefois, quelques patients subissent une augmentation des déficits neurologiques en escalade. La maladie débute sous la forme rémissions-rechutes chez approximativement soixante-dix pour cent des patients. 2- La forme *récurrente progressive*: les patients commencent à avoir des attaques puis développent des déficits neurologiques significatifs qui augmentent avec le temps. 3- La forme *chronique progressive* : touche environ 15% des patients et ceux-ci ont une progression constante et lente des déficits neurologiques à partir du début. 4- La forme *aiguë*: les patients subissent une maladie à plusieurs symptômes qui progresse vers une immobilité et/ou la mort en quelques mois (Paty et Ebers, 1998).

5.2 Description pathologique

La sclérose en plaques est caractérisée par des plaques de démyélinisation, surtout au niveau de la matière blanche. De telles plaques sont aussi occasionnellement observées dans la matière grise du SNC. La

gaine de myéline joue un rôle d'isolant pour permettre le transport efficace des influx nerveux le long des axones. À la suite de la démyélinisation, la conduction des influx est entravée, la conduction est lente et finalement absente, menant à l'apparition de symptômes. Les plaques de démyélinisation peuvent être retrouvées partout à travers le SNC. Par contre, certaines régions semblent plus vulnérables: le nerf optique, le tronc cérébral, la moelle épinière et les régions périventriculaires (Moore, 1998). Les lésions aiguës sont caractérisées par l'infiltration de lymphocytes B et T et la présence de macrophages contenant des débris de myéline. La perte d'oligodendrocytes, le bris de la gaine de myéline et la prolifération d'astrocytes sont aussi observés (Moore, 1998). Les lésions chroniques, quant à elles, démontrent peu d'inflammation. Les gaines de myéline et les oligodendrocytes sont absents et les axones démyélinisés sont séparés par des réseaux denses d'astrocytes. Des régions de remyélinisation sont aussi observées, particulièrement en bordure des plaques (Moore, 1998). Chez les patients atteints de sclérose en plaques, la barrière hémato-encéphalique est localement endommagée, permettant plus facilement le passage de molécules de haut poids moléculaire telles la transferrine, l'albumine, la fibrine (Moore, 1998). La démyélinisation, l'inflammation et la gliose constituent les trois grandes caractéristiques pathologiques de la sclérose en plaques.

Cette maladie démyélinisante du SNC serait le résultat de réponses aberrantes de lymphocytes T, dirigées contre des antigènes de la myéline (Hartung et Rieckmann, 1997). Les cellules T ne semblent pas directement impliquées dans les dommages observés au niveau du SNC chez les patients atteints de sclérose en plaques. Les responsables seraient plutôt les cytokines sécrétées et les macrophages recrutés pour attaquer la gaine de myéline et les cellules productrices de cette gaine, les oligodendrocytes (Hartung et Rieckmann, 1997). Les macrophages/microglies peuvent activement phagocytter la myéline ou attaquer la gaine de myéline via des molécules potentiellement très toxiques: des cytokines, des molécules oxygénées, et des métabolites du NO (Hartung et Rieckmann, 1997). Tous s'entendent pour dire

que les réponses immunitaires jouent un rôle dans la pathogenèse de la sclérose en plaques.

5.3 Prévalence

La sclérose en plaques est une maladie qui survient surtout chez les jeunes adultes, particulièrement les femmes (Duquette *et al.*, 1992), des régions au climat tempéré. Plusieurs pays occidentaux, développés économiquement, démontrent des taux élevés de prévalence de la sclérose en plaques. Dans l'hémisphère nord, il y a un gradient de diminution nord-sud pour la prévalence de cette maladie et aussi un gradient sud-nord dans l'hémisphère sud, tous deux indépendants de facteurs génétiques ou raciaux. L'Europe centrale et du nord, l'ancienne Union Soviétique, le Canada, le nord des États-Unis, la Nouvelle-Zélande et le sud de l'Australie sont des régions à prévalence élevée (30 et plus par 100 000 habitants). Les régions à prévalence moyenne (5 à 29 cas par 100 000 habitants) s'étendent sur le reste de l'Australie, le sud des États-Unis, le sud-ouest de la Norvège, le nord des pays scandinaves, et la partie nord du bassin de la Méditerranée. Une faible prévalence (moins de 5 cas par 100 000 habitants) a été rapportée pour l'Asie, les Caraïbes, l'Afrique, le Mexique et le nord de l'Amérique du Sud (Kurtzke, 1993).

Des études de migration et de tendances géographiques appuient un apport des facteurs environnementaux dans la distribution géographique de la maladie. Les études de migration démontrent que le risque pour un individu de développer cette maladie s'établit au cours de ses deux premières décennies de vie, probablement avant l'âge de 15 ans (Kurtzke, 1993). Les enfants d'immigrants ont tendance à démontrer le risque de développer la sclérose en plaques du pays hôte qu'ont choisi leurs parents (Gale et Martyn, 1995), alors que les adultes immigrants démontrent le risque de développer cette maladie associé à leur pays d'origine.

5.4 Facteurs génétiques

Des facteurs génétiques sont impliqués dans l'étiologie de la sclérose en plaques. En effet, la probabilité que le deuxième membre d'une paire de jumeaux identiques développe la sclérose en plaques alors que le premier membre en est atteint est de 30 % (Bobowick *et al.*, 1978; Kinnunen *et al.*, 1988; Sadovnick *et al.*, 1993; Mumford *et al.*, 1994). Cette proportion indique la contribution substantielle de facteurs génétiques au risque de développer cette maladie. Par contre, d'autres facteurs sont aussi probablement impliqués. Les travaux de plusieurs groupes démontrent que plus d'un gène serait impliqué (Ebers et Sadovnick, 1994). Les antigènes humains leucocytaires (HLA) représentent le facteur génétique pour lequel les études de liaison génétique ont démontré la plus grande association (Ebers *et al.*, 1996; Haines *et al.*, 1996). L'haplotype HLA-DR2 (DRB1*1501) est présent avec une fréquence supérieure chez les patients atteints de sclérose en plaques, particulièrement chez les Caucasiens (Stewart *et al.*, 1981; Ebers, 1982; Hauser *et al.*, 1989; Beall *et al.*, 1993; Hillert *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 1993; Kellar-Wood *et al.*, 1995; Haines *et al.*, 1998). Par contre, cet allèle ne confère pas automatiquement une prédisposition au développement de cette maladie. De plus, d'autres haplotypes ont aussi été associés avec la sclérose en plaques (Marrosu *et al.*, 1998; Weinshenker *et al.*, 1998).

Une association a aussi été observée pour le récepteur des cellules T (TCR) au niveau de la chaîne α et β . Certains segments des régions constantes et variables seraient plus souvent détectés chez les patients que chez les témoins (Beall *et al.*, 1989; Oksenberg *et al.*, 1989; Seboun *et al.*, 1989; Hockertz *et al.*, 1998). Par contre, d'autres études n'ont pas corroboré ces résultats (Lynch *et al.*, 1991; Lynch *et al.*, 1992; Briant *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1995). D'autres associations avec les gènes des immunoglobulines (Propert *et al.*, 1982; Walter *et al.*, 1991) et de la protéine basique de la myéline (Boylan *et al.*, 1990; Tienari *et al.*, 1992; Tienari *et al.*, 1998) ont été rapportées dans la littérature. Quatre groupes ont effectué des études systématiques de liaison génétique avec la sclérose en plaques; aucune nouvelle région génomique

ayant une fonction connue n'a été identifiée (Ebers *et al.*, 1996; Haines *et al.*, 1996; Kuokkanen *et al.*, 1996; Sawcer *et al.*, 1996).

5.5 Association à une étiologie virale

Plusieurs virus ont, à un moment ou un autre, été associés à la sclérose en plaques. D'autres maladies démyélinisantes humaines sont induites par des virus telles la panencéphalite sclérosante sous-aiguë induite par le virus de la rougeole (Johnson, 1987), la leucoencéphalopathie progressive multifocale causée par le polyomavirus JC (Major *et al.*, 1992), l'encéphalopathie et la myélopathie induites par le VIH (Spencer et Price, 1992) et la myélopathie associée au rétrovirus T-lymphotrope humain-1 (HTLV-1) (Osame *et al.*, 1986). L'étiologie de la sclérose en plaques pourrait aussi avoir une implication virale. De plus, des études épidémiologiques suggèrent l'implication de facteurs environnementaux, possiblement des virus. Toutefois, malgré les nombreux travaux, aucun virus n'a été associé hors de tout doute avec la sclérose en plaques jusqu'à maintenant. Différents groupes ont suivi des patients atteints de sclérose en plaques en relation avec des infections virales. Une corrélation significative entre le nombre d'exacerbations ou de crises des patients et des infections virales communes, particulièrement des voies respiratoires supérieures a été rapportée (Sibley *et al.*, 1985; Andersen *et al.*, 1993; Panitch, 1994). Ces résultats suggèrent fortement que des virus communs, sans doute plus d'un, sont impliqués dans le déclenchement d'exacerbations chez des patients atteints de sclérose en plaques.

Les virus pour lesquels plus d'un laboratoire a publié des observations au cours de dix ou vingt dernières années sont présentés au tableau 1. Il ne s'agit pas d'une compilation exhaustive, mais plutôt d'un relevé des virus ayant attiré davantage l'attention dans les recherches récentes. Les résultats obtenus de plusieurs équipes sont présentés en différentes catégories: détection de virions, de protéines virales ou de génomes viraux dans le SNC (virus-SNC), détection d'anticorps antiviraux dans le liquide céphalo-rachidien (anticorps-LCR),

détection de virions, de protéines virales ou de génomes viraux dans le sang, cellules ou plasma (virus-sang), et enfin détection d'anticorps antiviraux dans le sérum (anticorps-sang).

Souvent, une publication démontrant une association préférentielle entre la sclérose en plaques et un certain virus a été suivie par plusieurs autres démontrant l'absence d'un tel rapprochement. Cela fut surtout le cas dans les années 80 avec le virus HTLV-1, pour lequel davantage de données rejetant une telle association ont été rapportées que de résultats suggérant un tel rapprochement. La détection de HTLV-1 a été effectuée par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR). Étant donné le grand pouvoir d'amplification de cette technique, une contamination mineure provenant d'un témoin positif ou d'un autre échantillon positif peut après la réaction de PCR démontrer un signal positif. Un groupe de chercheurs s'est penché sur l'association de HTLV-1 avec la sclérose en plaques dans un grand nombre de patients. La détection de ce virus par PCR a été effectuée en utilisant des procédures expérimentales très strictes pour minimiser au maximum toute possibilité de contamination et de résultats faussement positifs (Ehrlich *et al.*, 1991). Les résultats obtenus n'ont pas démontré la présence de HTLV-1 dans un nombre significatif de patients atteints de sclérose en plaques (Ehrlich *et al.*, 1991). Un fait intéressant à noter, les symptômes cliniques de la myélopathie associée au HTLV-1 ressemblent fortement à ceux de la sclérose en plaques, ce qui a pu introduire des erreurs dans le choix de patients lors de certaines études (Ehrlich *et al.*, 1991).

Plusieurs virus à ADN et à ARN ont été associés à la sclérose en plaques. La détection de virus ou d'anticorps antiviraux dans le sang n'est peut-être pas représentative du SNC. C'est pourquoi plusieurs équipes ont tenté de détecter des virus dans le SNC ou des anticorps antiviraux dans le liquide céphalo-rachidien. Plusieurs virus ont été détectés dans le SNC, toutefois leur présence n'était pas toujours associée de façon préférentielle avec la sclérose en

Tableau 1: Association de virus avec la sclérose en plaques

Virus	Virus-SNC	Anticorps LCR	Virus-sang	Anticorps sang
Coronavirus	oui ⁽¹⁾	oui; non ⁽²⁾		non ⁽³⁾
Canin distemper	non ⁽⁴⁾			oui; non ⁽⁵⁾
Cytomégalovirus	non ⁽⁶⁾		non ⁽⁷⁾	non ⁽⁸⁾
Epstein-Barr	non ⁽⁹⁾	oui ⁽¹⁰⁾	oui; non ⁽¹¹⁾	oui; non ⁽¹²⁾
Herpès humain 6	oui; non ⁽¹³⁾	non ⁽¹⁴⁾	non ⁽¹⁵⁾	oui; non ⁽¹⁶⁾
Herpès simplex	oui; non ⁽¹⁷⁾		non ⁽¹⁸⁾	non ⁽¹⁹⁾
Oreillons	non ⁽²⁰⁾			oui ⁽²¹⁾
Paramyxovirus SV5	oui; non ⁽²²⁾	oui; non ⁽²³⁾		
Rétrovirus	oui ; non ⁽²⁴⁾		oui; non ⁽²⁵⁾	
Rétrovirus T lymphotrophe humain-1	oui; non ⁽²⁶⁾	oui; non ⁽²⁷⁾	oui; non ⁽²⁸⁾	oui; non ⁽²⁹⁾
Rougeole	oui ; non ⁽³⁰⁾	oui ⁽³¹⁾		oui; non ⁽³²⁾
Rubéole	non ⁽³³⁾	oui ⁽³⁴⁾		oui ; non ⁽³⁵⁾
Varicelle-zona	non ⁽³⁶⁾		non ⁽³⁷⁾	oui; non ⁽³⁸⁾

Oui: détection chez les patients atteints de sclérose en plaques ou détection préférentielle chez ces patients comparativement aux témoins.

Non: absence de détection chez les patients atteints de la sclérose en plaques ou absence de différence statistiquement significative en comparaison avec des témoins.

1 Tanaka *et al.*, 1976, Burks *et al.*, 1980, Murray *et al.*, 1992a, Stewart *et al.*, 1992

2 oui: Salmi *et al.*, 1982; non: Fleming *et al.*, 1988

3 Madden *et al.*, 1981a, Hovanec et Flanagan 1983, Johnson-Lussenburg et Zheng 1987,

4 Cook *et al.*, 1981, Cosby *et al.*, 1989

5 oui: Cook *et al.*, 1979, Madden *et al.*, 1981b; non: Haile *et al.*, 1982

6 Sanders *et al.*, 1996a, Martin *et al.*, 1997

- 7 Martin et al., 1997 8 Myhr et al., 1998
 9 Martin et al., 1997 10 Bray et al., 1992
 11 oui (crise) Ferrante et al., 1997; non: Martin et al., 1997
 12 oui: Warner et Carp 1981, Bray et al., 1983, Larsen et al., 1985, Compston et al., 1986, Vaughan et al., 1996, Myhr et al., 1998; non: Kinnunen et al., 1990
 13 oui: Challoner et al., 1995; non: Liedtke et al., 1995, Sanders et al., 1996a, Martin et al., 1997, Merelli et al., 1997
 14 Liedtke et al., 1995, Coates et Bell 1998, Fillet et al., 1998
 15 Martin et al., 1997, Merelli et al., 1997, Mayne et al., 1998
 16 oui: Soldan et al., 1997; non: Nielsen et al., 1997, Fillet et al., 1998,
 17 oui: Bergström et al., 1989; non: Sanders et al., 1996a,b, Martin et al., 1997,
 18 Martin et al., 1997 19 Myhr et al., 1998
 20 Godec et al., 1992 21 Alpérovitch et al., 1991
 22 Prineas 1972, Mitchell et al., 1978, non: Cosby et al., 1989
 23 oui: Goswani et al., 1987; non: Vandvik et al., 1989
 24 oui: Perron et al., 1991, Perron et al., 1997; non: Hackett et al., 1996
 25 oui: Perron et al., 1997, Garson et al., 1998; non: Rozenberg et al., 1991
 26 oui: Koprowski et al., 1985; non: Hauser et al., 1986, Oksenberg et al., 1990, Menzo et al., 1992, Rasmussen et Clausen 1992, Rasmussen et al., 1992
 27 oui: Koprowski et al., 1985; non: Hauser et al., 1986, Karpas et al., 1986
 28 oui: Reddy et al., 1989; non: Hauser et al., 1986, Chen et al., 1990, Dekaban et Rice 1990, Fugger et al., 1990, Oksenberg et al., 1990, Ehrlich et al., 1991, Menzo et al., 1992, Rasmussen et Clausen 1992, Rasmussen et al., 1992
 29 oui: Koprowski et al., 1985, Ohta et al., 1986, Shirazian et al., 1993, non: Hauser et al., 1986, Karpas et al., 1986, Kinnunen et al., 1990, Nishimura et al., 1990, Weinshenker et al., 1990, Rasmussen et al., 1992
 30 oui: Field et al., 1972, Haase et al., 1981, Cosby et al., 1989; non: Stevens et al., 1980, Cook et al., 1981, Hall et Choppin 1982, Dowling et al., 1986, Godec et al., 1992
 31 Salmi et al., 1983
 32 oui: Salmi et al., 1972, Cook et al., 1979, Stephenson et al., 1980, Madden et al., 1981b, Haile et al., 1982, Compston et al., 1986, Jingwu et al., 1991; non: Kinnunen et al., 1990, Alpérovitch et al., 1991
 33 Cosby et al., 1989, Godec et al., 1992 34 Woyciechowska et al., 1985
 35 oui: Compston et al., 1986; non: Kinnunen et al., 1990
 36 Sanders et al., 1996a, Martin et al., 1997, 37 Martin et al., 1997
 38 oui: Compston et al., 1986; non: Myhr et al., 1998

plaques. Cela a été le cas pour des virus de la famille des *Herpesviridae* (Sanders *et al.*, 1996a; Sanders *et al.*, 1996b; Martin *et al.*, 1997). Jusqu'à maintenant, aucun nouveau virus spécifique à la sclérose en plaques n'a été détecté. Les résultats tentent plutôt d'impliquer des virus communs qui, chez certaines personnes prédisposées, induiraient la sclérose en plaques ou des exacerbations de cette maladie.

Dernièrement, le virus de l'herpès humain 6 (HHV-6), agent causal de la roséole infantile, a retenu l'attention dans la littérature. Ce virus est neurotrophe, car il infecte des cellules neurales. De plus, le HHV-6 est neuroinvasif, car il a été retrouvé dans le SNC de plusieurs patients. Des antigènes viraux du HHV-6 ont été détectés exclusivement dans les oligodendrocytes des patients atteints de sclérose en plaques (Challoner *et al.*, 1995). De plus, l'équipe de Jacobson (Soldan *et al.*, 1997) a montré la présence spécifique d'anticorps anti-HHV-6 de type immunoglobuline M en périphérie chez des patients atteints de sclérose en plaques. Ces résultats suggèrent une infection active chez ces patients. Par contre, d'autres équipes n'ont pas détecté de différence quant à la présence d'anticorps anti-HHV-6 ou de génome viral chez les patients témoins en comparaison avec les patients atteints de la sclérose en plaques (voir tableau 1). Récemment, un autre virus a aussi retenu l'attention et a nourri des controverses. Il s'agit d'un rétrovirus associé à la sclérose en plaques et isolé à partir de leptoméninges et des plexus choroïdes de patients atteints de sclérose en plaques et jamais de patients témoins (Perron *et al.*, 1997). Toutefois Hackett et collaborateurs (1996) n'ont pas détecté d'activité de transcriptase inverse chez les patients atteints de sclérose en plaques. Il faut par conséquent analyser les observations avec circonspection. Davantage de patients devront être testés pour la présence de ces deux virus avant de conclure quant à leur rôle dans la sclérose en plaques.

De nombreux modèles animaux sont étudiés pour élucider la pathogenèse de maladies humaines démyélinisantes du SNC. Plusieurs caractéristiques sont communes aux modèles animaux de démyélinisation viro-induite tels le virus Theiler de l'encéphalomyélite murine, le MHV, le virus Visna Maedi, le virus canin distemper, et le virus Semliki Forest (Kastrukoff et Rice, 1998). 1- Certaines souches virales sont plus enclines que d'autres à induire une démyélinisation du SNC de l'hôte. Des facteurs viraux sont par conséquent

impliqués dans le déclenchement de cette pathogenèse. 2- Certains groupes d'animaux sont plus susceptibles que d'autres. Des déterminants génétiques de l'hôte contribuent aussi à la pathogenèse. 3- Une infection aiguë survient souvent bien avant le développement d'une démyélinisation chronique. L'infection aiguë ne serait pas directement responsable de la pathologie. 4- Une infection virale persistante caractérisée par une réPLICATION virale défective ou une latence virale est souvent détectée dans ces modèles. 5- Le système immunitaire de l'hôte joue un rôle central dans le développement de la démyélinisation chronique observée dans ces modèles (Kastrukoff et Rice, 1998). Toutes ces caractéristiques devraient servir de point de départ dans la recherche de virus impliqués dans la sclérose en plaques. Ces observations ont d'ailleurs été rapportées pour le modèle murin des coronavirus.

5.6 Traitement

La sclérose en plaques étant considérée comme une maladie impliquant des réponses immunitaires, plusieurs traitements ont été tentés en ciblant le système immunitaire. Les corticostéroïdes ont été utilisés pour accélérer le début de la rémission à la suite des attaques. Par contre, aucun effet bénéfique n'a été observé sur le développement de la maladie. L'interféron β (IFN- β), une cytokine anti-virale, est utilisé avec un certain succès pour diminuer l'intensité et la fréquence des exacerbations chez les patients atteints de la forme rechutes-rémissions de la sclérose en plaques (Paty *et al.*, 1993; Sibley *et al.*, 1993). Plusieurs ont tenté d'élucider les mécanismes par lesquels l'IFN- β a un tel effet bénéfique. En voici quelques-uns : 1- Cette cytokine diminue l'expression de molécules du CMH de classe II sur les monocytes sanguins. Cette action pourrait empêcher la présentation d'antigène, un élément clé dans les réponses immunitaires. 2- L'expression de molécules de costimulation B7-1 (CD80) sur les cellules B est aussi diminuée chez les patients atteints de sclérose en plaques traités. Cette diminution peut aussi inhiber l'activation de cellules Th1. 3- L'IFN- β a aussi un effet anti-prolifératif sur les cellules T, ce qui peut diminuer l'importance des réponses cellulaires. 4- Cette cytokine réduit la production d'IFN- γ par les cellules T. 5- L'IFN- β augmente les fonctions des cellules CD8+ incluant les fonctions suppressives de telles cellules (Arnason, 1996). 6- Une diminution de l'activité de la métalloprotéinase de la matrice-9 produite par les lymphocytes T a aussi été observée suite à un traitement à

l'IFN- β (Yong *et al.*, 1998). 7- Finalement, l'IFN- β peut diminuer et éliminer les ouvertures de la barrière hémato-encéphalique chez les patients traités (Yong *et al.*, 1998).

Le "copolymer-1", est constitué du sel d'acétate d'un mélange synthétique de quatre acides aminés: L-alanine, L-acide glutamique, L-lysine et L-tyrosine. Ce composé peut aussi avoir un effet bénéfique sur des patients atteints de la forme rechutes-rémissions de la sclérose en plaques (Johnson *et al.*, 1995). Un des mécanismes d'action de ce polymère s'effectuerait via l'interaction directe avec l'intérieur de la niche à peptide des molécules du CMH, particulièrement les protéines HLA-DR (Fridkis-Hareli et Strominger, 1998).

Aucune médication ne guérit la sclérose en plaques. Par contre, des traitements sont disponibles pour alléger les symptômes et leur fréquence. L'élucidation de l'étiologie de la sclérose en plaques permettrait le développement de traitement ciblé pour ces patients.

Hypothèses et Objectifs

Avant de passer au prochain chapitre, voici les hypothèses de départ du projet :

- 1- Certains coronavirus humains seraient neurotropes, neuroinvasifs et neurovirulents.
- 2- Une infection coronavirale persistante pourrait être impliquée dans l'étiologie soit dans l'induction et/ou le développement de la sclérose en plaques.

Les objectifs de travail de cette thèse dans le but de vérifier ces hypothèses étaient de:

- 1- Démontrer le neurotropisme des coronavirus humains *in vitro*
- 2- Démontrer la neuroinvasion de ces virus chez l'humain
- 3- Évaluer l'implication potentielle de tels virus dans l'étiologie de la sclérose en plaques.

CHAPITRE 2

**SUSCEPTIBILITÉ DES CELLULES NEURALES AUX
CORONAVIRUS HUMAINS**

La susceptibilité des cellules neurales aux HCoV a été abordée par des expériences effectuées sur des cultures primaires neurales humaines. De plus, la susceptibilité de lignées neurales immortalisées à des infections aiguës par les deux souches de HCoV a été montrée. Peu de données sont disponibles sur la persistance virale de tels virus dans le SNC humain. Dans le but de mieux caractériser la susceptibilité des cellules neurales aux HCoV, des infections persistantes, par les deux souches prototypes OC43 et 229E, ont été effectuées sur plusieurs lignées neurales. Ces infections ont été comparées à des infections aiguës sur ces mêmes cellules. L'implication de la persistance coronavirale dans le modèle murin de démyélinisation et d'encéphalomyélite chroniques suggère qu'un phénomène similaire soit possible chez les HCoV.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de deux articles le premier traite de la souche OC43 et le second de la souche 229E.

Résumé article I

Les coronavirus humains sont des pathogènes des voies respiratoires. Les résultats obtenus dans différents laboratoires suggèrent qu'ils puissent aussi avoir un potentiel neurotropie. Nous formulons l'hypothèse que le neurotropisme des HCoV pourrait mener à une persistance au niveau du SNC, comme il a été observé pour les coronavirus murins. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons caractérisé la susceptibilité de plusieurs lignées neurales à l'infection par le HCoV-OC43. Nous avons mesuré les antigènes vitaux, la production de virions infectieux et l'ARN viral au cours d'infections aiguës et persistantes. Les lignées d'astrocytomes U-87 MG, U-373 MG, et GL-15, le neuroblastome SK-N-SH, le neurogliome H4, la lignée oligodendrocytaire MO3.13 et la lignée microgliale CHME-5, ont tous été susceptibles à une infection aiguë par le virus OC43. Nous avons suivi les infections persistantes sur une période approximative de 130 jours au cours de laquelle la présence d'antigènes vitaux, d'ARN viral et la production de virions infectieux ont été observées avec les lignées U-87 MG, U-373 MG, H4 et

MO3.13. La séquence de la région N-terminale du gène S, à partir des ARN des cellules infectées au bout des 130 jours, a été comparée à la séquence du virus initial. Des mutations ponctuelles qui mèneraient à des changements en acides aminés ont été observées dans toutes les lignées infectées de façon persistante. Une délétion qui ne modifierait pas le cadre de lecture de la protéine a été détectée dans l'ARN provenant des cellules H4 infectées de façon persistante. Certaines mutations ont été décelables seulement dans quelques clones moléculaires, suggérant l'évolution de la population virale et l'émergence de quasi-espèces durant l'infection des lignées: H4, U-87 MG, U-373 MG et MO3.13. Ces résultats suggèrent une persistance potentielle du virus OC43 dans plusieurs types cellulaires du SNC humain.

ARTICLE I**ACUTE AND PERSISTENT INFECTION OF HUMAN NEURAL CELL LINES BY HUMAN CORONAVIRUS OC43**

Nathalie Arbour¹, Geneviève Côté¹, Claude Lachance¹, Marc Tardieu², Neil R. Cashman³, and Pierre J. Talbot^{1*}

¹ Laboratory of neuroimmunovirology, Human Health Research Center, Armand-Frappier Institute, INRS, University of Quebec, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

² Laboratoire de neurovirologie, Université Paris XI, Kremlin Bicêtre, France

³ Neuroimmunology Unit, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, Québec, Canada H3A 2B4

ABSTRACT

Human coronaviruses (HCoV) are recognized respiratory pathogens. Data accumulated by different laboratories suggest their neurotropic potential. For example, primary cultures of human astrocytes and microglia were shown to be susceptible to an infection by the OC43 strain of HCoV (A. Bonavia, N. Arbour, V. W. Yong, and P. J. Talbot, *J. Virol.* 71:800-806, 1997). We speculate that the neurotropism of HCoV will lead to persistence within the central nervous system, as was observed for murine coronaviruses. As a first step in the verification of our hypothesis, we have characterized the susceptibility of various human neural cell lines to infection by HCoV-OC43. Viral antigen, infectious virus progeny and viral RNA were monitored during both acute and persistent infections. The astrocytoma cell lines U-87 MG, U-373 MG, and GL-15, as well as neuroblastoma SK-N-SH, neuroglioma H4, oligodendrocytic MO3.13, and the CHME-5 immortalized fetal microglial cell line, were all susceptible to an acute infection by HCoV-OC43. Viral antigen and RNA and release of infectious virions were observed during persistent HCoV-OC43 infections (~ 130 days of culture) of U-87 MG, U-373 MG, MO3.13, and H4 cell lines. Nucleotide sequences of RNA encoding the putatively hypervariable viral S1 gene fragment obtained after 130 days of culture were compared to that of initial virus input. Point mutations leading to amino acid changes were observed in all persistently infected cell lines. Moreover, an in-frame deletion was also observed in persistently infected H4 cells. Some point mutations were observed in some molecular clones but not all, suggesting evolution of the viral population and the emergence of viral quasispecies during persistent infection of H4, U-87 MG, and MO3.13 cell lines. These results are consistent with the potential persistence of HCoV-OC43 in cells of the human nervous system, accompanied by the production of infectious virions and molecular variation of viral genomic RNA.

INTRODUCTION

Human coronaviruses (HCoV) are enveloped positive-stranded RNA viruses represented by two known viral serogroups, OC43 and 229E. These viruses were first isolated as pathogens of the respiratory tract (32, 49) and have been associated with up to one-third of common colds (58). Since their discovery, other pathologies have occasionally been associated with HCoV, such as pneumonia, meningitis, radiculitis (65) and diarrhea (64). Accumulating evidence from animal models and from studies of humans suggests a neurotropic potential for these viruses.

The murine counterpart of HCoV, mouse hepatitis virus (MHV) has been studied as an animal model of a virus-induced demyelinating disease of the central nervous system (CNS) (13, 83). The outcome of an MHV infection in the CNS is dependent upon the route and dose of inoculation, and on host factors such as age, species, strain, and immune system status as well as on the genetic constitution of the virus (72, 84). After intranasal inoculation, neurotropic strains of MHV enter the brain via the olfactory nerve and then spread within the mouse CNS (7, 42, 61). Other routes have been shown to be used by MHV to gain access to the CNS, such as the hematogenous and lymphatic systems (9). Moreover, a neurotropic MHV has been shown to enter the CNS of nonhuman primates after a peripheral inoculation (14). Once in the CNS, MHV replicates in neurons, astrocytes and oligodendrocytes (33). It was shown that the CNS of nonhuman primates is also susceptible to a coronavirus infection: after an intracerebral inoculation, a murine virus-like isolate caused a subacute panencephalitis and demyelination in these animals (56). Similar results could be envisaged for HCoV, especially the OC43 strain, which is classified within the same antigenic group as MHV and is closely linked at the molecular level (41).

Observations in humans are also consistent with HCoV neurotropism. Intrathecal anti-HCoV-OC43 antibody synthesis was detected in humans, particularly in multiple sclerosis (67) and in Parkinson's disease patients (25),

suggesting a CNS infection. Importantly, HCoV-OC43 RNA has repeatedly been detected in human brains (6, 55). Moreover, we have shown that this HCoV strain has the capacity to infect human astrocytes and microglia in primary cultures (12). In general, *in vitro* observations of coronavirus infections correlate with the ones occurring *in vivo*. For example, MHV-3 has an *in vitro* affinity for neurons, ependymal cells, and meningeal cells but not astrocytes and oligodendrocytes, corroborating the pattern of pathogenicity observed *in vivo*, where this virus induces an initial ependymitis, meningitis, and encephalitis (82). Similarly, three MHV-JHM variants that induce very different pathological patterns *in vivo*, demonstrated distinct corroborating *in vitro* growth properties on primary cultures of rat glial cells (48). Therefore, it is reasonable to assume that the characterization of HCoV replication *in vitro* will provide valuable data regarding its neurotropic properties, given that *in vivo* experiments could obviously not be performed in humans.

Of relevance to our study, MHV RNA was detected in mouse brain a long time after the initial infection (26, 33). In fact, the brain was the last organ from which MHV was cleared after an oronasal inoculation (8). Thus, this virus is able to persist in the CNS of its host (43, 70), especially in astrocytes, oligodendrocytes (63, 76), and neurons (71). It has been suggested that viral persistence observed in the CNS may play a role in chronic pathologies observed following a coronavirus infection (43). Of importance, persistent MHV infections of various neural cell lines have been observed (46, 74).

Since HCoV was detected in human brains and was able to infect human neural cells, both in primary and immortalized cultures, we speculate that HCoV could also persist in the human CNS. Collins and Sorensen (20) reported a persistent infection by HCoV-OC43 in a human glioblastoma cell line. However, more extensive studies are needed in order to elucidate the potential persistence of HCoV-OC43 in the human CNS.

Coronaviruses bear four structural proteins: spike (S), membrane (M), small membrane (E, formerly sM), and nucleocapsid (N). Some strains, such as HCoV-OC43, incorporate an additional structural protein: hemagglutinin-

esterase (HE) (41). More sequence variations are usually observed within the S protein than in any other structural protein (41). The pathogenesis of MHV is dependent in part on its S glycoprotein, which has multiple important biological properties, such as receptor ligation (22, 86), mediation of fusion (19), neutralizing antibody domains (21, 81, 85), and cytotoxic T lymphocyte epitope domains (10, 15). Moreover, different laboratories have shown that important molecular determinants of neurovirulence can be localized in some regions of the MHV S glycoprotein (13, 27). Gallagher and colleagues have shown that *in vitro* passaging of MHV-4 in culture generates heterogeneity in the structure of the S glycoprotein (29). Moreover, multiple point and deletion mutations arose, mainly concentrated in the S and the N genes of MHV during an *in vivo* persistent CNS infection (1, 66). On the other hand, potential variations of the HCoV-OC43 S glycoprotein in persistent infections of the CNS have not been examined to date.

The susceptibility of various neural cell lines to coronaviruses, particularly for MHV (28), has been demonstrated. Limited results (5, 20) are available concerning the susceptibility to HCoV-OC43 infection of human continuous cell lines representative of cells of the nervous system, which would enable these to serve as invaluable *in vitro* models of study. We have previously demonstrated the infection of primary cultures of human brain cells with HCoV-OC43 (12). However, the limited life span of these cell cultures does not allow a study of the effects of a long-term coronavirus infection.

In the present study, cell lines representative of different neural cell types (oligodendrocytes, astrocytes, microglia, and neurons) of the human nervous system were used to evaluate the potential of HCoV-OC43 to cause an acute and/or a persistent infection. Similar experiments were also carried out with HCoV-229E; these results are presented separately (4). Viral antigens, infectious virus particles, and viral RNA (N and S1 genes) were monitored during an acute and a persistent infection by HCoV-OC43. We report that all the cell lines tested were susceptible to an acute HCoV-OC43 infection. Moreover, all but three of them sustained a persistent infection. Sequencing of the S1

gene fragment after 130 days of culture showed, in all persistently infected cell lines, mainly point mutations leading to amino acid changes. Our results are consistent with the hypothesis that HCoV-OC43, as was extensively shown for MHV, could persist in various CNS cell types, leading to production of infectious viral particles and molecular variation of viral genomic RNA.

MATERIALS AND METHODS

Viruses and cell lines

HCoV-OC43 was originally obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Va), plaque-purified twice, and grown on HRT-18 cells as described previously (54). The fourth passage of HCoV-OC43 from laboratory stocks kept at -90°C, with a titer of 5.15×10^6 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀)/ml, was used for all experiments.

The GL-15 cell line established from a human glioblastoma multiforme was generated by V. Bocchini (University Medical School, Perugia, Italy) (11). The CHME-5 cell line was obtained from human fetal microglia by transfection with the large T antigen of simian virus 40 (34). The MO3.13 cell line was obtained from the fusion of a rhabdosarcoma cell line (Te671) with an adult human oligodendrocyte (51). The H4, SK-N-SH, U-373 MG, and U-87 MG cell lines were obtained from the ATCC. All of these neural cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum and gentamicin (50 mg/ml; GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.) .

Antibodies

Virus-specific monoclonal antibodies (MAbs) were produced in our laboratory by standard hybridoma technology. MAbs 1-10C.3, directed against the surface S glycoprotein of HCoV-OC43, and 5-11H.6, an isotypic control, were used to detect viral antigens in immunoperoxidase and immunofluorescence assays.

Acute infection

For detection of viral antigens, approximately 1×10^6 to 1.5×10^6 cells (obtained by trypsinization of cell monolayers grown on plastic 75-cm² flasks,

followed by pelleting) were mixed with an equal volume of HCoV-OC43 virus stock, diluted to provide a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 or 1.0, in the presence of L-1-tosylamide-2-phenylethyl-chloromethyl ketone treated trypsin (10 U/ml; Sigma-Aldrich Canada Ltd.). Twenty-five microliters of this suspension was deposited into each well of a 12-well glass slide (Flow, ICN Biomedical Canada Ltd., Mississauga, Ontario, Canada) and infection progressed for up to 4 days at 33°C prior to fixation in acetone at -20°C for 30 min. Slides were kept at -70°C until an immunofluorescence assay could be performed.

For quantitation of infectious virus production, cell lines at 60 to 80% confluence in 25-cm² flasks were infected with virus stock diluted to provide an MOI of 0.1, in the presence of L-1-tosylamide-2-phenylethyl-chloromethyl ketone treated trypsin (10 U/ml Sigma-Aldrich Canada Ltd.). Infection was carried out at 33°C for up to 4 days and supernatants and cell monolayers taken at different time points were harvested and kept at -70°C until infectious virus titers could be quantitated.

For studies of viral RNA, cell monolayers at 60 to 80% confluence in 150-cm² tissue culture-treated petri dishes were infected at an MOI of 0.01, in the presence of L-1-tosylamide-2-phenylethyl-chloromethyl ketone treated-trypsin (10 U/ml; Sigma-Aldrich Canada Ltd.) for 1 day at 33°C. Then, cell monolayers were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, and kept at -90°C until RNA could be extracted.

Persistent infection

Cell lines at 60 to 80% confluence in 25-cm² culture flasks were infected with 0.5 ml of viral suspension providing an MOI of 0.5, in the presence of L-1-tosylamide-2-phenylethyl-chloromethyl ketone treated trypsin (10 U/ml; Sigma-Aldrich Canada Ltd.) and incubated for 2 h at 33°C with periodical agitation. Cell monolayers were then washed with PBS and grown in regular cell culture medium at 37°C. Cells were passaged every 4 to 8 days. Samples of supernatants and cells were kept at -70°C for viral titration by an

immunoperoxidase assay at each passage, and cells at each fifth passage were kept for RNA extraction. Twenty-five microliters of cell samples from each passage at a concentration of 0.5×10^6 to 1.5×10^6 cells/ml was deposited into each well of a 12-well glass slide (Flow, ICN Biomedical Canada Ltd.), incubated for 24 to 48 h at 37°C, and then fixed in acetone at -20°C for 30 min and kept at -70°C until immunofluorescence could be performed.

Detection of viral antigens by immunofluorescence

The immunofluorescence assay was performed as described previously (68). Briefly, primary antibody (MAbs 1-10C.3 for HCoV-OC43 and 5-11H.6 as an isotypic control) was added to thawed slides and incubated for 1 h at 37°C. This was followed by three washes in PBS, the addition of the fluorescein-conjugated mouse-specific goat secondary antibody (Cappel, Durham N. C.) and a 30-min incubation at 37°C. After three washes in PBS, slides were mounted with glycerol-PBS (9:1). Slides were stored at 4°C until observation with a Leitz fluorescence microscope (Dialux 20 model) could be performed.

Immunoperoxidase assay for quantitation of infectious virus titers

The immunoperoxidase assay for quantitation of infectious virus titers was performed as described previously (68). Briefly, susceptible HRT-18 cells were inoculated with serial logarithmic dilutions of samples in a 96-well Linbro plate (Flow, ICN Biomedical Canada Ltd.). After 4 to 5 days of incubation at 33°C in 5% (vol/vol) CO₂, cells were washed with PBS and fixed with 0.3% (vol/vol) hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) in methanol for 30 min. After washing with PBS, they were incubated for 2 h at 37°C with an appropriate antiviral MAb (1-10C.3). Cells were then washed five times with PBS, and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins (Cappel) were added and incubated for 2 h at 37°C. Bound antibodies were detected by incubation with 0.025% (wt/vol) 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Bio-Rad, Richmond, Calif.) and 0.01% (vol/vol) hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) in PBS. The chromogenic

reaction was stopped with deionized water. Infectious virus titers were calculated by the Karber method. Negative controls consisted of noninfected cells.

Preparation of RNA, RT, and PCR

To extract total cellular RNA from acutely or persistently infected or controls cells, cell monolayers were lysed with GIT buffer (4 M guanidine isothiocyanate, 2.5 mM sodium acetate, 12 mM β -mercaptoethanol). Lysates were passed through a 26-gauge needle at least six times and then layered onto a cesium chloride cushion (5.7 M cesium chloride, 2.5 mM sodium acetate) for a 12- to 20-h centrifugation at 150,000 $\times g$. Supernatant was removed, and the RNA pellet was resuspended in sterile distilled and deionized H₂O. The pair of primers used for amplification of HCoV-OC43 as well as the one for the control housekeeping gene (encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, [GAPDH]) are described in Table 1. Forty picomoles of the inverse-complementary primer or 100 pmol of oligo(dT) (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) was incubated with 2 to 5 μ g of total cellular RNA at 65°C for 5 min to denature RNA, followed by a 30 min slow cooldown to 37°C for annealing. Reverse transcription (RT) with Expand Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (50 U; Roche Diagnostics) was performed at 42°C for 90 min in the presence of 60 U of RNA Guard (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada), 0.4 mM (each) deoxynucleoside triphosphate (Na salt; Roche Diagnostics), 1X Reverse Transcriptase buffer (50 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% [vol/vol] Tween 20, [pH 8.3]) and 10 mM dithiothreitol (Roche Diagnostics). For PCR, 1 of 10 or 1 of 5 of the synthesized cDNAs was incubated in the presence of 20 pmol (HCoV-OC43 S1 and N) or 50 pmol (GAPDH) of the sense and antisense primers, 1.5 mM (HCoV-OC43 S1 or GAPDH) or 2.5 mM (HCoV-OC43 N) MgCl₂ (Roche Diagnostics), 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl; Roche Diagnostics) and 0.4 mM (each) deoxynucleoside triphosphate (Li salt; Roche Diagnostics) at 94°C for 5 min and at 60°C (HCoV-OC43 N), 50°C (GAPDH), or 37°C (HCoV-OC43 S1) for another 5 min. After the addition of Expand high fidelity PCR system DNA polymerase

(*Taq* and *Pwo* DNA polymerases) (2.5 U; Roche Diagnostics), 30 cycles of 2 min at 72°C, 1 min at 94°C, and 2 min at 60°C (HCoV-OC43 N), 50°C (GAPDH), or 37°C (HCoV-OC43 S1) were performed, with a final elongation step of 10 min at 72°C. The DNA amplicons were separated by electrophoresis in a 1.5% (wt/vol) agarose gel with ethidium bromide (1 µg/ml).

Cloning and nucleotide sequencing

PCR products of the HCoV-OC43 S1 gene were ligated into pGEM-T or pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, Wis.) according to the manufacturer's instructions. The ligation mixture was then transformed into competent XL-1 blue bacteria. Plasmidic DNA was prepared with a plasmid mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and sequenced with an automated sequencer (ABI 310 genetic analyzer, Perkin Elmer) in both directions by using a universal primer, SP6, and internal primers (Table 1). Nucleotide sequences and predicted amino sequences were analyzed with Geneworks software for Macintosh (version 2.5.1; Oxford Molecular Ltd. Oxford, United Kingdom).

RESULTS

Acute infection of neural cell lines

We have previously reported that HCoV-OC43 can infect primary cultures of human brain cells (12). However, the limited life span of these cell cultures did not allow us to study the effects of a long-standing coronavirus infection. Only limited results are available concerning the susceptibility to HCoV infection of immortalized human cell lines representative of cells of the nervous system (5, 20). Therefore, the susceptibility to an acute HCoV-OC43 infection of various available cell lines was evaluated, and persistent infections were established and characterized in the virus-susceptible cell lines. This HCoV-OC43 virus was initially adapted in our laboratory to replicate in the HRT-18 cell line, a human adenocarcinoma of colon and rectum. Therefore, these cells were used as a positive control for infection. Expression of the HCoV S antigen in acutely infected cells was verified by an indirect immunofluorescence assay using a specific MAb. For all cell lines tested, no signal was detected on noninfected cells or with an isotypic control MAb on infected cells (data not shown). Representative results obtained at an MOI of 1.0 for at least three independent experiments are presented in Fig. 1. The appropriateness of the indirect immunofluorescence test for the detection of HCoV-OC43 infection is indicated by its specificity but also, as is evident in Fig. 1H, by a characteristic cytoplasmic signal observed in infected HRT-18 cells (50). Both neuronal cell lines (SK-N-SH cells and H4 cells [Fig. 1A and B respectively]) were susceptible to HCoV-OC43 infection, to a comparable level. HCoV-OC43 antigens were also detected in all three astrocytic cell lines (U-373 MG cells, U-87 MG cells, and GL-15 cells [Fig. 1D to E, respectively]). However, a lower percentage of infected cells was observed for the GL-15 cell line, compared to the other astrocytic cell lines. The oligodendrocytic MO3.13 (Fig. 1F) and microglial CHME-5 (Fig. 1G) cell lines were also positive after HCoV-OC43 infection. Overall, all neural cell lines tested were susceptible to HCoV-OC43 infection, as detected by an indirect immunofluorescence assay.

Infectious HCoV-OC43 virions were also produced by all susceptible cell lines. An assay to determine the kinetics of virion release was performed between 2 and 96 h of infection. The titers measured (data not shown) were not due to input viruses, since a strong increase in virus titers was observed from the 6 to 12 h time points. Most of the time, extracellular virus production paralleled intracellular production but was at a higher level. For most cell lines (H4, SK-N-SH, and MO3.13), maximal virus production was observed after 20 to 40 h and then a plateau effect with a slow decrease was seen for the remainder of the infection (data not shown). For the U-373 MG cell line, viral titers continued to increase until the end of the experiment (96 h). Maximal viral titers observed for all neural cell lines varied between 3.0 and 4.0 log TCID₅₀/ml and were lower than those obtained with the HRT-18 cell line (7 log TCID₅₀/ml). Overall, neural cell lines were able to produce infectious virions but to a lower level compared to the reference cell line.

Detection of coronavirus antigens in neural cell lines during persistent infection

MHV can establish a persistent infection in different cell lines (17, 46, 59, 74) with various effects, and is also involved in in vivo persistent infection in animals (1, 70). Since primary cultures of human brain cells cannot tolerate long-term culture, immortalized neural cell lines were used to verify the potential of a sustained persistent HCoV-OC43 infection in the CNS. Cell lines susceptible to an acute infection were infected and then cultured for several passages. Cells were collected for the detection of coronavirus antigens by indirect immunofluorescence at each cell passage. Representative results obtained for at least two independent experiments are presented in Fig. 2. Coronavirus antigens were detected in at least 1 to 5% of persistently infected HRT-18 cells (Fig. 2E). The neuronal H4 cells (Fig. 2A), and the astrocytic U-87 MG cells (Fig. 2D) showed the presence of HCoV-OC43 antigens at all cell passages tested. However, the percentage of positive cells varied from 1 to 10% for persistently infected H4 cells and 5 to 50% for U-87 MG cells. In the case of the persistently infected astrocytic U-373 MG cells, some cell passages (15 to

20) were negative, although the signal was detected at passage 21, at which >50% of cells were positive for viral antigens. Subsequently, the percentage of positive cells dropped to 5%. The MO3.13 oligodendrocytic cell line sustained a persistent infection in >50% of the cells in the monolayer, as detected by indirect immunofluorescence. Moreover, starting at the fifth passage, cytopathic effects were repeatedly observed: growth was slowed, and cells appeared bigger than normal, had fused, and contained oversized vacuoles until the end of the culture period, i.e. for more than 140 days (noninfected and persistently infected MO3.13 cells [Fig. 3A and B respectively]). The observed oversized vacuoles in persistently infected MO3.13 cells contained coronavirus antigens that were detected by immunofluorescence (Fig. 2B). On the other hand, the CHME-5, GL-15, and SK-N-SH cell lines did not show any HCoV-OC43 antigens after the second passage, even though they were all acutely infected by the same virus. Overall, HCoV-OC43 easily established a persistent infection in various neural cell lines representative of all four cellular phenotypes.

Detection of infectious virions during persistent infection

Pearson and Mims showed that a persistent HCoV-OC43 infection does not necessarily correlate with production of infectious virus (60). Therefore, we verified the presence of infectious viral particles in the supernatant and in the intracellular compartment of all persistently infected cell lines (Fig. 4). No infectious virions were detected after the third passage of infected SK-N-SH cells. Thus, no persistent infection could be established for this cell line (Fig. 4F). Similar results were obtained with GL-15 and CHME-5 cells (data not shown). All persistently infected cell lines produced infectious virions at least until the 25th passage (~130 days). In most cases, viral titers obtained from the extracellular compartment were at a higher level than those for intracellular infectious viruses. During persistent infection, continuous production of infectious virions of at least 3.5 and even up to 8.0 log TCID₅₀/ml was detected in the supernatants of persistently infected H4 cells (Fig. 4A). In the case of persistently infected U-373 MG cells (Fig. 4C), no virus was detected between cell passages 13 and 20, despite the presence of viruses at the beginning and

at the end of the culture. This correlated with the absence of HCoV-OC43 antigen at the same cell passages, as monitored by immunofluorescence. The negative results obtained by both methods may relate to the sensitivity of these tests. Negligible, undetectable amounts of virus may have been present at these specific cell passages, since infectious virions as well as viral antigens were detected later on. Alternatively, only viral RNA may have subsisted at these cell passages. At the end of the culture period, approximately 5% of the U-373 MG cells were infected, as shown by immunofluorescence. Persistently infected U-87 MG cells (Fig. 4D) produced infectious virions in various amounts (from 2.5 to 7.5 TCID₅₀/ml). In the case of persistently infected MO3.13 cells (Fig. 4B), relatively stable amounts of virions were detected, both intracellularly and extracellularly. Even though the persistent HCoV-OC43 infection produced cytopathic effects on MO3.13 cells, infectious virions were released from these cells. All HCoV-OC43 persistently infected cell lines were positive for expression of coronavirus antigen and release of infectious virus (a summary of results is presented in Table 2).

Detection of viral RNA during persistent infection

We have also verified the presence of coronavirus RNA by RT-PCR as another indicator of viral replication. RT-PCR is more sensitive than the indirect immunofluorescence assay (68). Moreover, it could detect RNA while no antigen or virion was produced. The N protein was chosen since it is usually present at high levels during a coronavirus infection. Moreover, the 3'-coterminal nested set structure of subgenomic coronavirus mRNAs results in the presence of this gene on all viral RNAs (41). RNA from acutely infected, non-infected, and persistently infected cells at different cell passages was extracted, reverse transcribed, and amplified with specific N primers (Table 1). GAPDH RNA was detected in each case (data not shown), indicating that RNA was suitable for amplification even from noninfected cells in which no viral RNA could be detected. Viral RNA was detected in comparable amounts at every cell passage tested for persistently infected H4, MO3.13, U-87 MG, and HRT-18 cells (Fig. 5). However, in the case of the persistently infected U-373 MG cells,

we observed less viral RNA at passages 15 and 20, even though the same amount of total RNA was used in all cases, corroborating negative results for infectious virus and viral antigen at cell passages 13 to 20.

Sequencing of viral S1 gene and a region of the viral N gene from persistently infected cells

Different laboratories have shown the presence of important determinants of neurovirulence within the S glycoprotein of MHV, especially its N-terminal half, designated S1. We looked for variations within the S1 portion of the S gene during persistent infection with HCoV-OC43, given that this region was shown in MHV to be hypervariable (33). First, an RT-PCR for this gene was performed (primers are listed in Table 1), and then 2,045-bp amplicons were cloned and sequenced in both directions. Sequencing results from acute and persistent infections at passage 42 for HRT-18, passage 36 for H4, passage 28 for U-87 MG, passage 25 for U-373 MG and passage 24 for MO3.13 were compared to the sequence we previously reported (53). Results were confirmed by reading both nucleic acid strands to reduce errors introduced by automatic sequence analysis and by examining three clones for each cell line and infection. For all acute and persistent infections, the HCoV-OC43 S1 gene presented four point mutations compared to our published sequence (53): they were at positions 894, 895, 949 and 2025, leading to two amino acid changes (Table 3). On the other hand, Künkel and Herrler have also published a sequence of the HCoV-OC43 S glycoprotein (40) that showed these same point mutations. Moreover, they have also published sequences from two different isolates (39) that are identical to our sequence at these positions. We conclude that the input virus we used for acute and persistent infections was identical in all cases but bore sequence differences compared to the S1 gene sequence already published by our group.

No consensus concerning mutations from a nucleotide to a specific one or for specific amino acid changes was observed. Point mutations at positions 102, 279, 579, 752, and 1496 were shared by viral RNA extracted from several

infected cell lines. Other point mutations were specific to only one cell line, such as the ones at positions 110 and 773 for the U-87 MG cells and positions 474, 1488, 1811, and 2079 for the MO3.13 cells. It is intriguing that the cell line in which cytopathic effects were detected (MO3.13; Fig. 3) presented the highest number of point mutations and also more distinct mutations compared to the other cell lines. A point mutation at position 579 was only found on viral RNA extracted from neural cell lines and was not observed in persistently infected HRT-18 cells. No mutation appeared essential for persistent infection since none was present on every infected cell line, with the exception of the one at position 579 for neural cell lines. One cell line (H4) demonstrated an in-frame deletion of 15 nucleotides, leading to a 5-amino acid deletion. Some regions of the S1 gene were more prone to mutations than others: no mutations or deletions were observed between positions 773 and 1445, whereas mutations were observed within other regions of the amplified gene. For some point mutations (Table 3), exactly the same ones or mutations at the same position but not accompanied by the same amino acid change, were observed by Kunkel and Herrler with their CU isolate, obtained from HCoV-OC43 passaged in MDCK cells, and their VA isolate from HCoV-OC43 passaged on Vero cells (39). These two clones were reported to have a less efficient ability to recognize 9-O-acetylated sialic acid, compared to the ATCC strain (39). However, specific amino acids involved were not identified (39). We conclude that these positions are predisposed to changes during cell passage on different cell lines.

The frequency of isolated mutations, found only in one out of three clones of the sequenced S1 gene, was between 2.1×10^{-4} and 8.6×10^{-4} for acute infections and 0 to 10.9×10^{-4} for persistent infections (data not shown). These isolated mutations were probably not representative of viral genomes but due to RT-PCR, since almost the same frequencies were observed in acute and persistent infections. Some point mutations were detected in two out of three sequenced clones from persistently infected cells, such as those at positions 1445 for H4 cells, 110 for U-87 MG cells, and 752 for MO3.13 cells (Table 3). These variations among the sequenced clones suggest that part of the viral genome population has mutated at these positions during persistent infection.

The amplified HCoV-OC43 N fragment (positions 215 to 520) was also sequenced. One point mutation, at position 401, was observed in all clones sequenced either from acutely or persistently infected cells (GGT to CGT [GGT→CGT], leading to an amino acid change from a glycine to an arginine), compared to the published sequenced (35). Thus, it must have been present in the input virus used and was not induced by our experiments.

DISCUSSION

Limited data (20) have been available concerning the susceptibility of human cell lines representative of nervous system cells to infection by HCoV-OC43. We have shown in the present study that cell lines representative of astrocytes (U-87 MG, U-373 MG and GL-15), oligodendrocytes (MO3.13), neurons (H4 and SK-N-SH) and microglia (CHME-5) were all susceptible to an acute HCoV-OC43 infection, as illustrated by the detection of viral antigen (Fig. 1) and the release of infectious virions (a summary of results is given in Table 2). Some astrocytic cell lines (U-87 MG and U-373 MG), as well as an oligodendrocytic cell line (MO3.13) and one neuronal cell line (H4), also sustained a persistent HCoV-OC43 infection.

These results can be compared with data from infections performed on primary cultures of human neural cells. We previously showed that fetal astrocytes as well as adult astrocytes were infectable by HCoV-OC43, with concomitant release of detectable infectious virions only from fetal astrocytes. Therefore, available data is consistent with the possibility that astrocytes are susceptible to HCoV-OC43 infection, given infection of such cells in primary cultures at either the fetal or adult stage (12) and the susceptibility of astrocytoma cells (20). Interestingly, the murine MHV-JHM strain was shown to infect astrocytes *in vivo* (77). Moreover, during the chronic pathology induced in infected mice, they were shown to represent the predominant cells expressing inflammatory cytokines such as interleukins 1 β and 6, as well as nitric oxide (76), that are probably involved in tissue damage, such as demyelination. Moreover, *in situ* hybridization combined with immunohistochemistry performed on brains from nonhuman primates infected intracerebrally showed that astrocytes are the target cells in white matter during an acute MHV-JHM infection (57). In addition, in asymptomatic MHV-JHM-infected mice, astrocytes apparently constitute a reservoir for persisting viruses (63). Thus, our current results combined with published work are consistent with a potential role for astrocytes in acute CNS infection with HCoV-OC43. These cells would also

presumably represent a potential HCoV-OC43 reservoir in the human CNS, as was shown for MHV in mice.

The CHME-5 cell line was only susceptible to an acute HCoV-OC43 infection. We previously reported that primary cultures of human microglia were susceptible to HCoV-OC43 infection (12). Adult human microglia are among the numerous cell types (others are oligodendrocytes, astrocytes, ependymal cells, perivascular macrophages and neurons) shown to be infected after intracranial MHV inoculation in mice (33). Microglia were susceptible to HCoV-OC43 infection, but our experiments with an immortalized cell line do not favor this cell type as a reservoir for virus during persistence in the CNS. Collins (18) has recently reported the susceptibility of human macrophages to an acute HCoV-OC43 infection. Since microglia and macrophages are closely related, her observations support our results.

Although we have previously shown that primary cultures of oligodendrocytes were not positive for viral antigen when infected with HCoV-OC43 (12), we now show that the MO3.13 oligodendrocytic cell line sustained acute and persistent infections by both HCoV-229E (4) and HCoV-OC43 (present study). Thus, more-extensive studies in primary cultures and on brain sections will be needed to confirm the potential susceptibility of myelin-synthesizing oligodendrocytes to HCoV infection. These studies are in progress.

For neuronal infection, we tested two different immortalized cell lines: SK-N-SH and H4. Both cell lines were susceptible to an acute infection as shown by detection of viral antigen and release of infectious virions. However, SK-N-SH cells did not sustain a persistent infection, while H4 cells did. Primary cultures of fetal neurons were previously shown to be negative for HCoV-OC43 (12). However, these cultures were in limited supply and multiple experiments could not be performed. Neurons are the site of coronavirus replication in mice (33) as well as the site of viral persistence in rats (71). Moreover, a HCoV-OC43 infection of primary cultures of mouse brain was shown to lead to production of infectious virus by neurons (60). Again, more work will be needed to better characterize potential neuronal susceptibility to HCoV infection. Moreover, with

the H4 cell line being from a neuroglioma (ganglioglioma) that consists of a mixture of cells of neuronal and glial origins, we cannot strongly conclude that neurons can be persistently infected by HCoV-OC43. Since, to our knowledge, no human neuronal cell lines from the CNS are available (neuroblastomas are from the peripheral nervous system), we have performed our experiments with the H4 cell line. More experiments should be performed when a CNS neuronal cell line becomes available, to validate the possibility that neurons could serve as a reservoir for HCoV-OC43.

Cell lines presenting lower percentages of infected cells during an acute infection (GL-15 and CHME-5) did not sustain a persistent infection (Table 2). These results suggest that a minimal percentage of acutely infected cells was necessary for establishment of a persistent HCoV-OC43 infection. Given the fact that astrocytes and neurons do not constitute completely homogeneous populations in the nervous system, the difference in susceptibility to acute and persistent infection by HCoV-OC43 could be explained by the different original neuronal or astrocytic cell that was immortalized, giving rise to the cell lines we have used. Additional experiments defining the exact phenotype of the cell lines would be necessary to fully explain the difference in susceptibility to HCoV-OC43 infections, such as number of viral receptors, secretion of viral inhibitors such as interferon, or induction of apoptosis in infected cells. The differences observed between immortalized and primary cells for neuronal and oligodendrocytic cell types could be due to different degrees of differentiation of the neural cells we have used as immortalized cell lines compared to primary cultures. Also, it is possible that the sensitivities of our assays were insufficient to detect a low level of infection by this virus. Nonetheless, we cannot rule out the possibility that the immortalized cell lines have acquired new properties, such as susceptibility to HCoV infections.

Different strains and variants of the same virus (MHV) demonstrate different neurotropic properties. MHV-4 infects mainly neurons (24) in intracerebrally inoculated mice; MHV-JHM is found mainly in oligodendrocytes of spinal cord and brain of the same animals (80), and MHV-A59 infects mostly

neurons and neural processes and terminals after an intranasal inoculation of mice (42). The genetic constitution of various viral strains and variants affects the neurotropism and the pathology observed, and these differences could appear during *in vivo* and *in vitro* infections (78, 79). Thus, it was important to look at genetic variations of HCoV in the context of human neurotropism, given the variety of results obtained with different MHV strains. Indeed, multiple point and deletion mutations within the N and S genes were reported to occur during a 42-day period postinfection in mice, suggesting a rapid evolution of viral genomic RNA (1, 66). Moreover, important molecular determinants of MHV pathogenesis are located within the S protein (47, 52). We looked at the S1 gene fragment since most of the mutations observed in MHV were concentrated within this fragment of the spike protein. The selection of virus variants with distinct fixed mutations and the evolution of more virulent phenotypes was shown to arise in cell lines persistently infected with MHV (16, 17, 30). The mutation frequencies and rates at which they appear were shown to vary at different genomic positions (17). However, no specific mutation was necessary for the establishment of *in vivo* persistence (66), even though a variety of mutations in the N and S genes was observed in mice, suggesting the development of quasispecies (66). On the other hand, during a persistent infection of rats by MHV, the S gene was reported to be stable, arguing in this case against the emergence of quasispecies (75). The generation of diverse genomic populations during a persistent infection could depend on host factors, explaining differences observed between mice and rats.

The error rate of retrovirus reverse transcriptase enzymes has been estimated at 10^{-4} on complex RNA template (69). The Expand high fidelity PCR system DNA polymerase (*Taq Pwo* DNA polymerases; Roche Diagnostics) we used has a calculated error rate of 8.5×10^{-6} . Since we performed 30 cycles, the total error rate of our RT-PCR could be estimated at 3.6×10^{-4} [$= 1 \times 10^{-4} + (8.5 \times 10^{-6} \times 30 \text{ cycles})$]. Variations between molecular clones of virus genome generated by RT-PCR should be greater than that expected from the error rate of reverse transcriptase and *Taq* (69) to be considered as mutations

representative of the viral population. However, when we added mutations found on two and three out of three molecular clones from persistently infected cells, these mutation rates were 2.5×10^{-3} to 3.4×10^{-3} for neural cells, corresponding to a 6.9- to 9.2-fold increase compared to the estimated error rate for RT-PCR. Substitutions present in more than one clone are likely to represent mutations actually present in the virus population (69). The mutations we observed in only one out of three clones (data not shown) were probably due to RT-PCR-induced errors since the rate of these variations was comparable to the error rate expected and these rates were not significantly different between acute and persistent infections. However, point mutations representative of the viral population were found within two or three clones sequenced in both directions. These point mutations would lead to amino acid changes as shown by the predicted sequence (Table 3). Mutations present in two out of three sequenced molecular clones suggest a variation within the viral population (Table 3) since not every viral genome has acquired these mutations. A larger sample of sequenced clones will be necessary for clearly evaluating the generation of viral quasispecies during a persistent HCoV-OC43 infection. Nonetheless, our results do favor the emergence of quasispecies during a persistent infection by HCoV-OC43 in neural cells, especially in the H4, U-87 MG, and MO3.13 cell lines. In these cells, at least one point mutation was observed in two out of three clones, meaning that the entire viral population did not mutate at this position (Table 3). The significance of the point mutations we observed is not yet established. We can speculate that they favor viral replication within these particular cell lines. Some mutations were prone to arise, since we observed them in many different cell lines and some were even observed after cell culture on different cell lines by another group (39).

Studies with other viruses have demonstrated that specific point mutations are critical for viral tropism and that the mutations arising are not necessarily numerous. For example, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), an RNA virus, exhibits minimal genetic drift during chronic infection in its natural host, the mouse. Moreover, a single point mutation in its genome was associated with an organ-specific selection (2). Such studies are still to come for

HCoV. The development of an in vitro model of persistent HCoV infection in neural cells will now allow us to explore mechanisms underlying acute and persistent CNS infections by HCoV. Kinetics of production of viral proteins and RNA, involvement of interferons, and the number of viral receptors on cells are all avenues that could now be investigated.

Numerous in vitro and in vivo experiments have proven the neurotropism of murine coronaviruses. However, a coronavirus infection does not necessarily yield severe pathological symptoms. Indeed, it was shown that MHV-JHM could persist and replicate within neurons and oligodendrocytes of rats without causing cell degeneration and death or eliciting an immunitaire attack (70). On the other hand, an MHV-JHM mutant was shown to establish reproducible persistent infections in mice and to induce progression from acute demyelinating disease to a chronic recurring form (37). MHV-JHM also establishes a persistent infection in the retina when injected by the intravitreal route, i.e. another immunologically-privileged site in the body, where viral RNA was detected by in situ hybridization up to 60 days postinfection (38). The neurotropism and persistence of HCoV remain to be explored in more depth. However, we predict from our results that several kinds of cells in the human CNS (astrocytes, oligodendrocytes, and some neurons) could presumably be used as a potential reservoir during a persistent HCoV-OC43 infection.

Other viruses have been identified as persisting viruses in human CNS. For example, Borna disease viruses cause CNS disease in several vertebrate species that is characterized by behavioral abnormalities. Recent studies suggest a potential role for these viruses in human mental health (31). Also, human immunodeficiency virus is known to induce dementia in AIDS patients, and JC virus, a polyomavirus, is associated with most cases of progressive multifocal leukoencephalopathy (3). Finally, persistent measles infection of the human brain is associated with subacute sclerosing panencephalitis and measles inclusion body encephalitis (45). A variety of pathological effects could be induced by persistent infections at this anatomical site, where the maintenance of intact neurons is primordial. The mechanisms by which

coronavirus RNA persists for long periods in the CNS are still unclear. Similarly, Sindbis virus was shown to persist in the mouse brain for a long period, in a nonproductive form (44). An endogenous reverse transcriptase that could generate cDNA transcripts from LCMV in a host-specific manner during an acute LCMV infection was reported. This cDNA was shown to persist long after the original acute infection had waned below detectable levels (36). Indeed, numerous unanswered questions have arisen with the increasing evidence of a persistent presence of viruses in various organs.

It is striking that coronavirus RNA was detected in both rodents and humans for long periods after primary infection (1, 4, 6, 55, 66). It is unlikely that all human brain tissues that tested positive for HCoV RNA in different laboratories (6, 55) were from humans infected by HCoV just prior to death. A low level of coronavirus antigens might be expressed in order to escape from immune surveillance during a persistent infection, since most often only viral RNA and neither infectious viruses nor viral antigens are detected for such long periods. Detailed *in situ* detection of HCoV in human brain sections would confirm the neurotropism observed *in vitro* with primary and immortalized cultures and provide clues for the outcome of the presence of HCoV in human CNS. These studies are in progress.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant MT-9203 from the Medical Research Council of Canada to P.J.T. who also gratefully acknowledges a senior scholarship award from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ). N.A. is grateful to the Institut Armand-Frappier as well as to the Multiple Sclerosis Society of Canada for studentship support.

We thank Francine Lambert for excellent technical assistance. We thank Julie Edwards for critically reviewing the manuscript.

REFERENCES

1. **Adami, C., J. Pooley, J. Glomb, E. Stecker, F. Fazal, J. O. Fleming, and S. C. Baker.** 1995. Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection: quasispecies nature of the persisting MHV RNA. *Virology* **209**:337-346.
2. **Ahmed, R., C. S. Hahn, T. Somasundaram, L. Villarete, M. Matloubian, and J. H. Strauss.** 1991. Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J. Virol.* **65**:4242-4247.
3. **Aksamit, A. R. Jr.** 1995. Progressive multifocal leukoencephalopathy: a review of the pathology and pathogenesis. *Microsc. Res. Tech.* **32**:302-311.
4. **Arbour, N., S. Ekandé, G. Côté, C. Lachance, F. Chagnon, M. Tardieu, N. R. Cashman, and P. J. Talbot.** 1998. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuronal cell lines by human coronavirus 229E. *J. Virol.* **73** In press.
5. **Arbour, N., and P. J. Talbot.** 1998. Persistent infection of neural cell lines by human coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**:575-581.
6. **Arbour, N., and P. J. Talbot.** Unpublished data.
7. **Barnett, E. M., and S. Perlman.** 1993. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology* **194**:185-191.
8. **Barthold, S. W., M. S. de Souza, and A. L. Smith.** 1990. Susceptibility of laboratory mice to intranasal and contact infection with coronaviruses of other species. *Lab. Anim. Sci.* **40**:481-485.
9. **Barthold, S. W., and A. L. Smith.** 1992. Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice. *Arch. Virol.* **122**:35-44.
10. **Bergmann, C. C., Q. Yao, M. Lin, and S. A. Stohlmeyer.** 1996. The JHM stain of mouse hepatitis virus induces a spike protein-specific D^b-restricted cytotoxic T cell response. *J. Gen. Virol.* **77**:315-325.

11. **Bocchini, V., R. Casalone, P. Collini, G. Rebel and F. Lo Curto.** 1991. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res.* **265**:73-81.
12. **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.
13. **Buchmeier, M. J., R. G. Dalziel, M. J. M. Koolen, and P. W. Lampert.** 1987. Molecular determinants of CNS virulence of the coronavirus mouse hepatitis virus-4. P. 409-422. *In* M.A. Brinton and R.R. Rueckert (eds.) Positive Strand RNA viruses, Alan R. Liss Inc. New York, N.Y.
14. **Cabirac, G. F., K. F. Soike, J.-Y. Zhang, K. Hoel, C. Butunoi, G.-Y. Cai, S. Johnson, and R. S. Murray.** 1994. Entry of coronavirus into primate CNS following peripheral infection. *Microb. Pathog.* **16**:349-357.
15. **Castro, R. F., and S. Perlman.** 1995. CD8+ T-cell epitopes within the surface glycoprotein of a neurotropic coronavirus and correlation with pathogenicity. *J. Virol.* **69**:8127-8131.
16. **Chen, W., and R. S. Baric.** 1996. Molecular anatomy of mouse hepatitis virus persistence: coevolution of increased host cell resistance and virus virulence. *J. Virol.* **70**:3947-60.
17. **Chen, W., and R. S. Baric.** 1995. Function of a 5'-end genomic RNA mutation that evolves during persistent mouse hepatitis virus infection in vitro. *J. Virol.* **69**:7529-7540.
18. **Collins, A. R.** 1998. Human macrophages are susceptible to coronavirus OC43. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**:635-639.
19. **Collins, A. R., R. L. Knobler, H. Powell, and M. J. Buchmeier.** 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* **119**:358-371.

20. **Collins, A. R., and O. Sorensen.** 1986. Regulation of viral persistence in human glioblastoma and rhabdosarcoma cells infected with coronavirus OC43. *Microb. Pathog.* **1**:573-582.
21. **Daniel, C., R. Anderson, M. J. Buchmeier, J. O. Fleming, W J. M. Spaan, H. Wege, and P. J. Talbot.** 1993. Identification of an immunodominant linear neutralization domain of the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein and evidence that it forms part of a complex tridimensional structure. *J. Virol.* **67**:1185-1194.
22. **Dveksler, G. S., M. N. Pensiero, C. B. Cardellicchio, R. K. Williams, G. S. Jiang, K. V. Holmes, and C. W. Dieffenbach.** 1991. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* **65**:6881-6891.
23. **Ercolani, L., B. Florence, M. Denaro, and M. Alexander.** 1988. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **263**:15335-15341.
24. **Fazakerley, J. K., S. E. Parker, F. Bloom, and M. J. Buchmeier.** 1992. The V5A13.1 envelope glycoprotein deletion mutant of mouse hepatitis virus type-4 is neuroattenuated by its reduced rate of spread in the central nervous system. *Virology* **187**:178-188.
25. **Fazzini, E., J. Fleming, and S. Fahn.** 1992. Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **7**:153-158.
26. **Fleming, J. O., J. J. Houtman, H. Alaca, H. C. Hinze, D. McKenzie, J. Aiken, T. Bleasdale, and S. Baker.** 1994. Persistence of viral RNA in the central nervous system of mice inoculated with MHV-4. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**:327-332.
27. **Fleming, J. O., M. D. Trousdale, J. Bradbury, S. A. Stohlman, and L. P. Weiner.** 1987. Experimental demyelination induced by coronavirus JHM (MHV-4): molecular identification of a viral determinant of paralytic disease. *Microb. Pathog.* **3**:9-20.

28. **Flintoff, W. F., and S. Van Dinter.** 1989. Several rat cell lines share a common defect in their inability to internalize murine coronaviruses efficiently. *J. Gen. Virol.* **70**:1713-1724.
29. **Gallagher, T. M., S. E. Parker, and M. J. Buchmeier.** 1990. Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. *J. Virol.* **64**:731-741.
30. **Gombold, J. L., S. T. Hingley, and S. R. Weiss.** 1993. Fusion-defective mutants of mouse hepatitis virus A59 contain a mutation in the spike protein cleavage signal. *J. Virol.* **67**:4504-4512.
31. **Gonzalez-Dunia, D., C. Sauder, and J. C. de la Torre.** 1997. Borna disease virus and the brain. *Brain Res. Bull.* **44**:647-664.
32. **Hamre, D., and J. J. Procknow.** 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**:190-193.
33. **Houtman, J. J., and J. O. Fleming.** 1996. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J. Neurovirol.* **2**:361-376.
34. **Janabi, N., S. Peudenier, B. Héron, K. H. Ng, and M. Tardieu.** 1995. Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglia cells with the SV40 large T antigen. *Neurosci. Lett.* **195**:105-108.
35. **Kamahora, T., L. H. Soe, and M. M. C. Lai.** 1989. Sequence analysis of nucleocapsid gene and leader RNA of human coronavirus OC43. *Virus Res.* **12**:1-9.
36. **Klenerman, P., Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 1997. A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature* **390**:298-301.
37. **Knobler, R. L., P. W. Lampert, and M. B. A. Oldstone.** 1982. Virus persistence and recurring demyelination produced by a temperature-sensitive mutant of MHV-4. *Nature* **298**:279-280.
38. **Komurasaki, Y., C. N. Nagineni, Y. Wang, and J. J. Hooks.** 1996. Virus RNA persists within the retina in coronavirus-induced retinopathy. *Virology* **222**:446-450.

39. **Künkel, F., and G. Herrler.** 1996. Structural and functional analysis of the S proteins of two human coronavirus OC43 strains adapted to grow in different cells. *Arch. Virol.* **141**:1123-1131.
40. **Künkel, F., and G. Herrler.** 1993. Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* **195**:195-202.
41. **Lai, M. M. C., and D. Cavanagh.** 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **48**:1-100.
42. **Lavi, E., P. S. Fishman, P. S. Highkin, and S. R. Weiss.** 1988. Limbic encephalitis after inhalation of a murine coronavirus. *Lab. Investig.* **58**:31-36.
43. **Lavi, E., D. H. Gilden, M. K. Highkin, and S. R. Weiss.** 1984. Persistence of mouse hepatitis virus A59 RNA in a slow virus demyelinating infection in mice as detected by in situ hybridization. *J. Virol.* **51**:563-566.
44. **Levine, B., and D. E. Griffin.** 1992. Persistence of viral RNA in mouse brains after recovery from acute alphavirus encephalitis. *J. Virol.* **66**:6429-6435.
45. **Liebert, U. G.** 1997. Measles virus infections of the central nervous system. *Intervirology* **40**:176-184.
46. **Lucas, A., M. Coulter, R. Anderson, S. Dales, and W. Flintoff.** 1978. In vivo and in vitro models of demyelinating diseases II. Persistence and host-regulated thermosensitivity in cells of neural derivation infected with mouse hepatitis and measles viruses. *Virology* **88**:325-337.
47. **Makino, S., J. O. Fleming, J. G. Keck, S. A. Stohlman, and M. M. C. Lai.** 1987. RNA recombination of coronaviruses: localization of neutralizing epitopes and neuropathogenic determinants on the carboxyl terminus of peplomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:6567-6571.
48. **Massa, P. T., H. Wege, and V. ter Meulen.** 1988. Growth pattern of various JHM coronavirus isolates in primary rat glial cell cultures correlates with differing neurotropism in vivo. *Virus Res.* **9**:133-144.

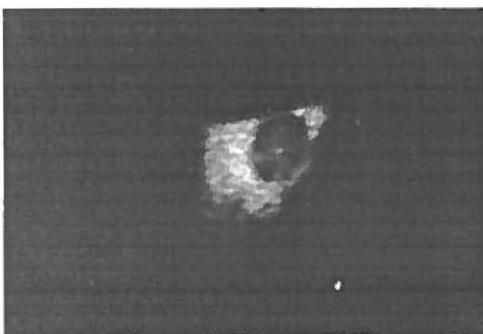
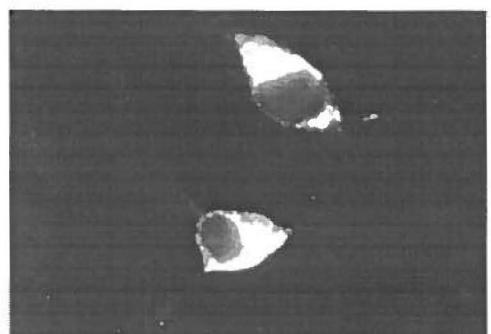
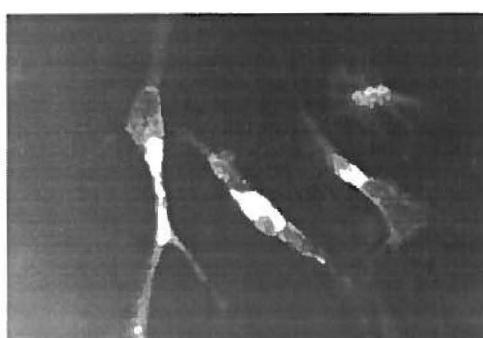
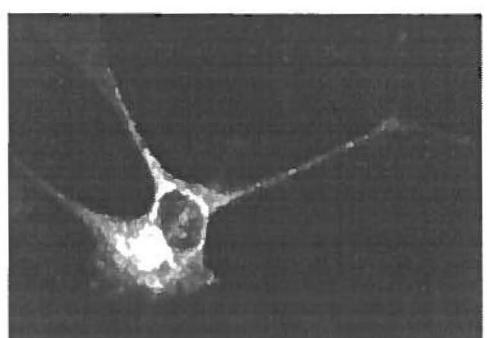
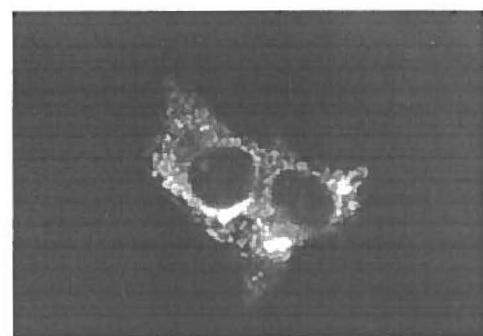
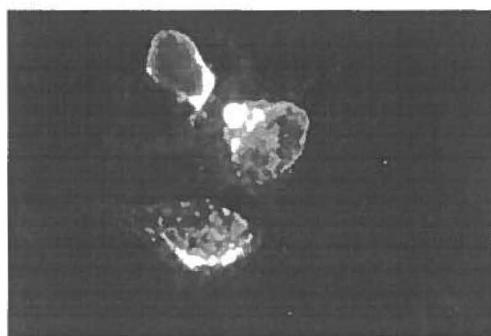
49. **McIntosh, K., W. B. Becker, and R. M. Chanock.** 1967. Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **58**:2268-73.
50. **McIntosh, K., J. McQuillin, S. E. Reed, and P. S. Gardner.** 1978. Diagnosis of human coronavirus infection by immunofluorescence: method and application to respiratory disease in hospitalized children. J. Med. Virol. **2**:341-346.
51. **McLaurin, J., G. C. Trudel, I. T. Shaw, J. P. Antel, and N. R. Cashman.** 1995. A human glial hybrid cell line differentially expressing genes subserving oligodendrocyte and astrocyte phenotype. J. Neurobiol. **26**:283-293.
52. **Morris, V. L., C. Tieszer, J. Mackinnon, and D. Percy.** 1989. Characterization of coronavirus JHM variants isolated from Wistar Furth rats with a viral-induced demyelinating disease. Virology **169**:127-136.
53. **Mounir, S., and P. J. Talbot.** 1993. Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. J. Gen. Virol. **74**:1981-1987.
54. **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.
55. **Murray, R. S., B. Brown, D. Brian, and G. F. Cabirac.** 1992. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. Ann. Neurol. **31**:525-533.
56. **Murray, R. S., G. Y. Cai, K. Hoel, J.- Y. Zhang, K. F. Soike, and G. F. Cabirac.** 1992. Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system. Virology **188**:274-284.
57. **Murray, R. S., G .Y. Cai, K. F. Soike, and G. F .Cabirac.** 1997. Further observations on coronavirus infection of primate CNS. J. Neurovirol. **3**:71-75.
58. **Myint, S. H.** 1994. Human coronaviruses-a brief review. Rev. Med. Virol. **4**:35-46.

59. **Okumura, A., K. Machii, S. Azuma, Y. Toyoda, and S. Kyuwa.** 1996. Maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells persistently infected with murine coronavirus. *J. Virol.* **70**:4146-4149.
60. **Pearson, J., and C. A. Mims.** 1985. Differential susceptibility of cultured neural cells to the human coronavirus OC43. *J. Virol.* **53**:1016-1019.
61. **Perlman, S., G. Evans, and A. Afifi.** 1990. Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. *J. Exp. Med.* **172**:1127-1132.
62. **Perlman, S., G. Jacobsen, and A. Afifi.** 1989. Spread of a neurotropic murine coronavirus into the CNS via the trigeminal and olfactory nerves. *Virology* **170**:556-560.
63. **Perlman, S., and D. Ries.** 1987. The astrocyte is a target cell in mice persistently infected with mouse hepatitis virus, strain JHM. *Microb. Pathog.* **3**:309-314.
64. **Resta, S., J. P. Luby, C. R. Rosenfeld, and J. D. Siegel.** 1985. Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science* **229**:978-981.
65. **Riski, H., and T. Hovi.** 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. *J. Med. Virol.* **6**:259-265.
66. **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.
67. **Salmi, A., B. Ziola, T. Hovi, and M. Reunanan.** 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* **32**:292-295.
68. **Sizun, J., N. Arbour, and P. J. Talbot.** 1998. Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronaviruses 229E and OC43 in cell culture. *J. Virol. Methods*. **72**:145-152.

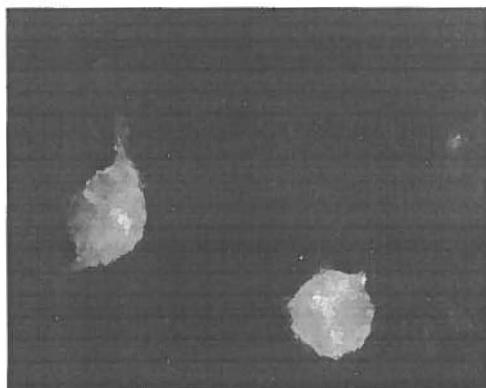
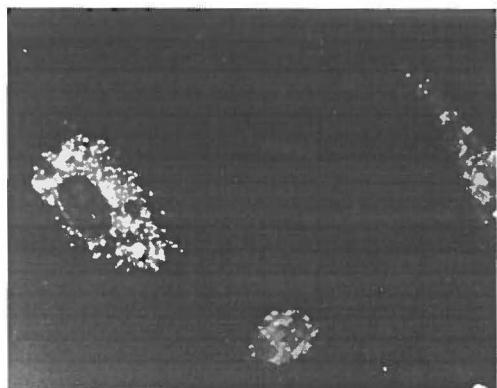
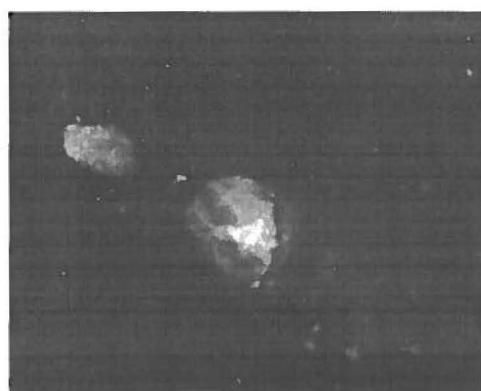
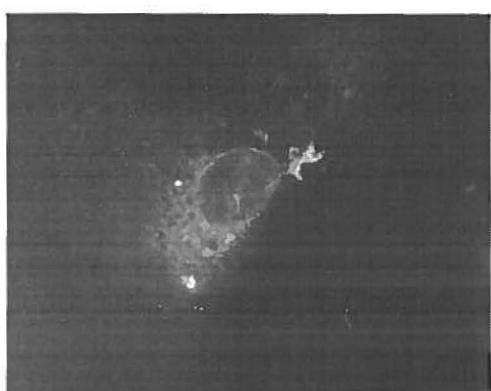
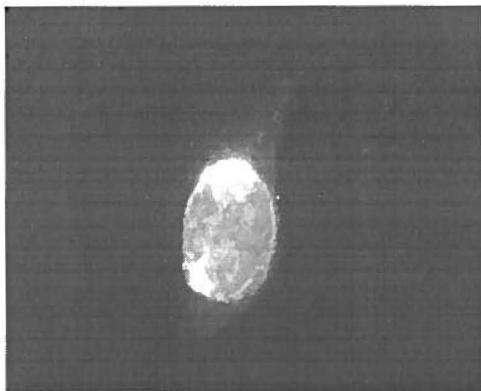
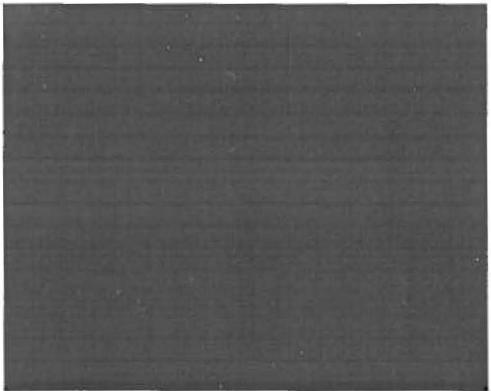
69. **Smith, D. B., J. McAllister, C. Casino, and P. Simmonds.** 1997. Virus 'quasispecies': making a mountain out of a molehill? *J. Gen. Virol.* **78**:1511-1519.
70. **Sorensen, O., M. B. Coulter-Mackie, S. Puchalski, and S. Dales.** 1984. In vivo and in vitro models of demyelinating disease. IX. Progression of JHM virus infection in the central nervous system of the rat during overt and asymptomatic phases. *Virology* **137**:347-357.
71. **Sorensen, O., and S. Dales.** 1985. In vivo and in vitro models of demyelinating disease: JHM virus in the rat central nervous system localized by in situ cDNA hybridization and immunofluorescent microscopy. *J. Virol.* **56**:434-438.
72. **Sorensen, O., R. Dugré, D. Percy, and S. Dales.** 1982. In vivo and in vitro models of demyelinating disease: endogenous factors influencing demyelinating disease caused by mouse hepatitis virus in rats and mice. *Infect. Immun.* **37**:1248-1260.
73. **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.
74. **Stohlman, S. A., and L. P. Weiner.** 1978. Stability of neurotropic mouse hepatitis virus (JHM strain) during chronic infection of neuroblastoma cells. *Arch. Virol.* **57**:53-61.
75. **Stühler, A., E. Flory, H. Wege, H. Lassmann, and H. Wege.** 1997. No evidence for quasispecies populations during persistence of the coronavirus mouse hepatitis virus JHM: sequence conservation within the surface glycoprotein S in Lewis rats. *J. Gen. Virol.* **78**:747-756.
76. **Sun, N., D. Grzybicki, R. F. Castro, S. Murphy, and S. Perlman.** 1995. Activation of astrocytes in the spinal cord of mice chronically infected with a neurotropic coronavirus. *Virology* **213**:482-493.
77. **Sun, N., and S. Perlman.** 1995. Spread of a neurotropic coronavirus to spinal cord white matter via neurons and astrocytes. *J. Virol.* **69**:633-641.

78. **Taguchi, F., P. T. Massa, and V. ter Meulen.** 1986. Characterization of a variant virus isolated from neural cell culture after infection of mouse coronavirus JHMV. *Virology* **155**:267-270.
79. **Taguchi, F., S. G. Siddell, H. Wege, and V. ter Meulen.** 1985. Characterization of a variant virus selected in rat brains after infection by coronavirus mouse hepatitis virus JHM. *J. Virol.* **54**:429-435.
80. **Takahashi, K., N. Goto, T. Ishida, K. Katami, and K. Fujiwara.** 1981. Acute demyelination in mice inoculated intraspinally with mouse hepatitis virus, JHM strain. *Jpn. J. Exp. Med.* **51**:323-330.
81. **Talbot, P. J., A. A. Salmi, R. L. Knobler, and M. J. Buchmeier.** 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. *Virology* **131**:250-260.
82. **Tardieu, M., O. Boespflug, and T. Barbé.** 1986. Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells. *J. Virol.* **60**:574-582.
83. **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.
84. **Wege H.** 1995. Immunopathological aspects of coronavirus infections. *Spinger Sem. Immunopathol.* **17**:133-148.
85. **Wege, H., J. Winter, and R. Meyermann.** 1988. The peplomer protein E2 of coronavirus JHM as a determinant of neurovirulence: definition of critical epitopes by variant analysis. *J. Gen. Virol.* **69**:87-98.
86. **Yokomori, K., and M. M. C. Lai.** 1992. Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *J. Virol.* **66**:6194-6199.

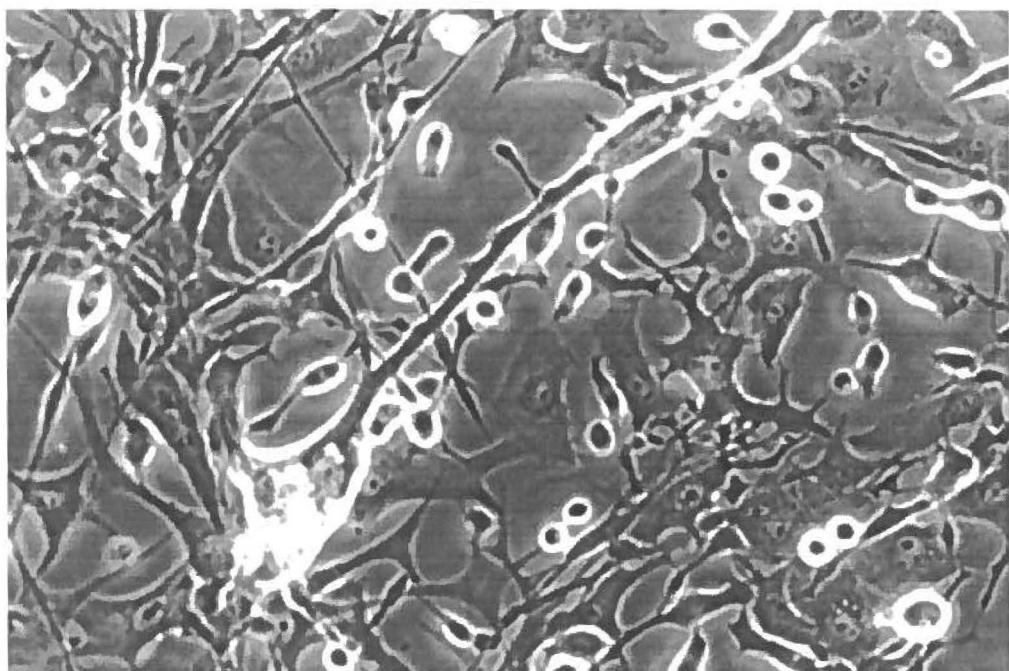
ARTICLE I FIGURE 1: Detection of HCoV antigens by indirect immunofluorescence on cells acutely infected by HCoV-OC43, using virus-specific MAb (1.10C.3). (A):H4 cells (B) SK-N-SH cells (C) U-373 MG cells (D) U-87 MG cells (E) GL-15 cells (F) MO3.13 cells (G) CHME-5 cells (H) HRT-18 cells.

A**B****C****D****E****F****G****H**

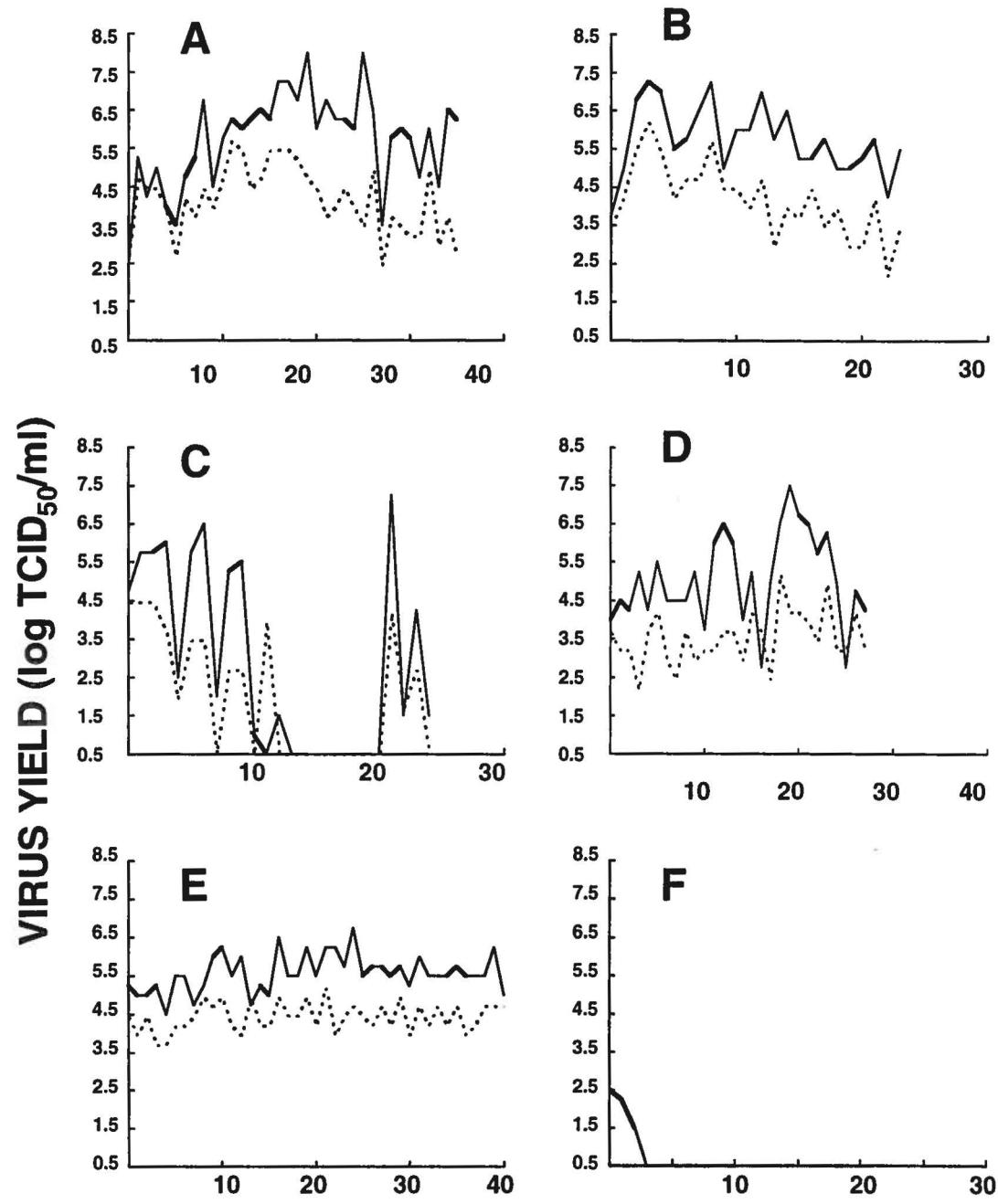
ARTICLE I FIGURE 2: Detection of HCoV antigens by indirect immunofluorescence on cells persistently infected by HCoV-OC43, using virus-specific MAb (1.10C.3). (A) H4 cells, passage 40 (B) MO3.13 cells, passage 21 (C) U-373 MG cells, passage 22 (D) U-87 MG cells, passage 24 (E) HRT-18 cells, passage 40 (F) isotypic control MAb (5-11H.6) on virus-infected U-373 MG cells.

A**B****C****D****E****F**

ARTICLE I FIGURE 3: Cytopathic effects of a persistent HCoV-OC43 infection on MO3.13 cells. (A) non-infected cells (B) HCoV-OC43-infected MO3.13 cells, passage 5.

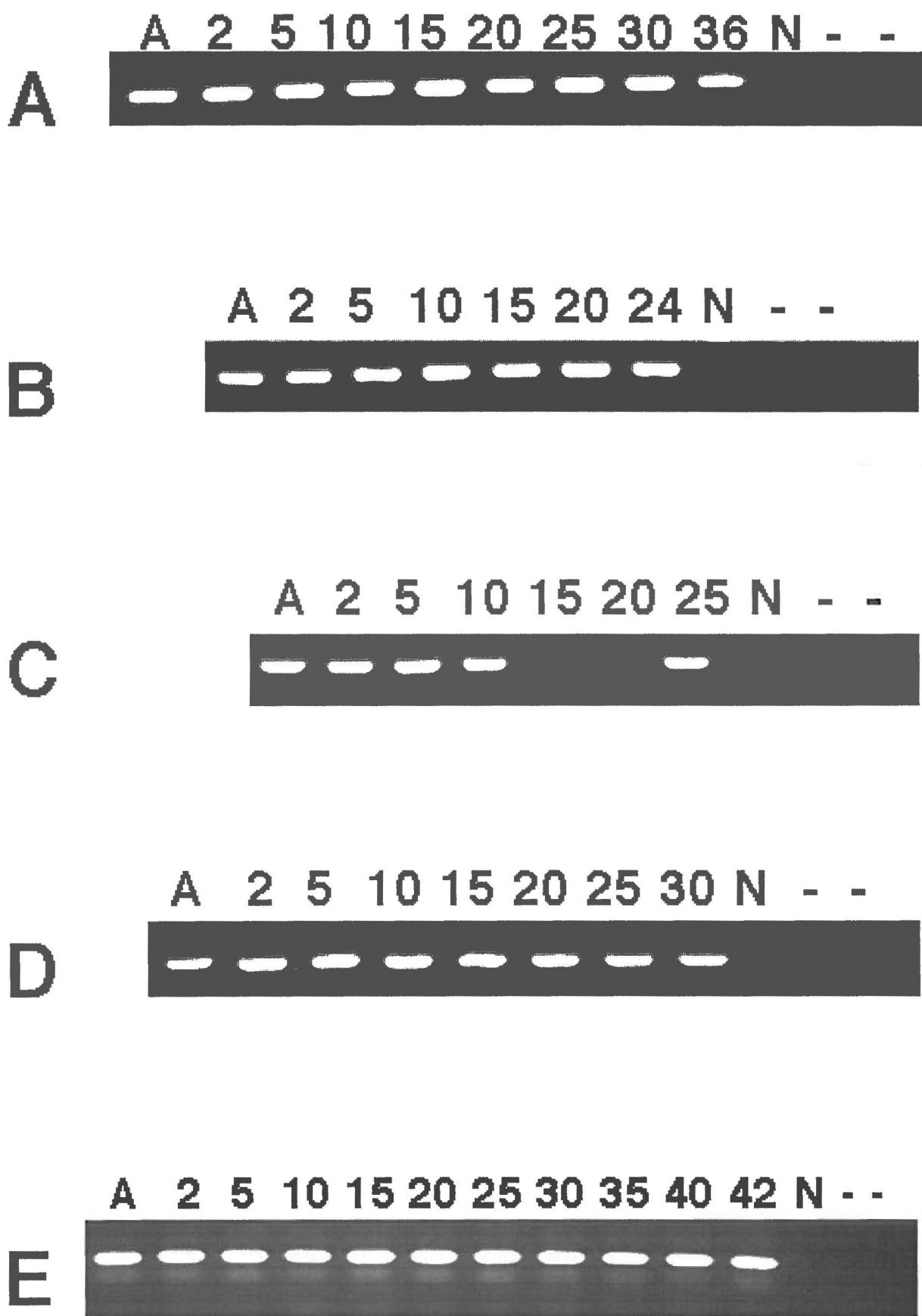
A**B**

ARTICLE I FIGURE 4: Yield of infectious virions from persistent HCoV-OC43 infections of various neural cell lines. (A) H4 cells (B) MO3.13 cells (C) U-373 MG cells (D) U-87 MG cells (E) HRT-18 cells (F) SK-N-SH cells. Solid lines, supernatant (extracellular virus); dotted lines cell lysate (intracellular virus).



CELL PASSAGE

ARTICLE I FIGURE 5: Detection of the N protein gene by RT-PCR during persistent HCoV-OC43 infection of various cell lines. One tenth of the PCR amplicon obtained was loaded onto a 1.5% (wt/vol) agarose gel for electrophoretic separation. (A) H4 cells (B) MO3.13 cells (C) U-373 MG cells (D) U-87 MG cells (E) HRT-18 cells. N, noninfected cells; A, acutely infected cells; -: negative control for reverse transcriptase and for PCR. numbers, cell passage at which RNA was extracted.



ARTICLE I Table 1: RT-PCR and Sequencing primers

RNA amplified or sequenced	Primers	Primer Designation	Nucleotides
RT-PCR HCoV-OC43 N protein	5'- CCCAAGCAAATGCTACCTCTCAG -3' 5'- GTAGACTCCGTCAATATCGGTGCC -3'	O1 sense O3 antisense	215-238 ¹ 497-520 ¹
RT-PCR HCoV-OC43 S1 gene portion	5'- TCTGCCAAGAGTCTTGCTCG -3' 5'- AGCATAGCAGCTGTTGACGG -3'	OC43-S1PH – sense OC43 S1PI antisense	54-74 ² 2081-2100 ²
RT-PCR GAPDH	5'- GTGAAGGTCGGAGTCAACG -3' 5'- CACCTGGTGCTCAGTGTAGC -3'	GAPDH-H sense GAPDH-I antisense	10-68 ³ 824-843 ³
Sequencing S1 gene portion	5'- ATAATATGTGCGAGTACCCAC -3' 5'- GATAAGTCGGTGCCCTCTC -3' 5'- CTTGTGATAATTGTGCACTCC -3' 5'- CGAACAGTGCTCACCTATGC -3' 5'- GACTGCAAATAGCCCAAATTACC -3' 5'- TACCATCTTGATTGAAAGCGAG -3' 5'- GTGTTGAATTGATTGTACGTGG -3'	S-OC43-A sense S-OC43-B sense S-OC43-C sense S-OC43-E antisense S-OC43-F antisense S-OC43-G antisense S-OC43-H antisense	528-539 ² 1058-1076 ² 1593-1614 ² 1671-1690 ² 1265-1287 ² 857-878 ² 455-477 ²

¹ references 35, 73

² reference 53

³ reference 23

ARTICLE I Table 2: Susceptibility of neural cell lines to acute and persistent infection by HCoV-OC43

Cell line		Infection ¹	
Line designation	Phenotype	Acute	Persistent
U-87 MG	Astrocytoma	2+	2+
U-373 MG	Astrocytoma (grade III)	2+	2+
GL-15	Astrocytic (glioblastoma multiforme, positive for glial fibrillary acidic protein marker)	1+	-
MO3.13	Oligodendrocytic (adult oligodendrocyte fused with a rhabdosarcoma)	2+	3+
CHME-5	Microglial (fetal microglia transfected with large T antigen of simian virus 40)	1+	-
H4	Neuroglial (ganglioglioma)	2+	2+
SK-N-SH	Neuroblastoma	2+	-

¹ Results obtained from an indirect immunofluorescence assay and an infectious-virus titer assay. -: non-infectable or no persistence after fifth passage; 1+, < 10% of cells infected; 2+, between 10 and 50% of cells infected; 3+, > 50% of cells infected.

ARTICLE I Table 3: Characterization of sequence changes in S1 during persistent HCV-OC43 infection

Cell line	Infection	Point mutation ¹	Codon change	Amino acid change
HRT-18, H4, U-87 MG, U-373 MG and MO3.13	Acute and persistent All clones	894-895 ² 949 ² 2025 ²	GAA -> GTT GCG -> GCA ATA -> ACA	E -> V No change I -> T
HRT-18	Persistent P42	279 ³ 1496 1740 ^{3,6}	AGT -> ACT AAT -> CAT CGA -> CAA	S -> T N -> H R -> Q
H4 ⁷	Persistent P36	102 ⁵ 134 ³ 579 ² 752 1445 ^{3,6}	GAT -> GCT CCT -> TCT CAT -> CGT TAT -> CAT CTT -> TTT	D -> A P -> S H -> R Y -> H L -> F
U-87 MG	Persistent P28	102 ³ 110 ⁶ 279 ³ 579 ³ 773 ⁴	GAT -> GTT AAT -> TAT AGT -> ACT CAT -> CGT CAC -> TAC	D -> V N -> Y S -> T H -> R H -> Y
U-373 MG	Persistent P25	102 ³ 279 ³ 579 ³ 752	GAT -> GTT AGT -> ACT CAT -> CGT TAT -> CAT	D -> V S -> T H -> R Y -> H
MO3.13	Persistent P24	474 ⁵ 579 ³ 752 ⁶ 1488 1496 1811 2079	ACA -> ATA CAT -> CGT TAT -> CAT GCT -> GTT AAT -> CAT TTT -> ATT TTT -> TAT	T -> I H -> R Y -> H A -> V N -> H F -> I F -> Y

¹ reference 53² reference 40³ reference 39; isolates CU and VA⁴ reference 39; isolate VA⁵ reference 39; isolates CU and VA (a point mutation at the same position but for a different amino acid)⁶ Point mutation observed in two out of three sequenced clones⁷ H4 cell line demonstrated an in-frame deletion of 15 nucleotides (471-485) leading to a 5-amino-acid deletion

Résumé article II

Des publications antérieures suggèrent que les HCoV, agents causaux de rhumes humains, puissent être neurotropes chez l'humain, comme cela a été observé chez d'autres mammifères. Le but à long terme de notre laboratoire consiste à apporter des preuves expérimentales du neurotropisme des HCoV et de l'établissement d'infections persistantes au SNC. Pour atteindre cet objectif, nous avons évalué la susceptibilité de plusieurs lignées neurales humaines à l'infection par le HCoV-229E. Nous avons suivi la production d'antigènes vitaux, d'ARN viral et de virions infectieux durant des infections aiguës et persistantes par ce virus. Les astrocytomes U-87MG, U-373 MG et GL-15, le neuroblastome SK-N-SH, le neurogliome H4, et la lignée d'oligodendrocytes MO3.13 ont tous été susceptibles à une infection aiguë par le HCoV-229E. La lignée de microglies foetales, CHME-5 n'a pas été susceptible à une telle infection. Parmi toutes les lignées testées, seules les lignées H4 et MO3.13 ont démontré une susceptibilité à une infection persistante par le HCoV-229E. Pour ces lignées, nous avons mesuré la production d'antigènes et d'ARN vitaux ainsi que la production de virions infectieux. Nous avons séquencé la région N-terminale du gène S à partir de l'ARN de cellules infectées, obtenu après les 130 jours de culture, et l'avons comparée à la séquence du virus de départ. Nous avons observé des mutations ponctuelles, qui mèneraient à des changements en acides aminés, apparues au cours de l'infection dans la lignée MO3.13. Aucune mutation n'a été observée pour l'infection persistante dans la lignée H4. L'infection persistante *in vitro* n'a pas généré de changements importants dans la portion S1 de la protéine des spicules. Cette région génomique a toutefois démontré des domaines hypervariables chez les coronavirus murins. Ces résultats suggèrent que le HCoV-229E peut persister dans des cellules du système nerveux humain, particulièrement dans les oligodendrocytes et possiblement des neurones.

ARTICLE II**PERSISTENT INFECTION OF HUMAN OLIGODENDROCYTIC AND
NEUROGLIAL CELL LINES BY HUMAN CORONAVIRUS 229E**

Nathalie Arbour¹, Sophie Ekandé¹, Geneviève Côté¹, Claude Lachance¹, Fanny Chagnon¹, Marc Tardieu², Neil R. Cashman³, and Pierre J. Talbot^{1*}

¹ Laboratory of neuroimmunovirology, Human Health Research Center,
Armand-Frappier Institute, INRS, University of Quebec, Laval, Québec,
Canada H7V 1B7.

² Laboratoire de neurovirologie, Université Paris XI, Kremlin Bicêtre, France

³ Neuroimmunology Unit, Montreal Neurological Institute, McGill University,
Montréal, Québec, Canada H3A 2B4

ABSTRACT

Human coronaviruses (HCoV) cause common colds. Previous reports suggest that these infectious agents may be neurotropic in humans, as they are for some mammals. With the long-term aim of providing experimental evidence for the neurotropism of HCoV and the establishment of persistent infections in the nervous system, we have evaluated the susceptibility of various human neural cell lines to acute and persistent infection by HCoV-229E. Viral antigen, infectious virus progeny and viral RNA were monitored during both acute and persistent infections. The astrocytoma cell lines U-87 MG, U-373 MG, and GL-15, as well as neuroblastoma SK-N-SH, neuroglioma H4, and oligodendocytic MO3.13 cell lines, were all susceptible to an acute infection by HCoV-229E. The CHME-5 immortalized fetal microglial cell line was not susceptible to infection by this virus. The MO3.13 and H4 cell lines also sustained a persistent viral infection, as monitored by detection of viral antigen and infectious virus progeny. Sequencing of the S1 gene from viral RNA after ~130 days of infection showed two point mutations, suggesting amino acid changes during persistent infection of MO3.13 cells but none for H4 cells. Thus, persistent *in vitro* infection did not generate important changes in the S1 portion of the viral spike protein, which was shown for murine coronaviruses to bear hypervariable domains and to interact with cellular receptor. These results are consistent with the potential persistence of HCoV-229E in cells of the human nervous system, such as oligodendrocytes and possibly neurons, and the virus's apparent genomic stability.

INTRODUCTION

Coronaviruses are large enveloped positive-stranded RNA viruses. Human coronaviruses (HCoV) are responsible for up to one-third of common colds (49). Other pathologies have occasionally been associated with HCoV, such as pneumonia, meningitis, and diarrhea (57). Two viral serotypes are known in humans. They are designated OC43 and 229E. Even though HCoV-229E was first isolated as a pathogen of the respiratory tract (28), increasing evidence from humans and experiments with other coronaviruses in animal models suggest its neurotropic potential.

Murine hepatitis virus (MHV), a naturally occurring murine coronavirus, gives rise in mice and rats to clinical manifestations resembling multiple sclerosis (MS) in humans. For this reason, it has been studied as an animal model of a virus-induced demyelinating disease of the central nervous system (CNS) (10, 80). The CNS of nonhuman primates is also susceptible to coronavirus infection: a murine virus-like isolate causes a subacute panencephalitis and demyelination (47). Neurotropic strains of MHV enter the brain via the olfactory nerve (4, 37) and then spread within the mouse CNS (53). A similar route might be used by HCoV-229E since it also infects the respiratory tract. Given the fact that this virus can infect human macrophages (51) and human brain endothelial cells (11), HCoV-229E could also use other routes for spreading to the CNS, such as the hematogenous and lymphatic systems, as was shown for MHV in mice (5) and nonhuman primates (12). Neurons, astrocytes and oligodendrocytes are the target CNS cells for MHV (29). Moreover, we have shown that the 229E prototype strain of HCoV has the capacity to infect human astrocytes and microglia in primary cultures (9). In general, in vitro observations of coronavirus infections corroborate the ones occurring in vivo. For example, Massa and collaborators (43) showed that three MHV-JHM variants, which induce very different pathological patterns in vivo, demonstrated distinct in vitro growth properties in primary cultures of rat glial cells that correlated with the in vivo observations. Moreover, MHV-3 induces an initial ependymitis, meningitis, and encephalitis in animals and has an in vitro

affinity for target cells compatible with this clinical outcome: viral growth in neurons, ependymal cells, and meningeal cells, but not astrocytes and oligodendrocytes (78). Therefore, it is reasonable to assume that the characterization of HCoV replication in vitro will provide valuable data regarding its neurotropic properties, given that *in vivo* experiments could obviously not be performed in humans.

Suggestions of HCoV-229E neurotropism do arise from observations in humans. We recently detected a HCoV-229E receptor (CD13) on human neural cell lines (oligodendrocytes, neurons, and astrocytes) and its presence correlated with virus binding and susceptibility of these cells to infection by HCoV-229E (34). Intrathecal anti-HCoV-229E antibody synthesis was detected in humans, particularly in MS patients (59), suggesting a CNS infection. Moreover, we have repeatedly detected HCoV-229E RNA in human brains from different age groups provided by various brain banks (3, 66). These observations suggest a persistent infection by HCoV-229E in human CNS since it is very unlikely that these humans were all acutely infected just before their death. However, more-extensive studies are needed in order to prove and characterize the persistence of HCoV-229E in human CNS. In the rodent model, MHV RNA can be detected in the brain for a long time after the initial infection (24, 29). This virus is able to persist in the CNS of its host (63) especially in astrocytes, oligodendrocytes (54, 69), or neurons (64) and in various neural cell lines in vitro (40, 67). Viral persistence observed in the CNS may play a role in chronic pathologies observed following a coronavirus infection (39). However, no specific pathology has been clearly associated with the presence of HCoV-229E in the CNS. Nonetheless, we have observed a preferential presence of T lymphocytes cross-reactive with both HCoV-229E and myelin basic protein in the peripheral blood of MS patients compared to that in controls (77).

The route and dose of infection, and host factors such as age, species, strain and immune system status as well as the genetic constitution of the virus influence the outcome of an MHV infection in the CNS (38, 65, 79). Similar results might be expected for HCoV-229E. Coronaviruses possess four

structural proteins: spike (S), membrane (M), small membrane (E, formerly sM), and nucleocapsid (N) (35). Among coronavirus structural proteins that might influence the outcome of the infection, the S glycoprotein is particularly interesting. It influences MHV pathogenesis via its multiple biological activities such as receptor ligation (20, 83), mediation of fusion (17), neutralizing antibody domains (17, 18, 75, 81) and cytotoxic-T-lymphocyte epitope domains (7, 13). Vaccination with the S protein (19) or even only peptides of it (74) protected mice from a lethal intracerebral infection by MHV-A59. Moreover, important determinants of neurovirulence reside in regions of the S glycoprotein of MHV (10, 23). In vitro passaging of MHV-4 in cell culture generates heterogeneity in the structure of the S glycoprotein (26). During persistent *in vivo* CNS infection in mice, multiple point and deletion mutations were shown to arise, mainly concentrated within the S and the N genes (1, 58). Studies regarding the importance of the S glycoprotein for the biology of HCoV-229E, such as the analysis of mutations arising in passaging viruses or during persistent infection, have so far not been reported. However, a study did suggest the existence of serological variants of this virus (56).

Various neural cell lines were shown to be susceptible to infection by MHV (25). However, very limited results (76) concerning the susceptibility to HCoV-229E infection of human immortalized cell lines representative of nervous system cells, which could serve as invaluable *in vitro* models are available. We have shown previously that primary cultures of human brain cells can be infected by HCoV-229E (9). In the present study, we used cell lines representative of the different neural cell types (oligodendrocytes, astrocytes, microglia, and neurons) of the human nervous system to evaluate the potential of acute and persistent HCoV-229E infections. Viral antigens, infectious particles, and viral RNA (N and S1 genes) were monitored during an acute and a persistent viral infection. Similar experiments were also performed with HCoV-OC43; these results are presented separately (2).

We show that astrocytoma cell lines (U-87 MG, U-373 MG, and GL-15), neuroblastoma (SK-N-SH), neuroglioma (H4), and immortalized

oligodendrocytic (MO3.13) cell lines were all susceptible to an acute HCoV-229E infection. However, only the H4 and MO3.13 cell lines sustained a persistent infection by this virus. Sequencing of the S1 gene showed two point mutations leading to amino acid changes on viral RNA amplified from persistently infected MO3.13 cells. These results are consistent with the potential persistence of HCoV-229E in cells of the human nervous system, mainly oligodendrocytes and possibly neurons.

MATERIALS AND METHODS

Viruses and cell lines

HCoV-229E was originally obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Va), plaque-purified twice, and grown on L-132 cells as described previously (31). The third passage of HCoV-229E from laboratory stocks kept at -90 °C, with a titer of 5.5×10^6 tissue culture infective doses (TCID₅₀)/ml, was used for all experiments.

The GL-15 line, established from a human glioblastoma multiforme was generated by V. Bocchini (University Medical School, Perugia, Italy) (8). The CHME-5 line was obtained from human fetal microglia by transfection with the large T-antigen of simian virus 40 (30). The MO3.13 cell line was obtained from the fusion of a rhabdosarcoma cell (Te671) with an adult human oligodendrocyte (44). The H4, SK-N-SH, U-373 MG, and U-87 MG cell lines, were obtained from the ATCC. All of these neural cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium, (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum and gentamicin (50 µg/ml GIBCO Laboratories).

Antibodies

Virus-specific monoclonal antibodies (MAbs) were produced in our laboratory by standard hybridoma technology. MAbs 5-11H.6, directed against the surface S glycoprotein of HCoV-229E, and 1-10C.3, an isotypic control, were used to detect viral antigens in immunoperoxidase and immunofluorescence assays.

Acute infection

For detection of viral antigens, approximately 1×10^6 to 1.5×10^6 cells (obtained by trypsinization of cell monolayers grown on plastic 75 cm² flasks, followed by pelleting) were mixed with an equal volume of HCoV-229E virus stock diluted to provide a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 or 1.0. Twenty-five

microliters of this suspension was deposited into each well of a 12-well glass slide (Flow, ICN Biomedical Canada Ltd., Mississauga, Ontario, Canada), and infection progressed for up to 2 days at 33°C prior to fixation in acetone at -20°C for 30 min. Slides were kept at -70°C prior to revelation of viral antigens by immunofluorescence.

For detection of infectious virus, cell lines at 60 to 80% confluence in 25-cm² flasks were infected with virus stock diluted to provide an MOI of 0.1. Infection was carried out at 33°C for up to 2 days, and supernatants and cell monolayers taken at different time points were harvested and kept at -70°C until infectious virus titers could be quantitated.

For analysis of viral RNA, cell monolayers at 60-80% confluence in 150-cm² tissue culture-treated petri dishes were infected at an MOI of 0.01 for 1 day at 33°C. Then, cell monolayers were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, and kept at -90°C until RNA could be extracted.

Persistent infection

Cell lines at 60 to 80% confluence in 25-cm² culture flasks were infected with 0.5 ml of viral suspension, providing an MOI of 0.5, and incubated for 2 h at 33°C with periodical agitation. Cell monolayers were then washed with PBS and grown in regular cell culture medium at 37°C. Cells were passaged every 4 to 8 days. Samples of supernatants and cells were kept at -70°C for viral titration by immunoperoxidase at each passage, and cells were kept at -70°C at each fifth passage for RNA extraction. Twenty-five microliters of cell samples from each passage, at a concentration of 0.5 x 10⁶ to 1.5 x 10⁶ cells/ml, was deposited into each well of a 12-well glass slide (Flow, ICN Biomedical Canada Ltd.), incubated for 24 to 48 h at 37°C and then fixed in acetone at -20°C for 30 min and kept at -70°C until immunofluorescence assay could be performed.

Detection of viral antigens by immunofluorescence

Immunofluorescence revelation of viral antigens was performed as described previously (61). Briefly, primary antibody (MAbs 5-11H.6 for HCoV-229E and 1-10C.3 as isotypic control) was added to thawed slides and incubated for 1 h at 37°C. This was followed by three washes in PBS, addition of the fluorescein-conjugated mouse-specific goat secondary antibody (Cappel, Durham, N. C.), and a 30-min incubation at 37°C. After three washes in PBS, slides were mounted with glycerol-PBS (9:1). Slides were stored at 4°C until they could be observed with a Leitz fluorescence microscope (Dialux 20 model).

Immunoperoxidase assay for quantitation of infectious virus titers

The immunoperoxidase assay for quantitation of infectious virus titers was performed as previously described (61). Briefly, susceptible L-132 cells were inoculated with serial logarithmic dilutions of samples in a 96-well Linbro plate (Flow; ICN Biomedical Canada Ltd.). After 4 to 5 days of incubation at 33°C in 5% (v/v) CO₂, cells were washed with PBS, and fixed with 0.3% (vol/vol) hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) in methanol for 30 min. After washing with PBS, they were incubated for 2 h at 37°C with an appropriate antiviral MAb (5-11H.6). Cells were then washed five times with PBS, and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins (Cappel) were added and incubated for 2 h at 37°C. Bound antibodies were detected by incubation with 0.025% (wt/vol) 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Bio-Rad, Richmond, Calif.) and 0.01% (vol/vol) hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) in PBS. The chromogenic reaction was stopped with deionized water. Infectious virus titers were calculated by the Karber method. Negative controls consisted of noninfected cells.

Preparation of RNA, RT and PCR

To extract total cellular RNA from acutely or persistently infected or control cells, cell monolayers were lysed with GIT buffer (4 M guanidine isothiocyanate, 2.5 mM sodium acetate, 12 mM β -mercaptoethanol). Lysates were passed through a 26-gauge needle at least six times and then layered onto a cesium chloride cushion (5.7 M cesium chloride, 2.5 mM sodium acetate) for a 12- to 20-h centrifugation at 150,000 \times g. Supernatant was removed, and the RNA pellet was resuspended in sterile distilled and deionized H₂O. The primers used for amplification of HCoV-229E and the one for the control housekeeping gene (encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, [GAPDH]) are described in Table 1. Forty picomoles of the inverse-complementary primer or 100 pmol of oligo(dT) (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) was incubated with 2 to 5 μ g of total cellular RNA at 65°C for 5 min to denature RNA, followed by a slow cooldown to 37°C for annealing. Reverse transcription (RT) with Expand Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (50 U; Roche Diagnostics) was performed at 42°C for 90 min in the presence of 60 U of RNA Guard (Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada), 0.4 mM (each) deoxynucleoside triphosphate (Na salt; Roche Diagnostics), 1X reverse transcriptase buffer (50 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% (vol/vol) Tween 20,[pH 8.3]) and 10 mM dithiothreitol (Roche Diagnostics). For PCR, 1 of 10 or 1 of 5 of the synthesized cDNAs was incubated in the presence of 20 pmol (HCoV-229E S1 gene) or 50 pmol (GAPDH or HCoV-229E N gene) of the sense and antisense primers, 1.5 mM (GAPDH gene) or 2.0 mM (HCoV-229E N gene), or 3.0 mM (HCoV-229E S1 gene) MgCl₂ (Roche Diagnostics), 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl, [pH 8.3], 50 mM KCl; Roche Diagnostics); and 0.4 mM (each) deoxynucleoside triphosphate, (Na salt; Roche Diagnostics) at 94°C for 5 min and at 60°C (HCoV-229E N gene), 50°C (GAPDH gene) or 37°C (HCoV-229E S1 gene) for another 5 min. After addition of the Expand high fidelity PCR system DNA polymerase (*Taq* and *Pwo* DNA polymerases) (2.5 U; Roche Diagnostics), 30 cycles of 2 min at 72°C, 1 min at 94°C and 2 min at 60°C (HCoV-229E N gene) or 50°C (GAPDH gene) or 37°C

(HCoV-229E S1 gene) were performed with a final elongation step of 10 min at 72°C. The DNA amplicons were separated by electrophoresis in a 1.5% (wt/vol) agarose gel with ethidium bromide (1 µg/ml).

Cloning and nucleotide sequencing

HCoV-229E S1 gene PCR products were ligated into pGEM-T or pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, Wis.) according to the manufacturer's instructions. The ligation mixture was then transformed into competent XL-1 blue bacteria. Many individual bacterial colonies were screened for the presence of the amplicons. Plasmid DNA was prepared from at least three individual clones for each cloning experiment, with a plasmid mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), and sequenced with an automated sequencer (ABI 310 genetic analyzer, Perkin Elmer) in both directions by using a universal primer, SP6, and internal primers (Table 1). Nucleotide sequences and predicted amino sequences were analyzed with Geneworks software for Macintosh (version 2.5.1; Oxford Molecular Ltd., Oxford, United Kingdom).

RESULTS

Acute infection of neural cell lines

Even though primary cultures of human brain cells are infectable by HCoV-229E (9), their limited life span does not allow the study of the effects of a long-standing coronavirus infection. Although the susceptibility of different neural cell lines to infection by coronaviruses, particularly MHV, has been extensively characterized, very limited results are available concerning the susceptibility to HCoV-229E infection of human continuous cell lines representative of cells of the nervous system (76). Therefore, we first characterized the susceptibility to HCoV-229E infection of various available neural cell lines representative of different cell types found in the nervous system. This virus was initially adapted in our laboratory to replicate in the L-132 cell line, which is of human embryonic fibroblastic origin. For this reason, these cells were used as a positive control for infection. We first performed a detection of HCoV-229E S antigen by indirect immunofluorescence on cells acutely infected at an MOI of 0.1. Representative results of at least three independent experiments are shown in Fig. 1. The specificity of the indirect immunofluorescence test was verified with an isotypic control MAb on the same slide as well as with noninfected cells. In both cases, no signal could be detected for any cell line (data not shown). Results obtained with the reference L-132 cell line are shown in Fig. 1H. The indirect immunofluorescence test was found suitable for the detection of an HCoV-229E infection because of its specificity and since a characteristic cytoplasmic signal was observed (41). Figures 1A and B show the results obtained with two neuronal cell lines, SK-N-SH and H4. Both cell lines were susceptible to HCoV-229E infection; however a higher percentage of SK-N-SH cells were infected compared to that observed for the H4 cell line (Table 2). We determined that the SK-N-SH cell line was at least as susceptible to acute infection by HCoV-229E as our reference L-132 cell line. Astrocytic cell lines (U-373 MG, U-87 MG, and GL-15 [Fig.1C to E, respectively) were all susceptible to HCoV-229E infection. The GL-15 cell line

was more easily infected at a lower MOI than the other two astrocytic cell lines. The oligodendrocytic MO3.13 cell line (Fig. 1F) was infected by HCoV-229E at a level comparable to that of the H4 neuronal and the GL-15 astrocytic cell lines (Table 2). The CHME-5 microglial cell line (Fig. 1G) was the only neural cell line tested not susceptible to HCoV-229E infection. No viral antigen was detected with this cell line, even at different times postinfection or higher MOIs. The percentage of infected cells progressed with time for all susceptible cell lines, from 12 to 40 h, and was augmented by increasing the MOI (data not shown). This is concordant with previously reported results (76).

HCoV-229E infection of the various cell lines was productive since infectious virions were produced by all the susceptible cell lines. An assay to determine the kinetics of virion release was performed between 2 and 60 h of infection (data no shown): a strong increase in viral titers was mainly seen during the first 15 to 20 h and then a plateau effect with a slow decrease was observed during the remainder of the infection. Most of the time, extracellular virus production paralleled that of intracellular virions but was at a higher level. Maximal virion production was achieved at 30 to 40 h postinfection. Titers observed (data not shown) were due not to the virus inoculum but rather to new virus production, since an increase in viral titer with time was observed for all the cell lines tested: SK-N-SH, H4, MO3.13, U-87 MG, and U-373 MG. Finally, we could establish a correlation between production of infectious virions and the percentage of infected cells. Cell lines showing a low percentage of infection produced low titers of virions: for example, the U-373 MG cell line produced a maximum of 4 log TCID₅₀/ml when an MOI of 1 was used; however, the MO3.13 and H4 cell lines produced, under the same conditions, maxima of 6.5 and 7 log TCID₅₀/ml, respectively.

Detection of coronavirus antigens in neural cell lines during persistent infection

It is well known that MHV, the murine counterpart of HCoV, can establish a persistent infection in different cell lines, with various effects (40, 50, 67). In vivo persistence has even been observed in animals (1, 63). Since in vivo experiments are obviously not possible in humans and also because primary cultures of human brain cells have a limited life span, we verified the ability of immortalized neural cell lines to sustain a persistent infection. The various cell lines we showed to be susceptible to an acute infection were infected and then cultured for several passages. At each cell passage, cells were collected for the detection of coronavirus antigens by indirect immunofluorescence (Fig. 2). The L-132 cells (Fig. 2C) sustained a persistent infection for over 42 cell passages, as was previously shown (14). At all passages tested, HCoV-229E antigens were detected by an indirect immunofluorescence assay. Among cell lines of the neuronal type, only H4 cells (Fig. 2A) sustained a persistent viral infection; however the percentage of positive cells was low (<5%). Surprisingly, the SK-N-SH cell line was negative after the second passage of HCoV-229E infection (data not shown), even though this cell line was extensively infected during an acute infection. No astrocytic cell lines (U-87 MG, U-373 MG, or GL-15) were susceptible to a persistent infection: no viral antigen could be detected at the second passage and further (data not shown). On the other hand, the oligodendrocytic cell line MO3.13 sustained a persistent infection for at least 44 cell passages (Fig. 2B). At all cell passages tested, HCoV-229E antigens could be detected in these persistently infected cells at a level comparable to that observed in persistently infected L-132 reference cells. Persistent infection did not significantly influence the proliferation of H4 and MO3.13 cells. However, L-132 cells showed a slight cytopathic effect due to virus at the second passage but recovered at the following passage (data not shown). Overall, among the neural cell lines tested, only the neuronal H4 cell line and the oligodendrocytic cell line MO3.13 showed a persistent presence of HCoV-229E antigens. Finally, the susceptibility to HCoV-229E acute infection did not necessarily correlate with the establishment of a persistent infection by the same viral strain.

Detection of infectious virions during persistent infection

Since a persistent infection does not necessarily correlate with production of infectious virus (52), we verified the presence of such infectious viral particles in the supernatant and in the intracellular compartment of all persistently infected cell lines at every cell passage. Infectious virions were detected by an immunoperoxidase test (Fig. 3). As observed with the immunofluorescence assay, only the H4 and MO3.13 neural cell lines and the L-132 reference cell line were susceptible to persistent infection by HCoV-229E. In general, release of extracellular virus paralleled the production of intracellular infectious virions. Viral titers varied with time, probably because of the varying percentages of infected cells and also depending on the cell cycle of the cell population. The maximal titer observed in persistently infected H4 cells was 5.25 log TCID₅₀/ml, while in MO3.13 cells it was 7.0 log TCID₅₀/ml. In the latter case, it was even higher than for the L-132 reference cell line (5.75 log TCID₅₀/ml). The levels of infectious virions produced by the persistently infected cells correlated with the percentage of infected cells as estimated by indirect immunofluorescence. Approximately 1% of persistently infected H4 cells were positive for HCoV-229E antigen and this cell line produced lower maximal infectious titers than the L-132 cell line. On the other hand, around 5 to 10% of persistently infected MO3.13 were positive in the same test and produced a maximum of 100 times more infectious virions (Table 2 and Fig. 3). The persistent infection resulted not only in a persistent presence of HCoV-229E antigen in the cell culture but also in the release of infectious virions at all cell passages during the persistent infection, which was monitored for ~130 days. The parental immortalized Te671 cell line used to generate the MO3.13 cell line was also persistently infected by HCoV-229E, as shown by immunofluorescence detection of viral antigen and the production of infectious virions in the intracellular and extracellular compartments (data not shown).

Detection of RNA during persistent infection

We looked for the presence of coronavirus RNA in the cell culture as another indication of viral replication. Since total RNA was taken from cell culture, every viral genome could be amplified, even defective ones. The RT-PCR assay being more sensitive than indirect immunofluorescence (61), it also allowed us to verify the presence of viral RNA even when no antigens or virions were detected. We chose to look for the N protein gene since it is usually present at high levels during a coronavirus infection. Moreover, the 3'-coterminal nested set structure of subgenomic coronavirus mRNAs results in the presence of this gene on all viral RNAs (35). Total RNA was extracted, reverse transcribed, and amplified by RT-PCR for a portion of the N protein gene, by using the primers described in Table 1. The PCR products were of the expected size (Fig. 4). No amplification products were detected when RNA from noninfected cells was used, while the GAPDH RNA was amplified from the same sample preparation (data not shown). Results from MO3.13 (Fig. 4B), H4 (Fig. 4A), and L-132 (Fig. 4C) cell lines were similar. Acutely and persistently infected cells were positive for viral RNA at all passages tested. Thus, persistent infection resulted in the persistence of coronavirus RNA at an apparently constant level.

Sequencing of S1 gene and a region of the N gene in persistently infected neural cell lines

During an *in vivo* persistent CNS infection by MHV in mice, multiple point and deletion mutations were previously shown to arise, mainly concentrated in the S and N genes (1, 58). Important determinants of neurovirulence reside in the S1 region of the S glycoprotein of MHV (10, 23). For these reasons, we evaluated possible molecular variations occurring in the amplified N gene portion and in the S1 portion of the S gene during persistent HCoV-229E

infections. The N gene amplicons obtained (Fig. 4) were cloned and sequenced in both directions for three clones for each cell line. Compared to the published sequence (60), two point mutations were present in every clone from acute and persistent infections as well as in our initial virus stock. They were located at positions 879 (ATC to ATG, [ATC->ATG] [amino acid change: I->M]) and 880 (GAA->CAA [amino acid change: E->Q]). Importantly, another sequence of the N gene, which bears exactly the same mutations as those observed in our clones, is available from Genbank (accession no X51325 [60a]). We conclude that these mutations are shared by HCoV-229E viruses studied in other laboratories.

An RT-PCR amplification of the S1 gene portion was first performed, and then the 1,897-bp amplicons were cloned and sequenced in both orientations (see description of internal primers in Table 1) to reduce possible errors introduced by automatic sequence analysis. Changes observed were compared to the published sequence (55) (Table 3). Results were confirmed by reading both nucleic acid strands and characterizing three clones for each cell line and infection. In certain cases, even amplicons obtained from different RT-PCRs were cloned and sequenced. No sequence differences between independent cloned amplicons were observed. Sequencing of the S1 gene from persistent passages passage 42 for L-132 cells, passage 48 for H4 cells, and passage 40 for MO3.13 cells as well as the acute HCoV-229E infection of these same cell types was performed. A point mutation compared to the published sequence was observed in all clones sequenced (55). This point mutation, at position 727, would lead to an amino acid change from a cysteine to a phenylalanine. However, we found in the Genbank database a sequence of the S1 gene from the ATCC isolate of HCoV-229E that bears the same point mutation at position 727 as our sequences (accession no Y09923 [28a]). We conclude that the sequence published in 1990 contains a discrepancy with our sequence, which is also observed by other laboratories. Coronavirus RNA obtained at the 42nd cell passage of persistently infected L-132 cells and at the 40th cell passage of persistently infected MO3.13 cells presented a mutation at position 571, leading to an amino acid change from a threonine to an isoleucine in all three clones sequenced for each cell line. In the case of viral sequences from persistently

infected MO3.13 cells, an additional mutation was observed at position 592, leading also to an amino acid change, from an alanine to a valine. Thus, we have identified a residue in S1 that was mutated in more than one cell line; however, this mutation was not necessary for the establishment of persistence, since HCoV-229E from persistently infected H4 cells did not show this mutation. Mutations found in one out of three sequenced clones were also observed for all cell lines either from acutely or persistently infected cells (data not shown).

The frequency of these isolated mutations varied between 8.1×10^{-4} and 1.1×10^{-3} and were similar in acute and persistent infections. Moreover, no isolated mutation was found in more than one cell line or infection. Thus, we conclude that these isolated point mutations were probably induced by the RT-PCR and not by the persistent infection.

DISCUSSION

HCoV are recognized respiratory pathogens, causing up to 30% of common colds (49). Increasing data suggesting their neurotropic potential has accumulated. Human neural cell lines and primary cultures of human brain cells are susceptible to infection by the 229E strain of HCoV (9, 76) and by MHV (46). However, very limited results (76) concerning the susceptibility of human continuous cell lines representative of nervous system cells to infection by HCoV-229E, which could provide an *in vitro* model for studying persistent infection are available.

In the present study, we have shown that cell lines representative of astrocytes (U-87 MG, U-373 MG, and GL-15), oligodendrocytes (MO3.13), and neurons (SK-N-SH and H4) were all susceptible to infection, albeit at various levels (see summary of results [Table 2]), to an acute infection by HCoV-229E, as monitored by the detection of viral antigen and by the release of infectious virions (Fig. 1 and 2). On the other hand, the CHME-5 cell line, which is representative of microglia and is to our knowledge the only available human microglial cell line, was not susceptible to infection by HCoV-229E. Indeed, no viral antigens could be detected in this cell line even when longer times of infection were investigated or higher MOI were used. Among the numerous cell lines susceptible to acute infection, the oligodendrocytic cell line (MO3.13) and one neuronal cell line (H4) also demonstrated a persistent infection by this virus.

Astrocytes were shown to be susceptible to infection by HCoV-229E but to a lesser extent than to HCoV-OC43 infection since, in general, the percentage of infected cells was lower in immortalized cell lines for HCoV-229E compared to the other strain, OC43 (2). Moreover, HCoV-229E infection of primary cultures of astrocytes could be detected only by RT-PCR in a previous study (9), suggesting an abortive infection and explaining why these cells could not sustain a long-term infection. In fact, the astrocytic cell lines we tested did not sustain a persistent HCoV-229E infection. On the other hand, the murine strain MHV-JHM was reported to infect brain astrocytes in mice (70) and in

nonhuman primates (48). Our results are consistent with a potential role of astrocytes in HCoV-229E infection of the CNS during an acute infection but not a persistent infection. Thus, HCoV-229E may not use these cells as a reservoir for its persistence in human CNS, contrary to what was observed for MHV-JHM in mice (54).

The CHME-5 microglial cell line was not susceptible to an acute HCoV-229E infection, even though primary cultures of human adult microglia were previously shown to be susceptible to infection by the same virus (9). The CHME-5 cells were generated by immortalization of human fetal microglia, while primary cultures used by Bonavia *et al.*, (9) were from adult brain. However, the infection levels in primary cultures were not very high and the infection seemed to be abortive since no virus progeny was observed and only viral RNA, not viral antigen, could be detected (9). Interestingly, recent work in our laboratory has shown that the HCoV-229E receptor, aminopeptidase N or CD13 (82), is also utilized by HCoV-229E as an attachment site to neural cells used in the present study (34). In that study, it was also found that the CHME-5 cells did not express CD13, as shown by cytofluorometry, which explains their noninfectability by HCoV-229E (34). We do not know if primary cultures of human microglia express this cellular receptor, although we do expect they would since this molecule is known to be expressed on monocyte/macrophage-type cells, most likely also including microglial cells that share most of the markers found on these cells. Nevertheless, based on our previous results with primary cultures and current results with immortalized cell lines, we conclude that HCoV-229E apparently would not easily infect microglia.

The MO3.13 oligodendrocytic cell line was susceptible to acute and persistent infection by both HCoV strains (2). However, we previously showed that primary cultures of oligodendrocytes were not positive for viral antigen detection when infected with HCoV (9). Moreover, the susceptibilities to HCoV-OC43 infection of oligodendrocytes were different between immortalized and primary cells. These variations could be due to the different degree of differentiation of the neural cells we have used as immortalized cell lines compared to that of primary cultures. Also, it is possible that the sensitivities of

nonhuman primates (48). Our results are consistent with a potential role of astrocytes in HCoV-229E infection of the CNS during an acute infection but not a persistent infection. Thus, HCoV-229E may not use these cells as a reservoir for its persistence in human CNS, contrary to what was observed for MHV-JHM in mice (54).

The CHME-5 microglial cell line was not susceptible to an acute HCoV-229E infection, even though primary cultures of human adult microglia were previously shown to be susceptible to infection by the same virus (9). The CHME-5 cells were generated by immortalization of human fetal microglia, while primary cultures used by Bonavia *et al.*, (9) were from adult brain. However, the infection levels in primary cultures were not very high and the infection seemed to be abortive since no virus progeny was observed and only viral RNA, not viral antigen, could be detected (9). Interestingly, recent work in our laboratory has shown that the HCoV-229E receptor, aminopeptidase N or CD13 (82), is also utilized by HCoV-229E as an attachment site to neural cells used in the present study (34). In that study, it was also found that the CHME-5 cells did not express CD13, as shown by cytofluorometry, which explains their noninfectability by HCoV-229E (34). We do not know if primary cultures of human microglia express this cellular receptor, although we do expect they would since this molecule is known to be expressed on monocyte/macrophage-type cells, most likely also including microglial cells that share most of the markers found on these cells. Nevertheless, based on our previous results with primary cultures and current results with immortalized cell lines, we conclude that HCoV-229E apparently would not easily infect microglia.

The MO3.13 oligodendrocytic cell line was susceptible to acute and persistent infection by both HCoV strains (2). However, we previously showed that primary cultures of oligodendrocytes were not positive for viral antigen detection when infected with HCoV (9). Moreover, the susceptibilities to HCoV-OC43 infection of oligodendrocytes were different between immortalized and primary cells. These variations could be due to the different degree of differentiation of the neural cells we have used as immortalized cell lines compared to that of primary cultures. Also, it is possible that the sensitivities of

our assays were insufficient to detect a low level of virus infection in primary cultures. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that immortalized cell lines have acquired new properties, such as susceptibility to HCoV infections.

For neuronal infections, we evaluated two different immortalized cell lines: SK-N-SH and H4. Both cell lines were susceptible to acute infection by HCoV-229E, as shown by viral antigen detection and production of infectious virions. However, unlike the H4 cell line, the SK-N-SH cell line did not sustain a persistent HCoV-229E infection. In our previous study with primary cultures (9), no HCoV-229E RNA detection could be performed on primary cultures of neurons and no viral antigen was detected after an infection (9). Thus, it is difficult to compare our results relating to neuronal cell lines to already published work, in which the infectability of neurons by HCoV-229E could not be ruled out, given that persistence of MHV in neurons was previously shown (63). Moreover, since the H4 cell line is from a neuroglioma (ganglioglioma) that consists of a mixture of cells of neuronal and glial origins and since, to our knowledge, no human neuronal cell lines from the CNS are available (neuroblastomas are from the peripheral nervous system), we have performed our experiments with this cell line. More experiments should be performed when a CNS neuronal cell line becomes available, to validate the possibility that neurons could serve as a reservoir for HCoV-229E.

Differences in the genetic constitution of various viral strains and variants could affect the neurotropism and the pathology observed and these differences could appear during an *in vivo* or *in vitro* infection (71, 72). It has been shown that MHV-4 infects mainly neurons of mice (22); whereas MHV-JHM is found mainly in oligodendrocytes of the spinal cord and brain of the same animals (73). Finally, MHV-A59 infects principally neurons and neural processes and terminals (37). Given this variety of results obtained with MHV strains, it was important to look at genetic variations of HCoV in the context of potential in the human nervous system. The viral N and S genes are of interest since, in persistently infected mice, RNA analysis showed a diverse population of viral

sequences for these two genes (1, 58). Also, important molecular determinants of MHV neuropathogenesis are located on the S protein (42, 45).

The portion of the N gene amplified in our study (nucleotides 819 to 1054) showed two point mutations in all persistently infected cell lines that were identical to a submitted sequence (60a). We have also looked at the S1 gene portion since most of the mutations observed with MHV were concentrated on this apparently hypervariable portion of the spike protein. One point mutation at position 571 was observed on HCoV-229E RNA from persistently infected MO3.13 and L-132 cells, leading to an amino acid change from a threonine to an isoleucine, an amino acid that is less charged. An additional mutation, at position 592, was observed on RNA from persistently infected MO3.13 cells, leading to an amino acid change from an alanine to a valine, a larger amino acid. In the case of HCoV-OC43, the MO3.13 cell line was also prone to more point mutations than the other cell lines and particularly at different positions than in other cell lines (2). Thus, interaction of HCoV with this cell line is apparently more prone to the appearance of virus mutants.

It is difficult at the moment to suggest a role for these mutations within the S1 gene of HCoV-229E, since no particular function has been attributed to this region of the HCoV-229E S protein. However, it has been shown for porcine transmissible gastroenteric virus, a coronavirus belonging to the same antigenic group as HCoV-229E, that the S1 gene is responsible for receptor binding and also that enterovirulence is associated with a region within the N-terminal end of S1 (36). This strongly suggests that the S1 gene of HCoV-229E plays a role in receptor binding and influences viral tropism. Since viruses do not have to face immune system pressure in vitro, we could then argue that these mutations did not occur for avoiding recognition by the immune system, but we can speculate that they favor viral replication. Interestingly, we observed a higher maximal virus yield for infected MO3.13 and L-132 cells (bearing the point mutation at position 571) compared to infected H4 cells. Moreover, the absence of immunitaire response may explain the constant shedding of infectious virus during the persistent infection, even after ~130 days, since no mechanism acted

to eliminate viruses or infected cells. We can speculate that the point mutation observed in two distinct cell lines is at a position prone to mutation compared to other regions of this protein. Other genomic regions should be sequenced to verify the possibility that other regions are more predisposed to mutation, even though the S1 region was predicted from work with MHV to be more variable. It will be interesting to compare HCoV-229E, with and without certain point mutations within the S1 gene, with regard to their capacity to infect and replicate in neural cells.

A controversy has arisen in recent scientific publications concerning the possible emergence of quasispecies during persistent coronavirus infections within the CNS. Stühler and colleagues reported that no quasispecies arose during a persistent MHV-JHM infection within the CNS of rats (68). Moreover, another study showed little evidence for the selection of specific mutations within the M protein, N-cytotoxic-T-lymphocyte epitope, and encapsidation sequence with time after infection in mice (6). On the other hand, others have shown that within the N and S genes, multiple point and deletion mutations occurred during a 42-day period postinfection in mice, suggesting rapid viral genomic RNA evolution and the emergence of quasispecies (1, 58). However, even though they were common, these variants were not required for persistent infections in mice (1, 58). The selection of virus variants with distinct localized mutations and the evolution of more virulent phenotypes for cell lines persistently infected with MHV was previously shown (15, 16, 27). However, mutation frequencies and the rate at which they appeared were different at various genomic positions (16).

The error rate of retroviral reverse transcriptase enzymes has been estimated at 10^{-4} on complex RNA templates (62). The Expand high fidelity PCR system DNA polymerase (*Taq* and *Pwo* DNA polymerases) we used has a calculated error rate of 8.5×10^{-6} (Roche Diagnostics). Since we have performed 30 amplification cycles, the total error rate for our RT-PCR could be estimated at 3.6×10^{-4} [$=1 \times 10^{-4} + (8.5 \times 10^{-6} \times 30 \text{ cycles})$]. Variations between clones of virus genome generated by RT-PCR should be greater than that

expected from the error rates of reverse transcriptase and Taq (62) to be considered as mutations representative of the viral population. Substitutions present in more than one clone are likely to represent mutations actually present in the virus population (62). The error rate of isolated mutations (found on only one out of three sequenced clones for each cell line) varied between 8.1×10^{-4} and 1.1×10^{-3} , which corresponds to a 2.2- to 3.0-fold increase compared to the theoretically expected error rate calculated for our experiments because of reverse transcriptase- and Taq polymerase-induced errors. Based on these results we cannot make a conclusion on the presence of quasispecies among the population of HCoV-229E viruses. Moreover, these rates of isolated mutations were comparable between S1 sequenced from acute and persistent infections, meaning that the persistent infection did not seem to involve a quasispecies evolution. If we agree to describe quasispecies as a whole population of phylogenetically related variants observed within a single infected cell population (62), we did not in our study sequence enough clones to make a conclusion about the whole population, but our results do not suggest such variants at the level of the S1 gene. It would be necessary to sequence a larger number of clones to clearly establish the absence of a diverse population of mutant viral RNA. Again, we should mention that, in our study, viruses were not exposed to immune responses and so did not have to escape from immunerecognition.

The neurotropism of murine coronaviruses has been well documented by in vitro and in vivo experiments. However, the neurotropism of HCoV remains to be confirmed. In rodents, a coronavirus infection does not necessarily result in severe pathological symptoms but could be manifested as a clinically silent subacute demyelinating disease (79). Indeed, MHV-JHM can persist and replicate within neurons and oligodendrocytes of rats without causing cell degeneration and death or eliciting an immune attack which may lead to tissue necrosis and suppression of the infection (63). On the other hand, the persistent infection could lead to a pathological outcome: an MHV-JHM mutant was shown to establish a reproducible persistent infection in mice and to induce

progression from an acute demyelinating disease to a chronic recurring form (32). MHV-JHM could also establish a persistent infection when injected intravitreally, i.e., into another immunologically-privileged site in the body, where viral RNA was detected by *in situ* hybridization up to 60 days postinfection (33).

Other viruses, such as Borna disease virus, human immunodeficiency virus, polyomavirus JC, and measles virus have been shown to persist within the human CNS with or without accompanying pathological manifestations. A persistent HCoV-229E infection might not lead directly to pathology since no cytopathic effects were observed in any of the neural cell lines tested in the present study. However, the presence of coronavirus antigens within the CNS could lead to localized and potentially detrimental immune responses. For example, it has been shown that a MHV-JHM infection of rats leads to T-cell-mediated auto-immune myelin reactivity, presumably through immune cross-reactivity with both virus and myelin antigens (80). Interestingly, we have previously reported the preferential presence of T cells cross-reactive to both HCoV-229E and myelin basic protein in the peripheral blood of MS patients compared to controls (77).

Viral RNA could be detected in both the rodent and human CNS for long periods after the primary infection. It is unlikely that all human brain tissues positive for HCoV RNA, originating from different laboratories (3, 46, 66), were from humans acutely infected by HCoV just prior to their deaths, in part because of differences in age and geographical origin at the time of autopsy. Coronaviruses might provide low levels of viral antigens in order to escape the immunitaire system during a persistent infection, since most often only viral RNA and neither infectious viruses nor viral antigens are detected for such long periods. However, sensitivities of techniques used might influence the observations made. Detailed *in situ* detection of HCoV in human brain sections would confirm the tropism observed *in vitro* with primary and immortalized cultures and provide clues as to the impact of the presence of HCoV-229E in human CNS. These studies are in progress. The results of our present study

favor oligodendrocytes, and possibly neurons, as potential HCoV-229E reservoirs within the human CNS.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant MT-9203 from the Medical Research Council of Canada to P.J.T. who also gratefully acknowledges a senior scholarship award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). N.A. is grateful to the Institut Armand-Frappier as well as to the Multiple Sclerosis Society of Canada for studentship support.

We thank Francine Lambert for excellent technical assistance. We thank Julie Edwards for critically reviewing the manuscript.

REFERENCES

1. **Adami, C., J. Pooley, J. Glomb, E. Stecker, F. Fazal, J. O. Fleming, and S. C. Baker.** 1995. Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection: quasispecies nature of the persisting MHV RNA. *Virology* **209**:337-346.
2. **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**: (In press).
3. Arbour, N., and P. J. Talbot. 1998. Unpublished data.
4. **Barnett, E. M., and S. Perlman.** 1993. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology* **194**:185-191.
5. **Barthold, S. W., and A. L. Smith.** 1992. Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice. *Arch. Virol.* **122**:35-44.
6. **Bergmann, C., E. Dimacali, S. Stohl, W. Wei, M. M. C. Lai, S. Tahara, and N. Marten.** 1998. Variability of persisting MHV RNA sequences constituting immune and replication-relevant domains. *Virology* **244**:563-572.
7. **Bergmann, C. C., Q. Yao, M. Lin, and S. A. Stohlmam.** 1996. The JHM strain of mouse hepatitis virus induces a spike protein-specific D^b-restricted cytotoxic T cell response. *J. Gen. Virol.* **77**:315-325.
8. **Bocchini, V., R. Casalone, P. Collini, G. Rebel, and F. Lo Curto.** 1991. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res.* **265**:73-81.
9. **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.
10. **Buchmeier, M. J., R. G. Dalziel, M. J. M. Koolen, and P. W. Lampert.** 1987. Molecular determinants of CNS virulence of the coronavirus mouse hepatitis virus-4. p. 409-422. *In Positive Strand RNA*

- Viruses, M. A. Brinton and R. R. Rueckert (eds.) Alan R. Liss Inc. New York, N.Y.
11. **Cabirac, G. F., R. S. Murray, L. B. McLaughlin, D. M. Skolnick, B. Hogue, K. Dorovini-Zis, and P. J. Didier.** 1995. In vitro interaction of coronaviruses with primate and human brain microvascular endothelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**:79-88.
 12. **Cabirac, G. F., K. F. Soike, J.-Y. Zhang, K. Hoel, C. Butunoi, G.-Y. Cai, S. Johnson, and R. S. Murray.** 1994. Entry of coronavirus into primate CNS following peripheral infection. *Microb. Pathog.* **16**:349-357.
 13. **Castro, R. F., and S. Perlman.** 1995. CD8+ T-cell epitopes within the surface glycoprotein of a neurotropic coronavirus and correlation with pathogenicity. *J. Virol.* **69**:8127-8131.
 14. **Chaloner-Larsson, G., and C. M. Johnson-Lussenburg.** 1981. Establishment and maintenance of a persistent infection of L132 cells by human coronavirus stain 229E. *Arch. Virol.* **69**:117-120.
 15. **Chen, W., and R. S. Baric.** 1996. Molecular anatomy of mouse hepatitis virus persistence: Coevolution of increased host cell resistance and virus virulence. *J. Virol.* **70**:3947-3960.
 16. **Chen, W., and R. S. Baric.** 1995. Function of a 5'-end genomic RNA mutation that evolves during persistent mouse hepatitis virus infection in vitro. *J. Virol.* **69**:7529-7540.
 17. **Collins, A. R., R. L. Knobler, H. Powell, and M. J. Buchmeier.** 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* **119**:358-371.

18. **Daniel, C., R. Anderson, M. J. Buchmeier, J. O. Fleming, W J. M. Spaan, H. Wege, and P. J. Talbot.** 1993. Identification of an immunodominant linear neutralization domain of the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein and evidence that it forms part of a complex tridimensional structure. *J. Virol.* **67**:1185-1194.
19. **Daniel, C., and P. J. Talbot.** 1990. Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59. *Virology* **174**:87-94.
20. **Dveksler, G. S., M. N. Pensiero, C. B. Cardellicchio, R. K. Williams, G. S. Jiang, K. V. Holmes, and C. W. Dieffenbach.** 1991. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* **65**:6881-6891.
21. **Ercolani, L., B. Florence, M. Denaro, and M. Alexander.** 1988. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **263**:15335-15341.
22. **Fazakerley, J. K., S. E. Parker, F. Bloom, and M. J. Buchmeier.** 1992. The V5A13.1 envelope glycoprotein deletion mutant of mouse hepatitis virus type-4 is neuroattenuated by its reduced rate of spread in the central nervous system. *Virology* **187**:178-188.
23. **Fleming, J. O., M. D. Trousdale, J. Bradbury, S. A. Stohlman, and L. P. Weiner.** 1987. Experimental demyelination induced by coronavirus JHM (MHV-4): molecular identification of a viral determinant of paralytic disease. *Microb. Pathog.* **3**:9-20.
24. **Fleming, J. O., J. J. Houtman, H. Alaca, H. C. Hinze, D. McKenzie, J. Aiken, T. Bleasdale, and S. Baker.** 1994. Persistence of viral RNA in the central nervous system of mice inoculated with MHV-4. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**:327-332.
25. **Flintoff, W. F., and S. Van Dinter.** 1989. Several rat cell lines share a common defect in their inability to internalize murine coronaviruses efficiently. *J. Gen. Virol.* **70**:1713-1724.

26. **Gallagher, T. M., S. E. Parker, and M. J. Buchmeier.** 1990. Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. *J. Virol.* **64**:731-741.
27. **Gombold, J. L., S. T. Hingley, and S. R. Weiss.** 1993. Fusion-defective mutants of mouse hepatitis virus A59 contain a mutation in the spike protein cleavage signal. *J. Virol.* **67**:4504-4512.
28. **Hamre, D., and J. J. Procknow.** 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**:190-193.
- 28a. **Hays J.P.** 1997. Genbank accession no. Y09923
29. **Houtman, J. J., and J. O. Fleming.** 1996. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J. Neurovirol.* **2**:361-376.
30. **Janabi, N., S. Peudenier, B. Héron, K. H. Ng, and M. Tardieu.** 1995. Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglia cells with the SV40 large T antigen. *Neurosci. Lett.* **195**:105-108.
31. **Jouvenne, P., S. Mounir, J. N. Stewart, C. D. Richardson, and P. J. Talbot.** 1992. Sequence analysis of human coronavirus 229E mRNAs 4 and 5: evidence for polymorphism and homology with myelin basic protein. *Virus Res.* **22**:125-141.
32. **Knobler, R. L., P. W. Lampert, and M. B. A. Oldstone.** 1982. Virus persistence and recurring demyelination produced by a temperature-sensitive mutant of MHV-4. *Nature* **298**:279-280.
33. **Komurasaki, Y., C. N. Nagineni, Y. Wang, and J. J. Hooks.** 1996. Virus RNA persists within the retina in coronavirus-induced retinopathy. *Virology* **222**:446-450.
34. **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 coronaviruses 229E. *J. Virol.* **72**:6511-6519.
35. **Lai, M. M. C., and D. Cavanagh.** 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **48**:1-100.

36. **Laude, H., M. Godet, S. Bernard, J. Gelfi, M. Duarte, and B. Delmas.** 1995. Functional domains in the spike protein of transmissible gastroenteritis virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**:299-304.
37. **Lavi, E., P. S. Fishman, P. S. Highkin, and S. R. Weiss.** 1988. Limbic encephalitis after inhalation of a murine coronavirus. *Lab. Investig.* **58**:31-36.
38. **Lavi, E., D. H. Gilden, M. K. Highkin, and S. R. Weiss.** 1986. The organ tropism of mouse hepatitis virus A59 in mice is dependent on dose and route of inoculation. *Lab. Anim. Sci.* **36**:130-135.
39. **Lavi, E., D. H. Gilden, M. K. Highkin, and S. R. Weiss.** 1984. Persistence of mouse hepatitis virus A59 RNA in a slow virus demyelinating infection in mice as detected by in situ hybridization. *J. Virol.* **51**:563-566.
40. **Lucas, A., M. Coulter, R. Anderson, S. Dales, and W. Flintoff.** 1978. In vivo and in vitro models of demyelinating diseases. II. Persistence and host-regulated thermosensitivity in cells of neural derivation infected with mouse hepatitis and measles viruses. *Virology* **88**: 325-337.
41. **Macnaughton, M. R., B. J. Thomas, H. A. Davies, and S. Patterson.** 1980. Infectivity of human coronavirus strain 229E. *J. Clin. Microbiol.* **12**:462-468.
42. **Makino, S., J. O. Fleming, J. G. Keck, S. A. Stohlman, and M. M. C. Lai.** 1987. RNA recombination of coronaviruses: localization of neutralizing epitopes and neuropathogenic determinants on the carboxyl terminus of peplomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:6567-6571.
43. **Massa, P. T., H. Wege, and V. ter Meulen.** 1988. Growth pattern of various JHM coronavirus isolates in primary rat glial cell cultures correlates with differing neurotropism in vivo. *Virus Res.* **9**:133-144.
44. **McLaurin, J., G. C. Trudel, I. T. Shaw, J. P. Antel, and N. R. Cashman.** 1995. A human glial hybrid cell line differentially expressing genes subserving oligodendrocyte and astrocyte phenotype. *J. Neurobiol.* **26**:283-293.

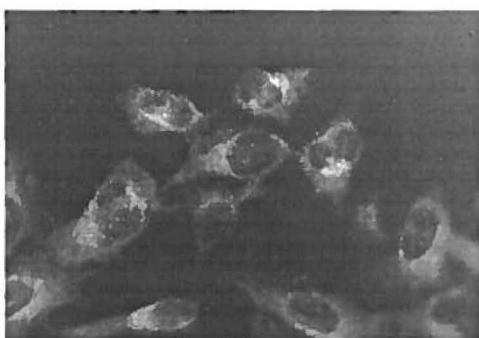
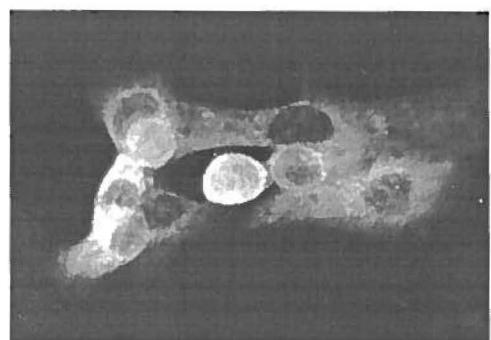
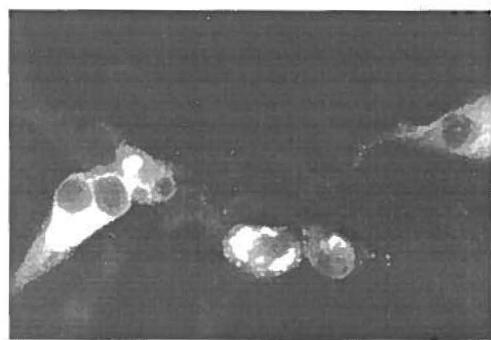
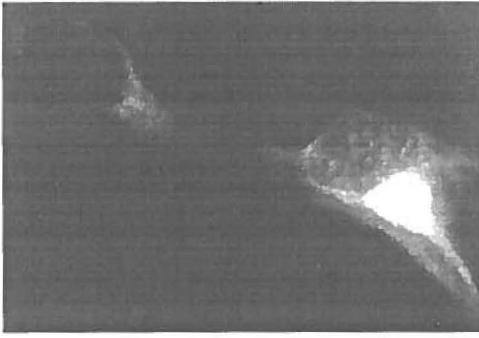
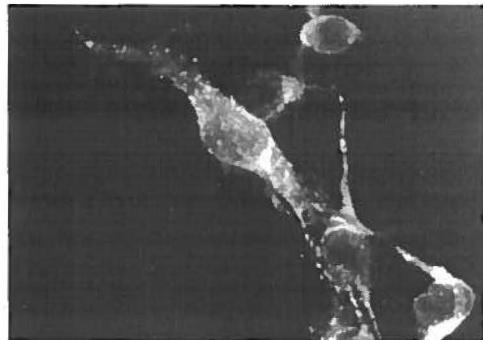
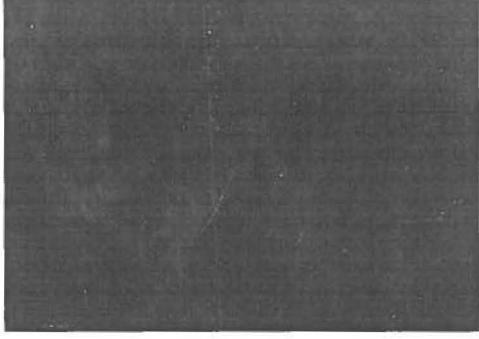
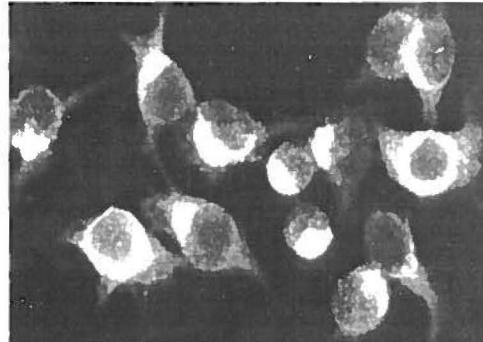
45. Morris, V. L., C. Tieszer, J. Mackinnon, and D. Percy. 1989. Characterization of coronavirus JHM variants isolated from Wistar furth rats with a viral-induced demyelinating disease. *Virology* **169**:127-136.
46. Murray, R. S., G. Y. Cai, K. Hoel, S. Johnson, G. F. Cabirac. 1993. Coronaviruses and multiple sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**: 353-357.
47. Murray, R. S., G.-Y. Cai, K. Hoel, J.-Y. Zhang, K. F. Soike, and G. F. Cabirac. 1992. Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system. *Virology* **188**:274-284.
48. Murray, R. S., G .Y. Cai, K. F. Soike, and G. F. Cabirac. 1997. Further observations on coronavirus infection of primate CNS. *J. Neurovirol.* **3**:71-75.
49. Myint, S. H. 1994. Human coronaviruses-a brief review. *Rev. Med. Virol.* **4**:35-46.
50. Okumura, A., K. Machii, S. Azuma, Y. Toyoda, and S. Kyuwa. 1996. Maintenance of pluripotency in mouse embryonic stem cells persistently infected with murine coronavirus. *J. Virol.* **70**:4146-4149.
51. Patterson, S., and M. R. Macnaughton. 1982. Replication of human respiratory coronavirus strain 229E in human macrophages. *J. Gen. Virol.* **60**:307-314.
52. Pearson, J., and C. A. Mims. 1985. Differential susceptibility of cultured neural cells to the human coronavirus OC43. *J. Virol.* **53**:1016-1019.
53. Perlman, S., G. Evans, and A. Afifi. 1990. Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. *J. Exp. Med.* **172**:1127-1132.
54. Perlman, S., and D. Ries. 1987. The astrocyte is a target cell in mice persistently infected with mouse hepatitis virus, strain JHM. *Microb. Pathog.* **3**:309-314.
55. Raabe, T., B. Schelle-Prinz, and S. G. Siddell. 1990. Nucleotide sequence of the gene encoding the spike glycoprotein of human coronavirus HCV 229E. *J. Gen. Virol.* **71**: 1065-1073.

56. **Reed, S. E.** 1984. The behaviour of recent isolates of human respiratory coronavirus in vitro and in volunteers: evidence of heterogeneity among 229E-related strains. *J. Med. Virol.* **13**:179-192.
57. **Resta, S., J. P. Luby, C. R. Rosenfeld, and J. D. Siegel.** 1985. Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science* **229**:978-981.
58. **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.
59. **Salmi, A., B. Ziola, T. Hovi, and M. Reunanan.** 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* **32**:292-295.
60. **Schreiber, S. S., T. Kamahora, and M. M. C. Lai.** 1989. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of human coronavirus 229E. *Virology* **169**:142-151.
- 60a. **Siddell, S.** 1993. Genbank accession no. X51325.
61. **Sizun, J., N. Arbour, and P. J. Talbot.** 1998. Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronaviruses 229E and OC43 in cell culture. *J. Virol. Methods* **72**:145-152.
62. **Smith, D. B., J. McAllister, C. Casino, and P. Simmonds.** 1997. Virus 'quasispecies' : making a mountain out of a molehill ? *J. Gen. Virol.* **78**:1511-1519.
63. **Sorensen, O., M. B. Coulter-Mackie, S. Puchalski, and S. Dales.** 1984. In vivo and in vitro models of demyelinating disease. IX. Progression of JHM virus infection in the central nervous system of the rat during overt and asymptomatic phases. *Virology* **137**:347-57.
64. **Sorensen, O., and S. Dales.** 1985. In vivo and in vitro models of demyelinating disease: JHM virus in the rat central nervous system localized by in situ cDNA hybridization and immunofluorescent microscopy. *J. Virol.* **56**:434-438.

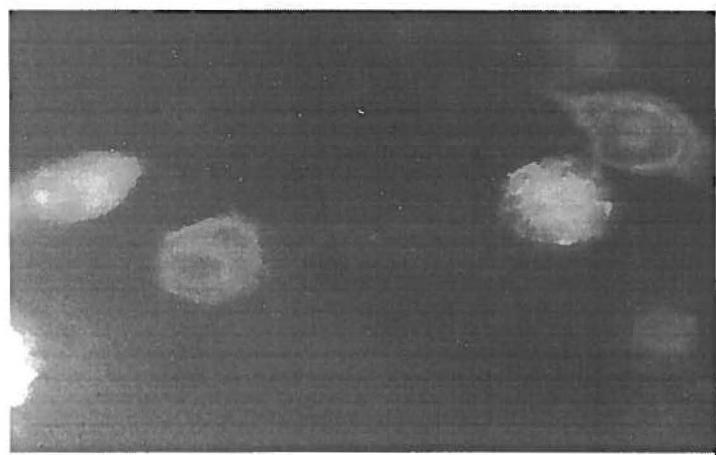
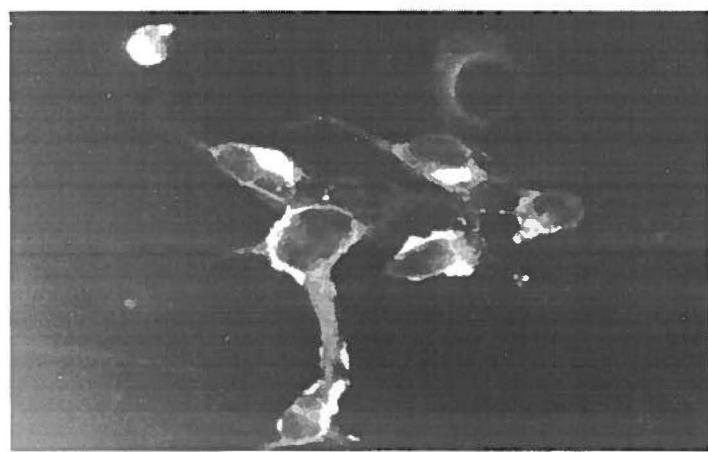
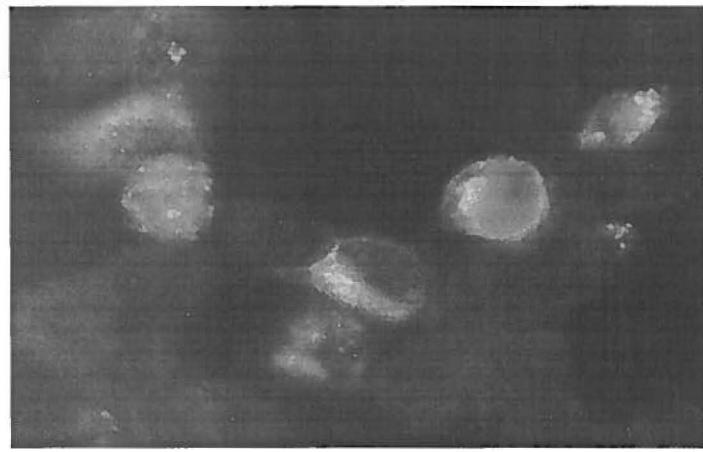
65. **Sorensen, O., R. Dugré, D. Percy, and S. Dales.** 1982. In vivo and in vitro models of demyelinating disease: endogenous factors influencing demyelinating disease caused by mouse hepatitis virus in rats and mice. *Infect. Immun.* **37**:1248-1260.
66. **Stewart, J. N., S. Mounir, and P. J. Talbot.** 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* **191**:502-505.
67. **Stohlman, S. A., and L. P. Weiner.** 1978. Stability of neurotropic mouse hepatitis virus (JHM strain) during chronic infection of neuroblastoma cells. *Arch. Virol.* **57**:53-61.
68. **Stühler, A., E. Flory, H. Wege, H. Lassmann, and H. Wege.** 1997. No evidence for quasispecies populations during persistence of the coronavirus mouse hepatitis virus JHM: sequence conservation within the surface glycoprotein S in Lewis rats. *J. Gen. Virol.* **78**:747-756.
69. **Sun, N., D. Grzybicki, R. F. Castro, S. Murphy, and S. Perlman.** 1995. Activation of astrocytes in the spinal cord of mice chronically infected with a neurotropic coronavirus. *Virology* **213**:482-493.
70. **Sun, N., and S. Perlman.** 1995. Spread of a neurotropic coronavirus to spinal cord white matter via neurons and astrocytes. *J. Virol.* **69**:633-641.
71. **Taguchi, F., P. T. Massa, and V. ter Meulen.** 1986. Characterization of a variant virus isolated from neural cell culture after infection of mouse coronavirus JHMV. *Virology* **155**:267-270.
72. **Taguchi, F., S. G. Siddell, H. Wege, and V. ter Meulen.** 1985. Characterization of a variant virus selected in rat brains after infection by coronavirus mouse hepatitis virus JHM. *J. Virol.* **54**:429-435.
73. **Takahashi, K., N. Goto, T. Ishida, K. Katami, and K. Fujiwara.** 1981. Acute demyelination in mice inoculated intraspinally with mouse hepatitis virus, JHM strain. *Jpn. J. Exp. Med.* **51**:323-330.
74. **Talbot, P. J., G. Dionne, and M. Lacroix.** 1988. Vaccination against lethal coronavirus-induced encephalitis with a synthetic decapeptide homologous to a domain in the predicted peplomer stalk. *J. Virol.* **62**:3032-3036.

75. **Talbot, P. J., A. A. Salmi, R. L. Knobler, and M J. Buchmeier.** 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. *Virology* **131**:250-260.
76. **Talbot, P. J., S. Ékandé, N. R. Cashman, S. Mounir, and J. N. Stewart.** 1994. Neurotropism of human coronavirus 229E. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**:339-346.
77. **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.
78. **Tardieu, M., O. Boespflug, and T. Barbé.** 1986. Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells. *J. Virol.* **60**:574-582.
79. **Watanabe, R., H. Wege, and V. ter Meulen.** 1987. Comparative analysis of coronavirus JHM-induced demyelinating encephalomyelitis in Lewis and Brown Norway rats. *Lab. Investig.* **57**:375-384.
80. **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.
81. **Wege, H., J. Winter, and R. Meyermann.** 1988. The peplomer protein E2 of coronavirus JHM as a determinant of neurovirulence: definition of critical epitopes by variant analysis. *J. Gen. Virol.* **69**:87-98.
82. **Yeager, C. L., R. A. Ashmun, R. K. Williams, C. B. Cardellicchio, L. H. Shapiro, A. T. Look, and K. V. Holmes.** 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**:420-422.
83. **Yokomori, K., and M. M. C. Lai.** 1992. Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *J. Virol.* **66**:6194-6199.

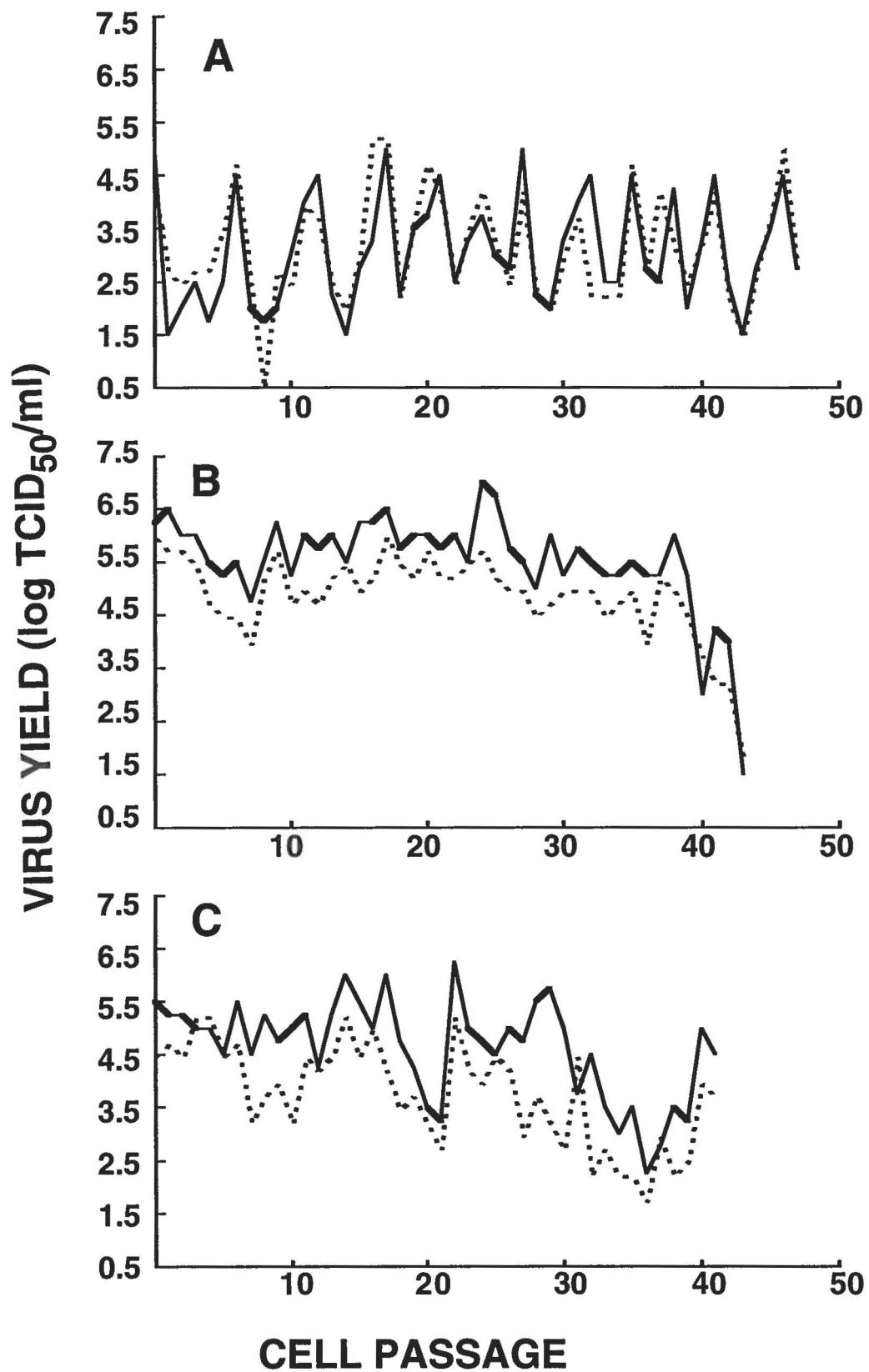
ARTICLE II FIGURE 1: Detection of HCoV antigens by indirect immunofluorescence on cells acutely infected by 229E strain, using 229E-specific MAb (5-11H.6). (A) H4 cells (B) SK-N-SH cells (C) U-373 MG cells (D) U-87 MG cells (E) GL-15 cells (F) MO3.13 cells (G) CHME-5 cells (H) L-132 cells

A**B****C****D****E****F****G****H**

ARTICLE II FIGURE 2: Detection of HCoV antigens by indirect immunofluorescence on cells persistently infected by 229E strain, using 229E-specific MAb (5-11H.6). (A) H4 cells, passage 37 (B) MO3.13 cells, passage 40 (C) L-132 cells, passage 40.

A**B****C**

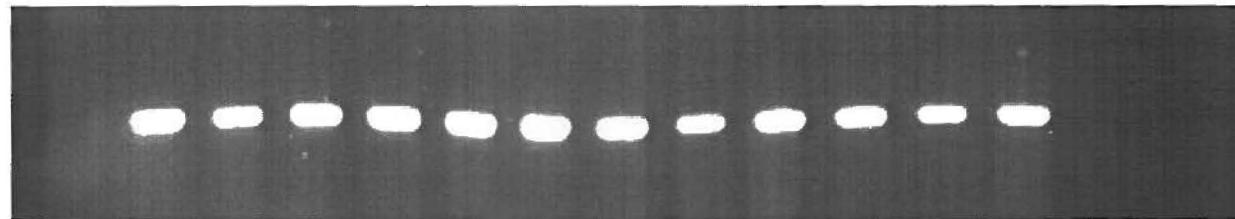
ARTICLE II FIGURE 3: Yield of infectious virions from persistent HCoV-229E infections of different cell lines. (A) H4 cells (B) MO3.13 cells (C) L-132 cells. Solid lines, supernatant (extracellular virus); dotted lines, cell lysate (intracellular virus).



ARTICLE II FIGURE 4: Detection of the N protein gene by RT-PCR during persistent HCoV-229E infection of various cell lines. One tenth of the PCR amplicon obtained was loaded on a 1.5% (wt/vol) agarose gel for electrophoretic separation. (A) H4 cells (B) MO3.13 cells (C) L-132 cells. N, noninfected cells; A, acutely infected cells; -, negative control for reverse transcriptase and for PCR; numbers, cell passages.

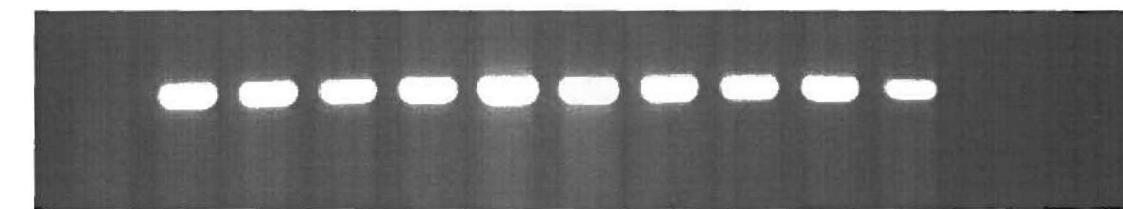
N A 2 5 10 15 20 25 30 35 40 45 48 - -

A



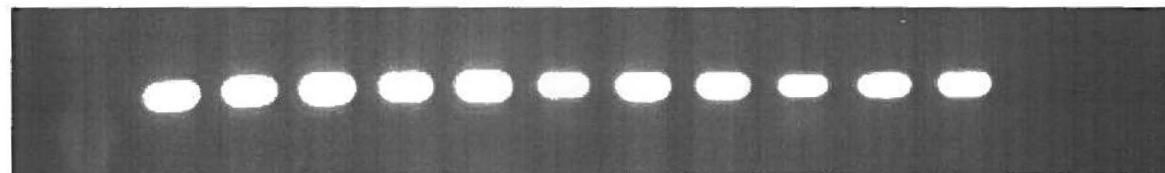
N A 2 5 10 15 20 25 30 35 40 - -

B



N A 2 5 10 15 20 25 30 35 40 42 - -

C



ARTICLE II Table 1: RT-PCR and Sequencing primers

RNA amplified or sequenced	Primers	Primer Designation	Nucleotides
RT-PCR HCoV-229E N protein	5'- TCTGCCAAGAGTCTGCTCG -3' 5'- AGCATAGCAGCTGTTGACGG -3'	E7-sense E9- antisense	819 - 838 ¹ 1035 - 1054 ¹
RT-PCR HCoV-229E S1 gene portion	5'- GTTGCATATTGCTGGTTGTCAAAC -3' 5'- CCTGGCGCTATTCTTAAGGC -3'	229E-S1PH sense 229E-S1PI antisense	68-91 ² 1944-1964 ²
RT-PCR GAPDH	5'- GTGAAGGTCGGAGTCAACG -3' 5'- CACCTGGTGCTCAGTGTAGC -3'	GAPDH-H-sense GAPDH-I-antisense	10 – 68 ³ 824 – 843 ³
Sequencing S1 gene portion	5'- GGAACCATTITGTTAAACATC -3' 5'- GTACGTTGACTTCAAACCTCAG -3' 5'- CTCCTTGTAACCCACCAGATC -3' 5'- GGTTACAAGGAGTGATAGAGTAG -3' 5'- CGTACAACACAATAAACGTATG -3' 5'- CAAAATGGTTCCACGTCTAAGG -3'	S-229E-A sense S-229E-B sense S-229E-C sense S-229E-D antisense S-229E-E antisense S-229E-F antisense	426-448 ² 960-981 ² 1522-1542 ² 1511-1533 ² 933-944 ² 414-435 ²

¹ reference 60

² reference 55

³ reference 21

ARTICLE II Table 2: Susceptibility of neural cell lines to acute and persistent infection by HCoV-229E

Cell line		Infection ¹	
Line designation	Phenotype	Acute	Persistent
U-87 MG	Astrocytoma	1+	-
U-373 MG	Astrocytoma (grade III)	1+	-
GL-15	Astrocytic (glioblastoma multiforme positive for glial fibrillary acidic protein marker)	2+	-
MO3.13	Oligodendrocytic (adult oligodendrocyte fused with a rhabdosarcoma)	2+	2+
CHME-5	Microglial (fetal microglia transfected with large T antigen of simian virus 40)	-	-
H4	Neuroglial (ganglioglioma)	2+	1+
SK-N-SH	Neuroblastoma	3+	-

¹ Results obtained from an indirect immunofluorescence assay and an infectious-virus titer assay. -: non-infectable or no persistence after fifth passage; +: < 10% of cells infected; 2+: between 10 and 50% of cells infected; 3+ > 50% of cells infected.

ARTICLE II Table 3: Characterization of sequence changes detected in the S1 region of the surface glycoprotein during persistent HCoV-229E infection

Cell line	Infection	Point mutation ¹	Codon change	Amino acid change
L-132, H4 and MO3.13	Acute and persistent	727 ^{1,2}	TGT -> TTT	C -> F
L-132	Persistent (passage 42)	571 ¹	ACT -> ATT	T -> I
H4	Persistent (passage 48)			
MO3.13	Persistent (passage 40)	571 ¹ 592 ¹	ACT -> ATT GCA -> GTA	T -> I A -> V

¹ reference 55

² Hays Accession no. Y09923; ATCC strain

CHAPITRE 3

NEUROINVASION ET NEUROTROPISME DES CORONAVIRUS HUMAINS ET LIEN POSSIBLE AVEC LA SCLÉROSE EN PLAQUES

La présence préférentielle de coronavirus a été précédemment démontrée dans les cerveaux de patients atteints de sclérose en plaques. Ces observations ont été effectuées à partir d'un nombre restreint d'échantillons. Une étude à plus grande échelle est nécessaire pour évaluer l'importance de la présence des HCoV dans des cerveaux humains. L'utilisation d'échantillons provenant de patients atteints de sclérose en plaques, d'autres maladies neurologiques et neurologiquement sains permet de vérifier toute association préférentielle possible. De plus, l'examen de cerveaux humains quant à la présence des HCoV permet d'aborder le neurotropisme de ces virus. Dans ce troisième chapitre, l'évaluation du potentiel neuroinvasif et neurotrope des HCoV est décrite. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article qui a été soumis pour publication.

Résumé article 3

Les coronavirus humains causent des rhumes. Plusieurs données expérimentales suggèrent que ces virus puissent être neurotropes chez l'humain comme les coronavirus murins peuvent l'être chez les rongeurs. Des coronavirus semblables aux coronavirus murins et des HCoV ont été détectés, dans des cerveaux humains, avec une association préférentielle avec la sclérose en plaques, une maladie inflammatoire du SNC. En accord avec ce potentiel neurotropisme, nous avons déjà démontré la susceptibilité de cultures primaires humaines d'astrocytes et de microglies à une infection par les HCoV. De plus, des lignées immortalisées de neurones, d'oligodendrocytes, de microglies et d'astrocytes sont aussi susceptibles à une infection par ces virus. Dans le but de fournir des preuves expérimentales pour le neurotropisme de ces virus et de son lien possible avec la sclérose en plaques, nous avons recherché et caractérisé la présence d'ARN de HCoV dans un grand nombre

d'échantillons de cerveaux humains obtenus de cinq banques de cerveaux. Nous avons utilisé des conditions très strictes de RT-PCR, révélé par une hybridation de type Southern, en utilisant deux paires d'amorces distinctes menant à l'amplification de segments du gène N des deux souches de HCoV : OC43 et 229E. Ces expériences ont été effectuées sur des échantillons codés provenant de 90 donneurs avec diverses maladies neurologiques (39 patients atteints de sclérose en plaques, 26 patients atteints d'autres maladies neurologiques) ou des témoins normaux (25 patients). Nous avons observé que 44 % des donneurs ont été testés positifs pour la souche 229E et 23 % pour la souche OC43. Une prévalence plus élevée et statistiquement significative a été observée chez les patients atteints de sclérose en plaques (14/39) en comparaison avec des témoins (7/51) pour le HCoV-OC43. Toutefois, la souche 229E a été détectée dans tous les groupes sans différence statistique. Le séquençage des amplicons du gène N a révélé des mutations ponctuelles pour la souche OC43. Certaines de ces mutations ont été détectées dans différents cerveaux, mais jamais dans les virus de laboratoire. Des expériences d'hybridation *in situ* ont confirmé la présence d'ARN coronaviral dans les tissus de cerveaux. La présence de HCoV dans des cerveaux humains suggère une neuroinvasion et un neurotropisme pour ces pathogènes respiratoires. Des études supplémentaires seront nécessaires pour distinguer entre une présence virale opportune et pathologique dans le SNC.

ARTICLE III

NEUROINVASION OF HUMAN RESPIRATORY CORONAVIRUSES
AND ASSOCIATION WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Nathalie Arbour *, Robert Day‡, Jia Newcombe§, and Pierre J. Talbot*

*Laboratory of neuroimmunovirology, Human Health Research Center, INRS-Armand Frappier Institute, University of Quebec, Laval, Québec, CANADA H7V 1B7

‡Department of Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, CANADA J1H 5N4

§NeuroResource, Institute of Neurology, University of London, London WC1N 1PJ, ENGLAND

Soumis pour publication en avril 1999

SUMMARY

Human coronaviruses (HCoV) cause common colds but can also infect neural cell cultures. To provide definitive experimental evidence for the neurotropism of HCoV and its possible association with multiple sclerosis (MS), we have performed an extensive search and characterization of HCoV RNA in a large panel of human brain autopsy samples from five brain banks. Very stringent RT-PCR with two primer pairs for both viral strains (229E and OC43), combined with Southern hybridization, were performed on samples from 90 coded donors with various neurological diseases (39 MS, 26 other neurological diseases) or normal controls (25 patients). We report that 44% (40/90) of donors were positive for 229E and 23% (21/90) for OC43. A statistically significant higher prevalence of OC43 was observed in MS (35.9%; 14/39) versus controls (13.7%; 7/51). Sequencing of N gene amplicons revealed point mutations in OC43, some consistently found in three MS brains and one normal control but never observed in laboratory viruses. *In situ* hybridization confirmed the presence of viral RNA in brain parenchyma outside blood vessels. The presence of HCoV in human brains is consistent with neuroinvasion by these respiratory pathogens. Further studies are needed to distinguish between opportunistic or disease-associated presence in human brains.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a central nervous system (CNS) disease characterized by patches of demyelination and infiltration of inflammatory cells (1). The etiology of this disabling disease has not yet been determined but appears to be multifactorial and involve both genetic factors such as genes encoding human leukocyte antigens, T cell receptors, and myelin basic protein (2, 3, 4), and environmental factors such as viruses (5). At least four human demyelinating diseases have a known viral etiology: subacute sclerosing panencephalitis as a late complication of measles virus infection of childhood (6), progressive multifocal leukoencephalopathy caused by the JC papovavirus (7), encephalopathy and myelopathy (neuro-AIDS) caused by human immunodeficiency virus (8), and human T-lymphotropic virus-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (9). Over the last decades, several viruses have been associated with MS, based on detection of virions, viral nucleic acids or viral proteins in CNS, or the presence of anti-viral antibodies in serum and/or cerebrospinal fluid. A confirmed association with MS is awaited but may involve more than one virus. Recent observations with human herpes virus-6 have sparked renewed interest in a viral etiology of MS. Detection of antigens of this virus was reported in oligodendrocytes of MS patients and not controls (10). Moreover, anti-viral IgM were detected in sera from MS patients (11). However, these observations have not been confirmed by other groups (12, 13, 14).

Several studies have associated human coronaviruses (HCoV) with MS. Coronavirus-like particles were detected in autopsied brain tissue from an MS patient (15). Two coronaviruses that are molecularly related to murine neurotropic coronaviruses were isolated from brain material obtained at autopsy from two MS patients (16). Intrathecal anti-HCoV antibody synthesis indicative of a CNS infection was reported in MS (17) and in Parkinson's disease patients (18). HCoV RNA was detected in MS brains (19, 20) and in cerebrospinal fluid of MS and other neurological disease (OND) patients (21). Coronaviral antigens were also detected in MS brains (20). Moreover, we have shown that HCoV can infect human astrocytes and microglia in primary

cultures (22), and can acutely and persistently infect immortalized human glial cells (23, 24, 25, 26). Thus, accumulating evidence suggests that these viruses, first isolated as pathogens of the respiratory tract (27, 28) and now associated with up to one-third of human common colds (29), might be neurotropic, neuroinvasive and neurovirulent in humans, as is the case for their murine counterpart, the coronavirus 'mouse hepatitis virus' (MHV). Neurotropic viruses have the ability to infect peripheral nervous tissues or specific CNS loci (30, 31), while neuroinvasive viruses have the ability to invade the CNS from peripheral sites, and neurovirulence refers to the ability of viruses to cause CNS injury to a degree that is clinically recognizable (30). Interestingly, upper respiratory infections of viral origin were shown to be an important trigger of MS attacks (32, 33, 34). Moreover, coronavirus seasonal patterns fit the observed occurrence of MS exacerbations (34).

Of the three animal models studied for elucidating the complex pathogenesis of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), Theiler's murine encephalomyelitis virus and MHV-induced demyelinating disease, the latter involves coronaviruses. As for MS, the pathogenesis of MHV disease is multifactorial (35). Its outcome is influenced by genetics of the host and virus, dose and route of inoculation, host age and immunological status at the time of infection (36, 37). Neurotropic strains of MHV could invade the CNS following an intranasal inoculation in mice (38, 39, 40), and could also gain access to the CNS via the hematogenous and/or lymphatic systems in mice (41) and in primates (42). Given that HCoV are respiratory viruses, they might also invade the CNS following a primary infection of the upper respiratory tract. Moreover, both known strains of HCoV, OC43 and 229E, can infect macrophages (43, 44), and 229E can infect human brain endothelial cells (45) as alternative routes for CNS invasion.

Striking similarities exist between MS and MHV-induced demyelination (46): 1- *Genetic susceptibility*: Genetic predispositions are also involved in MS (2,3,4). In mice, the genetic background, especially immune responses of the host, determine the outcome of MHV-induced disease (36, 37); 2- *Cyclic periods*

of exacerbations followed by remissions are observed in numerous MS patients. Rodents infected by neurotropic MHV strains go through different stages of acute and chronic disease, accompanied by demyelination and remyelination, and remissions and relapses (37); 3- *Neuropathology*. In both MS patients (1) and MHV-induced disease in mice (47), white matter lesions with myelin stripping and mononuclear infiltration are observed in brain and spinal cord. Soluble immune mediators (TNF- α , IFN- γ , IL-1 and nitric oxide synthase-2) are detected at these lesions and probably contribute to pathology observed in MS plaques (48, 49, 50) and MHV-infected mice (51, 52). 4. *Presence of autoreactive T lymphocytes*. Several laboratories have reported T cells reactive against diverse myelin components (53, 54, 55, 56) that are in an active state especially and specifically in MS patients compared to healthy controls (56, 57, 58, 59, 60). Myelin-reactive lymphocytes that could transfer EAE to naive rats were activated after MHV infection (61). Emergence of autoreactive T lymphocytes has also been observed after a coronavirus infection of mice (62). These results suggest that a coronavirus CNS infection could initiate an autoimmune response that may have pathological significance. Indeed, cross-reactive T cell lines recognizing both myelin basic protein and HCoV-229E were preferentially obtained from MS patients (63) and we have recently been able to demonstrate clonal T cell reactivity against both HCoV and two myelin proteins in MS patients (64).

Given these observations in animal models and in humans, demonstration and characterization of the neurotropism, neuroinvasion and neurovirulence of HCoV is necessary to elucidate the possible link between these ubiquitous viruses and CNS pathologies such as MS. In order to characterize the possible *in vivo* neurotropism of HCoV in humans we have analyzed human brain samples for the presence of both known strains, OC43 and 229E. We have looked for the presence of HCoV RNA within the CNS of a large panel of donors: MS, other neurological diseases (OND) and healthy patients. Very stringent RT-PCR coupled to Southern hybridization was performed. We have detected HCoV RNA in a large proportion of donors. A preferential association

of the presence of viral strain OC43 with MS was observed. Moreover, we detected viral RNA by Northern hybridization and *in situ* hybridization. Our results provide a strong indication for the neurotropism and neuroinvasion of these respiratory pathogens.

MATERIAL AND METHODS

Brain samples.

Frozen brain samples from MS patients and control donors were received (in a coded fashion; the nature of samples were unknown to us prior to compilation of results) from the following brain banks: The Multiple Sclerosis Society Tissue Bank, Institute of Neurology, University of London, London (Dr. Jia Newcombe); Laboratoire de neuropathologie Raymond Escourolle, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France (Drs. Jean-Jacques Hauw and Danielle Seilhean); Rocky Mountain Multiple Sclerosis Center Tissue Bank, Englewood, CO, U.S.A. (Drs. Catalin Butunoi and Ronald S. Murray); Multiple Sclerosis Human Neurospecimen Bank, West Los Angeles VA Medical Center, Los Angeles, CA, U.S.A. (Drs. Virginia Sanders and Wallace W. Tourtellotte); Douglas Hospital Research Center Brain Bank, McGill University, Verdun, Québec, Canada (Ms. Danielle Cécyre, Mr. Yvan Dumont and Dr. Rémi Quirion). All samples were stored in a physically remote -70°C freezer.

Preparation of RNA, Reverse-Transcription, Polymerase Chain Reaction, and Southern hybridization

The person performing pre-PCR preparation had not been in contact with post-PCR laboratory that day. To extract total cellular RNA from human brains (in a physically remote laminar flow hood in a pre-PCR laboratory), tissues were lysed with GIT buffer (4 M guanidine isothiocyanate, 2.5 mM Na acetate, 12 mM β -mercaptoethanol). Lysates were passed through a 26G needle at least six times and then layered onto a cesium chloride cushion (5.7 M cesium chloride, 2.5 mM Na acetate) for a 12 to 20 h centrifugation at 150,000 x g. Supernatant was removed and the RNA pellet resuspended in sterile distilled and deionized H₂O. The pairs of primers used for amplification of the RNA of HCoV-OC43, HCoV-229E, and myelin basic protein (internal gene control) are described in Table 1. For every amplification step, positive displacement pipettes were used to avoid carry-over contamination. Forty pmol of the inverse-complementary

primer was incubated with total cellular RNA at 65°C for 5 min to denature RNA, followed by a slow cool down to 37°C for annealing. Reverse transcription with Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (38 U Pharmacia, Baie d'Urfé, Québec, Canada) was performed at 42°C for 90 min in the presence of 48-75 U of RNA Guard® (Pharmacia), 0.4 mM of each dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; Pharmacia), 1X Reverse Transcriptase buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 62.5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT). Optimal conditions for PCR were determined on cDNA transcribed from positive control RNAs. For PCR, one fifth of the synthesized cDNA was incubated in the presence of either 20 pmol (O1/O3, O7/O9, and M1/M3 primer pairs) or 50 pmol (E7/E9, and E11/ E13 primer pairs) of the sense and antisense primers, with either 2.0 mM (E7/E9, and O7/O9 primer pairs), 2.5 mM (O1/ O3, and M1/M3 primer pairs) or 4.0 mM (E11/E13 primer pair) MgCl₂ (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada), 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl) (Roche Diagnostics), dNTP (0.2mM dATP, dCTP, dGTP and 0.6mM dUTP; Roche Diagnostics) and 2U uracil DNA glycosylase, (UNG; Roche Diagnostics) at 20°C for 10 min (UNG condition reaction, which eliminates any potential contamination from a previous PCR) and then 94°C for 10 min (inactivation of UNG and denaturation of DNA) and finally at 60°C for another 5 min (annealing). After the addition of Taq DNA polymerase (2.5 U; Roche Diagnostics) 30 cycles of 2 min at 72°C, 1 min at 94°C and 2 min at 60°C were performed with a final elongation step of 10 min at 72°C. DNA amplicons were separated by electrophoresis in a 1.5% (wt/vol) SeaKem agarose (FMC, Rockland, Maine, USA) gel with 1 µg/ml ethidium bromide (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) using TAE (40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA) as solvent and running buffer. After migration, the gel was denatured for 30 min in a solution of 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH and then neutralized by two 15 min rinses with 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA. The gel was transferred overnight to a positively charged nylon membrane (Hybond-N+, Amersham, Oakville, Ontario, Canada) by capillary action in 20x SSC buffer (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) at room temperature. The membrane was rinsed with 2X SSC and the DNA fixed with ultraviolet light for 5 min. The membrane was incubated with a pre-

hybridization solution [50% (vol/vol) formamide, 6x SSC, 5x Denhardt's (0.1% (wt/vol) BSA, 0.1% (wt/vol) Ficoll, 0.1% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone), 0.5% (wt/vol) SDS, 100 µg/ml of sheared denatured salmon sperm DNA] in a rotary hybridization oven at 42°C for at least 4 h. The solution was then replaced by a fresh pre-hybridization solution containing 20 pmol of ³²P-labeled internal oligonucleotide (O2, O8, E8, E12 or M2: see Table 1) having a specific activity > 1 x 10⁷ cpm/µg (69). Hybridization was performed at 42°C for at least 12 h (69). The membrane was then washed twice for 15 min with 2x SSC and once for 30 min with 0.1% (wt/vol) SDS, 2x SSC at 42°C, then twice for 15 min with 1x SSC, 0.1% (wt/vol) SDS and once for 10 min with 0.1x SSC, 0.1% (wt/vol) SDS at 52°C, and exposed to a Kodak X-OMAT autoradiography film for 2 to 48 h at -70°C (69). The sensitivity of the RT-PCR-Southern test was estimated by preparing *in vitro* transcribed RNA from N gene cloned in pGEM-T vector as described below (section on preparation of riboprobe), purified from agarose gel, quantified by spectrometry measurements and then diluted and used to perform the RT-PCR Southern in the same conditions used with brain RNA.

Nested PCR, cloning and sequencing of amplicons

PCR products giving a positive signal in Southern blotting were used for nested PCR to allow sequencing of specific amplicons. Ten microliters of a 1/100 dilution of the first PCR product was incubated with 50 pmol (O1.1/O3.1, and E7.1/E9.1 primer pairs) of sense and antisense primers, 0.4mM of each dNTP (Roche Diagnostics), 1X *Taq* buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl) (Roche Diagnostics) and 2.5 mM MgCl₂ for 5 min at 94°C and then 5 min at 60°C. *Taq* DNA polymerase (2.5U; Roche Diagnostics) was then added and tubes were incubated for 30 cycles of 2 min at 72°C, 1 min at 94°C and 2 min at 60°C with a final elongation step of 10 min at 72°C. PCR products were cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and XL-1 blue bacteria and sequenced with an automated sequencer (ALF, Pharmacia) in both directions, and for at least three clones for each cloning reaction. Nucleotide sequences and predicted amino sequences were analyzed with

Geneworks® software version 2.5.1 for Macintosh (Oxford Molecular Ltd. Oxford, UK).

Preparation of riboprobes

RNA from infected cells (HRT-18 cells infected with HCoV-OC43 and L-132 cells infected with HCoV-229E) was used to amplify a long fragment of the nucleocapsid protein coding RNA of each viral strain with primers described in Table 1. Reverse transcription was performed as described above, starting with 5 µg of RNA. For PCR, one tenth of the cDNA was incubated with 20 pmol of sense and antisense primers, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP, 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl) (Roche Diagnostics), at 94°C for 5 min and then at 60°C for 5 min. After addition of Taq DNA polymerase (2.5U, Roche Diagnostics), tubes were incubated for 30 cycles: 2 min 72°C, 1 min 94°C, 2 min 60°C, followed by an elongation step of 10 min at 72°C. PCR products were cloned into the pGEM-T vector (Promega, distributed by Fisher Scientific Ltd. Nepean, Ontario, Canada) and then partially sequenced with an automated sequencer (ALF, Pharmacia) in both directions to verify the integrity of the sequence as well as its orientation. Plasmids were then linearized, and 1-10 µg of DNA were transcribed into RNA for 2 h at 37°C in the presence of SP6 or T7 RNA polymerase (20 U; Roche Diagnostics), 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 6 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 4 mM spermidine, RNase inhibitor (40 U; Roche Diagnostics), 0.5mM of ATP, CTP, and GTP, and 170 µCi of [³²P]UTP (800 Ci/mmol, 20 mCi/ml; Amersham) for the riboprobes to be used for Northern hybridization, or 0.5mM of ATP and GTP, and 250 µCi of [³⁵S]UTP and [³⁵S]CTP (10 mCi/ml, >1000Ci/mmol; Amersham) for riboprobes to be used for *in situ* hybridization. Plasmid DNA was digested with RNase-free DNase (10 U; Roche Diagnostics) in the presence of 25 µg of yeast tRNA, 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 4 mM spermidine, RNase inhibitor (40 U; Roche-Diagnostics) for 15 min at 37°C. A phenol-chloroform extraction was performed and the upper phase was transferred onto a G-50 Sephadex column to eliminate non-incorporated radiolabeled nucleotides. For *in situ* hybridization, probes were hydrolyzed in the presence of 40 mM NaHCO₃, 60 mM Na₂CO₃ for

15 min at 60°C, followed by a neutralization and precipitation step with 91 mM Na acetate, 0.5% acetic acid, 15 µg yeast tRNA, 608 mM ammonium acetate to which was added 2.5 volumes of cold ethanol. The RNA pellet was resuspended in distilled and deionized H₂O. Probes labeled with ³⁵S were maintained under reducing conditions by adding a final concentration of 10 mM DTT.

For Northern hybridization, ³²P-labeled riboprobes were diluted in the hybridization buffer [5% (wt/vol) SDS, 400 mM NaPO₄, 1 mM EDTA, 1 mg/ml BSA and 50% (vol/vol) formamide]. For *in situ* hybridization, ³⁵S-labeled riboprobes were diluted in the ISH buffer [75% (vol/vol) formamide, 3x SSC, 0.1x Denhardt's, 200 µg/ml yeast tRNA, 50 mM NaPO₄ pH 7.4, 0.1 g/ml dextran sulfate], at a concentration of 3.3 X 10⁴ cpm/µl.

Northern hybridization

Five µg of denatured total RNA were separated by electrophoresis on a 1.5% (w/v) agarose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 6% (vol/vol) formaldehyde gel. Bands were transferred overnight to a positively charged nylon membrane (Nytran, Xymotech, Mont-Royal, Québec, Canada) by capillary action in 10x SSC buffer (1.5 M NaCl, 0.17 M sodium citrate, pH 7.0) at room temperature. The membrane was dried at 65°C for 1 h and then RNA was fixed with ultraviolet light for 45 s. The membrane was stained with methylene blue to verify adequate transfer. The membrane was then destained in a 0.1X SSC, 1% (wt/vol) SDS bath prior to pre-hybridization [pre-hybridization buffer: 5% (wt/vol) SDS, 400 mM NaPO₄, 1 mM EDTA, 1 mg/ml BSA and 50% (vol/vol) formamide], for at least 2 h at 60°C. Hybridization was performed overnight at 60°C with ³²P-labeled riboprobes. Blots were washed for 20 min, then twice for 1 h in 0.1x SSC, 0.1% (wt/vol) SDS and 1 mM EDTA at 70°C, and exposed to Kodak X-OMAT autoradiography film for 10 min to 48 h at room temperature or -70°C (70).

In situ hybridization

This was performed with a slight modification of a published protocol (71). Tissue sections of 5-10 µm were fixed in 4% (vol/vol) phosphate-buffered paraformaldehyde solution, for 1 h at room temperature and then washed twice in PBS, pH 7.4. A proteinase K treatment of 10 min at 37°C was performed (0.1 µg/ml) followed by the following washes: 5 min in distilled and deionized H₂O, 5 min in 0.1 M triethanolamine, 10 min in 0.1M triethanolamine containing 0.25% (vol/vol) acetic anhydride and then 5 min in 2x SSC, prior to dehydration in graded ethanol baths [50% to 95% (vol/vol)]. A ³⁵S-labeled (1×10^6 cpm) riboprobe was added onto each tissue for an overnight incubation at 55°C in a humid chamber with 75% (vol/vol) formamide. Sections were washed with 2x SSC to remove excess hybridization buffer and then treated for 45 min at 37°C with RNase A (40 µg/ml) and finally the following washes: 10 min at room temperature in 2x SSC, 1x SSC, 0.5x SSC and then 45 min at 60°C in 0.1x SSC. Sections were dehydrated in graded ethanol [50%, to 100%(vol/vol)], prior to coating with K-5 nuclear emulsion (Ilford), exposition for 1 to 2 months at 4°C and then development with D19 (Kodak) for 2 min and fixation for 4 min with sodium thiosulfate (30% wt/vol). Tissues were dehydrated in graded ethanol baths, and counterstained with cresyl violet. The cresyl violet counterstain performed after the hybridization procedure does not result in a typical Nissl staining. Neuron nuclei are weakly stained and are large and pale, while glial cell nuclei stained strong purple-blue and are smaller in size (70). Slides were observed with a Eclipse 800 Nikon microscope and a Darklite illuminator (Micro Video Instruments Inc. Avon, MA, USA). A positive signal was characterized by a significant number of silver grains developed over cells compared with background.

RESULTS

Detection of human coronavirus RNA in human brains

We (19) and others (20) have previously shown that HCoV or murine-like coronavirus RNA could be detected in human brain samples, with an apparent preferential association with MS. However, the establishment of the statistical significance of these observations justified the requirement for a larger number of patients. Therefore, we have verified the presence of HCoV RNA within a large panel of human brain autopsy samples. We have looked for viral RNA and not viral protein or infectious virions since it has been established that viral proteins and virions could not be detected for periods as long as could viral RNA during persistent coronavirus infections of murine CNS (72). We hypothesized that it could also be the case in humans. Indeed, available techniques to detect nucleic acids are more sensitive than the ones easily applicable for protein detection. We received coded brain samples from five different brain banks. These samples were treated blindly and only when experiments were completed were the codes broken to ensure complete objectivity in the interpretation of results. Since coronaviruses are RNA viruses, we first performed an RNA extraction and then an amplification by RT-PCR. We amplified segments of the nucleocapsid protein gene of HCoV since this RNA is expressed in larger amounts during a viral infection and also because its sequence is present on every subgenomic and genomic viral RNAs (73). For each viral strain, two distinct regions of the nucleocapsid protein gene were amplified. In order to increase both sensitivity and specificity of our assay, a Southern hybridization was performed on PCR amplicons using a radiolabeled oligonucleotide homologous to an internal sequence of the amplicon. The suitability of RNA for RT-PCR amplification was verified by a RT-PCR specific for an internal control, myelin basic protein (MBP) RNA. All primers used for these amplifications are described in Table 1. We worked in very stringent conditions in order to avoid any contamination from laboratory viruses or previous PCR amplifications (74). Positive displacement pipettes and the UNG carry-over prevention system were used. All steps of RNA extraction and pre-PCR were

performed in a virus-free room by a person who had not been in post-PCR areas that day. RNA extracted from infected cells (HRT-18 cells infected by HCoV-OC43 and L-132 cells infected by HCoV-229E) were used as positive controls in our RT-PCR. These control RNAs were never brought into our virus-free room used for the preparation of our samples. A negative control consisting of master mix solution without added RNA or cDNA was included in each reaction of reverse-transcription and polymerase chain reaction, respectively, and put also on each agarose gel that was eventually transferred onto a nylon membrane and hybridized with a radiolabeled oligonucleotide. An experiment was considered successful and compiled into our final results when both negative controls (RT and PCR) did not show any signal and also when the positive control showed a very strong hybridization signal. Moreover, an RNA had to be positive for the MBP specific RT-PCR to be considered in the final analysis. A brain donor was considered positive for one viral strain only in the case that both RT-PCR primer pairs for that specific strain showed a positive signal on the Southern blot at the expected size or RNA from two distinct extractions amplified by the same primer pair yielded positive Southern hybridization signals. Using *in vitro* transcribed RNA, the sensitivity of our RT-PCR/Southern hybridization test was estimated at 10^2 copies of viral nucleocapsid protein gene (data not shown). Examples of Southern hybridization results are presented in Figure 1: panel A for HCoV-OC43 and panel B for HCoV-229E. Signals obtained from our positive controls were very strong compared to signals obtained from human brain RNA (Fig. 1). The intensity varied amongst donors from nothing to a relatively strong band. We do not consider possible that the viral sequences detected by RT-PCR could have been DNA since the MBP-specific RT-PCR encompassed different exons. A DNA contamination would have been detected by a larger PCR product than expected without introns, which we have never experienced with the numerous samples we have handled.

Results obtained for each donor for both viral strains and information concerning each donor are presented in Table 2 for MS patients and Table 3 for non-MS patients. More brain samples were obtained from men than women.

The average age of MS patients (49-year-old) at death was lower than for non-MS patients (70-year-old). The time post-death prior to brain removal varied between samples but did not influence the suitability of RNA for amplification by RT-PCR since we were able to amplify MBP RNA for at least one block from every patient from which a sample was obtained. Description of the histological localization of positive signals for viral detection are presented by donors in Table 4, when this information was available from brain banks. A positive signal for HCoV detection was often observed in more than one brain tissue block obtained from the same patient. Signals were observed in plaque samples but also in grey and white matter from both controls and MS patients. It is important to mention that, before breaking the code, we did not know which blocks were from the same donor. There was no apparent correlation between parts of the brain used for HCoV detection and results obtained. There was no statistically significant difference between results obtained in MS patients from Europe versus North America.

A compilation of results is presented in Table 5. Overall, forty-eight percent of all donors were positive for either one or both HCoV. Considering that we have used on average a 200 mg tissue sample per block, and that a human brain weighs between 750 g and 1 kg, we used less than 1/1000th of the total brain. Given these considerations, we conclude that the proportion of human brain samples which were positive for one or both HCoV (48% of all) was relatively large. We have performed statistical analysis of our results. The 229E strain was present in all groups and did not show a preferential association for women versus men, MS versus OND or normal controls. However, the OC43 strain was preferentially present in MS patients compared to OND ($p = 0.0169$) or compared to all controls ($p = 0.0137$) as calculated by a Chi square and a Fisher's exact tests, respectively. Normal controls did not show a statistically different proportion of HCoV-OC43 positive brains compared to MS.

Molecular adaptation of viral strains in human brains

To ascertain the coronaviral origin and also to verify the possible molecular adaptation of these viruses in human brain samples compared to laboratory viruses we have sequenced HCoV amplicons from human brains. It has been shown for the murine counterpart of HCoV, MHV, that point mutations and deletions arise during a persistent *in vivo* infection of the murine CNS (75, 76). Moreover, certain point mutations were mainly observed in animals experiencing chronic demyelinating disease and rarely in asymptomatic animals (77). The viral nucleocapsid protein was previously shown to have mutated in the CNS of the viral host (76). Since PCR products were most of the time not detectable on an agarose gel, a nested PCR was performed on amplicons that were positive for the first round as detected by Southern hybridization, in order to obtain enough material for cloning and sequencing. Nested PCR was performed with primer pairs described in Table 1; O1.1 and O3.1 were used to amplify first round PCR obtained with O1 and O3 primers for OC43 strain, while E7.1 and E9.1 were used to amplify first round PCR obtained with E7 and E9 for 229E strain. Nested PCR amplicons were cloned and sequenced in both directions. Results were confirmed by reading both strands to reduce errors and by examining three clones for each brain sample. We compared sequences obtained to already published sequences for each viral strain. We did not observe point mutations or deletions among the human brain amplicons for the 229E strain compared to viral amplicons obtained from our positive control (RNA from infected cells). Two points mutations for the OC43 strain, one leading to an amino acid change, were observed in four different brains: one normal control and three MS patients. Moreover, an additional point mutation was observed in one of the MS brains (Table 6). These mutations were never observed in any positive controls. We conclude that these point mutations were probably representative of viral RNA present in human brains. Indeed, these changes suggest that HCoV could have adapted to the CNS compared to the laboratory viruses, which we obtained from the American Type Culture Collection, and which were initially isolated from the upper respiratory tract. Moreover, relative consistency of viral sequence for the N gene strongly

suggests that the amplified RNA from human brains was really from HCoV and not from an unknown source.

Detection of viral RNA in human brains by Northern hybridization

In order to evaluate the amount of viral RNA, and whether a sufficient amount was detectable prior to attempting *in situ* hybridization experiments, we performed Northern hybridization on RNA taken from some human brains. Representative results obtained are shown in Figure 2. Five micrograms of total RNA was loaded in each lane, migrated, transferred and then hybridized with a radiolabeled riboprobe specific for the nucleocapsid gene. The positive control, an RNA obtained from virus-infected cells, was loaded in the first well. Expected viral subgenomic RNAs, all of which retain the sequence of the N gene, were detected. As expected (73), the subgenomic viral RNA encoding the N gene was expressed in highest amounts in infected cells. Lanes 2, 3 and 4 represent hybridization to three different brain RNAs. We were able to detect RNA corresponding to the N gene of the OC43 strain on two of three RNA preparations. For the 229E strain, even though the positive control showed a strong signal for all subgenomic viral RNAs, we did not detect any signal in the human brain RNA tested (data not shown). Thus, viral RNA could be detected in human brains even without an amplification by RT-PCR. It suggested that viral RNA may be present in sufficient amount to be detected by *in situ* hybridization. This technique is less sensitive than RT-PCR coupled to Southern hybridization but has a sensitivity comparable to Northern blotting. *In situ* hybridization could even be more sensitive than Northern blotting when RNA are localized in a small subpopulation of the tissue (78).

Localization of viral RNA by *in situ* hybridization

We performed *in situ* hybridization at a high temperature (55°C) in order to avoid non-specific hybridization. We also performed very stringent washes (45 min in 0.1xSSC, 0.1% SDS at 60°C) on our slides to eliminate non-specific hybridization. Moreover, we used the same probe as for the Northern blot showing specific hybridization to viral RNA. When we performed *in situ*

hybridization on immortalized human neuronal cells, radiolabeled riboprobe signals were observed only on infected cells and not on non-infected cells (M. Viau, N. Arbour and P.J. Talbot 1999, unpublished observations). In order to verify the localization of viral RNA in the CNS either in blood vessels or in the brain parenchyma, an essential study to confirm the suspected neurotropism, we performed *in situ* hybridization on human brain sections. Riboprobes for each viral strain were prepared and hybridized onto the slides. These experiments were also performed blindly; we did not know which tissue block was from an MS patient or a normal control, in order to provide absolute objectivity in interpretation of results. Moreover, slides were read blindly and analyzed after reading was performed. At least two slides of the same tissue block had to be positive in order to consider the block positive. We did not observe any signal for the 229E strain, most likely because the amount of viral RNA was not sufficient for detection by this technique. Indeed, we did not detect HCoV-229E RNA in human brains by Northern blot, corroborating these *in situ* hybridization results (data not shown). We were able to detect positive signals for the OC43 strain on two blocks from one MS patient and one block from a normal control. We did not detect any signal when slides adjacent to the positive ones were pre-treated with RNase A prior to hybridization. We did not observe any positive signal with the sense probe, suggesting that the negative strand viral RNA was not present in detectable amount. Hybridization of slides just adjacent to the positive ones with the 229E strain riboprobe did not yield any signal. Examples of signals observed are shown in Figure 3. We can observe on dark field pictures that positive signals were really distinct from normal background (panel F). Three to four positive regions were randomly distributed on each positive slide. We often observed that more than one cell was positive in the same region. Signals obtained were never seen in blood vessels or grey matter but only in the white matter parenchyma.

DISCUSSION

Some murine coronaviruses are neurotropic, neuroinvasive and neurovirulent in rodents (35, 37, 38, 40, 79) and in non-human primates (42, 80), inducing in some cases an MS-like demyelinating disease. Our goal is to investigate the possible neurotropism, neuroinvasion and neurovirulence of the related human coronaviruses, which have so far only been definitively associated with respiratory infections, with occasional reports of associations with diarrhea and neurologic diseases, mainly MS (29). In the work presented herein, we have searched for the presence of HCoV RNA in a large number of autopsied brain samples from patients diagnosed with MS, other neurological diseases (OND), and normal controls. RT-PCR coupled to Southern hybridization experiments were used to detect a segment of the nucleocapsid protein gene of both known strains of HCoV: OC43 and 229E. Because we have used extremely stringent conditions, the possibility of a contamination during our RT-PCR experiments was completely eliminated. Viral RNA was present in a surprisingly large number of samples; 48% (44 / 90) of all donors were positive for one or both viral strains. There was no preferential association for the presence of HCoV-229E with a specific diagnosis. However, the OC43 strain was preferentially detected in MS brain samples (14 positive samples out of 39) compared to OND (2 positive samples out of 26) or the overall control group (OND + normal) (7 positive samples out of 51). Since the proportion of normal controls that harbored RNA from this viral strain (5 positive samples out of 25) was not statistically different than for MS patients (14 positive samples out of 39), other studies will be necessary to clearly establish this association beyond any doubt. However, one has to keep in mind that some of the normal controls, who died without any known neurological disease, may have had neurological abnormalities within their CNS, without visible clinical signs, and could have represented undiagnosed patients (81). Although a previous study in our laboratory (19) did not show the presence of HCoV in controls brains (5 normals, 4 Alzheimer's disease, 1 ischemic vascular disease and 1 encephalitis), this could easily be explained by the very small number of patients compared to the present study. Our current results are consistent with

those reported by another group, showing that coronavirus RNA was also present in some non-MS patients: 1 out of 5 OND and 1 out of 16 normal controls (20). In the current study, we detected HCoV-229E RNA in several OND controls (4 Parkinson's patients, 2 Alzheimer's disease, 1 meningoencephalitis, 1 depression, 1 schizophrenia) and normal controls (11 out of 25). HCoV-OC43 RNA was detected in a smaller number of normal controls (5 out of 25) and OND patients (1 schizophrenia, 1 meningo-encephalitis, out of 26) compared to the other viral strain.

Given the fact that most human beings have been in contact with HCoV as respiratory pathogens by the age of five (29), we suggest that the presence of HCoV RNA in brain samples correlates with a persistent infection within the CNS. Indeed, it would be rather surprising that over 40% of the donors were experiencing an acute infection by HCoV leading to its detection within the CNS just prior to their death. Importantly, we have recently shown that HCoV could persist in some immortalized human neural cell lines (23, 24). Others have shown that three MHV-JHM variants that induce very different pathological patterns *in vivo* showed distinct corroborating *in vitro* growth properties on primary cultures of rat glial cells (82). Therefore, we assume that the characterization of HCoV replication *in vitro* (22, 23, 24) is indicative of the neurotropic properties of such viruses *in vivo*, as it is for MHV. Given our *in vitro* observations, we suggest that HCoV could also persist *in vivo*. However, since the blood-brain barrier is damaged in MS patients (1), we cannot rule out the possibility that HCoV-OC43 could establish a persistent infection in the CNS following onset of disease, given the easier access to CNS in MS patients. However, our detection of HCoV RNA in normal brains strongly suggests that these viruses have access to the CNS prior to clinical disease.

Sequencing of PCR amplicons confirmed that positive detection signals had a coronaviral origin and also showed that sequences of amplified nucleocapsid fragments were relatively stable. We did not detect any mutations in the 229E strain compared to the virus used in the laboratory. However, point mutations never observed in laboratory viruses were detected in amplicons of

the OC43 strain; one point mutation was present in only one MS patient and two other point mutations were present in three MS patients and one normal donor. This represents another confirmation that our RT-PCR/Southern hybridization signals are truly specific to brain-expressed viral RNA. Given that point mutations within the HCoV-OC43 amplicons were detected mainly in MS patients and not in OND or in the majority of normal controls, we could speculate that HCoV-OC43 may adapt to the human CNS and in certain cases cause neurological abnormalities, either directly or indirectly. Although we demonstrated, by sequencing coronaviral amplicons from human brains, that the nucleocapsid gene is relatively stable, certain positions might be important in molecular adaptation of these viruses to the CNS. It will be important to sequence the RNA encoding the HCoV S protein since it has been shown to bear important determinants of neurovirulence in the animal model (79, 83). Moreover, we have shown that point mutations and deletions arise during *in vitro* persistent HCoV infection of immortalized neural cells (23, 24). In these studies, we observed that the OC43 strain could persistently infect a larger number of cell lines and also that a greater number of mutations arose during such an infection, suggesting the emergence of viral quasi-species (23). Given our observations in human brains and in immortalized human neural cell lines, we suggest that HCoV-OC43 has the capacity to persistently infect cells in the human CNS and that such infections could lead in some cases to specific molecular adaptation of this virus to the CNS environment.

We have also been able to detect HCoV-OC43 RNA by Northern hybridization, suggesting a relatively important abundance of this viral RNA within the CNS of some patients. *In situ* hybridization experiments were also successfully completed and yielded convincing positive viral RNA signals which were located outside any blood vessels but most probably within the parenchyma of white matter and plaques samples. Importantly, we used stringent conditions for *in situ* hybridization in order to insure that signals detected were due to a high level of complementarity between our probe and the hybridized viral RNA. Others have not been able to detect this virus in tissues from four patients with MS and one patient with a probable diagnosis of

MS (84), although they probably did not study a sufficiently large number of patients. Murray and colleagues have previously reported the detection of viral RNA by *in situ* hybridization in human brain samples in 5 out of 12 MS patients for the HCoV-OC43 strain and 12 out of 12 for the murine strain. They detected positive signals in cells appearing to be foamy macrophages (20). However, their analysis by RT-PCR and *in situ* hybridization detected murine-like coronavirus. In fact they obtained more results with a murine than with a human coronavirus probe. These authors concluded that the 3'-end of coronavirus RNAs they detected in brain were more MHV-like. They did not detect the 229E strain in any brain tested and neither the OC43 strain nor the murine one in controls (20). Our study was designed to specifically detect the human OC43 coronavirus and it would be surprising to have detected murine-like sequences, since amplicons obtained by RT-PCR were either identical or very closely related to HCoV-OC43. *In situ* hybridization experiments confirmed that HCoV-OC43 could be neuroinvasive and found in human brain parenchyma. Two tissue blocks from one MS patient (patient number 7) representing two plaque areas were positive for HCoV-OC43 by *in situ* hybridization and also by RT-PCR/Southern hybridization. Results using different corroborating techniques presented herein strongly suggest that HCoV-OC43 is neuroinvasive in humans. This represents the first time that detection of HCoV in humans is associated with sequencing of amplicons to prove viral origin of the positive signal.

In animal models of coronavirus infections using MHV, the presence of virus or viral genome or proteins is not always associated with pathological alterations detectable by clinical symptoms (85). Indeed, the JHM strain of MHV can remain in a latent state for prolonged periods without any apparent neurological disease (86). On the other hand, a persistent coronavirus infection could provoke a chronic demyelination in genetically predisposed mice. The demyelination observed in MHV-JHM-infected mice was reported to be mediated by immune mechanisms (52, 87). In fact viral clearance from the CNS and demyelination were not mediated by the same immune mechanisms (88). Demyelination was observed in MHV-infected animals even when viral antigen

and RNA were detectable only in a small proportion of glial cells and not in dying oligodendrocytes (89). By analogy, it is also possible that the outcome of a coronavirus infection in human CNS could depend on immune responses involved in demyelination or clearance of virus from the CNS. We suggest that genetic factors of the host as well as genetics of viruses (36, 37), could determine the consequence of a persistent presence of HCoV RNA in human CNS and explain the development of disease in only some individuals. We are currently also investigating the possibility that viral RNA could be localized in different regions or in different cell types, or in a different persistent state, latent or chronic, in MS versus other patients and that this histological localization could be related to disease development. Nevertheless, our experimental data strongly suggest that HCoV RNA frequently persists in human brains. Even though the possible pathological effects of such presence in the CNS are still unknown, investigations should be pursued given observations in animal models of neurological disease and the relevance of coronaviruses in inducing MS-like disease in laboratory animals.

It has been previously shown that the presence of viruses in the CNS does not necessarily correlate with disease. It seems that factors other than the presence of such viruses are necessary for the development of pathology. For example, measles virus (90) and JC virus (91) were detected in autopsied brain tissues from patients who had no apparent clinical symptoms. Similar observations could be envisaged for HCoV in human CNS. Human herpes virus 6 (HHV-6) is another virus candidate in MS etiology. It seems to be a commensal virus in human CNS since over 70% of MS and controls were positive by PCR (10). However, HHV-6 antigens were detected in oligodendrocytes of MS patients and not in controls (10). HCoV and HHV-6 may be part of a virus group implicated in MS etiology. Given the large variety of clinical symptoms of this disease, the involvement of several viruses would not be impossible (92, 93).

Our results of RT-PC/Southern hybridization, Northern hybridization and *in situ* hybridization strongly suggest that HCoV are neuroinvasive and could

potentially be neurovirulent in humans as their murine counterparts are in rodents. There are several possible mechanisms by which a virus could induce a demyelinating disease such as MS. It could be due to direct consequences of viral infection such as lytic infection of oligodendrocytes, as is observed for JC virus (7). It could also involve bystander effects of the viral infection, such as expression of cytotoxic molecules by glial cells. It has been shown that during a MHV-induced chronic demyelination in the CNS of mice, several inflammatory molecules or their mRNA are detected such as: IL-1 β , TNF, IL-6, type 2 nitric oxide synthase (51), cytokine-response gene-2, RANTES, macrophage-inflammatory protein-1 β (94). Upregulation of MHC class I mRNA and antigen expression has been observed in MHV-infected animals (95, 96). An enhanced expression of MHC would favor recognition by immune cells because these molecules are usually expressed at very low levels within the CNS. The fact that HCoV-OC43 and MHV belong to the same antigenic group (73) strongly suggests that this human virus could act similarly to its murine counterpart in the CNS of its host. We are currently testing the hypothesis that HCoV could induce the secretion of pro-inflammatory cytokines and molecules during infection of neural cells. It is also possible that viral infection primes immune response to cross-react with myelin antigens that are targeted in MS: myelin basic protein, proteolipid protein, myelin-oligodendrocyte glycoprotein, myelin-associated glycoprotein and heat-shock proteins (98, 99). This hypothesis is being evaluated in our laboratory and we have already shown the presence in MS patients of peripheral cross-reactive T cell clones recognizing both HCoV and a myelin antigen (63, 64). We can hypothesize that the presence of HCoV RNA could lead in certain circumstances to a low level of viral protein production that could be involved in the stimulation of immune responses within the CNS, thereby exacerbating the effect of a coronaviral infection in MS patients.

Our results strongly suggest that HCoV are neurotropic and neuroinvasive in humans, as are their murine counterparts in rodents. Given the observations made in animal models, we suggest that coronavirus neurovirulence may also be possible in genetically predisposed human beings, especially for the OC43 strain. Several host factors in humans could influence the outcome of the HCoV

CNS infection. Animal models may provide clues for experiments to be performed in human systems. Thus, human coronaviruses can be added to the growing list of viruses that persist in the central nervous system, a viral flora of the brain that could have pathological consequences in some individuals but remain subclinical and perhaps even beneficial in others.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant MT-9203 from the Medical Research Council of Canada to P.J.T., who also gratefully acknowledges a senior scholarship award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). N.A. is grateful to the Institut Armand-Frappier as well as to the Multiple Sclerosis Society of Canada for studentship support.

We thank Dr. Weijia Dong and Ms. Xue Wen Yuan for excellent technical assistance. We thank Ms. Julie Edwards and Dr. François Denis for critically reviewing the manuscript.

We are grateful to the following brain banks which have provided us with precious material for our study: Laboratoire de neuropathologie Raymond Escourolle, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France (Drs. Jean-Jacques Hauw and Danielle Seilhean); Rocky Mountain Multiple Sclerosis Center Tissue Bank, Englewood, CO, U.S.A. (Drs. Catalin Butunoi and Ronald S. Murray); Multiple Sclerosis Human Neurospecimen Bank, West Los Angeles VA Medical Center, Los Angeles, CA, U.S.A. (Drs. Virginia Sanders and Wallace W. Tourtellotte); and Douglas Hospital Research Centre Brain Bank, McGill University, Verdun, Québec, Canada (Ms. Danielle Cécyre, Mr. Yvan Dumont and Dr. Rémi Quirion).

BIBLIOGRAPHY

1. ffrench-Constant , C. 1994. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Lancet* 343:271-275.
2. Ebers, G.C., and A.D. Sadovnick. 1994. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J. Neuroimmunol.* 54:1-17.
3. Ebers, G.C., K. Kukay, D.E. Bulman, A.D. Sadovnick, G. Rice, C. Anderson, H. Armstrong, K. Cousin, R.B. Bell, W. Hader, D.W. Paty, S. Hashimoto, J. Oger, P. Duquette, S .Warren, T. Gray, P. O'Connor, A. Nath, A. Auty, L. Metz, G. Francis, J.E. Paulseth, T.J. Murray, W. Pryse-Phillips, R. Nelson, M. Freedman, D. Brunet, J.-P. Bouchard, D. Hinds, and N. Risch. 1996. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat.Genet.* 13: 472-476.
4. Hockertz, M.K., D.W. Paty, and S.S. Beall. 1998. Susceptibility to relapsing-progressive multiple sclerosis is associated with inheritance of genes linked to the variable region of the TcR beta locus: Use of affected family-based controls. *Am. J. Hum. Genet.* 62:373-385.
5. Kurtzke, J.F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:382-427.
6. Liebert, U.G. 1997. Measles virus infections of the central nervous system. *Intervirology* 40:176-184.
7. Weber, T., and E.O. Major. 1997. Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. *Intervirology* 40:98-111.
8. Power, C., J.C. McArthur, A. Nath, K. Wehrly, M. Mayne, J. Nishio, T. Langelier, R.T. Johnson, and B. Chesebro. 1998. Neuronal death induced by brain-derived human immunodeficiency virus type 1envelope genes differs between demented and nondemented AIDS patients. *J. Virol.* 72:9045-9053.
9. Izumo, S., F. Umehara, N. Kashio, R. Kubota, E. Sato, and M. Osame. 1997. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP).*Leukemia* 11 :82-84.

10. Challoner, P.B., K.T. Smith, J.D. Parker, D.L. MacLeod, S.N. Coulter, T.M. Rose, E.R. Schultz, J.L. Bennett, R.L. Garber, M. Chang, P.E. Schad, P.M. Stewart, R.C. Nowinski, J.P. Brown, and G.C. Burmer. 1995. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7440-7444.
11. Soldan, S.S., R. Berti, N. Salem, P. Secchiero, L. Flamand, P.A. Calabresi, M.B. Brennan, H.W. Maloni, H.F. McFarland, H.C. Lin, M. Patnaik, and S. Jacobson. 1997. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat. Med.* 3:1394-1397.
12. Fillet, A.M., P. Lozeron, H. Agut, O. Lyon-Caen, and R. Liblau. 1998. HHV-6 and multiple sclerosis. *Nat. Med.* 4:537.
13. Coates, A.R., and J. Bell. 1998. HHV-6 and multiple sclerosis. *Nat. Med.* 4:537-538
14. Mayne, M., J. Krishnan, L. Metz, A. Nath, A. Auty, B.M. Sahai, and C. Power. Infrequent detection of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 44:391-394
15. Tanaka, R. Y. Iwasaki, and H. Koprowski. 1976. Intracisternal virus-like particles in brain of a multiple sclerosis patient. *J. Neurol. Sci.* 28: 121-126.
16. Burks, J.S., B.L. DeVald, L.D. Jankovsky, and J.C. Gerdes. 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science* 209: 933-934.
17. Salmi, A , B. Ziola, T. Hovi, and M. Reunanan. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* 32:292-295.
18. Fazzini, E., J. Fleming, and S. Fahn. 1992. Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 7:153-158.
19. 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.

20. Murray R.S., B. Brown, D. Brian, and G.F. Cabirac. 1992. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* 31:525-533.
21. 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. *Microbiologica* 2:105-114.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Pearson, J., and C. A. Mims. 1985. Differential susceptibility of cultured neural cells to the human coronavirus OC43. *J. Virol.* 53:1016-1019.
26. Collins, A. R., and O. Sorensen. 1986. Regulation of viral persistence in human glioblastoma and rhabdosarcoma cells infected with coronavirus OC43. *Microb. Pathog.* 1:573-582.
27. Hamre, D., and J.J. Procknow, 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121:190-193.
28. McIntosh, K., W.B. Becker, and R. M. Chanock. 1967. Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58:2268-2273.
29. Myint, S.H. 1994. Human coronaviruses: a brief review. *Rev. Med. Virol.* 4:35-46.

30. Stroop, W.G. 1994. Viral pathogenesis. In *Handbook of neurovirology*. R.R. McKendall and W.G. Stroop, editors. Marcel Dekker Inc. New York, NY. 27-54.
31. Tyler, K.L., and F. Gonzalez-Scarano. 1997. Viral disease of the central nervous system, acute infections. In *Viral pathogenesis*. N. Nathanson, R. Ahmed, F. Gonzalez-Scarano, D.E. Griffin, K.V. Homes, F.A. Murphy and H.L. Robinson, editors. Lippincott-Raven, New York, NY. 837-853.
32. Panitch, H.S. 1994. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 36:S25-8.
33. Andersen, O., P.E. Lygner, T. Bergstrom, M. Andersson, and A. Vahlne. 1993. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J. Neurol.* 240:417-422.
34. Sibley, W.A., C.R. Bamford, and K. Clark. 1985. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1:1313-5.
35. Houtman, J.J., and J.O. Fleming. 1996. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J. Neurovirol.* 2:361-376.
36. Sorensen, O., R. Dugré, D. Percy, and S. Dales. 1982. *In vivo* and *in vitro* models of demyelinating disease: endogenous factors influencing demyelinating disease caused by mouse hepatitis virus in rats and mice. *Infect. Immun.* 37: 1248-1260.
37. Wege H. 1995. Immunopathological aspects of coronavirus infections. *Springer Sem. Immunopathol.* 17:133-148.
38. Lavi, E., P. S. Fishman, M. K. Highkin, S. R. Weiss. 1988. Limbic encephalitis after inhalation of a murine coronavirus. *Lab. Invest.* 58:31-36.
39. Barnett EM, and Perlman S. 1993. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM, *Virology*. 194:185-191.

40. Perlman, S., G. Evans, and A. Afifi. 1990. Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. *J. Exp. Med.* 172:1127-1132.
41. Barthold, S. W., and A. L. Smith. 1992. Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice. *Arch. Virol.* 122:35-44.
42. Cabirac, G.F, K.F. Soike, J.-Y. Zhang, K. Hoel, C. Butunoi, G.-Y. Cai, S. Johnson, and R.S. Murray. 1994. Entry of coronavirus into primate CNS following peripheral infection. *Microb. Pathog.* 16: 349-357.
43. Collins, A. R. 1998. Human macrophages are susceptible to coronavirus OC43. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440:635-639.
44. Patterson, S., and M.R. Macnaughton. 1982. Replication of human respiratory coronavirus strain 229E in human macrophages. *J. Gen. Virol.* 60: 307-314.
45. Cabirac, G. F., R. S. Murray, L. B. McLaughlin, D. M. Skolnick, B. Hogue, K. Dorovini-Zis, and P. J. Didier. 1995. *In vitro* interaction of coronaviruses with primate and human brain microvascular endothelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 380:79-88.
46. Lane, T.E., and M.J. Buchmeier. 1997. Murine coronavirus infection: a paradigm for virus-induced demyelinating disease. *Trends Microbiol.* 5: 9-14.
47. Lampert, P.W., J.K. Sims, and A.J. Kniazeff. 1973. Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis, electron microscopic studies. *Acta Neuropathol.* 24:76-85.
48. Cannella, B., and C.S. Raine, 1995. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 37:424-435.
49. Wucherpfennig, K.W., J. Newcombe, H. Li, C. Keddy, M.L. Cuzner, and D.A. Hafler. 1992. T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* 175:993-1002.

50. De Groot, C.J.A., S.R. Ruuls, J.W.M. Theeuwes, C.D. Dijkstra, and P. Van der Valk. 1997. Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:10-20.
51. Sun, N., D. Grzybicki, R.F. Castro, S. Murphy, and S. Perlman. 1995. Activation of astrocytes in the spinal cord of mice chronically infected with a neurotropic coronavirus. *Virology* 213:482-493.
52. Wang, F.-I., S.A. Stohlman, and J.O. Fleming. 1990. Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated. *J. Neuroimmunol.* 30:31-41.
53. Allegretta, M., J.A. Nicklas, S. Sriram, and R.J. Albertini. 1990. T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 247:718-721.
54. Chou, Y.K., D.N. Bourdette, H. Offner, R. Whitham, R.-Y. Wang, G.A. Hashim, and A.A. Vandenbark. 1992. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 38:105-113.
55. Trotter, J.L., C.M. Pelfrey, A.L. Trotter, J.A. Selvidge, K.C. Gushleff, T. Mohanakumar, and H.F. McFarland. 1998. T cell recognition of myelin proteolipid protein and myelin proteolipid protein peptides in the peripheral blood of multiple sclerosis and control subjects. *J. Neuroimmunol.* 84:172-178.
56. Zhang, J., S. Markovic-Plese, B. Lacet, J. Raus, H.L. Weiner HL, and D.A. Hafler. 1994. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 179:973-984.
57. Lodge, P.A., C. Johnson, and S. Sriram. 1996. Frequency of MBP and MBP-peptide reactive T cells in the HPRT mutant T cell population of MS patients. *Neurology* 46:1410-1415.

58. Trotter, J.L., C.A. Damico, A.H. Cross, C.M. Pelfrey, R.W. Karr, X.T. Fu, and H.F. McFarland. 1997. HPRT mutant T cell lines from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein peptides. *J. Neuroimmunol.* 75:95-103.
59. Scholz, C., K.T. Patton, D.E. Anderson, G.J. Freeman, and D.A. Hafler. 1998. Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J. Immunol.* 160:1532-1538.
60. Burns, J., B. Bartholomew, and S. Lobo. 1999. Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 45:33-39.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Boucher, A., G. Mercier, P. Duquette, and P.J. Talbot. 1998. Clonal T-cell cross-reactivity between myelin antigens MBP and PLP and human respiratory coronaviruses in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 90:33. (Abstr.)
65. Sizun, J., N. Arbour, and P.J. Talbot. 1998. Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronavirus 229E and OC43 in cell culture. *J. Virol. Meth.* 72:145-152.
66. Kamahora, T., L.H. Soe, and M.M. Lai. 1989. Sequence analysis of nucleocapsid gene and leader RNA of human coronavirus OC43. *Virus Res.* 12:1-9.

67. Schreiber, S. S., T. Kamahora, and M. M. C. Lai. 1989. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of human coronavirus 229E. *Virology* 169:142-151.
68. Streicher, Stoffel, 1989. The organization of the human myelin basic protein gene. Comparison with the mouse gene. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370:503-510.
69. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY.
70. Dong, W., M. Marcinkiewicz, D. Vieau, M. Chrétien, N.G. Seidah, and R. Day. 1995. Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. *J. Neurosci.* 15:1778-1796.
71. Schäfer, M.K.-H., and R. Day. 1994. *In situ* hybridization techniques to study processing enzyme expression at the cellular level. *Methods Neurosci.* 23:16-44.
72. Fleming, J.O, J.J. Houtman, H. Alaca, H.C. Hinze, D. McKenzie, J. Aiken, T. Bleasdale, and S. Baker. 1993. Persistence of viral RNA in the central nervous system of mice inoculated with MHV-4. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342:327-332.
73. Lai, M.M., and D. Cavanagh. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 48:1-100.
74. Kwok, S., and R. Higuchi. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-238
75. 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.
76. Adami, C., J Pooley, J. Glomb, E. Stecker, F Fazal, J.O Fleming, and S.C. Baker. 1995. Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection: Quasispecies nature of the persisting MHV RNA. *Virology* 209:337-346.

77. Pewe, L., G.F. Wu, E.M. Barnett, R.F. Castro, and S. Perlman. 1996. Cytotoxic T cell-resistant variants are selected in a virus-induced demyelinating disease. *Immunity* 5:253-262.
78. Angerer, L.M., and R.C. Angerer. 1992. *In situ* hybridization to cellular RNA with radiolabelled RNA probes. In: *In situ* hybridization, a practical approach. D.G. Wilkinson, editor. IRL Press, Oxford Press, New York, NY. 15-32.
79. Dalziel, R. G., P. W. Lampert, P. J. Talbot, and M. J. Buchmeier. 1986. Site-specific alteration of murine hepatitis virus type 4 peplomer glycoprotein E2 results in reduced neurovirulence. *J. Virol.* 59:463-471.
80. Murray, R. S., G. Y. Cai, K. Hoel, J.-Y. Zhang, K. F. Soike, and G. F. Cabirac. 1992. Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system. *Virology* 188:274-284.
81. Gilbert, I.J., and M. Sadler. 1983. Unsuspected multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 40:533.
82. Massa, P. T., H. Wege, and V. ter Meulen. 1988. Growth pattern of various JHM coronavirus isolates in primary rat glial cell cultures correlates with differing neurotropism *in vivo*. *Virus Res.* 9:133-144.
83. Fleming, J. O., M. D. Trousdale, J. Bradbury, S. A. Stohlman, and L. P. Weiner. 1987. Experimental demyelination induced by coronavirus JHM (MHV-4): molecular identification of a viral determinant of paralytic disease. *Microb. Pathog.* 3:9-20.
84. Sorensen, O., A. Collins, W. Flintoff, G. Ebers, and S. Dales. 1986. Probing for the human coronavirus OC43 in multiple sclerosis. *Neurology* 36:1604-1606.
85. Compton, S.R., S.W. Barthold, and A.L. Smith. 1993. The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab. Ani. Sci.* 43:15-28.
86. Sorensen, O., M. B. Coulter-Mackie, S. Puchalski, and S. Dales. 1984. *In vivo* and *in vitro* models of demyelinating disease. IX. Progression of JHM virus infection in the central nervous system of the rat during overt and asymptomatic phases. *Virology* 137:347-357.

87. Fleming, J.O., F.I. Wang, M.D. Trousdale, D.R. Hinton, and S.A. Stohlman. 1993. Interaction of immune and central nervous systems: Contribution of anti-viral Thy-1+ cells to demyelination induced by coronavirus JHM. *Reg. Immunol.* 5:37-43.
88. Houtman, J.J., and J.O. Fleming, 1996. Dissociation of demyelination and viral clearance in congenitally immunodeficient mice infected with murine coronavirus JHM. *J. Neurovirol.* 2:101-110.
89. Barac-Latas, V., G. Suchanek, H. Breitschopf, A. Stuehler, H. Wege, and H. Lassmann. 1997. Patterns of oligodendrocyte pathology in coronavirus-induced subacute demyelinating encephalomyelitis in the Lewis rat. *Glia* 19:1-12.
90. Katayama, Y., H .Hotta, A. Nishimura, Y. Tatsuno, and M. Homma. 1995. Detection of measles virus nucleoprotein mRNA in autopsied brain tissues. *J. Gen. Virol.* 76:3201-3204.
91. White, F. A. III, M. Ishaq, G.L. Stoner, and R.J. Frisque. 1992. JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* 66:5726-5734.
92. Talbot, P.J. 1997. Virus-induced autoimmunity in multiple sclerosis: the coronavirus paradigm. *Adv. Clin. Neurosci.* 7:215-233.
93. Talbot, P.J., D. Arnold, and J.P. Antel. 1999. Virus-induced autoimmune reactions in the central nervous system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* In press.
94. Lane, T.E., V.C. Asensio, N. Yu, A.D. Paoletti, I.L. Campbell, and M.J. Buchmeier. 1998. Dynamic regulation of a- and b- chemokine expression in the central nervous system during mouse hepatitis virus-induced demyelinating disease. *J. Immunol.* 160:970-978.
95. Massa, P.T., R. Dorries, and V. ter Meulen. 1986. Viral particles induce la antigen expression on astrocytes. *Nature* 320:543-6.

96. Gombold, J.L., and S.R. Weiss. 1992. Mouse hepatitis virus A59 increases steady-state levels of MHC mRNAs in primary glial cell cultures and in the murine central nervous system. *Microb. Pathogen.* 13:493-505.
97. Pearce, B.D., M.V. Hobbs, T.S. McGraw, and M.J. Buchmeier. 1995. Cytokine induction during T-cell mediated clearance of mouse hepatitis virus from neurons in vivo. *J. Virol.* 68:5483-5495.
98. Fujinami, R.S., and M.B.A. Oldstone. 1985. Amino acid homology and immune responses between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: a mechanism for autoimmunity. *Science* 230:1043-1045.
99. Fazakerley, J.F., and M.J. Buchmeier. 1993. Pathogenesis of virus-induced demyelination. *Adv. Virus. Res.* 42:249-324.

ARTICLE III; TABLE 1: Primers used to amplify HCoV-229E and HCoV-OC43 nucleocapsid protein and myelin basic protein genes

RNA amplified (references)	Primers- corresponding region on published sequence	
HCoV-OC43 nucleocapsid protein (19, 23, 66)	5'-CCCAAGCAAACGTACCTCTCAG-3' 5'-GTAGACTCCGTCAATATCGGTGCC-3' 5'-GATGGCAACCAGCGTCAACTGCTG-3' 5'-CATCAGGAGGGAATGTTGTACC-3' 5'-TACTGGTCTTAGCATGCGGTC-3' 5'-GGATGCCACTAAACCTCAGCAAG-3' 5'-GGTGCGAGTTCTGCAAAGATGG-3' 5'-GGAGCCCCAATAAACAAATGC-3'	O1-sense: 215- 238 O3-antisense: 497-520 O2-probe: 419-442 O1.1 nested-sense: 243-264 O3.1 nested-antisense: 474-495 O7-sense: 920-942 (738-760) ^a O9-antisense: 1114-1135(954-975) ^a O8-probe: 1005-1024 (821-840) ^a
HCoV-229E nucleocapsid protein (24, 67)	5'-TCTGCCAAGAGTCTTGCTCG -3' 5'-AGCATAGCAGCTGTTGACGG -3' 5'-GGAAGTGCAGGTGTTGTGGC-3' 5'-CAAAAGAACAAAAGCATGAAATCG-3' 5'-GCTCAGCAAATTGTGGATAGC-3' 5'-TCAGAACTAGAAAGGGCAAACGG-3' 5'-GGGAGCTTTGATTGAAGTGTGG-3' 5'-CGTGTGAAAGGTGTCGCTGG-3'	E7-sense : 819-838 E9, antisense: 1035-1054 E8, probe: 969-988 E7.1-nested-sense: 856-879 E9.1-nested-antisense: 1009-1029 E11, sense : 337-359 E13, antisense: 525-547 E12, probe: 432-452
Myelin basic protein (68)	5'-AGAACTGCTCACTACGGCTCCCTG-3' 5'-TCCAGAGCGACTATCTCTCCTCC-3' 5'-CTGTCCTGAGCAGATTAGCTGG-3'	M1, sense: 274-297 (in coding region) ^b M3, antisense: 550-573 (in coding region) ^b M2-probe: 406-429 (in coding region) ^b
HCoV-229E, nucleocapsid riboprobe (67)	5'-TACAGTCAAATGGGCTGATG-3' 5'-GCGTTCACCTAGGTTCAGTAAC-3'	ISH229E-H (152-171) ISH229E-I (1543-1562)
HCoV-OC43 nucleocapsid protein riboprobe (66)	5'-CTGGTAATCGCATCCTCAAG-3' 5'-AGAAGGCTGATGTCCTCTGC-3'	ISHOC43-H (138-157) ISHOC43-I (1465-1484)

a) error in the original publication for number of nucleotide

b) position on the coding region only, without introns

ARTICLE III TABLE 2: Description of MS patients from which autopsy brain samples were used and summary of HCoV RT-PCR results

Patient number	Sex	Age	Time post-death (h)	HCoV detection	
				229E	OC43
1	M	57	>30	+	-
2	M	62	>60	-	-
3	F	42	34	-	+
4	F	42	48	-	-
5	F	37	24	-	-
6	F	58	52	+	+
7	F	29	14	+	+
8	M	52	29	-	+
9	F	47	9	-	-
10	F	38	n.a.	+	-
11	F	40	n.a.	+	+
12	M	34	n.a.	+	-
13	F	38	n.a.	-	-
14	F	60	n.a.	+	-
15	F	43	n.a.	+	+
16	F	71	n.a.	-	-
17	F	70	n.a.	+	+
18	F	38	n.a.	-	-
19	F	22	n.a.	+	-
20	F	55	n.a.	+	+
21	M	53	n.a.	-	-
22	M	48	17	+	+
23	M	57	48	-	-
24	M	37	51	+	+
25	F	70	31	+	+
26	F	37	11	-	-
27	M	70	9	+	-
28	M	63	6	+	-
29	M	40	6	+	-
30	M	39	6	-	-
31	M	58	5	-	-
32	F	48	10.5	-	-
33	M	38	60	+	-
34	M	44	4.5	-	-
35	M	57	35.5	+	+
36	M	42	31.5	+	+
37	M	79	7	-	-
38	M	69	9	-	+
39	F	37	12	-	-

* M : male ; F : female

‡ n.a. : data not available

ARTICLE III TABLE 3: Description of non-MS patients from which autopsy brain samples were used and summary of HCoV RT-PCR results

Patient number	Diagnosis	Sex	Age	Time post-death (h)	HCoV detection	
					229E	OC43
40	control	M	68	18	+	+
41	control	M	62	6	+	+
42	control	M	85	6	+	-
43	control	M	76	9	-	-
44	control	M	59	9	+	-
45	control	M	89	16	+	-
46	control	M	61	13	-	-
47	control	M	75	24	+	-
48	control	M	61	18	-	-
49	control	M	79	27	-	-
50	control	M	89	11	-	-
51	control	F	87	8	-	+
52	control	M	64	24	-	-
53	control	M	74	16	-	-
54	control	M	95	20	-	-
55	control	F	77	19	-	-
56	control	F	70	19	+	-
57	control	F	64	45	+	-
58	control	M	37	40	+	+
59	control	F	37	24	-	-
60	control	M	24	27	-	-
61	control	M	63	45	-	-
62	control	M	28	26	-	-
63	control	M	51	27	+	+
64	control	M	45	9	+	-
65	Alzheimer's	F	83	12-24	-	-
66	Alzheimer's	F	78	16	-	-
67	Alzheimer's	F	82	7	+	-
68	Alzheimer's	M	81	12	-	-
69	Alzheimer's	M	78	8-24	-	-
70	Alzheimer's	F	90	23	-	-
71	Alzheimer's	F	74	12	-	-
72	Alzheimer's	F	81	8	-	-
73	Alzheimer's	F	69	15	-	-
74	Alzheimer's	F	83	4.5	+	-
75	Parkinson's	M	71	6	+	-
76	Parkinson's	F	84	24	+	-
77	Parkinson's	M	78	21	+	-
78	Parkinson's	M	77	18	+	-
79	Parkinson's	M	75	15	-	-

Patient number	Diagnosis	Sex	Age	Time post-death (h)	HCoV detection	
					229E	OC43
80	Parkinson's	F	47	91	-	-
81	Schizophrenia	M	61	27	+	+
82	Schizophrenia	M	74	13.5	-	-
83	Schizophrenia	F	67	8	-	-
84	Schizophrenia	M	59	26.5	-	-
85	Depression	M	81	14	+	-
86	Depression	F	76	55	-	-
87	Depression	F	82	29	-	-
88	Amyloid	M	80	48	-	-
89	Bacterial	M	70	24	-	-
90	Meningoence	M	68	36	+	+

* M : male ; F : female

‡ n.a. : data not available

ARTICLE III TABLE 4: Information concerning histological localization positive signals in patients' brains

Patient	Diagnosis	Brain localization	HCoV detection 229E	OC43
3	MS	Plaque	-	+
		normal grey matter	-	+
		normal white matter	-	+
6	MS	normal tissue encircling plaque	+	-
		normal grey	-	-
		active MS plaque	+	-
7	MS	normal tissue	+	-
		normal grey matter, cerebellum	+	-
		normal tissue encircling plaque	-	+
		active plaque	+	-
		Plaque	-	+
		Plaque	-	+
		chronic plaque, Pons	+	-
		Plaque	-	+
8	MS	normal white matter	+	-
22	MS	Plaque	-	+
24	MS	normal white matter	+	-
		Plaque	+	-
25	MS	white matter	-	+
		white matter	+	-
		grey matter	+	-
		inactive plaque	+	-
27	MS	inactive plaque	+	-
28	MS	subcort grey matter	+	-
		active & inactive plaque	+	-
29	MS	active plaque	+	-
33	MS	inactive plaque	+	-
35	MS	white matter	+	-
36	MS	inactive plaque	+	-
		grey matter	-	+
38	MS	white matter	-	+
57	normal control	grey matter	+	-
		white matter	+	-
58	normal control	grey matter	-	+
		grey matter	+	-
		grey matter,	+	-
		white matter	-	+
63	normal control	white matter	+	-
64	normal control	white matter	+	-
81	Schizophrenia	grey matter	+	-
		white matter	+	-

ARTICLE III TABLE 5: Statistical analysis of the association of the detection of HCoV RNA in human brain samples with MS diagnostic

Diagnosis	229E +	OC43 +	229E and OC43 +
MS	20/39 51.3%	14/39 35.9%	11/39 28.2%
OND	9/26 34.6%	2/26 7.7%	2/26 7.7%
Normal	11/25 44 %	5/25 20 %	4/25 16%
Total	40/90 44 %	21/90 23.3%	17/90 18.9%

Statistical analysis:

MS versus:	OC43	229E	229E + OC43
Other neurological diseases	p=0.0169 *	p>0.05	p>0.05
Normal controls	p>0.05	p>0.05	p>0.05
All controls	p=0.0137**	p>0.05	p>0.05

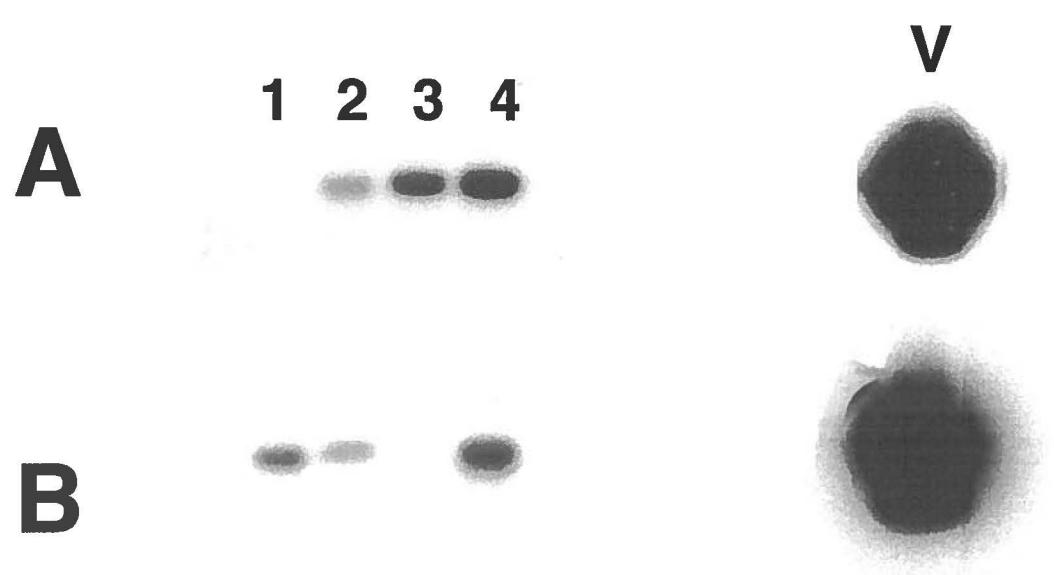
*Fisher's exact *p* value

** Chi square *p* value

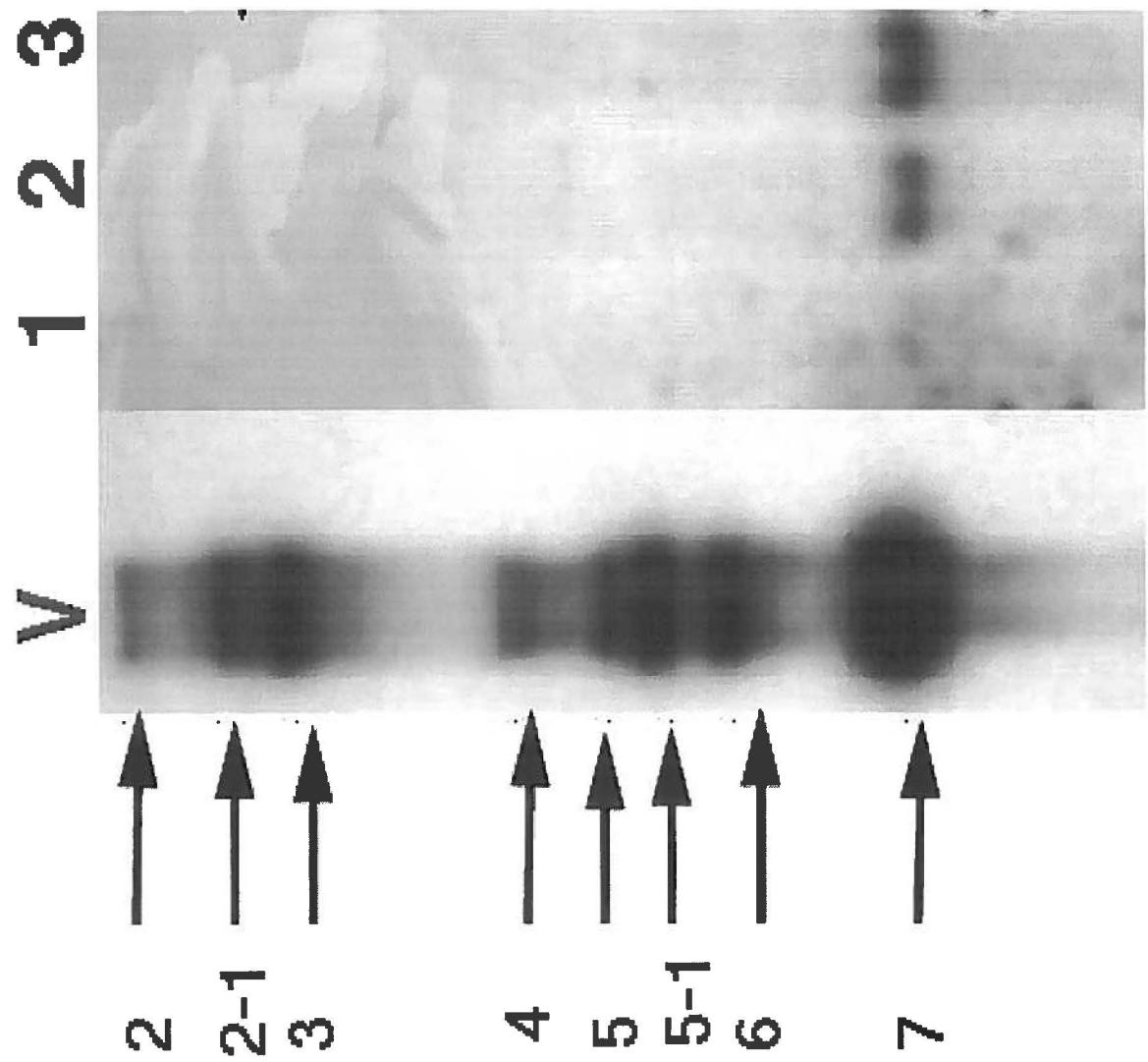
ARTICLE III TABLE 6: Sequencing of HCoV-OC43 N amplicons from human brains

Brain(s)	Point mutation	Codon change	Amino acid. change
Normal control and 3 MS	398	AGA -> GGA	R -> G
	442	CTG -> CTA	silent
MS	261	GTA -> GCA	V -> A

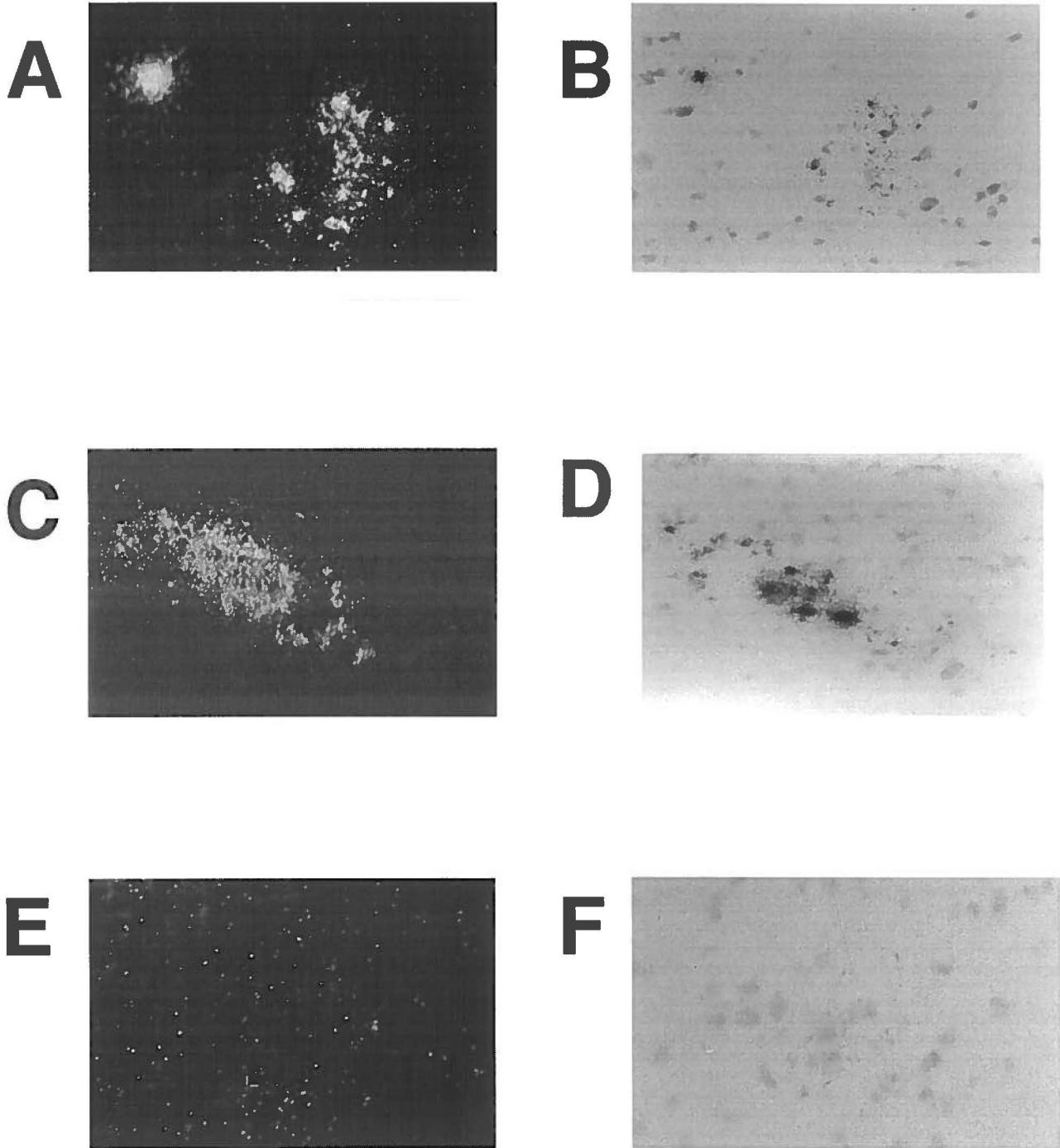
ARTICLE III FIGURE 1: Examples of RT-PCR-Southern hybridization using RNA extracted from human brains. Panel A: HCoV-OC43 (1: other neurological disease, 2-5: MS); panel B: HCoV-229E (1, 2, 4: normal controls; 3: MS). The left lane (labeled V) represents positive control RNAs extracted from HCoV-infected cell lines (panel A: HCoV-OC43 in HRT-18 cells; panel B: HCoV-229E in L132 cells).



ARTICLE III FIGURE 2: Northern hybridization for HCoV-OC43 on RNA extracted from human brains (lanes 1-3) or from positive control HCoV-OC43-infected HRT-18 cells (lane V). HCoV-OC43 subgenomic RNAs are as follows, from top to bottom (estimated size and encoded protein indicated): RNA 2 (11.6 kb; ns2 protein); RNA 2-1 (8.8 kb; HE protein); RNA 3 (7.1 kb; S protein); RNA 4 (4.0 kb; ns4 protein); RNA 5 (3.3 kb; ns5 protein); RNA 5-1 (3.0 kb; E protein); RNA 6 (2.5 kb; M protein); RNA 7 (1.8 kb; N protein).



ARTICLE III FIGURE 3: Photomicrographs showing *in situ* hybridization for HCoV-OC43 RNA in a human brain section, using a radiolabeled riboprobe for the N gene. Both results from panels A and B and panels C and D were taken from two distinct blocks from the same MS patient. Panel E and F: negative control, adjacent slide to A and B treated by RNase A prior to *in situ* hybridization. Photographs shown in panels A, C and E were taken under dark field those shown in panels B, D, and F were taken at the same site under regular light exposure. Magnification 100X.



CHAPITRE 4

DISCUSSION

1.0 SUSCEPTIBILITÉ DES CELLULES NEURALES AUX CORONAVIRUS HUMAINS

Peu de données sont disponibles sur la susceptibilité de lignées humaines représentatives du SNC à une infection par des coronavirus humains. Collins et Sorensen (1986) ont montré qu'une infection persistante de 28 jours par le HCoV-OC43 pouvait être observée dans un astrocytome humain (U-87MG). Des collègues de laboratoire (Sophie Ékandé, Geneviève Côté et Claude Lachance; étudiants à la maîtrise) ont démontré que plusieurs lignées neurales humaines sont susceptibles à des infections aiguës par les HCoV. Le premier objectif de ce projet de doctorat visait à vérifier la susceptibilité de telles lignées à une infection persistante par les HCoV et à caractériser ces infections persistantes. L'importance de ces travaux a pris racine dans les observations obtenues avec les coronavirus murins. Certaines souches neuroadaptées du MHV peuvent persister dans le SNC de leur hôte et déclencher une encéphalomyélite accompagnée d'une démyélinisation chronique. Ce modèle animal est utilisé pour tenter d'élucider la pathogénèse des maladies démyélinisantes humaines telle la sclérose en plaques. La pertinence du modèle coronaviral murin repose sur la démonstration que de tels virus pourraient agir de la même façon dans le SNC humain. La susceptibilité des cellules neurales aux HCoV a tout d'abord été caractérisée. Des infections persistantes ont été réalisées avec les deux souches prototypes de HCoV et des lignées neurales humaines représentatives de différents types cellulaires: neurones, oligodendrocytes, microglies et astrocytes. L'expression d'antigènes et d'ARN viraux ainsi que la production de virions infectieux ont été suivies pour une période de 130 jours. Les résultats obtenus ont fait l'objet des publications 1 et 2 (chapitre 2).

1.1 Susceptibilité à des infections coronavirales

Toutes les lignées représentatives des astrocytes: les astrocytomes U.87 MG, U-373 MG et le glioblastome multiforme GL-15 ont été susceptibles à

des infections aiguës par les deux souches de HCoV: OC43 et 229E. Deux des trois lignées: U-87 MG et U-373 MG ont été susceptibles à une infection persistante par le virus OC43 (résumé des résultats tableau 2, article 1, chapitre 2). Aucune de ces lignées n'a démontré une susceptibilité à l'infection persistante par la souche 229E (résumé des résultats tableau 2, article 2, chapitre 2). Les résultats obtenus avec des cultures primaires humaines ont démontré que les astrocytes adultes et foetaux sont susceptibles à une infection par la souche OC43 (Bonavia *et al.*, 1997), tel que détecté par un test d'immunofluorescence indirecte. De plus, une augmentation des titres infectieux a été détectée dans le surnageant d'astrocytes foetaux, suggérant une infection productive. L'infection d'astrocytes en cultures primaires par le HCoV-229E a seulement été détectée par RT-PCR. Ces résultats suggèrent que l'infection est de faible niveau et potentiellement abortive, étant donné que des antigènes viraux n'ont pas été détectés. Les astrocytes constituent une population cible lors des infections par le coronavirus murin chez les rongeurs (Sun *et al.*, 1995) et chez les primates non humains (Murray *et al.*, 1997). Ces cellules sont aussi utilisées comme réservoir viral par le MHV chez les souris (Perlman et Ries, 1987). Les astrocytes sont impliqués dans les dommages et la démyélinisation observés suite à une infection par le MHV via la sécrétion de cytokines et d'oxyde nitrique (Sun *et al.*, 1995). Nos résultats suggèrent que les astrocytes peuvent être une cible lors d'infection par les HCoV. De plus, ces cellules pourraient servir de réservoir viral, particulièrement lors d'infection par le HCoV-OC43. Il faut rappeler que ce virus appartient au même groupe antigénique que le MHV. Il serait pertinent de vérifier si une infection par les HCoV induit une activation des astrocytes et une sécrétion de molécules inflammatoires comme c'est le cas dans le modèle murin.

Une lignée représentative des microglies, la lignée CHME-5, a été susceptible à une infection aiguë seulement par la souche OC43 des HCoV. Les cultures primaires de microglies ont été infectées par le HCoV-OC43 tel que démontré par la détection d'antigènes viraux (Bonavia *et al.*, 1997). De plus, les macrophages humains, qui sont des cellules apparentées aux

microglies, sont aussi susceptibles à une infection par le HCoV-OC43 (Collins, 1998). La lignée CHME-5 n'a pas été infectée par le HCoV-229E. Claude Lachance, du laboratoire du docteur Talbot, a d'ailleurs démontré, au cours de ses travaux de maîtrise, que cette lignée ne possède pas le récepteur CD13 ou l'aminopeptidase N, utilisé par le HCoV-229E (Lachance *et al.*, 1998), ce qui expliquerait la non-susceptibilité de cette lignée à ce virus. Il est possible que le récepteur ait été perdu lors du processus d'immortalisation. L'expression du récepteur CD13 n'a pas été vérifiée sur des microglies en cultures primaires. A la suite de l'infection de cultures primaires par le HCoV-229E, de l'ARN viral a été détecté dans les microglies (Bonavia *et al.*, 1997). Toutefois, aucune détection d'antigène viral n'a pu être démontrée, suggérant encore une fois une infection faible ou abortive. D'autre part, les microglies de rongeurs sont susceptibles à une infection par le coronavirus murin (Houtman et Fleming, 1996b). Nos résultats suggèrent que les microglies puissent être la cible d'infections aiguës par les HCoV. Par contre, ils ne favorisent pas ce type cellulaire comme réservoir viral lors d'infection persistante coronavirale.

La lignée représentative d'oligodendrocytes MO3.13 a été susceptible aux infections aiguës et persistantes par les deux souches de HCoV. Par contre, les oligodendrocytes en culture primaire n'ont pas été infectés par ces virus (Bonavia *et al.*, 1997). Nous ne pouvons pas rejeter la possibilité que les propriétés cellulaires aient été altérées par l'immortalisation ou encore que l'infection en culture primaire soit si faible que les techniques utilisées ne permettaient pas de la détecter. La susceptibilité de ces cellules dans le modèle murin (Houtman et Fleming, 1996b) nous suggère de pousser plus loin l'investigation du rôle des oligodendrocytes *in vivo* lors des infections par les HCoV, d'autant plus qu'elles produisent la gaine de myéline et qu'une atteinte à ces cellules pourrait compromettre la formation de cet isolant.

Les deux lignées immortalisées de neurones testées, soit les cellules SK-N-SH et les cellules H4 ont été susceptibles à une infection aiguë par les deux HCoV. Par contre, seule la lignée H4 a été susceptible à une infection

persistante par les deux souches de HCoV. Ces lignées sont issues de neurones périphériques. Il n'y a pas à notre connaissance de lignées neuronales du SNC humain disponibles à ce jour. Quelques expériences avec des cultures primaires foetales de neurones ont été effectuées par Aurelio Bonavia, étudiant à la maîtrise au laboratoire du docteur Pierre Talbot, les neurones adultes n'étant pas viables *in vitro*. Il n'a détecté aucune infection par les deux souches de HCoV dans ces cellules (Bonavia *et al.*, 1997). Des expériences supplémentaires devront être réalisées avant de clairement conclure sur le rôle des neurones lors d'infection par les HCoV. Chez la souris, les neurones sont un des sites de réplication des MHV (Houtman et Fleming, 1996b), et même un réservoir pour les virus persistants chez le rat (Sorensen et Dales, 1985).

1.2 Modifications du fragment N-terminal du gène S durant des infections persistantes

Le neurotropisme des coronavirus murins a été étudié en détail et plusieurs laboratoires ont révélé que différentes souches et divers variants viraux démontrent des neurotropisme et neurovirulence variés et que ces différences s'expliquent par des variations génétiques principalement dans le gène S (Houtman et Fleming, 1996b). Par exemple, la souche MHV-A59 infecte les neurones (Lavi *et al.*, 1988). Par contre, la souche MHV-JHM a une prédisposition pour les oligodendrocytes (Takahashi *et al.*, 1981). Parmi toutes les protéines structurales virales, la protéine S du coronavirus murin est celle qui présente le plus de variations de séquences (Lai et Cavanagh, 1997). De plus, elle contient des déterminants de neurovirulence (Dalziel *et al.*, 1986; Fleming *et al.*, 1987). Au cours d'une infection persistante *in vivo* chez la souris, des délétions et des mutations ponctuelles apparaissent dans la séquence de cette protéine tout comme dans la protéine N (Adami *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1997a). Les mutations apparaissent surtout dans la région S1 de cette protéine (Parker *et al.*, 1989). Ce segment de gène a donc été ciblé pour évaluer l'adaptation

moléculaire de HCoV lors des infections persistantes de cellules du SNC humain.

La région putative S1 des HCoV a été séquencée à partir de l'ARN du dernier passage cellulaire disponible pour les lignées infectées de façon persistante par les deux HCoV. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences déjà publiées de même qu'aux séquences obtenues à partir des ARN des cellules infectées de façon aiguë. Il n'y a pas eu de changement entre les séquences des clones issus des infections aiguës. Nous aurions pu aussi séquencer le stock de virus utilisés pour ces expériences pour comparer avec les clones des infections persistantes. Toutefois, étant donné l'absence de variation entre les infections aiguës sur les différentes lignées, ces résultats suggéraient une faible variation dans la population de virus initial. Les ARN viraux obtenus des infections persistantes par le virus HCoV-229E dans la lignée L-132 au passage 42 et la lignée MO3.13 au passage 40 ont démontré une mutation en position 571 qui mènerait à un changement en acide aminé. L'ARN viral obtenu de la lignée MO3.13 a démontré une mutation additionnelle en position 592 qui mènerait aussi à un changement en acide aminé. Ces mutations n'ont pas été observées dans le virus de départ. Aucune mutation n'a été observée lors de la réPLICATION virale dans la lignée H4. Globalement, peu de mutations ponctuelles ont été observées sur ce fragment de plus de 1,8 kb. Par contre, la position 571 semble encliner à muter au cours d'infection persistante (Tableau 3, article 2, chapitre 2). Il est intéressant de noter que les lignées MO3.13 et L-132 qui contenaient des virus mutés à la position 571 ont démontré des titres infectieux plus élevés que la lignée H4 lors des infections persistantes. Ces observations suggèrent qu'une mutation à cette position favorise la réPLICATION virale. Le séquençage d'autres régions génomiques serait nécessaire pour évaluer la différence entre les virions obtenus à la fin des infections persistantes des différentes lignées.

Le séquençage de la région N-terminale du gène S a aussi été effectué pour les infections persistantes par le HCoV-OC43. Davantage de mutations ont

été observées dans le cas de ce virus en comparaison avec le HCoV-229E. D'une part, un plus grand nombre de lignées ont été susceptibles à une infection persistante pour le HCoV-OC43. D'autre part, les titres infectieux obtenus pour le HCoV-OC43 lors des infections persistantes étaient supérieurs à ceux observés lors de telles infections avec le HCoV-229E. Un plus grand nombre d'individus dans une population virale favorise certainement un plus grand nombre de mutations possibles à cause du plus grand nombre de génomes transcrits et copiés. Plusieurs mutations ponctuelles ont été observées dans plusieurs lignées infectées de façon persistante, suggérant que ces positions soient portées à muter lors de la réPLICATION virale. De plus, certaines d'entre elles ont même été rapportées par un autre groupe ayant séquencé le HCoV-OC43 à la suite d'une infection des cellules MDCK et des cellules Vero (Künkel et Herrler, 1996). Ces positions sont par conséquent sujettes à muter lors de passage sur cellules. La lignée MO3.13 est celle qui a démontré le plus grand nombre de mutations, et aussi la plus grande variété de mutations en comparaison aux autres lignées utilisées. De plus, des effets cytopathiques ont été détectés seulement dans cette lignée au cours de l'infection persistante par le HCoV-OC43 (Figure 3, article 1, chapitre 2). Il serait important de vérifier le rôle des mutations observées lors de l'infection persistante de cette lignée. Aussi, la cinétique d'apparition de telles mutations pourrait être évaluée en séquençant l'ARN de cellules infectées aux passages précédents. Ces expériences permettraient de vérifier la corrélation entre l'apparition des effets cytopathiques, perceptibles de façon reproductible à partir du cinquième passage, et l'apparition des mutations ponctuelles au cours de l'infection persistante. La séquence coronavirale obtenue à partir de la lignée H4 a démontré une délétion de 15 nucléotides donc 5 acides aminés seraient éliminés sans changer le cadre de lecture de la protéine.

De nombreuses activités biologiques ont été attribuées à la protéine S chez le MHV: attachement au récepteur cellulaire (Dveksler *et al.*, 1991; Yokomori et Lai, 1992), formation de syncytiums lors de l'infection (Collins *et al.*, 1982), déterminants de neurovirulence (Dalziel *et al.*, 1986; Fleming *et al.*,

1987; Gallagher *et al.*, 1990; Matsubara *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992a; Taguchi *et al.*, 1995), protéine cible des réponses immunitaires (Collins *et al.*, 1982; Talbot *et al.*, 1984; Wege *et al.*, 1988; Daniel *et al.*, 1993; Castro et Perlman, 1995; Bergmann *et al.*, 1996). Des fonctions similaires peuvent être envisagées pour la protéine S des HCoV. Des informations concernant l'importance de différents acides aminés ou de certaines régions de la protéine S ne sont pas encore disponibles pour les HCoV. On peut émettre l'hypothèse que certaines mutations observées lors des infections persistantes par les HCoV pourraient influencer l'attachement des virus au récepteur cellulaire. De plus, ces changements dans la protéine S pourraient influencer la neurovirulence, comme cela a été observé pour le coronavirus murin. Des anticorps et des lymphocytes T dirigés contre cette protéine ont été détectés chez des individus infectés par le HCoV-229E (Macnaughton *et al.*, 1981; Spencer *et al.*, 1995). Il serait intéressant de vérifier quels sont les épitopes dominants de ces réponses immunitaires et de les comparer aux positions sujettes à muter lors des infections persistantes. Une corrélation entre les épitopes reconnus par les réponses immunitaires et les mutations observées suggérerait une évasion du système immunitaire par ces variants viraux.

Certaines mutations ponctuelles ont été détectées chez seulement une partie des clones moléculaires séquencés pour le fragment S1 du gène S de HCoV-OC43. La fréquence de ces mutations ponctuelles observées à la suite des infections persistantes a été nettement supérieure à la fréquence attendue des erreurs combinées de la transcriptase inverse et de la Taq polymérase utilisées. Elle a aussi été plus élevée que la fréquence des mutations observées dans les clones obtenus des infections aiguës sur les mêmes lignées cellulaires. Ces résultats suggèrent l'émergence de quasi-espèces au cours de l'infection persistante des lignées H4, U-87 MG et MO3.13 (Tableau 3, article 1, chapitre 2). L'observation de l'émergence de quasi-espèces a été rapportée lors d'infection persistante *in vivo* par le MHV chez la souris (Rowe *et al.*, 1997a). Par contre, Stühler et collaborateurs ont suivi le génome viral du virus MHV lors d'infection chez le rat et ils n'ont pas observé l'émergence de

quasi-espèces. Des caractéristiques de l'hôte sont sans doute impliquées dans ces différences. L'émergence de quasi-espèces suggère que les coronavirus tentent de s'adapter au SNC. Cependant, nous n'avons pas détecté de mutations qui seraient essentielles à l'établissement de l'infection persistante. Des observations dans le modèle murin ont aussi suggéré que, malgré l'apparition de nombreuses mutations, aucune mutation ne semble nécessaire à l'établissement de la persistance. Par contre, Pewe et collaborateurs (1996) ont démontré l'apparition de changements, dans un épitope de lymphocytes T CD8+ situé dans une région hypervariable du gène S, de façon spécifique chez des souris ayant développé les symptômes cliniques de la démyélinisation. Certaines mutations pourraient jouer un rôle primordial dans l'aboutissement pathologique de l'infection coronavirale et permettre au virus de s'évader de la reconnaissance et de l'élimination par le système immunitaire. Dans le but de mieux évaluer l'importance des quasi-espèces, l'utilisation de la technique de polymorphisme conformationnel de simple brin ("single strand conformation polymorphism") permettrait d'évaluer des variations dans la population virale, et ce, sur un plus grand nombre d'amplicons de PCR et de clones de produits de PCR différents.

Une distribution de la population virale en plusieurs variants a été observée lors d'infections humaines. L'émergence de quasi-espèces a été observée chez des individus infectés par le virus de l'hépatite C. La distribution des variants de ce virus semble varier dans le temps et aussi en fonction des phases de l'infection et des traitements. En effet, une augmentation des variations au sein des quasi-espèces a été détectée chez des patients infectés par le virus de l'hépatite C et traité à l'interféron (Yun *et al.*, 1996). De même une distribution différente des quasi-espèces dans divers sites (foie, sang et cellules mononucléaires du sang) au sein de mêmes individus a été démontrée (Maggi *et al.*, 1997). Le VIH évolue aussi en quasi-espèces au sein d'un même individu (Delwart *et al.*, 1997). L'évolution de quasi-espèces varie selon les stades de la progression vers la maladie du SIDA (Delwart *et al.*, 1997). Une évolution plus lente a été observée chez des patients ayant une forme

fulminante ou une forme plus avancée du SIDA (Delwart *et al.*, 1997). Les pressions de l'hôte pour contrôler l'infection étaient moins importantes dans ces situations que lorsque l'hôte possède encore un système immunitaire efficace, il était donc moins nécessaire pour le VIH de varier (Delwart *et al.*, 1997). Les séquences des quasi-espèces de VIH détectées dans le SNC n'ont pas le même patron que celles détectées dans le sang d'un même individu; il semble que les virus du SNC ont une signature plutôt caractéristique des isolats ayant un tropisme pour les macrophages/monocytes (Korber *et al.*, 1994). Ce virus évolue en quasi-espèces, mais de façon adaptée à son environnement (Korber *et al.*, 1994; Delwart *et al.*, 1997; Ostrowski *et al.*, 1998) tout comme semble le faire aussi le virus de la rage (Morimoto *et al.*, 1998). Les virus évoluent en quasi-espèces pour s'adapter à leur environnement cellulaire, ou encore pour s'évader des pressions du système immunitaire (Domingo et Holland, 1997). De plus, l'évolution des quasi-espèces est dépendante de la taille de la population virale impliquée dans l'infection (Domingo et Holland, 1997). L'émergence de quasi-espèces repose à la fois sur des facteurs viraux et des facteurs de l'hôte.

1.3 Implications de la persistance virale

Les expériences d'infection persistante effectuées suggèrent que les HCoV puissent persister dans des cellules du SNC humain tous comme leurs cousins murins chez les rongeurs. Deux des trois lignées astrocytaires ont été infectées de façon persistante par le HCoV-OC43. Étant donné l'implication des astrocytes lors d'infection coronavirale chez les rongeurs par la sécrétion de molécules potentiellement toxiques pour la gaine de la myéline (Sun *et al.*, 1995) et par l'augmentation de l'expression de molécules du CMH (Gilmore *et al.*, 1994), l'investigation de l'effet des HCoV sur ces cellules devrait être entreprise. Un des mécanismes par lequel les coronavirus peuvent induire des effets néfastes au niveau du SNC pourrait nécessiter la contribution de ce type de cellules. La lignée d'oligodendrocytes a démontré de façon reproductible des effets cytopathiques à partir du cinquième passage cellulaire lors de

l'infection persistante par le HCoV-OC43 (Figure 3, article 1, chapitre 2). Ces cellules sont responsables de la formation de la gaine de myéline. Un effet aussi important sur ce type cellulaire par un HCoV mérite d'être vérifié sur des cellules en cultures primaires même si elles n'avaient pas été infectées de façon détectable lors d'expériences antérieures (Bonavia *et al.*, 1997). Un dysfonctionnement de ces cellules pourrait être directement impliqué dans une démyélinisation comme c'est le cas pour le polyomavirus JC (Major *et al.*, 1992).

Les lignées immortalisées ne sont pas l'image parfaite des cellules *in vivo*. Elles présentent toutefois des avantages; elles se propagent suffisamment longtemps pour nous permettre d'effectuer de telles études. Elles peuvent avoir acquis ou perdu certaines propriétés cellulaires. Toutefois, étant donné la grande corrélation dans le modèle murin entre les observations en cultures et les observations *in vivo* avec différents variants et souches de MHV (Tardieu *et al.*, 1986; Massa *et al.*, 1988), les résultats obtenus avec les lignées immortalisées fournissent sans doute de précieuses indications. Il faut noter aussi que les populations cellulaires ne sont pas homogènes *in vivo*; il existe plusieurs types de neurones et d'astrocytes. Malgré ces limitations, les lignées immortalisées sont représentatives d'un type de neurone ou d'astrocyte, car elles ont été obtenues à partir de l'immortalisation au départ d'un ou quelques clones. Les lignées immortalisées nous fournissent un modèle inestimable pour évaluer divers paramètres potentiellement impliqués dans les infections coronavirales.

Il a été démontré pour plusieurs systèmes d'infections virales que des changements autant chez les virus que chez les cellules cibles contribuent au maintien de la persistance virale (Ron et Tal, 1985; de la Torre *et al.*, 1988; Hernandez *et al.*, 1994). Il serait intéressant d'aborder le nombre de récepteurs cellulaires au cours de l'infection persistante. En effet, des études *in vitro* de persistance par les coronavirus murins ont démontré qu'une expression épigénétique ou instable du récepteur pour le MHV semble contribuer à

l'établissement d'infection persistante par le MHV dans des cellules murines transformées (Sawicki *et al.*, 1995; Chen et Baric, 1996). De plus, la sécrétion d'inhibiteurs viraux tel l'interféron pourrait être vérifiée, même si une telle cytokine antivirale n'a pas été détectée dans le surnageant de cellules DBT infectées de façon persistante par le MHV (Sawicki *et al.*, 1995). L'interféron peut être synthétisé par presque tous les types cellulaires en réponse à des infections virales (Ahmed *et al.*, 1997). De part ses nombreuses activités anti-virales, la présence de cette cytokine dans un milieu de culture de cellules infectées de façon persistante peut moduler cette infection, en inhibant la réPLICATION virale et la croissance cellulaire (Ahmed *et al.*, 1997). Les lignées infectées de façon persistante par le HCoV n'ont pas démontré de ralentissement de croissance ou de changement morphologique, hormis la lignée MO3.13 infectée de façon persistante par le HCoV-OC43. Les surnageants de cette lignée pourraient être évalués en premier lieu.

L'induction d'apoptose de cellules infectées peut aussi être une des conséquences des infections virales du SNC. Le virus Sindbis peut induire l'apoptose de cellules neuronales immatures (Griffin et Hardwick, 1997). Le degré de différenciation cellulaire semble jouer un grand rôle puisque les neurones matures sont moins susceptibles que les neurones immatures à l'induction de l'apoptose par ce virus (Griffin et Hardwick, 1997). Lors d'infection de neurones matures, le virus Sindbis a tendance à établir une infection persistante (Griffin et Hardwick, 1997). Il serait intéressant de vérifier dans les modèles d'infections persistantes que nous avons établis l'importance des phénomènes d'apoptose et de différenciation cellulaire. En effet, nous avons utilisé trois lignées d'astrocytes et deux lignées de neurones qui n'ont pas été susceptibles de la même façon aux infections aiguës et persistantes par les HCoV.

Les lignées cellulaires pourraient aussi être utilisées comme modèle pour évaluer l'implication de facteurs telle l'expression de CMH de classe I et II, de cytokines et d'autres molécules inflammatoires, car la démyélinisation observée

dans le modèle animal implique des composantes du système immunitaire. Une augmentation de l'expression des molécules impliquées dans la présentation d'antigènes dans le SNC stimulerait les réponses immunitaires. Des expériences de plus courte durée, sans doute, pourront aussi être tentées avec des cultures primaires, pour confirmer l'importance de chaque type cellulaire dans la persistance de HCoV dans le SNC humain. Il serait sans doute approprié d'effectuer ces expériences avec des cultures monotypiques et mixtes, car ces dernières sont plus représentatives de la réalité *in vivo*. Les cellules du SNC s'influencent les unes et les autres par la sécrétion de plusieurs molécules. Des cultures mixtes, contenant des cellules de plusieurs types cellulaires du SNC pourraient être infectées. A l'aide de marqueurs spécifiques à chaque type cellulaire, nous pourrions évaluer les cellules infectées dans cette population et aussi vérifier les effets d'une telle infection sur l'ensemble des cellules. L'infection d'un type de cellule pourrait avoir des répercussions sur d'autres cellules. Les molécules toxiques sécrétées par les macrophages, les microglies infectées de même que les astrocytes activés lors de l'infection du SNC par le VIH affectent les neurones (Lipton, 1998).

Certaines mutations peuvent être critiques pour le tropisme viral. Par exemple, dans le cas du LCMV, une seule mutation ponctuelle a été associée à une sélection spécifique d'organe pour ce virus (Ahmed et al., 1991). L'évaluation de l'importance de chaque mutation devrait par la suite être explorée dans le modèle des lignées immortalisées. L'isolement de variants porteurs de certaines mutations pourrait permettre la comparaison avec la souche prototype au niveau du pouvoir pathogénique de ces virus. L'émergence de quasi-espèces a été rapportée au cours de diverses infections virales, par exemple pour les individus infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (Delwart et al., 1997). L'importance de ce phénomène peut s'avérer critique étant donné l'évasion facilitée du système immunitaire par ces virus. La réponse immunitaire sera toujours un peu en retard sur l'apparition de nouveaux variants. Dans le système *in vitro* abordé ici,

les virus n'ont pas subi des pressions du système immunitaire, pourtant plusieurs mutations sont apparues, surtout pour la souche OC43. On peut supposer que, dans un système complet, les virus auraient encore plus d'avantages à muter pour échapper à la reconnaissance du système immunitaire. Le séquençage du gène S1, à partir d'échantillons de patients dans lesquels de l'ARN coronaviral a été détecté pourrait nous fournir des indications précieuses sur les taux de mutations par les HCoV *in vivo* et aussi sur leur adaptation et leur spécificité moléculaire dans le SNC.

2.0 NEUROINVASION ET NEUROTROPISME DES CORONAVIRUS HUMAINS ET LIEN POSSIBLE AVEC LA SCLÉROSE EN PLAQUES

L'équipe du docteur Murray (1992a) a déjà démontré la présence de coronavirus très similaires à des coronavirus murins dans le cerveau de patients atteints de sclérose en plaques. Nous trouvions approprié de rechercher la présence de HCoV. Ces virus sont respiratoires et pourraient, à l'image des coronavirus murins, se rendre dans le SNC de leur hôte, à la suite d'une infection des voies respiratoires. Janet Stewart, étudiante à la maîtrise au laboratoire du docteur Talbot, a démontré la présence d'ARN du HCoV-229E dans quatre des onze patients atteints de sclérose en plaques testés, mais dans aucun des six témoins atteints d'autres maladies neurologiques et des cinq normaux (Stewart *et al.*, 1992). Nous avons voulu effectuer une étude à plus grande échelle pour évaluer l'importance de la présence de HCoV dans des cerveaux humains et aussi de vérifier l'implication potentielle de ces virus dans la sclérose en plaques. L'utilisation de cerveaux humains permet aussi d'aborder le neurotropisme et la neuroinvasion de ces virus.

2.1 Observations dans les cerveaux humains

La présence d'ARN des HCoV a été évaluée dans des échantillons provenant de 90 donneurs dont 39 étaient atteints de sclérose en plaques, 25 étaient des témoins normaux et 26 étaient atteints d'autres maladies neurologiques. L'ARN de l'une des deux souches de HCoV a été détecté dans 48 % de tous les donneurs testés ; 44 % des donneurs se sont avérés positifs pour la souche 229E et 23 % pour la souche OC43. Une association préférentielle a été observée pour OC43 lorsque nous avons comparé les patients atteints de sclérose en plaques (14/39 ont été positifs) avec tous les autres donneurs (7/51 ont été positifs). Cette association n'était toutefois plus significative lorsque nous comparions les donneurs atteints de sclérose en plaques avec les donneurs décédés sans maladie neurologique connue (5/25 ont été positifs pour OC43). Le séquençage d'amplicons de la protéine N

provenant de cerveaux humains n'a démontré aucune mutation du HCoV-229E en comparaison avec la séquence du virus prototype. Toutefois, des mutations spécifiques à des cerveaux provenant de patients atteints de sclérose en plaques, et jamais détectées dans le virus prototype, ont été observées pour le HCoV-OC43.

Nous avons détecté l'ARN de HCoV-OC43 non seulement par RT-PCR couplé à une hybridation de type Southern, mais aussi par l'hybridation de type Northern et l'hybridation *in situ* dans la matière blanche. Ces résultats suggèrent que l'ARN de ce virus est présent dans des cerveaux humains et en quantité suffisante pour ne pas nécessiter d'amplification tel le RT-PCR. Le fait que nous ayons détecté plus facilement la présence de la souche OC43 n'est sans doute pas étranger au fait que ce virus infecte plusieurs types cellulaires du SNC humain *in vitro* de façon aiguë et persistante. De plus, l'infection de cultures primaires par le HCoV-OC43 a été plus facilement détectable, par un test d'immunofluorescence indirecte, suggérant une infection non pas abortive, mais efficace. En effet, une augmentation du titre de virions infectieux dans le surnageant d'astrocytes foetaux, infectés par le HCoV-OC43 a été détectée entre le deuxième et le septième jour post-infection (Bonavia *et al.*, 1997). Toutefois, une telle observation n'a pas été faite pour les astrocytes adultes (Bonavia *et al.*, 1997). Pour le HCoV-229E, les titres infectieux obtenus pour les infections de lignées ont été inférieurs à ceux du HCoV-OC43. Moins de lignées ont été infectées de façon persistante que pour le HCoV-OC43. Nous avons observé moins de mutations ponctuelles, ce qui suggère une adaptation moléculaire moindre pour le HCoV-229E lors du passage sur des cellules neurales. De plus, les infections de cultures primaires ont été détectées seulement par RT-PCR, présumément à cause d'infection faible ou abortive. Finalement, lors de nos expériences d'hybridation de type Northern nous n'avons pas détecté d'ARN de HCoV-229E dans les ARN de cerveaux testés, ni en hybridation *in situ*, suggérant que de plus faibles quantités d'ARN de ce virus se retrouvent dans le SNC humain.

Il serait intéressant de localiser le type cellulaire porteur d'ARN de HCoV, particulièrement pour la souche OC43. La vérification de l'expression d'antigène coronaviral dans les cerveaux devrait être aussi vérifiée pour évaluer si la présence de HCoV s'accompagne d'expression virale. Le séquençage du fragment S1 dans les cerveaux humains devrait être entrepris étant donné les mutations observées lors des persistances virales, particulièrement pour la souche OC43.

2.2 Implications de la présence virale dans le système nerveux central

La détection d'ARN des HCoV dans des cerveaux sains suppose que ces virus peuvent se rendre dans le SNC humain sans qu'il y ait dommage à la barrière hémato-encéphalique. Le coronavirus serait par conséquent présent dans le cerveau avant le déclenchement de la maladie, et ne serait pas présent de façon opportune chez les patients atteints de maladie neurologique dont la barrière hémato-encéphalique a été endommagée. Cabirac et collaborateurs (1995) ont d'ailleurs démontré la susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau au HCoV-229E. Il est possible que ces virus utilisent cette voie d'accès pour entrer dans le SNC en absence de dommages à la barrière hémato-encéphalique. De plus, les macrophages humains sont susceptibles aux HCoV (Patterson et Macnaughton 1982; Collins, 1998). L'inflammation ou une infection virale peuvent augmenter l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales du SNC (Del Bigio, 1995; Tuomanen, 1996). Par conséquent, il est possible que des cellules infectées par les HCoV puissent traverser la barrière hémato-encéphalique exprimant davantage de molécules d'adhésion. Plusieurs voies pourraient être utilisées par ces virus pour envahir le SNC.

L'aboutissement de la présence des HCoV dans le SNC humain serait dépendant de facteurs génétiques du virus et de l'hôte comme c'est le cas dans le modèle murin. Chez la souris, ce n'est pas la grande quantité de virus qui

semble causer la démyélinisation. L'ARN et les antigènes coronaviraux sont détectables dans peu de cellules et sont absents des oligodendrocytes mourants chez les souris atteintes de démyélinisation (Barac-Latas *et al.*, 1997). Ces données suggèrent que la démyélinisation dans ce modèle puisse n'être pas directement induite par la présence coronavirale dans les oligodendrocytes. Nous suggérons plutôt que des réponses immunitaires soient impliquées. Des molécules inflammatoires sécrétées par des cellules immunes actives pourraient être impliquées. L'acteur principal causant la démyélinisation pourrait aussi être une cellule du SNC. Les microglies et les astrocytes peuvent sécréter des molécules toxiques pour la myéline (Sriram et Rodriguez, 1997; Aschner, 1998; Vincent *et al.*, 1998). Par exemple, les espèces oxygénées réactives, le TNF- α et de la lymphotoxine- α peuvent endommager la gaine de myéline (Cuzner et Norton, 1996; Aschner, 1998; Ledeen et Chakraborty, 1998).

Étant donné le pourcentage élevé des patients qui se sont avérés positifs pour l'un ou l'autre des HCoV, nous présumons que cette présence ne pouvait être à cause d'une infection aiguë survenue dans tous ces cas peu de temps avant la mort de ces patients. Les HCoV étaient probablement présents depuis déjà un bon moment. La majorité des donneurs ont été possiblement en contact à maintes reprises avec ces virus depuis leur enfance. Nous avons utilisé, toute proportion gardée, une petite fraction du cerveau humain. Malgré cela, nous avons observé dans plus de 40 % des cerveaux la présence d'un ou des deux HCoV. Ces observations suggèrent que ces virus, particulièrement la souche 229E, puissent être des virus ubiquitaires ou faire partie de la flore virale du SNC. Il est possible que l'ARN coronaviral soit silencieux dans le SNC, sans qu'aucun virion ou protéine viraux ne soit produit (Fleming *et al.*, 1994). La détection de mutations spécifiques à des cerveaux de patients atteints de sclérose en plaques, et observées dans seulement un témoin normal, suggère que des variants du HCoV-OC43 puissent être présents de façon préférentielle chez les patients atteints de cette maladie. Ces variants pourraient être impliqués dans des neuropathologies alors que la souche prototype pourrait

être inoffensive. Le séquençage de régions génomiques coronavirales supplémentaires serait nécessaire pour évaluer la pertinence de cette hypothèse.

Étant donné la prévalence particulière des plaques de démyélinisation pour certaines régions du SNC: le nerf optique, le tronc cérébral, la moelle épinière et les régions périventriculaires (Moore, 1998), il serait pertinent de vérifier les sites anatomiques dans des cerveaux humains où les HCoV peuvent être détectés. Nous avons détecté de l'ARN de HCoV dans la matière blanche et dans la matière grise, dans des échantillons provenant de plaques actives et chroniques, et dans du tissu normal. Malheureusement, la localisation anatomique exacte de la majorité des échantillons n'était pas une information disponible des banques de cerveaux. De plus, dans le cas du HHV-6, une association préférentielle de la présence de ce virus dans les oligodendrocytes a été détectée chez les patients atteints de sclérose en plaques en comparaison avec des témoins (Challoner *et al.*, 1995). Une association préférentielle entre la présence de virus dans un type cellulaire particulier ou au site de neuropathologie et une maladie du SNC pourrait nous donner des indications quant aux rôles potentiels de ces virus comme agent causal d'une neuropathologie. Nous n'avons pu identifier le ou les type(s) cellulaire(s) contenant l'ARN coronaviral dans les cerveaux humains. Toutefois, les expériences d'infections persistantes *in vitro* suggèrent que les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones pourraient être de sites de persistance pour le virus OC43, alors que les oligodendrocytes et les neurones pourraient être les cellules de prédilection pour la persistance par le virus 229E.

La présence persistante du MHV a été associée à la progression de la démyélinisation aiguë vers une forme chronique et récurrente de la maladie (Knobler *et al.*, 1982). Toutefois, le MHV-JHM peut aussi persister dans le SNC des rats, se répliquer dans les neurones et les oligodendrocytes sans causer d'effet cytopathique, ni la mort des cellules infectées ou la stimulation d'une attaque par le système immunitaire (Sorensen *et al.*, 1984). Plusieurs facteurs

influencent l'aboutissement de la persistance coronavirale chez les rongeurs (Houtman et Fleming 1996b). Des observations similaires sont à prévoir chez l'humain. La persistance de HCoV pourrait être impliquée dans certaines pathologies, mais pourrait aussi n'avoir aucun effet pathologique détectable. D'autres virus persistent dans le SNC humain en induisant parfois des pathologies, tels le virus de la maladie de Borna, associé à des troubles de santé mentale (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997), le VIH associé à la démence et la myélopathie (Spencer et Price 1992), le polyomavirus JC associé à la leucoencéphalite multifocale progressive (Aksamit *et al.*, 1995), et le virus de la rougeole associé à la panencéphalite sous-aiguë sclérosante et l'encéphalite avec corps d'inclusion (Liebert 1997). Certains de ces virus peuvent aussi être détectés dans des cerveaux humains considérés neurologiquement sains : le virus de la rougeole (Katayama *et al.*, 1995), le virus JC (White *et al.*, 1992) et le virus HHV-6 (Challoner *et al.*, 1995). A l'image de ces virus, la présence de HCoV dans des cerveaux humains pourrait être synonyme de neuropathologie seulement chez une fraction des individus.

2.3 Mécanismes possibles de persistance

Des virus persistent chez leur hôte grâce à plusieurs stratégies qui consistent à fuir le système immunitaire sans causer la lyse des cellules infectées (Stroop, 1994). Tout d'abord, certains d'entre eux se répliquent dans un site immunologiquement privilégié, c'est-à-dire là où il y a peu de réponses immunitaires en général, par exemple le SNC. D'autres virus produisent des protéines peu immunogènes. Par exemple, le système immunitaire ne reconnaît pas comme étranger les prions, qui ne sont donc pas immunogènes. D'autres virus induisent une tolérance immunitaire. C'est le cas du virus LCMV lorsqu'il infecte les souriceaux nouveau-nés (Zinkernagel et Hengartner, 1992). Quelques virus infectent des cellules non permissives. Dans ce cas, le cycle réplicatif viral est interrompu et peu de protéines virales sont produites. Le virus de la rougeole est défectif au niveau de sa protéine M lorsqu'il cause l'encéphalite post-infectieuse sous-aiguë (Cattaneo *et al.*, 1986). La persistance

virale plutôt que la mort de l'hôte représente une éventualité avantageuse pour les virus.

La persistance d'acides nucléiques étrangers, particulièrement sous forme d'ARN, donc sensible aux RNAses cellulaires (Silverman, 1994; Player et Torrence, 1998), reste encore une énigme. Dans le cas du virus LCMV, une transcriptase inverse spécifique à l'hôte génère des ADN complémentaires à l'ARN viral. C'est sous forme d'ADN que ce virus pourrait persister (Klernerman *et al.*, 1997). Le virus Sindbis quant à lui reste sous une forme non productive dans les cerveaux de souris (Levine et Griffin, 1992). De tels mécanismes n'ont pas été démontrés pour les coronavirus.

2.4 Mécanismes de démyélinisation

Les mécanismes potentiels de démyélinisation viro-induite se divisent en deux groupes: l'effet direct sur les cellules productrices de la gaine de myéline et l'effet indirect par la stimulation de réponses immunitaires qui iront attaquer et endommager la myéline. La persistance virale pourrait déranger les fonctions des oligodendrocytes, donc nuire à la production de la gaine de myéline. C'est ce qui a été observé pour le virus JC (Aksamit *et al.*, 1995). Toutefois, pour les coronavirus murins l'effet direct sur les oligodendrocytes ne semble pas le mécanisme inducteur de démyélinisation (Barac-Latas *et al.*, 1997).

Pour les hypothèses d'effets indirects, la persistance virale pourrait induire la production de produits toxiques pour la myéline, des cytokines et des produits d'oxyde nitrique. Cette hypothèse est plausible, car dans le modèle murin des coronavirus, les astrocytes sont activés et sécrètent de telles molécules inflammatoires (Sun *et al.*, 1995). La persistance virale pourrait aussi stimuler une réponse immunitaire dirigée contre les cellules infectées. Cette hypothèse est aussi plausible, car une augmentation de l'expression de molécules du CMH a été observée suite à l'infection d'astrocytes murins en cultures primaires par certaines souches de MHV (Gilmore *et al.*, 1994).

L'induction de molécules du CMH et de molécules de costimulation telles les B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86), pourrait permettre des réponses immunitaires qui sont habituellement pratiquement absentes du SNC. Le mimétisme moléculaire suppose qu'une réponse immunitaire d'abord induite pour réagir à l'infection virale est dirigée par la suite contre des protéines du soi. De cette façon, l'infection virale pourrait induire une réponse auto-immunitaire non désirée. Le laboratoire du docteur Pierre Talbot a démontré la production préférentielle de lignées de lymphocytes T reconnaissant à la fois le virus 229E et la protéine basique de la myéline humaine à partir du sang périphérique de patients atteints de sclérose en plaques (Talbot *et al.*, 1996). Annie Boucher, du même laboratoire, a aussi réussi à obtenir des clones de lymphocytes T reconnaissant à la fois une protéine de la myéline et un HCoV soit la souche OC43 ou la souche 229E (Boucher *et al.*, 1998). On peut supposer que la persistance des HCoV dans le SNC, accompagnée d'une expression minimale ou transitoire de protéines virales, permet le maintien d'épitopes cibles pour des lymphocytes T actifs qui traversent le SNC. Les protéines de la gaine de myéline saine ne sont habituellement pas présentées par des cellules présentatrices d'antigènes de façon efficace dans le SNC. La présentation efficace de protéines virales permettraient aux lymphocytes T ayant des réactions croisées de demeurer dans le SNC, car l'un des épitopes, l'épitope viral, pour lesquels ils sont spécifiques, est présenté. Par la même occasion, ces cellules activées réagiraient ensuite à leur épitope du soi maintenant présenté à cause du processus inflammatoire induit par la persistance virale. Des nouvelles plaques actives de démyélinisation pourraient être détectées dans le microenvironnement où les HCoV persistants expriment leurs protéines virales, induisant une inflammation et par la même occasion la présentation de divers épitopes. Étant donné la nature ARN du génome coronaviral, une expression transitoire de certaines protéines virales permettant tout au moins la réPLICATION du génome viral est probablement nécessaire pour assurer le maintien des informations génétiques virales dans la cellule cible (Ahmed *et al.*, 1997); à moins que les coronavirus à l'image du LCMV (Klernerman *et al.*, 1997)

transcrivent leur génome en ADN pour permettre sa réPLICATION par la machinerie cellulaire.

Le MHV a induit des lymphocytes T autoréactifs contre la protéine basique de la myéline chez des rats infectés (Watanabe *et al.*, 1983). Une augmentation de la fréquence de lymphocytes T autoréactifs a aussi été observée chez des souris infectées par le MHV (Kyuwama *et al.*, 1990). L'hypothèse de mimétisme moléculaire entre les HCoV et des protéines du soi demeure plausible. Des expériences supplémentaires devront être effectuées pour conclure quant au(x) mécanisme(s) potentiellement impliqué(s) dans la démyélinisation observée chez les rongeurs et les primates non humains, et aussi pour évaluer la possibilité d'un tel effet pathologique chez des humains infectés par des HCoV au niveau du SNC.

2.5 Lien avec la sclérose en plaques

Malgré les nombreux efforts, l'étiologie de la sclérose en plaques demeure un mystère. La communauté scientifique s'entend en général pour affirmer que cette maladie est polygénique, donc que plusieurs facteurs génétiques sont impliqués, mais aussi qu'un ou des agents infectieux, potentiellement des virus, jouent un rôle d'initiateur ou de stimulateur pour la propagation de cette maladie. Des réponses immunitaires détectables au niveau des plaques de démyélinisation sont impliquées dans sa pathogenèse. La question demeure ouverte à savoir quel(s) virus seraient associé(s) à cette pathologie et aussi par quel(s) mécanisme(s). Il est possible que l'agent initiateur ne soit déjà plus détectable au moment où les symptômes cliniques apparaissent; qu'ayant induit une réponse immunitaire aberrante, il soit disparu ou qu'il ait été éliminé par le système immunitaire. Il est aussi possible que l'agent initiateur ou stimulateur de cette maladie, soit encore présent, probablement persistant à son lieu de délit, soit le SNC. Ayant en tête cette dernière hypothèse, plusieurs laboratoires ont tenté de détecter un agent infectieux spécifique à la sclérose en plaques.

Les coronavirus s'inscrivent sur une liste déjà longue de virus associés à un moment ou un autre avec la sclérose en plaques. Les résultats présentés dans cette thèse ne peuvent prétendre que les HCoV soient les agents infectieux causant la sclérose en plaques. Par contre, ils démontrent clairement, et ce, pour la première fois, que ces virus peuvent être neurotropes, donc qu'ils peuvent infecter et persister dans des cellules du SNC. De plus, nos travaux, particulièrement les expériences d'hybridation *in situ*, indiquent pour la première fois que les HCoV sont neuroinvasifs, tout au moins la souche HCoV-OC43, car ils ont atteint le SNC à partir de sites périphériques. Pour le moment, nous ne pouvons définir la source originale d'infection à partir de laquelle ces virus ont atteint le SNC. La susceptibilité des macrophages (Patterson *et al.*, 1982, Collins 1998), suggère que ces cellules pourraient agir comme vecteur. De plus, les cellules endothéliales du cerveau humain sont susceptibles à l'infection par HCoV-229E (Cabirac *et al.*, 1995), elles pourraient aussi agir comme porte d'entrée pour ce virus. A l'image des coronavirus murins, l'utilisation du nerf olfactif comme voie d'entrée dans le système nerveux pourrait être plausible pour les HCoV, particulièrement la souche OC43 qui appartient au même groupe antigénique que le MHV. Une grande question demeure, est-ce que la présence de HCoV peut impliquer une neurovirulence ? Encore une fois, en se basant sur le modèle murin, on pourrait supposer que chez certaines personnes prédisposées génétiquement, la présence de tels virus dans le SNC peut induire une pathologie. Étant donné l'importance des astrocytes dans le maintien de l'homéostasie du SNC (Aschner, 1998) et la démonstration *in vitro* que ces cellules peuvent être la cible d'infections persistantes par les HCoV, il est possible qu'une telle présence virale détériore ou active ces cellules. Des astrocytes activés ont été détectés au cours de maladies neurodégénératives telles la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Chao *et al.*, 1996). De plus, les oligodendrocytes semblent aussi une cible de choix pour les infections persistantes par ces virus. Étant donné leur rôle dans la production de la gaine de myéline du SNC, il est aussi possible que la persistance de HCoV dans ces

cellules nuisent aux métabolismes cellulaires normaux et induisent une démyélinisation. Les microglies ne semblent pas des cellules de choix pour la persistance des HCoV. Toutefois, ces cellules aux multiples activités immunitaires sont potentiellement impliquées, une fois activées, dans diverses pathologies telles la sclérose en plaques (Sriram et Rodriguez, 1997), et la maladie d'Alzheimer (Meda *et al.*, 1995). La présence de virus dans les cellules avoisinantes pourrait activer ces macrophages résidents du SNC, par des mécanismes encore inconnus.

La démonstration de neurotropisme et de neuroinvasion a aussi été faite pour d'autres virus candidats comme agent causal de la sclérose en plaques, par exemple pour le HHV-6. Nous suggérons, à l'instar d'autres chercheurs, qu'étant donné la grande diversité des symptômes cliniques observés chez les patients atteints de sclérose en plaques, plusieurs virus puissent induire la maladie ou participer aux exacerbations (Ewing et Bernard, 1998). L'implication d'un seul agent étiologique serait peu probable. De plus comme l'ont suggéré de nombreuses observations, les virus sont probablement impliqués dans les exacerbations de cette maladie (Sibley *et al.*, 1985; Andersen *et al.*, 1993; Panitch, 1994).

La détermination des types cellulaires infectés *in vivo* dans le SNC humain pourra déjà nous fournir des indications quant à l'issue potentielle d'une telle infection. De plus, la recherche d'antigènes viraux devrait aussi être entreprise pour évaluer si les HCoV sont persistants sous forme latente, donc sans expression génique, ou sous forme chronique, avec une traduction de protéines virales. Il serait aussi important de pouvoir déterminer le phénotype des molécules de CMH des patients chez lesquels les HCoV ont été détectés. Ces gènes représentent le facteur génétique associé de façon plus importante à la sclérose en plaques. De plus, chez les patients décédés sans maladie neurologique connue, il serait approprié de vérifier la présence d'anomalies dans le SNC. La présence d'une démyélinisation et d'une infiltration de cellules immunitaires ou l'expression de molécules de CMH et de molécules

d'activation accessoires, n'ayant pas encore induit des symptômes cliniques, pourraient être détectées. Il est possible que la présence de HCoV-OC43 soit préférentielle chez les patients atteints de sclérose en plaques et chez des patients dits neurologiquement sains, mais chez qui des anomalies neurologiques encore silencieuses sont présentes. De très nombreuses expériences seront nécessaires pour confirmer ou infirmer l'implication des HCoV dans la sclérose en plaques. Néanmoins, les résultats présentés dans cette thèse contribuent à qualifier les HCoV de neurotropes et neuroinvasifs.

CONCLUSION

Certaines souches de coronavirus murins neuroadaptées sont neurotropes, car elles infectent les cellules du SNC de leur hôte, rongeurs ou primates non humains. De plus, elles pénètrent le SNC à partir de sites périphériques, elles sont par conséquent neuroinvasives. Finalement, des pathologies neurologiques sont causées par des infections coronavirales; ces virus sont donc aussi neurovirulents. Des inoculations intranasales et intracérébrales de MHV induisent une encéphalomyélite chronique, accompagnée d'une persistante virale et d'une démyélinisation, chez les rongeurs. Ces neuropathologies sont d'ailleurs utilisées comme modèle de maladies démyélinisantes humaines telle la sclérose en plaques.

Les HCoV sont impliqués dans approximativement 30 % des rhumes. Des observations à partir du SNC de patients atteints de la sclérose en plaques, telle la détection d'ARN viral, de protéines virales et de virions suggèrent que ces virus puissent être impliqués dans la pathogenèse de cette maladie démyélinisante. Des cellules neurales humaines en cultures primaires et en lignées immortalisées sont susceptibles à des infections par les HCoV. Des expériences supplémentaires étaient nécessaires pour mieux caractériser les potentiels neurotropisme, neuroinvasion et neurovirulence de ces virus. Nous avions comme objectifs initiaux de caractériser le neurotropisme des HCoV et d'évaluer l'implication potentielle d'un tel neurotropisme dans la sclérose en plaques. Nous avons d'une part utilisé des lignées neurales humaines pour étudier le neurotropisme *in vitro* de tels virus et des cerveaux humains provenant de patients décédés pour examiner le neurotropisme et la neuroinvasion.

Nous avons démontré que les HCoV peuvent infecter de façon persistante des lignées neurales humaines. De plus, au cours de ces infections des antigènes viraux et de l'ARN viral ont pu être détectés, de même qu'une production de virions infectieux. Une lignée humaine d'oligodendrocytes et une lignée humaine neuronale ont été infectées de façon persistante par le HCoV-229E. Au cours de ces infections, peu de modifications ont été observées

au niveau du gène putatif S1 de ce virus. Des infections persistantes par le HCoV-OC43 ont été observées sur deux lignées astrocytaires, une lignée oligodendrocytaire et une lignée neuronale. De nombreuses modifications du gène putatif S1 du HCoV-OC43 sont apparues au cours de telles infections. Ces résultats suggèrent que ce virus puisse s'adapter de façon moléculaire à l'environnement du SNC.

Nous avons aussi démontré que les HCoV sont potentiellement neurotropes. En effet, 48 % de tous les donneurs se sont avérés positifs pour la détection d'ARN de HCoV. Étant donné la petite portion du cerveau utilisée pour effectuer ces expériences, ces résultats suggèrent que les HCoV, particulièrement la souche 229E présente chez 44 % des donneurs, puissent faire partie de la flore virale du SNC. La souche OC43 a été présente dans 23 % des donneurs. Une prévalence plus élevée et statistiquement significative du HCoV-OC43 a été observée chez les patients atteints de sclérose en plaques (14/39) en comparaison avec des témoins (7/51). Le séquençage des amplicons du gène N a révélé des mutations ponctuelles pour la souche OC43. Certaines de ces mutations ont été détectées dans différents cerveaux, et plus particulièrement dans des cerveaux provenant de patients atteints de sclérose en plaques. Ces mutations n'ont jamais été détectées dans des virus de laboratoire. Des expériences d'hybridation *in situ* ont confirmé la présence d'ARN de HCoV-OC43 dans les tissus de cerveaux humains. La présence de HCoV dans des cerveaux humains suggère une neuroinvasion et un neurotropisme pour ces virus.

Des études supplémentaires seront nécessaires pour clairement caractériser la conséquence physiologique de la présence des HCoV dans le SNC humain. L'étude du modèle murin avec les MHV a démontré que les neuropathologies observées sont complexes et qu'elles impliquent un apport viral sous forme de persistance, et des réponses immunitaires de l'hôte. Nous avons prouvé que les HCoV peuvent persister dans des lignées neurales. Les effets de ces virus sur les cellules neurales humaines pourraient être explorés à

l'aide de ce modèle d'infection persistante ou encore avec des cultures primaires. De plus, les séquences des HCoV, retrouvés dans le SNC humain et détectés à la suite des infections persistantes *in vitro*, devront être scrutées en détail. Des déterminants de neurovirulence ont été associés à des séquences particulières dans le modèle murin. Le potentiel de neurovirulence des HCoV pourrait s'exprimer par certaines souches de ces virus seulement. Suite aux observations dans le modèle animal, on peut supposer que des individus, prédisposés génétiquement, et infectés par des souches neurovirulentes de HCoV, pourraient développer des maladies neurologiques telle la sclérose en plaques.

REMERCIEMENTS

Je voudrais témoigner ma profonde gratitude au docteur Pierre Talbot pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je le remercie pour sa disponibilité et sa grande confiance au cours des années passées dans son équipe. Il a su faire développer mes qualités de scientifique en poussant toujours plus loin les limites de mes défis. Je peux déjà affirmer qu'il a influencé positivement toute la carrière qui s'ouvre devant moi.

Je voudrais aussi remercier les membres passés et actuels du laboratoire pour les nombreuses discussions et les encouragements que nous nous sommes prodigués. De façon plus particulière, je voudrais souligner l'apport scientifique et critique des docteurs Alain Lamarre et Mathilde Yu. Je voudrais aussi remercier madame Francine Lambert pour son soutien technique occasionnel.

Je ne pourrais passer sous silence l'appui inconditionnel de mon conjoint, Richard Villemur, qui a partagé tous les moments de ma route vers la réalisation de mon doctorat, les agréables comme les plus difficiles.

Enfin, je remercie la Fondation Armand-Frappier, l'Institut Armand-Frappier et la Société Canadienne de la Sclérose en Plaques pour leur soutien financier sous forme de bourse d'études, et le Conseil de Recherches Médicales du Canada pour le subventionnement de tous les travaux présentés.

BIBLIOGRAPHIE

- Adami, C., J. Pooley, J. Glomb, E. Stecker, F. Fazal, J.O. Fleming, et S.C. Baker. 1995. Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection: Quasispecies nature of the persisting MHV RNA. *Virology* **209**:337-346.
- Ahmed, R., C.S. Hahn, T. Somasundaram, L. Villarete, M. Matloubian, et J.H. Strauss. 1991. Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J. Virol.* **65**:4242-4247.
- Ahmed, R., L.A. Morrison, et D.M. Knipe. 1997. Viral persistance. Dans: N. Nathanson, R. Ahmed, F. Gonzalez-Scarano, D.E. Griffin, K.V. Holmes, F.A. Murphy, H.L. Robinson (ed). Viral pathogenesis. Philadelphia, PA. USA. : Lippincott-Raven Publishers. p.181-205.
- Aichele, P., M.F. Bachmann, H. Hengartner, et R.M. Zinkernagel. 1996. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol. Rev.* **152**:21-45.
- Aksamit, A. J. Jr. 1995. Progressive multifocal leukoencephalopathy: a review of the pathology and pathogenesis. *Microsc. Res. Tech.* **32**:302-311.
- Aloisi, F., F. Ria, G. Penna, et L. Adorini. 1998. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J. Immunol.* **160**:4671-4680.
- Alpérovitch, A., C. Berr, A. Cambon-Thomsen, J. Puel, J.-M. Dugoujon, J.-B. Ruidavets, et M. Clanet. 1991. Viral antibody titers, immunogenetic markers, and their interrelations in multiple sclerosis patients and controls. *Hum. Immunol.* **31**:94-99.
- Andersen, O., P.E. Lygner, T. Bergstrom, M. Andersson, et A. Vahlne. 1993. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J. Neurol.* **240**:417-422.
- Antel, J. P., E. McCrea, U. Ladiwala, Y.F. Qin, et B. Becher. 1998. Non-MHC-restricted cell-mediated lysis of human oligodendrocytes in vitro: Relation with CD56 expression. *J. Immunol.* **160**:1606-1611.
- Apostolov, K., et P. Spasic. 1975. Evidence of viral etiology in endemic (Balkan) nephropathy. *Lancet* **2**:1271-1273.
- Arnason, B. G. W. 1996. Interferon beta in multiple sclerosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **81**:1-11.
- Arnold, W., M. Klein, J.B. Wang, W.A. Schmidt, et H.J. Trampisch. 1981. Coronavirus-associated antibodies in nasopharyngeal carcinoma and infectious mononucleosis. *Arch. Otorhinolaryngol.* **232**:165-177.

- Aschner, M. 1998. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology* **19**:269-281.
- Atkinson, M. A., M.A. Bowman, L. Campbell, B.L. Darrow, D.L. Kaufman, et N.K. MacLaren. 1994. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* **94**:2125-2129.
- Baker, S. C., C.-K Sheih, L.E. Soe, M.-F Chang, D.M. Vannier, et Lai M.M.C. 1989. Identification of a domain required for the autoproteolytic cleavage of murine coronavirus gene A polyprotein. *J. Virol.* **63**:3693-3699.
- Baker, S. C., K. Yokomori, S. Dong, R. Carlisle, A.E. Gorbatenko, E.V. Koonin, et Lai M.M.C. 1993. Identification of the catalytic sites of a papain-like cystein proteinase of murine coronavirus. *J. Virol.* **67**:6056-6063.
- Barac-Latas, V., G. Suchanek, H. Breitschopf, A. Stuehler, H. Wege, et H. Lassmann. 1997. Patterns of oligodendrocyte pathology in coronavirus-induced subacute demyelinating encephalomyelitis in the Lewis rat. *Glia* **19**:1-12.
- Barnaba, V. 1996. Viruses, hidden self-epitopes and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **152**:47-66.
- Barnett, E. M., et S. Perlman. 1993. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology* **194**:185-191.
- Barthold, S. W., et A.L. Smith. 1992. Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice. *Arch. Virol.* **122**:35-44.
- Beall, S. S., W.E. Biddison, D.E. McFarlin, H.F. McFarland, et L.E. Hood. 1993. Susceptibility for multiple sclerosis is determined, in part, by inheritance of a 175-kb region of the TcR V beta chain locus and HLA class II genes. *J. Neuroimmunol.* **45**:53-60.
- Beall, S. S., P. Concannon, P. Charmley, H.F. McFarland, R.A. Gatti, L.E. Hood, D.E. McFarlin, et W.E. Biddison. 1989. The germline repertoire of T cell receptor beta-chain genes in patients with chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **21**:59-66.
- Beards, G. M., C. Hall, J. Green, T.H. Flewett, F. Lamouliatte, et P. Du Pasquier. 1984. An enveloped virus in stools of children and adults with gastroenteritis that resembles the Breda virus of calves. *Lancet* **1**:1050-1052.

- Bende, M., I. Barrow, J. Heptonstall, P.G. Higgins, W. Al-Nakib, D.A. Tyrrell, et A. Akerlund. 1989. Changes in human nasal mucosa during experimental coronavirus common colds. *Acta Otolaryngol.* **107**:262-269.
- Bergmann, C. C., Q. Yao, M. Lin, et S.A. Stohlman. 1996. The JHM strain of mouse hepatitis virus induces a spike protein-specific Db-restricted cytotoxic T cell response. *J. Gen. Virol.* **77**:315-25.
- Bergström, T., O. Andersen, et A. Vahlne. 1989. Isolation of herpes simplex virus type 1 during first attack of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **26**:283-285.
- Bobowick, A. R., J.F. Kurtzke, J.A. Brody, Z. Hrubec, et M. Gillespie. 1978. Twin study of multiple sclerosis: an epidemiologic inquiry. *Neurology* **28**:978-987.
- Bonavia, A., N. Arbour, V.W. Yong, et P.J. Talbot. 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *J. Virol.* **71**:800-806.
- Bonilla, P. J., S.A. Hughes, J.D. Pinon, et S.R. Weiss. 1995. Characterization of the leader papain-like proteinase of MHV-A59: Identification of a new cleavage site. *Virology* **209**:489-497.
- Bonilla, P. J., S.A. Hughes, et S.R. Weiss. 1997. Characterization of a second cleavage site and demonstration of activity in trans by the papain-like proteinase of the murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.* **71**:900-909.
- Bos, E. C. W., W. Luytjes, H. van der Meulen, H.K. Koerten, et W.J.M. Spaan. 1996. The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. *Virology* **218**:52-60.
- Boucher, A., G. Mercier, P. Duquette, et P.J. Talbot. 1998. "Clonal T-cell cross-reactivity between myelin antigens MBP and PLP and human respiratory coronaviruses in multiple sclerosis." Dans: Fifth International Congress of the International Society of Neuroimmunology (Montréal, 23-27 août 1998). *J. Neuroimmunol.* **90**:30.
- Boylan, K. B., N. Takahashi, D.W. Paty, A.D. Sadovnick, M. Diamond, L.E. Hood, et S.B. Prusiner. 1990. DNA length polymorphism 5' to the myelin basic protein gene is associated with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **27**:291-7.
- Bray, P. F., L.C. Bloomer, V.C. Salmon, M.H. Bagley, et P.D. Larsen. 1983. Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* **40**:406-408.

- Bray, P. F., J. Luka, P.F. Bray, K.W. Culp, et J.P. Schlight. 1992. Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology* **42**:1798-1804.
- Bredenbeek, P. J., C.J. Pachuk, A.F.H. Noten, J. Charite, W. Luytjes, S.R. Weiss, et W.J.M. Spaan. 1990. The primary structure and expression of the second open reading frame of the polymerase gene of the coronavirus MHV-A59: A highly conserved polymerase is expressed by an efficient ribosomal frameshift mechanism. *Nucleic Acids Res.* **18**:1825-1832.
- Briant, L., P. Avoustin, J. Clayton, M. McDermott, M. Clanet, A. Cambon-Thomsen, et The French Group on Multiple Sclerosis. 1993. Multiple sclerosis susceptibility: population and twin study of polymorphisms in the T-cell receptor beta and gamma genes region. *Autoimmunity* **15**:67-73.
- Buchmeier, M. J., H.A. Lewicki, P.J. Talbot, et R.L. Knobler. 1984. Murine hepatitis virus-4 (strain JHM)-induced neurologic disease is modulated in vivo by monoclonal antibody. *Virology* **132**:261-270.
- Burks, J. S., B.L. DeVald, L.D. Jankovsky, et J.C. Gerdes. 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science* **209**:933-934.
- Cabirac, G. F., R.S. Murray, L.B. McLaughlin, D.M. Skolnick, B. Hogue, K. Dorovini-Zis, et P.J. Didier. 1995. In vitro interaction of coronaviruses with primate and human brain microvascular endothelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**:79-88.
- Cabirac, G. F., K.F. Soike, J.Y. Zhang, K. Hoel, C. Butunoi, G.Y. Cai, S. Johnson, et R.S. Murray. 1994. Entry of coronavirus into primate CNS following peripheral infection. *Microb. Pathog.* **16**:349-357.
- Callow, K. A. 1985. Effect of specific humoral immunity and some non-specific factors on resistance of volunteers to respiratory coronavirus infection. *J. Hyg. (Lond)* **95**:173-189.
- Callow, K. A., H.F. Parry, M. Sergeant, et D.A. Tyrrell. 1990. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection in man. *Epidemiol. Infect.* **105**:435-446.
- Castro, R. F., et S. Perlman. 1995. CD8+ T-cell epitopes within the surface glycoprotein of a neurotropic coronavirus and correlation with pathogenicity. *J. Virol.* **69**:8127-8131.

- Cattaneo, R., A. Schmid, P. Spielhofer, K. Kaelin, K. Baczko, V. ter Meulen, J. Pardowitz, S. Flanagan, B.K. Rima, S.A. Udem, et M.A. Billeter. 1989. Mutated and hypermutated genes of persistent measles viruses which caused lethal human brain diseases. *Virology* **173**:415-425.
- Cavanagh, D., D.A. Brian, M. Brinton, L. Enjuanes, M.C. Horzinek, M.M.C. Lai, H. Laude, P.G.W. Plagemann, S. Siddell, W.J.M. Spaan, et P.J. Talbot. 1997. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* **142**:629-633.
- Chagnon, F., A. Lamarre, C. Lachance, M. Krakowski, T. Owens, J.-F Laliberté, et P.J. Talbot. 1998. Characterization of the expression and immunogenicity of the ns4b protein of human coronavirus 229E. *Can. J. Microbiol.* **44**:1012-1017.
- Challoner, P. B., K.T. Smith, J.D. Parker, D.L. MacLeod, S.N. Coulter, T.M. Rose, E.R. Schultz, J.L. Bennett, R.L. Garber, M. Chang, P.A. Schad, P.M. Stewart, R.C. Nowinski, J.P. Brown, et G.C. Burmer. 1995. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:7440-7444.
- Chany, C., O. Moscovici, P. Lebon, et S. Rousset. 1982. Association of coronavirus infection with neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* **69**:209-214.
- Chao, C. C., S. Hu, et P.K. Peterson. 1996. Glia: the not so innocent bystanders. *J. Neurovirol.* **2**:234-239.
- Chen, D. S., M. Asanaka, K. Yokomori, F. Wang, S.B. Hwang, H.P. Li, et M.M.C. Lai. 1995. A pregnancy-specific glycoprotein is expressed in the brain and serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:12095-12099.
- Chen, I. S. Y., A.M. Haislip, L.W. Myers, G.W. Ellison, et J.E. Merrill. 1990. Failure to detect human T-cell leukemia virus-related sequences in multiple sclerosis blood. *Arch. Neurol.* **47**:1064-1065.
- Chen, W., et R.S. Baric. 1995. Function of a 5'-end genomic RNA mutation that evolves during persistent mouse hepatitis virus infection in vitro. *J. Virol.* **69**:7529-7540.
- Chen, W., et R.S. Baric. 1996. Molecular anatomy of mouse hepatitis virus persistence: Coevolution of increased host cell resistance and virus virulence. *J. Virol.* **70**:3947-3960.

- Cjaza, A. J., H.A. Carpenter, P.J. Santrach, S.B. Moore, H.F. Taswell, et H.A. Homburger. 1993. Evidence against hepatitis viruses as important causes of severe autoimmune hepatitis in the United States. *J. Hepatol.* **18**:342-352.
- Coates, A. R. M., et J. Bell. 1998. HHV-6 and multiple sclerosis. *Nat. Med.* **4**:537-538.
- Collins, A. R. 1994. Human coronavirus OC43 interacts with major histocompatibility complex class I molecules at the cell surface to establish infection. *Immunol. Invest.* **23**:313-321.
- Collins, A. R. 1998. Human macrophages are susceptible to coronavirus OC43. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**:635-639.
- Collins, A. R., R.L. Knobler, H. Powell, et M.J. Buchmeier. 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* **119**:358-371.
- Collins, A. R., et O. Sorensen. 1986. Regulation of viral persistence in human glioblastoma and rhabdomyosarcoma cells infected with coronavirus OC43. *Microb.Pathog.* **1**:573-582.
- Compston, D. A., B.N. Vakarelis, E. Paul, W.I. McDonald, J.R. Batchelor, et C.A. Mims. 1986. Viral infection in patients with multiple sclerosis and HLA-DR matched controls. *Brain* **109**:325-344.
- Compton, S. R., S.W. Barthold, et A.L. Smith. 1993. The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab. Anim. Sci.* **43**:15-28.
- Compton, S. R., D.B. Rogers, K.V. Holmes, D. Fertsch, J. Remenick, et J.J. McGowan. 1987. In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.* **61**:1814-1820.
- Cook, S. D., P.C. Dowling, et W.C. Russell. 1979. Neutralizing antibodies to canine distemper and measles virus in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **41**:61-70.
- Cook, S. D., P.C. Dowling, J.W. Prineas, et W.W. Hall. 1981. A radioimmunoassay research for measles and distemper antigens in subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis brain tissues. *J. Neurol. Sci.* **51**:447-456.
- Cosby, S. L., S. McQuaid, M.J. Taylor, M. Bailey, B.K. Rima, S.J. Martin, et I.V. Allen. 1989. Examination of eight cases of multiple sclerosis and 56 neurological and non-neurological controls for genomic sequences of

- measles virus, canine distemper virus, simian virus 5 and rubella virus. J. Gen. Virol. **70**:2027-2036.
- Cox, G. J., M.D. Parker, et L.A. Babiuk. 1991. Bovine coronavirus nonstructural protein ns2 is a phosphoprotein. Virology **185**:509-512.
- Cristallo, A., F. Gambaro, G. Biamonti, P. Ferrante, M. Battaglia, et P.M. Cereda. 1997. Human coronavirus polyadenylated RNA sequences in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. Microbiologica **20**:105-114.
- Cuzner, M. L., et W.T. Norton. 1996. Biochemistry of demyelination. Brain Pathol. **6**:231-242.
- Dales, S., et R. Anderson. 1995. Pathogenesis and diseases of the central nervous system caused by murine coronaviruses. Dans: S.G. Siddell (éd.). The Coronaviridae. NewYork, N.Y. :Plenum Press p. 257-292.
- Dalziel, R. G., P.W. Lampert, P.J. Talbot, et M.J. Buchmeier. 1986. Site-specific alteration of murine hepatitis virus type 4 peplomer glycoprotein E2 results in reduced neurovirulence. J. Virol. **59**:463-471.
- Daniel, C., R. Anderson, M.J. Buchmeier, J.O. Fleming, W.J. Spaan, H. Wege, et 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.
- Daniel, C., et P.J. Talbot. 1990. Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59. Virology **174**:87-94.
- de la Torre, J. C., E. Martinez-Salas, J. Diez, A. Villaverde, F. Gebauer, E. Rocha, M. Davila, et E. Domingo. 1988. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. J. Virol. **62**:2050-2058.
- de la Torre, J. C., et M.B. Oldstone. 1996. Anatomy of viral persistence: mechanisms of persistence and associated disease. Adv. Virus Res. **46**:311-343.
- de Vries, H. E., J. Kuiper, A.G. de Boer, T.J.C. van Berkel, et D.D. Breimer. 1997. The blood-brain barrier in neuroimmunology diseases. Pharmacol. Rev. **49**:143-155.

- Debiaggi, M., M. Luini, P.M. Cereda, M. Perduca, et E. Romero. 1986. Serum inhibitor of coronaviruses OC43 and NCDCV: a study in vivo. *Microbiologica* **9**:33-37.
- Dekaban, G. A., et G.P.A. Rice. 1990. Retroviruses and multiple sclerosis. II. Failure of gene amplification techniques to detect viral sequences unique to the disease. *Neurology* **40**:1254-1258.
- Del Bigio, M. R. 1995. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *GLIA* **14**:1-13.
- Delmas, B., J. Gelfi, R. L'Haridon, L.K. Vogel, H. Sjöström, O. Norén, et H. Laude. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**:417-420.
- Delwart, E. L., H. Pan, H.W. Sheppard, D. Wolpert, A.U. Neumann, B. Korber, et J.I. Mullins. 1997. Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J. Virol.* **71**:7498-7508.
- DiRosa, F., et V. Barnaba. 1998. Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity. *Immunol. Rev.* **164**:17-27.
- Domingo, E., et J.J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:151-178.
- Dörries, R., S. Schwender, H. Imrich, et H. Harms. 1991. Population dynamics of lymphocyte subsets in the central nervous system of rats with different susceptibility to coronavirus-induced demyelinating encephalitis. *Immunology* **74**:539-545.
- Dowling, P. C., B.M. Blumberg, D. Kolakofsky, P. Cook, A. Jotkowitz, J.W. Prineas, et S.D. Cook. 5. Measles virus nucleic acid sequences in human brain. *Virus Res.*
- Duquette, P., J. Pleines, M. Girard, L. Charest, M. Senecal-Quevillon, et C. Masse. 1992. The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* **19**:466-471.
- Dveksler, G. S., M.N. Pensiero, C.B. Cardellichio, R.K. Williams, G.-S Jiang, K.V. Holmes, et C.W. Dieffenbach. 1991. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* **65**:6881-6891.
- Ebers, G. C. 1982. HLA typing in sibling pairs with multiple sclerosis. *Lancet* **2**:1278.

- Ebers, G. C., K. Kukay, D.E. Bulman, A.D. Sadovnick, G. Rice, C. Anderson, H. Armstrong, K. Cousin, R.B. Bell, W. Hader, D.W. Paty, S. Hashimoto, J. Oger, P. Duquette, S. Warren, T. Gray, P. O'Connor, A. Nath, A. Auty, L. Metz, G. Francis, J.E. Paulseth, T.J. Murray, W. Pryse-Phillips, R. Nelson, M. Freedman, D. Brunet, J.P. Bouchard, D. Hinds, et N. Risch. 1996. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **13**:472-476.
- Ebers, G. C., et A.D. Sadovnick. 1994. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J. Neuroimmunol.* **54**:1-17.
- Ehrlich, G. D., J.B. Glaser, V. Bryz-Gornia, J. Maese, T.A. Waldmann, B.J. Poiesz, S.J. Greenberg, et The HTLV-MS Working Group. 1991. Multiple sclerosis, retroviruses, and PCR. *Neurology* **41**:335-343.
- Enjuanes, L., D.A. Brian, D. Cavanagh, K.V. Holmes, M.M.C. Lai, H. Laude, P. Masters, P. Rottier, S.G. Siddell, W.J.M. Spaan, F. Taguchi, et P.J. Talbot. 1999. Coronaviridae. Dans: C.M. Fauquet, M.H.V. Van Regenmortel, D.H.L. Bishop, et C.R. Pringle (ed). *Virus taxonomy*. New York. NY. USA. : Academic Press, (Sous presse).
- Evans, C. F., M.S. Horwitz, M.V. Hobbs, et M.B.A. Oldstone. 1996. Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **184**:2371-2384.
- Ewing, C., et C.C. Bernard. 1998. Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol. Cell Biol.* **76**:47-54.
- Fazakerley, J. K., et M.J. Buchmeier. 1993. Pathogenesis of virus-induced demyelination. *Adv. Virus Res.* **42**:249-324.
- Fazakerley, J. K., S.E. Parker, F. Bloom, et M.J. Buchmeier. 1992. The V5A13.1 envelope glycoprotein deletion mutant of mouse hepatitis virus type-4 is neuroattenuated by its reduced rate of spread in the central nervous system. *Virology* **187**:178-188.
- Fazzini, E., J. Fleming, et S. Fahn. 1992. Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **7**:153-158.
- Ferrante, P., E. Omodeo-Zorini, M.R. Zuffolato, R. Mancuso, R. Caldarelli-Stefano, S. Puricelli, M. Mediati, L. Losciale, et D. Caputo. 1997. Human T-cell lymphotropic virus tax and Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood of multiple sclerosis patients during acute attack. *Acta Neurol.Scand.* **95**:79-85.

- Ferraro, A. S., et M.M. Newkirk. 1993. Correlative studies of rheumatoid factors and anti-viral antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **92**:425-431.
- Ferri, C., F. Greco, G. Longombardo, P. Palla, A. Moretti, E. Marzo, P.V. Fosella, G. Pasero, et S. Bombardieri. 1991. Antibodies against hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia patients. *Infection* **19**:417-420.
- Field, E. J., S. Cowshall, H.K. Narang, et T.M. Bell. 1972. Viruses in multiple sclerosis ? *Lancet* **2**:280-281.
- Fillet, A. M., P. Lozeron, H. Agut, O. Lyon-Caen, et R. Liblau. 1998. HHV-6 and multiple sclerosis. *Nat. Med.* **4**:537.
- Fleming, J. O., F.A.K. El Zaatar, W. Gilmore, J.D. Berne, J.S. Burks, S.A. Stohlman, W.W. Tourtellotte, et L.P. Weiner. 1988. Antigenic assessment of coronaviruses isolated from patients with multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* **45**:629-633.
- Fleming, J. O., J.J. Houtman, H. Alaca, H.C. Hinze, D. McKenzie, J. Aiken, T. Bleasdale, et S. Baker. 1994. Persistence of viral RNA in the central nervous system of mice inoculated with MHV-4. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**:327-332.
- Fleming, J. O., R.A. Shubin, M.A. Sussman, N. Casteel, et S.A. Stohlman. 1989. Monoclonal antibodies to the matrix (E1) glycoprotein of mouse hepatitis virus protect mice from encephalitis. *Virology* **168**:162-167.
- Fleming, J. O., M.D. Trousdale, J. Bradbury, S.A. Stohlman, et L.P. Weiner. 1987. Experimental demyelination induced by coronavirus JHM (MHV-4): molecular identification of a viral determinant of paralytic disease. *Microb. Pathog.* **3**:9-20.
- Frasca, L., C. Piazza, et E. Piccolella. 1998. CD4+ T cells orchestrate both amplification and deletion of CD8+ T cells. *Crit. Rev. Immunol.* **18**:569-594.
- Fridkis-Hareli, M., et J.L. Strominger. 1998. Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. *J. Immunol.* **160**:4386-4397.
- Fugger, L., N. Morling, L.P. Ryder, M. Sandberg-Wollheim, et A. Svejgaard. 1990. Failure to demonstrate human T cell lymphotropic virus type I in multiple sclerosis patients. *J. Gen. Virol.* **71**:1103-1107.
- Fujinami, R. S., J.A. Nelson, L. Walker, et M.B.A. Oldstone. 1988. Sequence homology and immunologic cross-reactivity of human cytomegalovirus with HLA-DR β chain: a means for graft rejection and immunosuppression. *J. Virol.* **62**:100-105.

- Fujinami, R. S., et M.B. Oldstone. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**:1043-1045.
- Fujinami, R. S., M.B.A. Oldstone, Z. Wroblewska, M.E. Frankel, et H. Koprowski. 1983. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:2346-2350.
- Gale, C. R., et C.N. Martyn. 1995. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog. Neurobiol.* **47**:425-448.
- Gallagher, T. M., S.E. Parker, et M.J. Buchmeier. 1990. Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. *J. Virol.* **64**:731-741.
- Garson, J. A., P.W. Tuke, P. Giraud, G. Paranhos-Baccala, et H. Perron. 1998. Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* **351**:33.
- Gehrman, J., Y. Matsumoto, et G.W. Kreutzberg. 1995. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **20**:269-287.
- Gerna, G., N. Passarani, P.M. Cereda, et M. Battaglia. 1984. Antigenic relatedness of human enteric coronavirus strains to human coronavirus OC43: a preliminary report. *J. Infect. Dis.* **150**:618-619.
- Gilmore, W., J. Correale, et L.P. Weiner. 1994. Coronavirus induction of class I major histocompatibility complex expression in murine astrocytes is virus strain specific. *J. Exp. Med.* **180**:1013-1023.
- Godec, M. S., D.M. Asher, R.S. Murray, M.L. Shin, L.W. Greenham, C.J.Jr. Gibbs, et D.C. Gajdusek. 1992. Absence of measles, mumps, and rubella viral genomic sequences from multiple sclerosis brain tissue by polymerase chain reaction. *Ann. Neurol.* **32**:401-404.
- Gombold, J. L., R.M. Sutherland, E. Lavi, Y. Paterson, et S.R. Weiss. 1995. Mouse hepatitis virus A59-induced demyelination can occur in the absence of CD8+ T cells. *Microb. Pathog.* **18**:211-221.
- Gonzalez-Dunia, D., C. Sauder, et J.C. de la Torre. 1997. Borna disease virus and the brain. *Brain Res. Bull.* **44**:647-664.
- Goswami, K. K. A., R.E. Randall, L.S. Lange, et W.C. Russell. 1987. Antibodies against the paramyxovirus SV5 in the cerebrospinal fluids of some multiple sclerosis patients. *Nature* **327**:244-247.

- Griffin, D. E. 1998. A review of alphavirus replication in neurons. *Neurosci. Biobeha. Rev.* **22**:721-723.
- Griffin, D. E., et J.M. Hardwick. 1997. Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:565-592.
- Guyton, A. C. 1989. Anatomie et physiologie du système nerveux. Traduction et adaptation de l'anglais. Québec. :Décarie éditeur inc. , 423 p.
- Haase, A. T., P. Ventura, C.J. Gibbs, et W.W. Tourtellotte. 1981. Measles virus nucleotide sequences: detection by hybridization in situ. *Science* **212**:672-675.
- Hackett, J., P. Swanson, D. Leahy, E.L. Anderson, S. Sato, R.P. Roos, R. Decker, et S.G. Devare. 1996. Search for retrovirus in patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **40**:805-809.
- Haile, R., P. Smith, D. Read, D. Nassim, C. Warlow, et W.C. Russell. 1982. A study of measles virus and canine distemper virus antibodies, and of childhood infections in multiple sclerosis patients and controls. *J. Neurol. Sci.* **56**:1-10.
- Haines, J. L., M. Ter-Minassian, A. Bazyk, J.F. Gusella, D.J. Kim, H. Terwedow, M.A. Pericak-Vance, J.B. Rimmier, C.S. Haynes, A.D. Roses, A. Lee, B. Shaner, M. Menold, E. Seboun, R.P. Fitoussi, C. Gartioux, C. Reyes, F. Ribierre, G. Gyapay, J. Weissenbach, S.L. Hauser, D.E. Goodkin, R. Lincoln, K. Usuku, A. Garcia-Merino, N. Gatto, S. Young, et J.R. Oksenberg. 1996. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. *Nat. Genet.* **13**:469-471.
- Haines, J. L., H.A. Terwedow, K. Burgess, M.A. Pericak-Vance, J.B. Rimmier, E.R. Martin, J.R. Oksenberg, R. Lincoln, D.Y. Zhang, D.R. Banatao, N. Gatto, D.E. Goodkin, et S.L. Hauser. 1998. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. *Hum. Mol. Genet.* **7**:1229-1234.
- Hall, W. W., et P.W. Choppin. 1982. Failure to detect measles virus proteins in brain tissue of patients with multiple sclerosis. *Lancet* **1**:957.
- Hamre, D., et J.J. Procknow. 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**:190-193.
- Hart, M. N., et Z. Fabry. 1995. CNS antigen presentation. *Trends Neurosci.* **18**:475-481.
- Hartung, H. P., et P. Rieckmann. 1997. Pathogenesis of immune-mediated demyelination in the CNS. *J. Neural Transm. Suppl.* **50**:173-181.

- Hauser, S. L., C. Aubert, J.S. Burks, C. Kerr, O. Lyon-Caen, G. de The, et M. Brahic. 1986. Analysis of human T-lymphotropic virus sequences in multiple sclerosis tissue. *Nature* **322**:176-177.
- Hauser, S. L., E. Fleischnick, H.L. Weiner, D. Marcus, Z. Awdeh, E.J. Yunis, et C.A. Alper. 1989. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with multiple sclerosis. *Neurology* **39**:275-277.
- Hernandez, A. M. M., E.C. Carrillo, N. Sevilla, et E. Domingo. 1994. Rapid cell variation can determine the establishment of a persistent viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:3705-3709.
- Herold, J., A.E. Gorbalyena, V. Thiel, B. Schelle, et S.G. Siddell. 1998. Proteolytic processing at the amino terminus of human coronavirus 229E gene 1-encoded polyproteins: Identification of a papain-like proteinase and its substrate. *J. Virol.* **72**:910-918.
- Heusipp, G., C. Grotzinger, J. Herold, S.G. Siddell, et J. Ziebuhr. 1997. Identification and subcellular localization of a 41 kDa, polyprotein 1ab processing product in human coronavirus 229E-infected cells. *J. Gen. Virol.* **78**:2789-2794.
- Hillert, J., et O. Olerup. 1993. Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DQ6,Dw2 haplotype. *Neurology* **43**:163-168.
- Hockertz, M. K., D.W. Paty, et S.S. Beall. 1998. Susceptibility to relapsing-progressive multiple sclerosis is associated with inheritance of genes linked to the variable region of the TcR beta locus: Use of affected family-based controls. *Am. J. Hum. Genet.* **62**:373-385.
- Holmes, M. J., K.A. Callow, R.A. Childs, et D.A.J. Tyrrell. 1986. Antibody dependent cellular cytotoxicity against coronavirus 229E-infected cells. *Br.J. Exp. Pathol.* **67**:581-586.
- Houtman, J. J., et 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., et J.O. Fleming. 1996b. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J. Neurovirol.* **2**:361-376.
- Hovanec, D. L., et T.D. Flanagan. 1983. Detection of antibodies to human coronaviruses 229E and OC43 in the sera of multiple sclerosis patients and normal subjects. *Infect. Immun.* **41**:426-429.

- Janzer, R. C., et M.C. Raff. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**:253-257.
- Jingwu, Z., Y. Chin, P. Henderikx, R. Medaer, C.-H Chou, et J.C.M. Raus. 1991. Antibodies to myelin basic protein and measles virus in multiple sclerosis: precursor frequency analysis of the antibody producing B cells. *Autoimmunity* **11**:27-34.
- Johnson-Lussenburg, C. M., et Q. Zheng. 1987. Coronavirus and multiple sclerosis: results of a case/control longitudinal serological study. *Adv. Exp. Med. Biol.* **218**:421-429.
- Johnson, K. P., B.R. Brooks, J.A. Cohen, C.C. Ford, J. Goldstein, R.P. Lisak, L.W. Myers, H.S. Panitch, J.W. Rose, R.B. Schiffer, T. Vollmer, L.P. Weiner, J.S. Wolinsky, et The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. 1995. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing remitting multiple sclerosis: Results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* **45**:1268-1276.
- Johnson, R. T. 1987. The pathogenesis of acute viral encephalitis and postinfectious encephalomyelitis. *J. Infect. Dis.* **155**:359-364.
- Jouvenne, P., S. Mounir, J.N. Stewart, C.D. Richardson, et P.J. Talbot. 1992. Sequence analysis of human coronavirus 229E mRNAs 4 and 5: evidence for polymorphism and homology with myelin basic protein. *Virus Res.* **22**:125-141.
- Karpas, A., U. Kämpf, A. Sidèn, M. Koch, et S. Poser. 1986. Lack of evidence for involvement of known human retroviruses in multiple sclerosis. *Nature* **322**:177-178.
- Kastrukoff, L. F., et G.P.A. Rice. 1998. Virology. Dans: D.W. Paty et G.C. Ebers (éd.). Multiple sclerosis. Philadelphia, PA. USA. : FA Davis Company p. 370-402.
- Katayama, Y., H. Hotta, A. Nishimura, Y. Tatsuno, et M. Homma. 1995. Detection of measles virus nucleoprotein mRNA in autopsied brain tissues. *J. Gen. Virol.* **76**:3201-3204.
- Kellar-Wood, H. F., N.W. Wood, P. Holmans, D. Clayton, N. Robertson, et D.A.S. Compston. 1995. Multiple sclerosis and the HLA-D region: Linkage and association studies. *J. Neuroimmunol.* **58**:183-190.
- Kelly, M. A., D.A. Cavan, M.A. Penny, C.H. Mijovic, D. Jenkins, S. Morrissey, D.H. Miller, A.H. Barnett, et D.A. Francis. 1993. The influence of HLA-DR and

-DQ alleles on progression to multiple sclerosis following a clinically isolated syndrome. *Hum. Immunol.* **37**:185-191.

Kinnunen, E., J. Juntunen, L. Ketonen, S. Koskimies, Y.T. Konttinen, T. Salmi, M. Koskenvuo, et J. Kaprio. 1988. Genetic susceptibility to multiple sclerosis. A co-twin study of a nationwide series. *Arch. Neurol.* **45**:1108-1111.

Kinnunen, E., M. Valle, L. Piirainen, M. Kleemola, M-L. Kantanen, J. Juntunen, M. Klockars, et M. Koskenvuo. 1990. Viral antibodies in multiple sclerosis. A nationwide co-twin study. *Arch. Neurol.* **47**:743-746.

Klenerman, P., H. Hengartner, et R.M. Zinkernagel. 1997. A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature* **390**:298-301.

Knobler, R. L., M.V. Haspel, et M.B.A. Oldstone. 1981. Mouse hepatitis virus type 4 (JHM strain)- induced fatal central nervous system disease. I. Genetic control and the murine neuron as the susceptible site of disease. *J. Exp. Med.* **153**:832-843.

Knobler, R. L., P.W. Lampert, et M.B.A. Oldstone. 1982. Virus persistence and recurring demyelination produced by a temperature-sensitive mutant of MHV-4. *Nature* **298**:279-280.

Koprowski, H., E.C. DeFreitas, M.E. Harper, M. Sandberg-Wollheim, W.A. Sheremata, M. Robert-Guroff, C.W. Saxinger, M.B. Feinberg, F. Wong-Staal, et R.C. Gallo. 1985. Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. *Nature* **318**:154-160.

Korber, B. T. M., K.J. Kunstman, B.K. Patterson, M. Furtado, M.M. McEvilly, R. Levy, et S.M. Wolinsky. 1994. Genetic differences between blood- and brain-derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: evidence of conserved elements in the V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences. *J. Virol.* **68**:7467-7481.

Körner, H., A. Schliephake, J. Winter, F. Zimprich, H. Lassmann, J. Sedgwick, S. Siddell, et H. Wege. 1991. Nucleocapsid or spike protein-specific CD4+ T lymphocytes protect against coronavirus-induced encephalomyelitis in the absence of CD8+ T cells. *J. Immunol.* **147**:2317-2323.

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

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

- Kunkel, F., et 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.
- Kuokkanen, S., M. Sundvall, J.D. Terwilliger, P.J. Tienari, J. Wikström, R. Holmdahl, U. Pettersson, et L. Peltonen. 1996. A putative vulnerability locus to multiple sclerosis maps to 5p14-p12 in a region syntenic to the murine locus Eae2. *Nat. Genet.* **13**:477-480.
- Kurtzke, J. F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:382-427.
- Kyuwa, S., K. Yamaguchi, Y. Toyoda, et K. Fujiwara. 1991. Induction of self-reactive T cells after murine coronavirus infection. *J. Virol.* **65**:1789-1795.
- La Monica, N., L.R. Banner, V.L. Morris, et M.M.C. Lai. 1991. Localization of extensive deletions in the structural genes of two neurotropic variants of murine coronavirus JHM. *Virology* **182**:883-888.
- Labonte, P., S. Mounir, et P.J. Talbot. 1995. Sequence and expression of the ns2 protein gene of human coronavirus OC43. *J. Gen. Virol.* **76**:431-435.
- Lachance, C., N. Arbour, N.R. Cashman, et P.J. Talbot. 1998. Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by human coronavirus 229E. *J. Virol.* **72**:6511-6519.
- Lai, M. M. C., et D. Cavanagh. 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **48**:1-100.
- Larsen, P. D., L.C. Bloomer, et P.F. Bray. 1985. Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology* **35**:435-438.
- Lavi, E., P.S. Fishman, M.K. Highkin, et S.R. Weiss. 1988. Limbic encephalitis after inhalation of a murine coronavirus. *Lab. Invest.* **58**:31-36.
- Ledeen, R. W., et G. Chakraborty. 1998. Cytokines, signal transduction, and inflammatory demyelination: Review and hypothesis. *Neurochem. Res.* **23**:277-289.
- Levine, B., et D.E. Griffin. 1992. Persistence of viral RNA in mouse brains after recovery from acute alphavirus encephalitis. *J. Virol.* **66**:6429-6435.
- Liebert, U. G. 1997. Measles virus infections of the central nervous system. *Intervirology* **40**:176-184.

- Liedtke, W., R. Malessa, P.M. Faustmann, et A.M. Eis-Hübinger. 1995. Human herpesvirus 6 polymerase chain reaction findings in human immunodeficiency virus associated neurological disease and multiple sclerosis. *J. Neurovirol.* **1**:253-258.
- Lin, M. T., D.R. Hinton, B. Parra, S.A. Stohlman, et R.C. van der Veen. 1998. The role of IL-10 in mouse hepatitis virus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Virology* **245**:270-280.
- Lin, M. T., S.A. Stohlman, et D.R. Hinton. 1997. Mouse hepatitis virus is cleared from the central nervous systems of mice lacking perforin-mediated cytotoxicity. *J. Virol.* **71**:383-391.
- Lipton, H. L., et D.H. Gilden. 1997. Viral diseases of the nervous system: persistent infections. Dans: N. Nathanson, R. Ahmed, F. Gonzalez-Scarano, D.E. Griffin, K.V. Holmes, F.A. Murphy, H.L. Robinson (ed). Viral pathogenesis. Philadelphia, PA. USA. : Lippincott-Raven Publishers p. 855-869.
- Lipton, S. A. 1998. Neuronal injury associated with HIV-1: approaches to treatment. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**:159-177.
- Lu, Y. Q., X.T. Lu, et M.R. Denison. 1995. Identification and characterization of a serine-like proteinase of the murine coronavirus MHV-A59. *J. Virol.* **69**:3554-3559.
- Lynch, S. G., J.W. Rose, J.H. Petajan, D. Stauffer, C. Kamerath, et M. Leppert. 1991. Discordance of T-cell receptor beta-chain genes in familial multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **30**:402-410.
- Lynch, S. G., J.W. Rose, J.H. Petajan, et M. Leppert. 1992. Discordance of the T-cell receptor alpha-chain gene in familial multiple sclerosis. *Neurology* **42**:839-844.
- Macnaughton, M. R., H.J. Hasony, M.H. Madge, et S.E. Reed. 1981. Antibody to virus components in volunteers experimentally infected with human coronavirus 229E group viruses. *Infect. Immun.* **31**:845-849.
- Madden, D. L., W.C. Wallen, S.A. Houff, P.A. Leinikki, J.L. Sever, K.A. Holmes, G.A. Castellano, et I.C. Shekarchi. 1981a. Coronavirus antibodies in sera from patients with multiple sclerosis and matched controls. *Arch. Neurol.* **38**:209-210.
- Madden, D. L., W.C. Wallen, S.A. Houff, I.C. Shekarchi, P.O. Leinikki, G.A. Castellano, et J.L. Sever. 1981b. Measles and canine distemper antibody.

Presence in sera from patients with multiple sclerosis and matched control subjects. Arch. Neurol. **38**:13-15.

Maggi, F., C. Fornai, M.L. Vatteroni, M. Giorgi, A. Morrica, M. Pistello, G. Cammarota, S. Marchi, P. Ciccorossi, A. Bionda, et M. Bendinelli. 1997. Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. J. Gen. Virol. **78**

Major, E. O., K. Amemiya, C.S. Tornatore, S.A. Houff, et J.R. Berger. 1992. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. Clin. Microbiol. Rev. **5**:49-73.

Marrosu, M. G., M.R. Murru, G. Costa, R. Murru, F. Muntoni, et F. Cucca. 1998. DRB1-DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population. Hum. Mol. Genet. **7**:1235-1237.

Martin, C., M. Enbom, M. Soderstrom, S. Fredrikson, H. Dahl, J. Lycke, T. Bergstrom, et A. Linde. 1997. Absence of seven human herpesviruses, including HHV-6, by polymerase chain reaction in CSF and blood from patients with multiple sclerosis and optic neuritis. Acta Neurol. Scand. **95**:280-283.

Massa, P. T., H. Wege, et V. ter Meulen. 1988. Growth pattern of various JHM coronavirus isolates in primary rat glial cell cultures correlates with differing neurotropism in vivo. Virus Res. **9**:133-144.

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

Mayne, M., J. Krishnan, L. Metz, A. Nath, A. Auty, B.M. Sahai, et C. Power. 1998. Infrequent detection of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. Ann. Neurol. **44**:391-394.

McIntosh, K., W.B. Becker, et R.M. Chanock. 1967. Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease. Pro. Natl. Acad. Sci. USA **58**:2268-2273.

McQuaid, S., S. Campbell, I.J. Wallace, J. Kirk, et S.L. Cosby. 1998. Measles virus infection and replication in undifferentiated and differentiated human neural cells in culture. J. Virol. **72**:5245-5250.

Meda, L., M.A. Cassatella, G.I. Szendrei, L. Otvos Jr, P. Baron, M. Villalba, D. Ferrari, et F. Rossi. 1995. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. Nature **374**:647-650.

- Menzo, S., A. Manzin, P. Bagnarelli, P.E. Varaldo, G. Grandi, G. Giuliani, G. Cazzato, M. Giacca, et M. Clementi. 1992. Lack of detectable human T-cell lymphotropic virus type I sequences in samples from multiple sclerosis patients. *J. Med. Virol.* **36**:155-161.
- Merelli, E., R. Bedin, P. Sola, P. Barozzi, G.L. Mancardi, G. Ficarra, et G. Franchini. 1997. Human herpes virus 6 and human herpes virus 8 DNA sequences in brains of multiple sclerosis patients, normal adults and children. *J. Neurol.* **244**:450-454.
- Miller, J. F., et A. Basten. 1996. Mechanisms of tolerance to self. *Curr. Opin. Immunol.* **8**:815-321.
- Mitchell, D. N., J.S. Porterfield, R. Micheletti, L.S. Lange, K.K.A. Goswami, P. Taylor, J.P. Jacobs, D.J. Hockley, et A.J. Salsbury. 1978. Isolation of an infectious agent from bone-marrows of patients with multiple sclerosis. *Lancet* **2**:387-391.
- Mobley, J., G. Evans, M.O. Dailey, et S. Perlman. 1992. Immune response to a murine coronavirus: identification of a homing receptor-negative CD4+ T cell subset that responds to viral glycoproteins. *Virology* **187**:443-452.
- Monto, A. S., M.W. Higgins, et H.W. Ross. 1975. The Tecumseh study of respiratory illness. VIII. Acute infection in chronic respiratory disease and comparison groups. *Am. Rev. Respir. Dis.* **111**:27-36.
- Moore, G. R. W. 1998. Neuropathology and pathophysiology of the multiple sclerosis lesion. Dans: D.W. Paty et G.C. Ebers (éd.). *Multiple sclerosis*. Philadelphia, PA, USA. : FA Davis Company p. 257-327.
- Morimoto, K., D.G. Hooper, H. Carbaugh, Z.F. Fu, H. Koprowski, et B. Dietzschold. 1998. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3152-3156.
- Mortensen, M. L., C.G. Ray, C.M. Payne, A.D. Friedman, L.L. Minnich, et C. Rousseau. 1985. Coronaviruslike particles in human gastrointestinal disease. Epidemiologic, clinical, and laboratory observations. *Am. J. Dis. Child.* **139**:928-934.
- Mounir, S., et P.J. Talbot. 1993a. Human coronavirus OC43 RNA 4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Virology* **192**:355-360.
- Mounir, S., et P.J. Talbot. 1993b. Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. *J. Gen. Virol.* **74**:1981-1987.

- Mounir, S., et 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.
- Mumford, C. J., N.W. Wood, H. Kellar-Wood, J.W. Thorpe, D.H. Miller, et D.A. Compston. 1994. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* **44**:11-15.
- Murray, R. S., B. Brown, D. Brian, et G.F. Cabirac. 1992a. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* **31**:525-533.
- Murray, R. S., G.-Y Cai, K. Hoel, J.-Y Zhang, K.F. Soike, et G.F. Cabirac. 1992b. Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system. *Virology* **188**:274-284.
- Murray, R. S., G.-Y Cai, K.F. Soike, et G.F. Cabirac. 1997. Further observations on coronavirus infection of primate CNS. *J. Neurovirol.* **3**:71-75.
- Myhr, K. M., T. Riise, E. Barrett-Connor, H. Myrmel, C. Vedeler, M. Gronning, M.B. Kalvenes, et H. Nyland. 1998. Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *J. Neurol.Neurosurg. Psychiatry* **64**:539-542.
- Myint, S. H. 1994. Human coronaviruses: a brief review. *Rev. Med. Virol.* **4**:35-46.
- Myint, S. H. 1995. Human coronavirus infections Dans: S.G. Siddell (éd.). The Coronaviridae. NewYork, N.Y. : Plenum Press p.389-401.
- Nicholson, K. G., J. Kent, et D.C. Ireland. 1993. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *Br. Med. J.* **307**:982-986.
- Nielsen, L., A.M. Larsen, M. Munk, et B.F. Vestergaard. 1997. Human herpesvirus-6 immunoglobulin G antibodies in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **95**:76-78.
- Nishimura, M., A. Adachi, M. Maeda, I. Akiguchi, A. Ishimoto, et J. Kimura. 1990. Human T lymphotropic virus type I may not be associated with multiple sclerosis in Japan. *J. Immunol.* **144**:1684-1688.
- Ohashi, P. S., S. Oehen, K. Bürki, H.P. Pircher, C.T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R. Zinkernagel, et H. Hengartner. 1991. Ablation of<tolerance> and induction of a diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* **65**:305-317.

- Ohta, M., K. Ohta, F. Mori, H. Nishitani, et T. Saida. 1986. Sera from patients with multiple sclerosis react with human T cell lymphotropic virus-I gag proteins but not env proteins-Western blotting analysis. *J. Immunol.* **137**:3440-3443.
- Oksenberg, J. R., R. Mantegazza, K. Sakai, C.C.A. Bernard, et L. Steinman. 1990. HTLV-I sequences are not detected in peripheral blood genomic DNA or in brain cDNA of multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* **28**:574-577.
- Oksenberg, J. R., M. Sherritt, A.B. Begovich, H.A. Erlich, C.C. Bernard, L.L. Cavalli-Sforza, et L. Steinman. 1989. T-cell receptor V alpha and C alpha alleles associated with multiple and myasthenia gravis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:988-992.
- Oldstone, M. B. A. 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* **50**:819-820.
- Oldstone, M. B. A. 1998. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J.* **12**:1255-1265.
- Oldstone, M. B. A. 1989. Viral persistence. *Cell* **56**:517-520.
- Oldstone, M. B. A., M. Nerenberg, P. Southern, J. Price, et H. Lewicki. 1991. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* **65**:319-331.
- Opdenakker, G., et J. Van Damme. 1994. Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunol. Today* **15**:103-7.
- Osame, M., K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, A. Igata, M. Matsumoto, et M. Tara. 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* **1**:1031-1032.
- Ostrowski, M. A., D.C. Krakauer, Y. Li, S.J. Justement, G. Learn, L.A. Ehler, S.K. Stanley, M. Nowak, et A.S. Fauci. 1998. Effect of immune activation on the dynamics of human immunodeficiency virus replication and on the distribution of viral quasispecies. *J. Virol.* **72**:7772-7784.
- Panitch, H. S. 1994. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **36** Suppl.:S25-28.
- Parker, S. E., T.M. Gallagher, et M.J. Buchmeier. 1989. Sequence analysis reveals extensive polymorphism and evidence of deletions within the E2 glycoprotein gene of several strains of murine hepatitis virus. *Virology* **173**:664-673.

- Parra, B., D.R. Hinton, M.T. Lin, D.J. Cua, et S.A. Stohlman. 1997. Kinetics of cytokine mRNA expression in the central nervous system following lethal and nonlethal coronavirus-induced acute encephalomyelitis. *Virology* **233**:260-270.
- Patterson, S., et M.R. Macnaughton. 1982. Replication of human respiratory coronavirus strain 229E in human macrophages. *J. Gen. Virol.* **60**:307-314.
- Paty, D. W., et G.C. Ebers. 1998. Clinical features. Dans: D.W. Paty et G.C.Ebers (éd.). Multiple sclerosis. Philadelphia, PA, USA. :FA Davis Company p.135-191.
- Paty, D. W., D.K.B. Li, UBC MS/MRI Study Group, et the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* **43**:662-667.
- Pearce, B. D., M.V. Hobbs, T.S. McGraw, et M.J. Buchmeier. 1994. Cytokine induction during T-cell-mediated clearance of mouse hepatitis virus from neurons in vivo. *J. Virol.* **68**:5483-5495.
- Perlman, S., G. Evans, et A. Afifi. 1990. Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. *J. Exp. Med.* **172**:1127-1132.
- Perlman, S., et D. Ries. 1987. The astrocyte is a target cell in mice persistently infected with mouse hepatitis virus, strain JHM. *Microb. Pathog.* **3**:309-314.
- Perlman, S., R. Schelper, E. Bolger, et D. Ries. 1987. Late onset, symptomatic, demyelinating encephalomyelitis in mice infected with MHV-JHM in the presence of maternal antibody. *Microb. Pathog.* **2**:185-194.
- Perron, H., J.A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P.W. Tuke, C. Voisset, J.L. Blond, B. Lalande, J.M. Seigneurin, B. Mandrand, et The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. 1997. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:7583-7588.
- Perron, H., B. Lalande, B. Gratacap, A. Laurent, O. Genoulaz, C. Geny, M. Mallaret, E. Schuller, P. Stoebner, et J.M. Seigneurin. 1991. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* **337**:862-863.
- Pewe, L., G.F. Wu, E.M. Barnett, R.F. Castro, et S. Perlman. 1996. Cytotoxic T cell-resistant variants are selected in a virus-induced demyelinating disease. *Immunity* **5**:253-262.

- Player, M. R., et P.F. Torrence. 1998. The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol. Ther.* **78**:55-113.
- Prineas, J. 1972. Paramyxovirus-like particles associated with acute demyelination in chronic relapsing multiple sclerosis. *Science* **178**:760-763.
- Propert, D. N., C.C. Bernard, et M.J. Simons. 1982. Gm allotypes and multiple sclerosis. *J. Immunogenet.* **9**:359-361.
- Rao, P. V., S. Kumari, et T.M. Gallagher. 1997. Identification of a contiguous 6-residue determinant in the MHV receptor that controls the level of virion binding to cells. *Virology* **229**:336-348.
- Rasmussen, H. B., et J. Clausen. 1992. Search for a retrovirus in multiple sclerosis by enzymatic amplification of DNA from brain capillaries, brain tissue and mononuclear cells from peripheral blood. *Acta Neurol. Scand.* **86**:87-90.
- Rasmussen, H. B., B.B. Kvinesdal, et J. Clausen. 1992. Seroreactivity to human T cell leukemia/lymphoma virus type 1 and related retroviruses in multiple sclerosis patients from Denmark and the Faroes. *Acta Neurol. Scand.* **86**:91-94.
- Reddy, E. P., M. Sandberg-Wollheim, R.V. Mettus, P.E. Ray, E. DeFreitas, et H. Koprowski. 1989. Amplification and molecular cloning of HTLV-I sequences from DNA of multiple sclerosis patients. *Science* **243**:529-533.
- Resta, S., J.P. Luby, C.R. Rosenfeld, et J.D. Siegel. 1985. Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science* **229**:978-981.
- Riski, H., et T. Hovi. 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. *J. Med. Virol.* **6**:259-265.
- Ron, D., et J. Tal. 1985. Coevolution of cells and virus as a mechanism for the persistence of lymphotropic minute virus of mice in L-cells. *J. Virol.* **55**:424-430.
- Rowe, C. L., S.C. Baker, M.J. Nathan, et J.O. Fleming. 1997a. Evolution of mouse hepatitis virus: Detection and characterization of spike deletion variants during persistent infection. *J. Virol.* **71**:2959-2969.
- Rowe, C. L., J.O. Fleming, M.J. Nathan, J.Y. Sgro, A.C. Palmenberg, et S.C. Baker. 1997b. Generation of coronavirus spike deletion variants by high-frequency recombination at regions of predicted RNA secondary structure. *J. Virol.* **71**:6183-6190.

- Rozenberg, F., S. Lefebvre, C. Lubetzki, P. Lebon, O. Lyon-Caen, M. Brahic, et J.-F Bureau. 1991. Analysis of retroviral sequences in the spinal form of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **29**:333-336.
- Sadovnick, A. D., H. Armstrong, G.P. Rice, D. Bulman, L. Hashimoto, D.W. Paty, S.A. Hashimoto, S. Warren, W. Hader, T.J. Murray, et al. 1993. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann. Neurol.* **33**:281-285.
- Saito, I., B. Servenius, T. Compton, et R.I. Fox. 1989. Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J. Exp. Med.* **169**:2191-2198.
- Salmi, A. A., M. Panelius, et E. Norrby. 1972. Multiple sclerosis and measles virus. *Lancet* **2**:1088-1089.
- Salmi, A., M. Reunanan, J. Ilonen, et M. Panelius. 1983. Intrathecal antibody synthesis to virus antigens in multiple sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* **52**:241-249.
- Salmi, A., B. Ziola, T. Hovi, et M. Reunanan. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* **32**:292-295.
- Sanders, V. J., S. Felisan, A. Waddell, et W.W. Tourtellotte. 1996a. Detection of Herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J. Neurovirol.* **2**:249-258.
- Sanders, V. J., A.E. Waddell, S.L. Felisan, X. Li, A.J. Conrad, et W.W. Tourtellotte. 1996b. Herpes simplex virus in postmortem multiple sclerosis brain tissue. *Arch. Neurol.* **53**:125-133.
- Sawcer, S., H.B. Jones, R. Feakes, J. Gray, N. Smaldon, J. Chataway, N. Robertson, D. Clayton, P.N. Goodfellow, et A. Compston. 1996. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat. Genet.* **13**:464-468.
- Sawicki, S. G., J.H. Lu, et K.V. Holmes. 1995. Persistent infection of cultured cells with mouse hepatitis virus (MHV) results from the epigenetic expression of the MHV receptor. *J. Virol.* **69**:5535-5543.
- Schickli, J. H., B.D. Zelus, D.E. Wentworth, S.G. Sawicki, et K.V. Holmes. 1997. The murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 from persistently infected murine cells exhibits an extended host range. *J. Virol.* **71**:9499-9507.

- Seboun, E., M.A. Robinson, T.H. Doolittle, T.A. Ciulla, T.J. Kindt, et S.L. Hauser. 1989. A susceptibility locus for multiple sclerosis is linked to the T cell receptor beta chain complex. *Cell* **57**:1095-1100.
- Sharief, M. K., et E.J. Thompson. 1992. In vivo relationship of tumor necrosis factor-alpha to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **38**:27-33.
- Shirazian, D., F. Mokhtarian, B.C. Herzlich, A.E. Miller, et D. Grob. 1993. Presence of cross-reactive antibodies to HTLV-1 and absence of antigens in patients with multiple sclerosis. *J. Lab. Clin. Med.* **122**:252-259.
- Sibley W.A., G.C. Ebers, H.S. Panitch, A.T. Reder, P.Duquette, M. Girard, R.L. Knobler, F.D. Lublin, G.S. Francis, Y. Lapierre, J. Antel, J.I. Greenstein, B. Mishra, J.N. Whitaker, D.W. Paty, J.J. Oger, L.F. Kastrukoff, D.S. Goodin, B.G.W. Arnason, A. Noronha, A.T. Reder, G.P.A. Rice, K.P. Johnson, et C.T. Bever. 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* **43**:655-661.
- Sibley, W. A., C.R. Bamford, et K. Clark. 1985. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* **1**:1313-5.
- Silverman, R. H. 1994. Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action. *J. Interferon Res.* **14**:101-104.
- Sizun, J., D. Soupre, M.C. Legrand, J.D. Giroux, S. Rubio, J.M. Cauvin, C. Chastel, D. Alix, et L. de Parscau. 1995. Neonatal nosocomial respiratory infection with coronavirus: a prospective study in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr.* **84**:617-620.
- Soldan, S. S., R. Berti, N. Salem, P. Secchiero, L. Flamand, P.A. Calabresi, M.B. Brennan, H.W. Maloni, H.F. McFarland, H.-C Lin, M. Patnaik, et S. Jacobson. 1997. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: Increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat. Med.* **3**:1394-1397.
- Sorensen, O., M.B. Coulter-Mackie, S. Puchalski, et S. Dales. 1984. In vivo and in vitro models of demyelinating disease. IX. Progression of JHM virus infection in the central nervous system of the rat during overt and asymptomatic phases. *Virology* **137**:347-357.
- Sorensen, O., et S. Dales. 1985. In vivo and in vitro models of demyelinating disease: JHM virus in the rat central nervous system localized by in situ cDNA hybridization and immunofluorescent microscopy. *J. Virol.* **56**:434-438.

- Spencer, D. C., et R.W. Price. 1992. Human immunodeficiency virus and the central nervous system. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:655-693.
- Spencer, J. S., G.F. Cabirac, C. Best, L. McLaughlin, et R.S. Murray. 1995. Characterization of human T cell clones specific for coronavirus 229E. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**:121-129.
- Sriram, S., et M. Rodriguez. 1997. Indictment of the microglia as the villain in multiple sclerosis. *Neurology* **48**:464-470.
- Steinman, L., et M.B.A. Oldstone. 1997. More mayhem from molecular mimics. *Nat. Med.* **3**:1321-1322.
- Stephenson, J. R., V. ter Meulen, et W. Kiessling. 1980. Search for canine-distemper-virus antibodies in multiple sclerosis. A detailed virological evaluation. *Lancet* **2**:772-775.
- Stevens, J. G., V.B. Bastone, G.W. Ellison, et L.W. Myers. 1980. No measles virus genetic information detected in multiple sclerosis-derived brains. *Ann. Neurol.* **8**:625-627.
- Stewart, G. J., J.G. McLeod, A. Basten, et H.V. Bashir. 1981. HLA family studies and multiple sclerosis: a common gene, dominantly expressed. *Hum. Immunol.* **3**:13-29.
- Stewart, J. N., S. Mounir, et P.J. Talbot. 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* **191**:502-505.
- Stohlman, S. A., C.C. Bergmann, R.C. van der Veen, et D.R. Hinton. 1995a. Mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system. *J. Virol.* **69**:684-694.
- Stohlman, S. A., D.R. Hinton, D. Cua, E. Dimacali, J. Sensintaffar, F.M. Hofman, S.M. Tahara, et Q. Yao. 1995b. Tumor necrosis factor expression during mouse hepatitis virus-induced demyelinating encephalomyelitis. *J. Virol.* **69**:5898-5903.
- Stohlman, S. A., G.K. Matsushima, N. Casteel, et L.P. Weiner. 1986. In vivo effects of coronavirus-specific T cell clones: DTH inducer cells prevent a lethal infection but do not inhibit virus replication. *J. Immunol.* **136**:3052-3056.
- Stohlman, S. A., M.A. Sussman, G.K. Matsushima, R.A. Shubin, et S.S. Erlich. 1988. Delayed-type hypersensitivity response in the central nervous system

- during JHM virus infection requires viral specificity for protection. *J. Neuroimmunol.* **19**:255-268.
- Stroop, W. G. 1994. Viral pathogenesis. Dans: R.R. McKendall et W.G. Stroop (éd.). Handbook of neurovirology. New York, NY, USA. :Marcel Dekker, Inc p.27-54.
- Stühler, A., E. Flory, H. Wege, H. Lassmann, et H. Wege. 1997. No evidence for quasispecies populations during persistence of the coronavirus mouse hepatitis virus JHM: Sequence conservation within the surface glycoprotein gene S in Lewis rats. *J. Gen. Virol.* **78**:747-756.
- Sturman, L. S., K.V. Holmes, et J. Behnke. 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* **33**:449-462.
- Sun, N., D. Grzybicki, R.F. Castro, S. Murphy, et S. Perlman. 1995. Activation of astrocytes in the spinal cord of mice chronically infected with a neurotropic coronavirus. *Virology* **213**:482-493.
- Taguchi, F., H. Kubo, H. Takahashi, et H. Suzuki. 1995. Localization of neurovirulence determinant for rats on the S1 subunit of murine coronavirus JHMV. *Virology* **208**:67-74.
- Takahashi, K., N. Goto, T. Ishida, K. Katami, et K. Fujiwara. 1981. Acute demyelination in mice inoculated intraspinally with mouse hepatitis virus, JHM strain. *Jpn. J. Exp. Med.* **51**:323-330.
- Talbot, P. J., G. Dionne, et M. Lacroix. 1988. Vaccination against lethal coronavirus-induced encephalitis with a synthetic decapeptide homologous to a domain in the predicted peplomer stalk. *J. Virol.* **62**:3032-3036.
- Talbot, P. J., J.S. Paquette, C. Ciurli, J.P. Antel, et F. Ouellet. 1996. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **39**:233-240.
- Talbot, P. J., A.A. Salmi, R.L. Knobler, et M.J. Buchmeier. 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4(strain JHM): correlation with biological activities. *Virology* **131**:250-260.
- Tanaka, R., Y. Iwasaki, et H. Koprowski. 1976. Intracisternal virus-like particles in brain of a multiple sclerosis patient. *J. Neurol. Sci.* **28**:121-126.
- Tardieu, M., O. Boespflug, et T. Barbé. 1986. Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells. *J. Virol.* **60**:574-582.

- Tienari, P. J., S. Kuokkanen, T. Pastinen, J. Wikstrom, A. Sajantila, M. Sandberg-Wolheim, J. Palo, et L. Peltonen. 1998. Golli-MBP gene in multiple sclerosis susceptibility. *J. Neuroimmunol.* **81**:158-167.
- Tienari, P. J., J. Wikstrom, A. Sajantila, J. Palo, et L. Peltonen. 1992. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *Lancet* **340**:987-991.
- Tuomanen, E. 1996. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**:289-299.
- Turner, R. B., A. Felton, K. Kosak, D.K. Kelsey, et C.K. Meschievitz. 1986. Prevention of experimental coronavirus colds with intranasal alpha-2b interferon. *J. Infect. Dis.* **154**:443-447.
- Tyler, K. L., et F. Gonzalez-Scarano. 1997. Viral diseases of the central nervous system. Acute infections. Dans: N. Nathanson, R. Ahmed, F. Gonzalez-Scarano, D.E. Griffin, K.V. Holmes, F.A. Murphy, H.L. Robinson (ed). *Viral pathogenesis*. Philadelphia, PA. USA. :Lippincott-Raven Publishers p.837-853.
- Tyrrell, D. A., S. Cohen, et J.E. Schlarb. 1993. Signs and symptoms in common colds. *Epidemiol. Infect.* **111**:143-156.
- Vandvik, B., et E. Norrby. 1989. Paramyxovirus SV5 and multiple sclerosis. *Nature* **338**:769-771.
- Vaughan, J. H., T. Riise, G.H. Rhodes, M.D. Nguyen, E. Barrett-Connor, et H. Nyland. 1996. An Epstein Barr virus-related cross reactive autoimmune response in multiple sclerosis in Norway. *J. Neuroimmunol.* **69**:95-102.
- Vaughan, J. H., J.R. Valbracht, M.D. Nguyen, H.H. Handley, R.S. Smith, K. Patrick, et G.H. Rhodes. 1995. Epstein-Barr virus-induced autoimmune responses. I. Immunoglobulin M autoantibodies to proteins mimicking and not mimicking Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *J. Clin. Invest.* **95**:1306-1315.
- Vennema, H., G.J. Godeke, J.W.A. Rossen, W.F. Voorhout , M.C. Horzinek, D.J.E. Opstelten, et P.J.M. Rottier. 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* **15**:2020-2028.
- Vincent, V. A. M., F.J.H. Tilders, et A.M. Van Dam. 1998. Production, regulation and role of nitric oxide in glial cells. *Mediators Inflamm.* **7**:239-255.

- von Herrath, M. G., C.F. Evans, M.S. Horwitz, et M.B. Oldstone. 1996. Using transgenic mouse models to dissect the pathogenesis of virus-induced autoimmune disorders of the islets of Langerhans and the central nervous system. *Immunol. Rev.* **152**:111-143.
- Walter, M. A., W.T. Gibson, G.C. Ebers, et D.W. Cox. 1991. Susceptibility to multiple sclerosis is associated with the proximal immunoglobulin heavy chain variable region. *J. Clin. Invest.* **87**:1266-1273.
- Wang, F. I., J.O. Fleming, et M.M.C. Lai. 1992a. Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: study of genetic sites affecting neuropathogenicity. *Virology* **186**:742-749.
- Wang, F. I., D.R. Hinton, W. Gilmore, M.D. Trousdale, et J.O. Fleming. 1992b. Sequential infection of glial cells by the murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) leads to a characteristic distribution of demyelination. *Lab. Invest.* **66**:744-754.
- Warner, H. B., et R.I. Carp. 1981. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Lancet* **2**:1290.
- Watanabe, R., H. Wege, et V. ter Meulen. 1983. Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Nature* **305**:150-153.
- Watanabe, R., H. Wege, et V. ter Meulen. 1987. Comparative analysis of coronavirus JHM-induced demyelinating encephalomyelitis in Lewis and Brown Norway rats. *Lab. Invest.* **57**:375-384.
- Wege, H., J. Winter, et R. Meyermann. 1988. The peplomer protein E2 of coronavirus JHM as a determinant of neurovirulence: definition of critical epitopes by variant analysis. *J. Gen. Virol.* **69**:87-98.
- Wei, S., P. Charmley, R.I. Birchfield, et P. Concannon. 1995. Human T-cell receptor V beta gene polymorphism and multiple sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* **56**:963-969.
- Weinshenker, B. G., G. Dekaban, et G.P.A. Rice. 1990. Retroviruses and multiple sclerosis. I. Analysis of seroreactivity by western blot and radioimmune assay. *Neurology* **40**:1251-1253.
- Weinshenker, B. G., P. Santrach, A.S. Bissonet, S.K. McDonnell, D. Schaid, S.B. Moore, et M. Rodriguez. 1998. Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: A population-based study. *Neurology* **51**:742-747.

- White, F. A. 3d, M. Ishaq, G.L. Stoner, et R.J. Frisque. 1992. JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* **66**:5726-5734.
- Williamson, J. S. P., et S.A. Stohlman. 1990. Effective clearance of mouse hepatitis virus from the central nervous system requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J. Virol.* **64**:4589-4592.
- Williamson, J. S. P., K.C. Sykes, et S.A. Stohlman. 1991. Characterization of brain-infiltrating mononuclear cells during infection with mouse hepatitis virus strain JHM. *J. Neuroimmunol.* **32**:199-207.
- Williams, R. K., G.S. Jiang, et K.V. Holmes. 1991. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5533-5536.
- Wolburg, H., et W. Risau. 1995. Formation of the blood-brain barrier. In: H. Kettenmann et B.R. Ransom (ed.) *Neuroglia*. New York, N.Y. USA : Oxford University Press. p. 763-776.
- Woyciechowska, J. L., J. Dambrozia, P. Leinikki, C. Shekarchi, W. Wallen, J. Sever, H. McFarland, et D. McFarlin. 1985. Viral antibodies in twins with multiple sclerosis. *Neurology* **35**:1176-1180.
- Wucherpfennig, K. W., et J.L. Strominger. 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**:695-705.
- Xue, S., A. Jaszewski, et S. Perlman. 1995. Identification of a CD4(+) T cell epitope within the M protein of a neurotropic coronavirus. *Virology* **208**:173-179.
- Yamaguchi, K., N. Goto, S. Kyuwa, M. Hayami, et Y. Toyoda. 1991. Protection of mice from a lethal coronavirus infection in the central nervous system by adoptive transfer of virus-specific T cell clones. *J. Neuroimmunol.* **32**:1-9.
- Yeager, C. L., R.A. Ashmun, R.K. Williams, C.B. Cardellichio, L.H. Shapiro, A.T. Look, et K.V. Holmes. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**:420-422.
- Yokomori, K., M. Asanaka, S.A. Stohlman, S. Makino, R.A. Shubin, W. Gilmore, L.P. Weiner, F.I. Wang, et M.M.C. Lai. 1995. Neuropathogenicity of mouse hepatitis virus JHM isolates differing in hemagglutinin-esterase protein expression. *J. Neurovirol.* **1**:330-339.

- Yokomori, K., S.C. Baker, S.A. Stohlman, et M.M.C. Lai. 1992. Hemagglutinin-esterase specific monoclonal antibodies alter the neuropathogenicity of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **66**:2865-2874.
- Yokomori, K., et M.M.C. Lai. 1992. Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *J. Virol.* **66**:6194-6199.
- Yong, V. W., S. Chabot, O. Stuve, et G. Williams. 1998. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: Mechanisms of action. *Neurology* **51**:682-689.
- Yun, Z. B., J. Odeberg, J. Lundeberg, O. Weiland, M. Uhlen, et A. Sonnerborg. 1996. Restriction of hepatitis C virus heterogeneity during prolonged interferon-alpha therapy in relation to changes in virus load. *J. Infect. Dis.* **173**:992-996.
- Zelus, B. D., D.R. Wessner, R.K. Williams, M.N. Pensiero, F.T. Phibbs, M. deSouza, G.S. Dveksler, et K.V. Holmes. 1998. Purified, soluble recombinant mouse hepatitis virus receptor, bgp1(b), and bgp2 murine coronavirus receptors differ in mouse hepatitis virus binding and neutralizing activities. *J. Virol.* **72**:7237-7244.
- Ziebuhr, J., J. Herold, et S.G. Siddell. 1995. Characterization of a human coronavirus (strain 229E) 3C-like proteinase activity. *J. Virol.* **69**:4331-4338.
- Zinkernagel RM, Hengartner H. 1992. Virally induced immunosuppression. *Curr. Opin. Immunol.* **4**:408-412.

ANNEXE I

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Liste des publications

1. **Arbour N.**, R. Day, J. Newcombe et P.J. Talbot. 1999. Neuroinvasion of human respiratory coronaviruses and association with multiple sclerosis. (soumis).
2. **Arbour N.**, S. Ekandé, G. Côté, C. Lachance, F. Chagnon, M. Tardieu, N. R. Cashman et P. J. Talbot. 1999. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuronal cell lines by human coronavirus 229E. *J. Virol.* 73: 3326-3337 .
3. **Arbour N.**, G. Côté, C. Lachance, M. Tardieu, N.R. Cashman et P.J. Talbot. 1999. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *J. Virol.* 73 : 3338-3350.
4. Lachance C., **N. Arbour**, N.R. Cashman et P.J. Talbot. 1998. Implication of CD13 in infection of human neural cells by human coronavirus 229E. *J. Virol.* 72: 6511-6519.
5. Sizun J., **N. Arbour** et P.J. Talbot. 1998. Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronaviruses 229E and OC43 in cell culture. *J. Virol. Methods* 72:145-152.
6. **Arbour N.** et P.J. Talbot. 1998. Persistent infection of neural cell lines by human coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440: 575-581.
7. Bonavia A., **N. Arbour**, V.W. Yong et P.J. Talbot. 1996. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *J. Virol.* 71:800-806.
8. Stewart J.N., **N. Arbour**, S. Mounir et P.J. Talbot. 1995. "Detection of human coronaviruses in autopsy tissue by RT-PCR." Dans: PCR: Protocols for Diagnosis of Human and Animal Virus Diseases, Becker, Y. and Darai, G., eds., Springer Verlag, Heidelberg, pp. 349-356.

Liste des communications

1. Talbot, P.J. et **N. Arbour**. Infection of human brains by human respiratory coronaviruses OC43 and 229E. 49th annual congress, Canadian Society of Microbiologists. Université de Montréal, 13-17 Juin, 1999.
2. **Arbour N.**, et P.J. Talbot. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. 18th Annual Meeting of The American Society for Virology, Amherst, MA, États-Unis, 10-14 Juillet, 1999.
3. Sizun J., **N. Arbour** et P.J. Talbot. Detection of human coronaviruses by immunofluorescence using monoclonal antibodies in comparison with RT-PCR in cell culture. International meeting, European Society for Pediatric Infectious Diseases, Paris, France, 21-23 Mai, 1997.
4. Talbot P.J., G. Côté et **N. Arbour**. Human coronavirus OC43 and 229E persistence in neural cell cultures and human brains. 7th International Symposium on Coronaviruses and Arteriviruses. Segovia, Espagne, 10-15 Mai, 1997.
5. **Arbour N.**, J. Newcombe et P.J. Talbot. Evidence for the neurotropic potential of human coronaviruses. First International Symposium of Neurovirology, Philadelphia, Pennsylvania, États-Unis. 5-7 Mai, 1997. (Résumé: J. Neurovirol. 3:S91).
6. **Arbour N.**, A. Bonavia, V.W. Yong, J. Newcombe, R.B. Dessau et P.J. Talbot. Human coronaviruses and multiple sclerosis: detection by RT-PCR in human brains and infection of primary cultures of neural cells. Xth International Congress of Virology. Jerusalem, Israël, 11-16 Août, 1996.
7. Dessau R.B., J.L. Frederiksen., **N. Arbour**, P.J. Talbot et G. Lisby. Human coronavirus RNA in patients with multiple sclerosis. Xth International Congress of Virology. Jerusalem, Israel, 11-16 Août, 1996.
8. Talbot P.J., **N. Arbour**, V.W. Yong et A. Bonavia. Infection of primary cultures of human neural cells by human respiratory coronaviruses. 46th

annual congress, Canadian Society of Microbiologists. Université de l'Île du Prince Edouard, Charlottetown, 16-20 Juin, 1996.

9. Talbot P.J., **N. Arbour**, V.W. Yong et A. Bonavia. Infection of primary cultures of human neural cells by human respiratory coronaviruses. Cytokines in the Brain-Neuropathological Aspects, International Symposium, Saint-Jean-de Luz, France, 26-28 Avril, 1996.
10. **Arbour N.** La sclérose en plaques: recherche actuelle. XXIe congrès de biologie médicale: Les maladies neurodégénératives. Université du Québec à Trois-Rivières, 22-23 mars 1996. conférence invitée.

ANNEXE II

TIRÉS À PART DES ARTICLES