

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

**CARACTÉRISATION DE LA MORT NEURONALE INDUITE PAR LE
CORONAVIRUS HUMAIN HCOV-OC43**

Par
Mathieu MEESEN-PINARD

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Ian Gaël Rodrigue-Gervais INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Louis Flamand Université Laval
Examineur externe	Eric Rassart Université du Québec à Montréal
Directeur de recherche	Pierre Talbot INRS-Institut Armand-Frappier

Le succès n'est pas final, l'échec n'est pas fatal. C'est le courage de continuer qui compte.

Winston Churchill

REMERCIEMENTS

Faire un doctorat ressemble davantage à un marathon qu'à un sprint. La ligne d'arrivée semble bien loin lorsque l'on commence et c'est probablement parce que le chemin n'est pas une ligne bien droite. C'est pourquoi un tel défi ne peut se faire sans l'appui de nombreuses personnes que je prends le temps de remercier ici.

Premièrement, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Pierre J. Talbot, d'une part de m'avoir accepté dans son laboratoire et d'autre part, de m'avoir transmis ce désir de se dépasser et de devenir un scientifique accompli. Merci de m'avoir permis de participer à différentes expériences de travail, à voyager dans le cadre de plusieurs congrès nationaux ou internationaux et encouragés à continuer malgré les embûches.

Je ne pourrais passer sous silence l'importance du "bras droit" de Pierre, Marc Desforges, l'associé de recherche sans qui ce doctorat n'aurait pas été le même. En effet, malgré certaines réunions de laboratoire houleuses, de nombreuses critiques et des corrections en quantités industrielles, Marc a contribué de façon exceptionnelle à la personne que je suis devenu aujourd'hui, autant scientifiquement qu'individuellement. Je ne saurais te remercier assez Marc pour tes précieux conseils, tes encouragements, nos discussions passionnées et ton humour, parfois douteux. Je remercie également les membres présents et passés du laboratoire, certains sont devenus davantage que de simples collègues pour devenir de vrais amis. Votre amitié m'aura aidé à traverser les épreuves. De plus, j'aimerais remercier le professeur Maritza Jaramillo et les membres de son laboratoire pour leurs aides durant les expériences de *Polysome Profile Analysis*.

Je me dois également de remercier ma famille et mes amis qui m'ont encouragé de bien des façons à ne pas lâcher et qui m'ont permis de poursuivre jusqu'à la fin.

Finalement, la dernière, mais non la moindre, ma femme, Kim Tardif. Ta contribution dépasse largement cette thèse et je te remercie de m'avoir apporté ton réconfort dans les moments plus difficiles, de m'avoir encouragé mais surtout aimé à travers ce moment de ma vie où ta présence m'a permis de devenir quelqu'un de meilleur.

RÉSUMÉ

Les coronavirus humains (HCoV) sont des virus ubiquitaires et initialement identifiés comme des pathogènes respiratoires. La manifestation la plus fréquente de l'infection est le rhume, mais ces virus peuvent également être à l'origine de pathologies respiratoires plus sévères chez les personnes susceptibles, notamment les personnes âgées, les nouveau-nés et les patients immunodéprimés. Bien que la majorité des complications soient associées aux voies respiratoires inférieures, certaines souches ont démontré un opportunisme en ayant développé un tropisme neurologique, la neuroinvasion, c'est-à-dire la capacité à envahir le système nerveux central (SNC) à partir de la périphérie. En effet, des travaux réalisés dans le laboratoire ont notamment démontré que la souche OC43 (HCoV-OC43) est neuroinvasive et neurotrophe chez l'humain et la souris et également neurovirulent en souris. De plus, HCoV-OC43 infecte les cultures neuronales humaines et provoque la mort cellulaire de celles-ci, bien que les mécanismes impliqués dans ce phénomène ne soient pas élucidés. Les maladies neurologiques étant des maladies extrêmement complexes et multifactorielles, la présence du virus au SNC pourrait s'avérer une composante importante dans l'apparition ou l'augmentation de la sévérité des désordres neurologiques.

Ainsi, dans le cadre de mon projet de doctorat, j'ai utilisé un variant de HCoV-OC43 ayant acquis deux mutations ponctuelles (H183R et Y241H), situées dans la région de liaison du récepteur de la glycoprotéine S, suite à une infection persistante de cellules neurales humaines. Ces mutations réintroduites dans un clone infectieux (rOC/U_{s183-241}) m'ont permis, par la suite, d'établir que ces mutations procurent une neurovirulence accrue en souris comparativement au variant de référence (rOC/ATCC). Bien que l'inoculation intracérébrale du virus de référence cause des symptômes s'apparentant à une encéphalite chez les souris infectées, le virus rOC/U_{s183-241} augmente la sévérité de ces symptômes et provoque un taux de mortalité plus importante chez les souris infectées. Bien que la rapidité de dissémination à travers le SNC et l'activation plus soutenue de l'inflammation par les astrocytes participent sans aucun doute à l'augmentation de la neurovirulence du virus mutant par rapport au virus de référence, la mort neuronale représente une avenue qui pourrait contribuer à la sévérité des neuropathologies.

La mort cellulaire régulée (MCR) représente l'ensemble des mécanismes et des facteurs cellulaires associés qui sont activés par la cellule en réponse à un stimulus et qui mène à la mort de celle-ci. Parmi ces facteurs, le facteur Bax associé à l'apoptose, provoque la perméabilisation de la membrane mitochondriale en formant des pores qui perturbent la génération d'ATP et laisse sortir le contenu mitochondrial dans le cytosol. Bien que ce facteur semble activé chez les neurones infectés par HCoV-OC43, ce dernier ne joue pas de rôle prépondérant dans la mort neuronale. La nécroptose est une forme de mort cellulaire apparentée à la nécrose se traduisant par la destruction des membranes plasmiques, la libération du contenu cellulaire et la libération de molécules pro-inflammatoires dans l'environnement extracellulaire. En absence de caspase-8 fonctionnelle ou lors d'une expression endogène importante de la *Receptor-interacting protein 3* (RIP3), cette protéine kinase pro-nécroptotique active le facteur MLKL. Dans certains cas, le facteur RIP1 est également nécessaire à l'activation de MLKL en s'associant avec RIP3. Ce nouveau complexe, appelé nécrosome, s'oligomérisent pour former des pores à travers la membrane plasmique, ce qui mène à la destruction de l'intégrité cellulaire. À l'inverse de Bax, les facteurs RIP1, RIP3 et MLKL, tous reliés à la nécroptose, semblent être impliqués dans la mort neuronale et être davantage activés par la présence du virus mutant. En effet, l'infection de cultures neuronales humaines et murines provoque l'activation de ces facteurs et l'inhibition de l'expression de RIP1, par ARN interférant, provoque une augmentation de la survie de la lignée neuronale humaine. De plus, l'inhibition de

RIP1 provoque une augmentation du nombre de particules infectieuses, suggérant l'aspect antiviral de cette MCR. Finalement, le facteur MLKL est également activé et relocalisé à la membrane des neurones infectés, ce qui confirme le rôle important que ces facteurs et la nécroptose jouent dans la mort neuronale induite par le virus HCoV-OC43.

En conclusion, les résultats présentés dans cette thèse démontrent, pour la première fois, l'implication des facteurs associés à la nécroptose dans un contexte de réponse neuronale à la présence du virus HCoV-OC43. Cette réponse neuronale s'effectue, fort probablement, dans l'optique d'établir une réponse antivirale contre le virus HCoV-OC43 et de protéger le SNC. Toutefois, l'activation de cette voie de mort cellulaire pourrait s'avérer délétère pour l'organisme en accélérant la perte neuronale, la neuroinflammation et l'accumulation de dommages et ainsi contribuer à la neuropathologie, notamment observée en souris.

ABSTRACT

Human coronaviruses (HCoV) are found around the world and were initially identified as respiratory pathogens. HCoV are mostly associated with the common cold, but they are also involved in more severe respiratory disorders in more susceptible populations such as the elderly, newborn and immunocompromised individuals. Even though the majority of symptoms are related to respiratory tract complications, some strains have developed a neuroinvasive property, defined as the capacity to reach the central nervous system (CNS) from the periphery. We have previously demonstrated that the OC43 strain (HCoV-OC43) has neuroinvasive and neurotropic properties both in humans and mice with a neurovirulent potential. Moreover, HCoV-OC43 can infect neuronal cell lines, which leads to cell death, but the molecular mechanisms involved are still poorly understood. Regarding the origin and complexity of neurological diseases, the potential threat of CNS infection by viruses could contribute to the onset or exacerbation of these diseases.

During my thesis project, I worked on a HCoV-OC43 variant harboring two point mutations (H183R and Y241H), located within the receptor-binding site of Spike (S) glycoprotein, were found following persistent infection on neural cell lines. After these mutations were re-introduced into an infectious clone, the mutant virus (rOC/U_{s183-241}) demonstrated an increase in neurovirulence in the mouse model compared to wild-type virus (rOC/ATCC). Although both viruses induced symptoms related to viral encephalitis after intracerebral inoculation, the infection by the mutant increased the severity of the pathology and mortality of infected mice. In addition to the capacity of the mutant virus to disseminate more rapidly within the CNS and to the astrocyte-mediated inflammation to contribute to the neurovirulence, regulated cell death (RCD) could not be ignored as an important process during the neuropathology.

The regulated cell death regroups all mechanisms and cellular factors that are activated by the cell in response to a stimulus and leads to cell death. Among these factors, Bax (mostly associated with apoptosis) is relocalized to the mitochondrial outer membrane where it forms a pore that inhibits the generation of ATP by interfering with membrane potential and allows the release of other factors from mitochondria towards the cytosol. Although this factor seems to be activated during HCoV-OC43 infection, Bax does not play a significant role in the associated neuronal cell-death. Necroptosis is a form of cell death similar to necrosis, which results in the disruption of the intracellular and cytoplasmic membrane and to the release of pro-inflammatory contents in the environment. In the absence of caspase-8 activity or higher endogenous expression of the Receptor-interacting protein 3 (RIP3), this pro-necroptotic kinase is phosphorylated at multiple sites, which is necessary to activate MLKL. Under certain conditions, RIP1 is recruited by RIP3 to activate MLKL. This pseudokinase that mediates the disruption of cellular membranes form the necrosome. Unlike Bax, RIP1, RIP3 and MLKL, factors related to necroptosis, are involved during neuronal cell death and mutant infection increases the activation of these factors. Indeed, infection of human or murine cell cultures by HCoV-OC43 activates necroptosis-related factors and inhibition of RIP1 expression by RNA interference (RNAi) induces an increased survival of infected human neuronal cell lines. Moreover, the use of RNAi increases the production of infectious viral particles, suggesting a potential antiviral mechanism of necroptosis in this context. The effector factor MLKL is also activated and relocalized to the cytoplasmic membrane, confirming the essential role of these factors during neuronal cell death induced by HCoV-OC43.

In conclusion, results presented in this thesis show, for the first time, the role played by necroptosis-related factors during neuronal cell death induced by HCoV-OC43. This neuronal

response is potentially initiated to counteract viral replication and protect the host against viral propagation in the CNS. However, the activation of this MCR could be deleterious for the host by accumulating damages, increasing inflammation and accelerating the loss of neurons. These consequences would contribute to the observed neuropathology in mice.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	iv
ABSTRACT	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xvi
LISTE DES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	xix
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1. LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL (SNC)	2
1.1 Structure du SNC	2
1.2 Composantes du SNC	3
1.2.1 Les neurones.....	3
1.2.2 Les astrocytes	5
1.2.3 Les oligodendrocytes	6
1.2.4 Les microglies	7
1.2.5 La barrière hémato-encéphalique	8
1.3 Système immunitaire en général	8
1.4 Infection virale du SNC	13
1.4.1 Stratégies virales d'entrée au SNC	13
1.4.2 Réponse immunitaire en réponse aux infections virales	15
1.4.3 Adaptation, persistance et évasion virale.....	21
1.4.4 Pathologies neurologiques associées aux infections virales.....	22
2. LES CORONAVIRUS.....	25
2.1 Généralité et taxonomie	25

2.2. Structures et fonctions des protéines virales	27
2.2.1 Généralités	27
2.2.2 Protéines non-structurales	27
2.3 Glycoprotéine S de spicule	30
2.3.1 Généralités	30
2.3.2 Structure	31
2.3.3 Fonctions	32
2.3.4 Évolution et adaptation	34
2.4 Le cycle réplcatif	36
2.5 Pathologies et réponses immunitaires associées aux infections coronavirales... 39	39
2.5.1 Coronavirus murin	39
2.5.2 Coronavirus félin	41
2.5.3 Coronavirus porcin	42
2.5.4 Coronavirus bovin	42
2.5.5 Coronavirus humains et souches coronavirales émergentes	42
2.5.6 HCoV-OC43	46
3. LES MÉCANISMES DE MORT CELLULAIRE	50
3.1 Généralité.....	50
3.2 Classification des divers types de MCR	51
3.3 Mécanismes d'action de la MCR.....	54
3.3.1 Apoptose	54
3.3.2 Nécroptose	57
3.3.3 Autres formes de MCR.....	61
3.4 Stratégies virales en réponse à la MCR	63
3.4.1 Activation de la MCR.....	63
3.4.2 Neutralisation de la MCR	65
3.5 Implication de la MCR dans les maladies neurologiques	67
3.5.1 Généralités	67
3.5.2 Maladie de Parkinson.....	68
3.5.3 Maladie d'Alzheimer	68
3.5.4 Sclérose en plaques (SEP)	69
3.5.5 Sclérose latérale amyotrophique (SLA).....	70
3.5.6 Maladie de Huntingdon	70
3.6 Implication de la MCR suite une infection virale du SNC.....	71
4. CONCLUSION	73
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	74

CHAPITRE II : PUBLICATION	75
CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE	136
1. TECHNIQUES	137
1.1 Activité enzymatique de la caspase 8	137
1.2 Inhibition chimique de RIP1	137
1.3. Analyse du profile de polysomes (<i>Polysome profiling analysis</i>)	137
CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSION	139
1. MODULATION DE LA NEUROPATHOLOGIE CHEZ LA SOURIS EN LIEN AVEC LA GLYCOPROTÉINE S	140
1.1 Contexte	140
1.2 Influence des mutations acquises en infection persistante de lignées humaines sur la neuropathologie en souris	140
1.3 Implication des mutations dans la neuroinvasion et la neuropropagation	142
1.4 Implication des mutations dans le neurotropisme et l'entrée/sortie des nouveaux virions	145
1.5 Implication des mutations dans la réponse immunitaire du SNC	148
1.6 Implication des mutations dans les mécanismes cellulaires des cellules gliales..	150
2. LA DÉGÉNÉRESCENCE NEURONALE INDUITE PAR LE VIRUS HCoV-OC43 N'EST PAS RELIÉE À UNE APOPTOSE CLASSIQUE	153
2.1 Contexte	153
2.2 Activation apparente du facteur Bax sans impact sur la mortalité neuronale induite par HCoV-OC43	153
2.3 Possible implication de partenaire du facteur Bax	157
3. ACTIVATION D'UNE FORME DE MCR ANALOGUE À LA NÉCROPTOSE IMPLIQUANT LES FACTEURS RIP1 ET MLKL	160

3.1 Ubiquitination et caspase-8 précédant l'activation de la nécroptose	160
3.2 Activation des facteurs RIP1, RIP3 et MLKL	164
3.3 Implication du facteur RIP1 dans le mécanisme antiviral	172
3.4 L'activation de la nécroptose chez le modèle neuronal humain ne suit pas la voie classique	177
4. CONCLUSIONS	181
5. PERSPECTIVES	183
ANNEXES	186
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	187

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Schéma d'une coupe latérale d'un cerveau humain.	3
Figure 2. Schéma représentant les zones susceptibles à une infection virale.	16
Figure 3. Réponse immunitaire adaptative dans le SNC suite à une infection virale.	21
Figure 4. Arbre phylogénétique représentant la classification des coronavirus.	26
Figure 5. Représentation du virion des <i>Coronaviridae</i> .	30
Figure 6. Représentation de la glycoprotéine S du virus HCoV-OC43.	36
Figure 7. Cycle répliatif des <i>Coronaviridae</i> .	38
Figure 8. Dynamique de la réponse cellulaire en fonction de la MCR.	51
Figure 9. Activation de l'apoptose associée à la voie extrinsèque ou intrinsèque.	57
Figure 10. Activation de la nécroptose associée aux facteurs RIP1 et RIP3.	58
Figure 11. Représentation des différents domaines du facteur RIP1.	59

Publication n°1

Figure 12. rOC/U _{s183-241} is more neurovirulent than rOC/ATCC in infected mice	119
Figure 13. rOC/U _{s183-241} disseminates more rapidly in the brain and induces a stronger activation of astrocytes compared to rOC/ATCC in infected mice	121
Figure 14. rOC/U _{s183/241} disseminates more rapidly than rOC/ATCC in neuronal cell cultures	123

Figure 15. rOC/U_{s183-241} infection increases neuronal cell death and produces more infectious particles compared to rOC/ATCC infection 125

Figure 16. Bax gene expression is increased in neuronal cell cultures during neuronal response to HCoV-OC43 infection 127

Figure 17. Bax-dependent apoptosis does not play a significant role in LA-N-5 cell death induced by HCoV-OC43 infection 128

Figure 18. HCoV-OC43 infection increases RIP1 and RIP3 gene expression 130

Figure 19. RIP1 is involved in HCoV-OC43-induced LA-N-5 cell death and limits production of infectious virus 132

Figure 20. MLKL is involved in LA-N-5 cell death induced by HCoV-OC43. 134

Résultats/discussions

Figure 21. La surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 ne protège pas les cellules LA-N-5 de la mort cellulaire induite par HCoV-OC43. 156

Figure 22. Activité enzymatique de la caspase-8 mesurée chez les cellules LA-N-5 lors de traitements chimiques ou de l'infection par HCoV-OC43. 163

Figure 23. Augmentation de l'expression en ARNm de RIP3 chez les cellules astrocytaires U373 suite à la présence de TNF α + zVAD ou lors de l'infection par HCoV-OC43. 166

Figure 24. Diminution potentielle de la présence de polysomes et de la traduction des ARNm correspondant au facteur RIP1 lors de l'infection des cellules LA-N-5 par les virus de référence ou mutant. 170

Figure 25. L'inhibiteur chimique contre RIP1 (Nec-1) augmente la survie cellulaire en diminuant la réplication virale dépendamment de la concentration de ce dernier. 174

Figure 26. Effet antiviral de l'inhibiteur chimique (Nec-1) de l'activité kinase de RIP1. 176

Figure 27. Survie cellulaire de différents types cellulaires en présence de composés chimiques qui activent la nécroptose ($\text{TNF}\alpha/\text{zVAD}$) ou qui l'inhibent ($\text{TNF}\alpha/\text{zVAD}/\text{Nec-1}$). 179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Infections virales du SNC et pathologies associées ou hypothétiques.	23
Tableau 2. Classification fonctionnelle des différents types de MCR.	53
Tableau 3. Virus et protéines virales qui activent la MCR.	64
Tableau 4. Virus et protéines virales qui inhibent la MCR.	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE2 : *Angiotensin converting enzyme 2*

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

APN : *Aminopeptidase-N*

ATP : *Adénosine triphosphate*

Bax : *Bcl-2-like protein*

BHE : *Barrière hémato-encéphalique*

Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*

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

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

CEACAM1a : *Carcinoembryonic cell adhesion molecule 1a*

CMH : *Complexe majeur d'histocompatibilité*

CPA : *Cellules présentatrices d'antigènes*

CypA : *Cyclophiline A*

DAI : *Activateur des facteurs IFN dépendant à l'ADN (DNA dependent activator of IFN-regulatory factors)*

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

DPP4 : *Dipeptidyl peptidase 4*

EBV : *Virus Epstein-Barr*

ERGIC : *Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate compartment*

FCoV : *Coronavirus félin (Feline Coronavirus)*

FGF : *Facteur de croissance de fibroblastes (Fibroblast growth factor)*

GALT : *Gut-associated lymphoid tissues*

GAPDH : *Glycéraldhyde-3-phosphate déhydrogénase*

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

GLAST : *Transporteur du glutamate-aspartate (Glutamate-aspartate transporter)*

GLT-1 : *Transporteur spécifique du glutamate (Glutamate transporter)*

HCoV : *Coronavirus humain (Human Coronavirus)*

HR : *Heptad repeat 1 and 2, HR1and HR2*

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

HTLV-1 : Virus lymphotrope T humain (*Human T-lymphotropic virus*)
IBV : *Avian Infectious Bronchitis Virus*
IFN- γ : *Interferon gamma*
IGF-1 : Facteur de croissance à l'insuline (*Insulin-like growth factor*)
IL : Interleukine
IRF3 : Facteurs régulateurs de l'interféron (*Interferon regulated factors*)
ISG : Gènes stimulant l'interféron (*Interferon-stimulated genes*)
JAK-STAT : Janus kinase-STAT
JEV : Virus de l'encéphalite japonaise (*Japanese encephalitis virus*)
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LIF : Facteur inhibiteur de Leucémie (*Leukemia inhibiting factor*)
LPS : Lipopolysaccharides
MAdV : Adénovirus murin (*Murine adenovirus*)
MAP : Protéines associées aux microtubules (*Microtubule-associated protein*)
MAVS : Protéine de signalisation antivirale mitochondriale (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*)
MBP : Protéine basique de la myéline (*Myelin basic protein*)
MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein-1*
MCR : Mort cellulaire régulée
MERS-CoV : *Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus*
MHV : *Murine Hepatitis Virus*
MMP : Métalloprotéinase de la matrice (*Matrix metalloproteinase*)
MOG : Glycoprotéine de la myéline d'oligodendrocytes (*Myelin oligodendrocyte glycoprotein*)
NGF : Facteur de croissance des nerfs (*Nerve growth factor*)
NK : Cellules *Natural Killer*
NMDA : N-methyl-D-aspartic acid
NO : Oxyde nitrique (*Nitrogen oxide*)
Nrg1 : Neuregulin-1
NRO : Neurones récepteurs olfactifs
OPC : Cellules progénitrices des oligodendrocytes (*Oligodendrocytes progenitor cells*)
ORF : cadre de lecture (*Open Reading Frame*)
PAMPs : Motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-associated molecular patterns*)
PCR : *Polymerase chain reaction*

PDEV : Virus de la diarrhée porcine (*Porcine epidemic diarrhea virus*)
PHEV : Porcine Hemagglutine encephalitis virus
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-derived growth factor*)
PLP : Protéine protéolipidique (*Proteolipid protein*)
PRRs : Récepteurs de reconnaissance de motifs (*Pattern recognition receptors*)
RAG : Gène d'activation de la recombinaison
RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante
RBD : Région de liaison au récepteur, *Receptor Binding Domain*
RIP1 : *Receptor Interacting Protein Kinase 1*
RIP3 : *Receptor Interacting Protein Kinase 3*
ROS : Espèces réactives oxygénées (*Reactive oxygen species*)
RTC : complexe de réplication-transcription (*Replication-Transcription complex*)
SARS-CoV : *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*
SEP : Sclérose en plaques
SLA : Sclérose latérale amyotrophique
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
STAT1 : *Signal transducer and activator of transcription 1*
TLR : Récepteur homologue à *Toll* (*Toll-like receptor*)
TGF- β : Facteur beta de croissance des tissus (*Tissus growth factor beta*)
TMEV : Virus de l'encéphalite murine de Theiler (*Theiler's murine encephalitis virus*)
TMPRSS : *Transmembrane serine protease*
TNF α : *Tumour-necrosis alpha*
TRIF : *Toll/Interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon beta*
VSV : Virus de la stomatite vésiculaire
WNV : Virus du Nil occidental (*West Nile virus*)

LISTE DES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

LISTE DES PUBLICATIONS

MEESSEN-PINARD M, A. LE COUPANEC, M. DESFORGES and P.J. TALBOT (2016) *Pivotal role of RIP1 and MLKL in neuronal cell death induced by the human neuroinvasive coronavirus OC43*. J. Virol. 91(1). *J'ai conçu et réalisé la majorité des expérimentations présentées dans cet article (90%), en plus d'analyser tous les résultats et d'écrire l'ensemble du manuscrit.*

DESFORGES, M., **M. MEESSEN-PINARD**, and P.J. TALBOT (2016) *Modulating regulated cell death : the virus way to influence cell fate, survive and persist*. In: Programmed cell death in plants and animals. Rice, J., ed., ISBN 978-1-63484-505-02, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, New York, U.S.A., Chap. 2, pp. 35-73.

LE COUPANEC, A., M. DESFORGES, **M. MEESSEN-PINARD**, M. DUBE, R. DAY, N.G. SEIDAH, and P.J. TALBOT (2015) *Cleavage of a neuroinvasive human respiratory virus spike glycoprotein by proprotein convertases modulates neurovirulence and virus spread within the central nervous system*. PLoS Pathogens November 6. *J'ai participé, en collaboration avec A. Le Coupanec, à l'élaboration et la mise en application de la technique permettant d'isoler et de cultiver les cellules neuronales primaires murines.*

DESFORGES, M., A. LE COUPANEC, J.K. STODOLA, **M. MEESSEN-PINARD**, and P.J. TALBOT (2014) *Human coronaviruses : viral and cellular factors involved in neuroinvasiveness and neuropathogenesis*. Virus Res. 194: 145-158.

DESFORGES, M., A. LE COUPANEC, E. BRISON, **M. MEESSEN-PINARD** and P.J. TALBOT (2014) *Neuroinvasive and neurotropic human respiratory coronaviruses : potential neurovirulent agents in humans*. Adv. Exp. Med. Biol. 807: 75-96.

DESFORGES, M., A. LE COUPANEC, E. BRISON, **M. MEESSEN-PINARD** and P.J. Talbot (2014) *Coronavirus humains respiratoires neuroinvasifs et neurotropes : agents neurovirulents potentiels*. Virologie 18: 5-16.

FAVREAU, D.J., **M. MEESSEN-PINARD**, M. DESFORGES, and P.J. TALBOT (2012) *Human coronavirus - induced neuronal programmed cell death is cyclophilin D - dependent and potentially caspase-dispensable*. J. Virol. 86: 81-93. *J'ai conçu et produit les populations stables de cellules LA-N-5 dont l'expression de la protéine Cyclophiline D est inhibée et j'ai mesuré les niveaux d'expression en ARN.*

DESFORGES, M., D.F. FAVREAU, E. BRISON, J. DESJARDINS, **M. MEESSEN-PINARD**, H. JACOMY, and P.J. TALBOT (2012) *Human coronaviruses : respiratory pathogens revisited as infectious neuroinvasive, neurotropic and neurovirulent agents*. In: Neuroviral Infections. Singh, S.K. and Ruzek, D., eds., Taylor & Francis Group, LLC/CRC Press, Chap. 5, pp. 93-120.

LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES

MEESSEN-PINARD M, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2015). *Caractérisation de la mort neuronale induite par le coronavirus humain HCoV-OC43*, 9^e congrès Armand-Frappier, Hôtel Chéribourg, Orford, Québec, 12-14 novembre 2015.

MEESSEN-PINARD M, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2014). *Modulation of necroptosis by the human neuroinvasive coronavirus OC43*, 14^e symposium de *International Union of Microbiological societies (IUMS)*, Palais des congrès de Montréal, Montréal, Québec, 27 juillet-1 août 2014.

MEESSEN-PINARD M, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2014). *Understanding neuronal cell death induced by a human neuroinvasive coronavirus*, Déjeuner-conférence mensuel, Institut et hôpital neurologiques de Montréal, Montréal, Québec, 3 mars 2014.

MEESSEN-PINARD M, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2013). *Characterization of neuronal programmed cell death induced by a human coronavirus*, 8^e symposium annuel du *NeuroInflammation training program*, *New resident Hall*, Montréal, Québec, 6 juin 2013.

MEESSEN-PINARD M, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2013). *Characterization of neuronal programmed cell death induced by a human coronavirus*, 32^e symposium annuel de *l'American society for virology*, Pennsylvania State University, State College, Pennsylvanie, (USA), 20-24 juillet 2013.

MEESSEN-PINARD M, DJ FAVREAU, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2012). *Characterization of neuronal programmed cell death induced by a human coronavirus*, Déjeuner-conférence mensuel, Institut et hôpital neurologiques de Montréal, Montréal, Québec, 11 juin 2012.

LISTE DES COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

MEESSEN-PINARD M, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2015). *Characterisation of neuronal cell death induced by the human neuroinvasive coronavirus OC43*, 10e symposium annuel du *NeuroInflammation training program*, New resident Hall, Montréal, Québec, 10 juin 2015.

MEESSEN-PINARD M, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2014). *Characterization of neuronal death induce by human coronavirus infection: significance of viral spike (S) glycoprotein*, 13e International nidovirus symposium, Fundacion universidad, Salamanca (Espagne), 1-6 juin 2014.

MEESSEN-PINARD M, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2013). *Mort neuronale induite par un coronavirus*, 8^e congrès Armand-Frappier, Hotel Manoir des Sables, Orford, Québec, 14-16 novembre 2015.

MEESSEN-PINARD M, DJ FAVREAU, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2012). *Characterization of neuronal death induce by human coronavirus infection: significance of viral spike (S) glycoprotein*, 7e symposium annuel du *NeuroInflammation training program*, New resident Hall, Montréal, Québec, 11 mai 2012.

MEESSEN-PINARD M, DJ FAVREAU, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2012). *Characterization of neuronal programmed cell death induced by a human coronavirus*, 10e anniversaire Cité Biotech, Université de Montréal (Campus Laval), Laval, Québec, 2-3 mai 2012.

MEESSEN-PINARD M, DJ FAVREAU, M. DESFORGES and PJ TALBOT (2011). *Caractérisation de la mort cellulaire induite par le coronavirus humain OC43 chez les neurones : importance de la glycoprotéine de surface S*, 7^e congrès Armand-Frappier, Hotel Estérel, Estérel, Québec, 17-19 novembre 2011.

CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

1. LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL (SNC)

1.1 Structure du SNC

Le système nerveux central (SNC) est composé de l'encéphale, lui-même subdivisé en quatre régions : le cerveau (télencéphale), le diencephale, le tronc cérébral et le cervelet, ainsi que de la moelle épinière (Figure 1). Le cerveau, siège de l'intelligence, représente la plus grosse partie de l'encéphale et comprend plusieurs structures impliquées dans le traitement des informations sensorielles et motrices (Guyton, 1989). Bien que l'encéphale ne pèse que 2 % du poids total d'un adulte, cet organe utilise plus de 20% de l'oxygène et du glucose consommés, témoignant ainsi de son importance (Mink *et al.*, 1981). Le diencephale est localisé entre le cerveau et le tronc cérébral et comprend le thalamus et ses organes dérivés, qui sont responsables de diverses fonctions incluant la cognition, la perception de certaines sensations et la régulation des comportements. Les informations, captées par les organes sensoriels, sont acheminées par le système nerveux périphérique (SNP) au SNC où elles sont traitées. Les influx nerveux repartent en sens inverse pour acheminer une réponse de l'organisme à son environnement. Le tronc cérébral, qui fait la jonction entre le diencephale et la moelle épinière, relaie les influx sensitifs et les commandes motrices entre l'encéphale et la moelle épinière. La quatrième région de l'encéphale, le cervelet, se trouve à l'arrière de la boîte crânienne et coordonne les mouvements et régit la posture et l'équilibre. Finalement, bien plus qu'une simple autoroute pour les influx nerveux ou les commandes motrices entre l'encéphale et le SNP, la moelle épinière préside également les réflexes et est le siège de l'intégration des différents potentiels post-synaptiques (Guyton, 1989).

Étant donné l'importance que revêt le SNC pour l'organisme, celui-ci est bien protégé par un ensemble de structures qui tente de minimiser les dommages qui pourraient y survenir. Dans un premier temps, le SNC est entouré d'os qui forme la boîte crânienne et les vertèbres. Ensuite, sous la boîte crânienne, les méninges forment un ensemble de tissus (dure-mère, arachnoïde et pie-mère) qui protège le SNC (encéphale et moelle épinière) contre les dommages ou les blessures. Le liquide céphalo-rachidien (LCR), qui circule autour et à l'intérieur de l'encéphale et de la moelle épinière entre les régions arachnoïdes et pie-mère, protège le SNC en faisant office de coussins contre les secousses venant de l'extérieur. De plus, le LCR constitue un milieu chimique propice aux influx nerveux et apporte des nutriments aux tissus nerveux et évacue les déchets vers le sang (Liddelow, 2011).

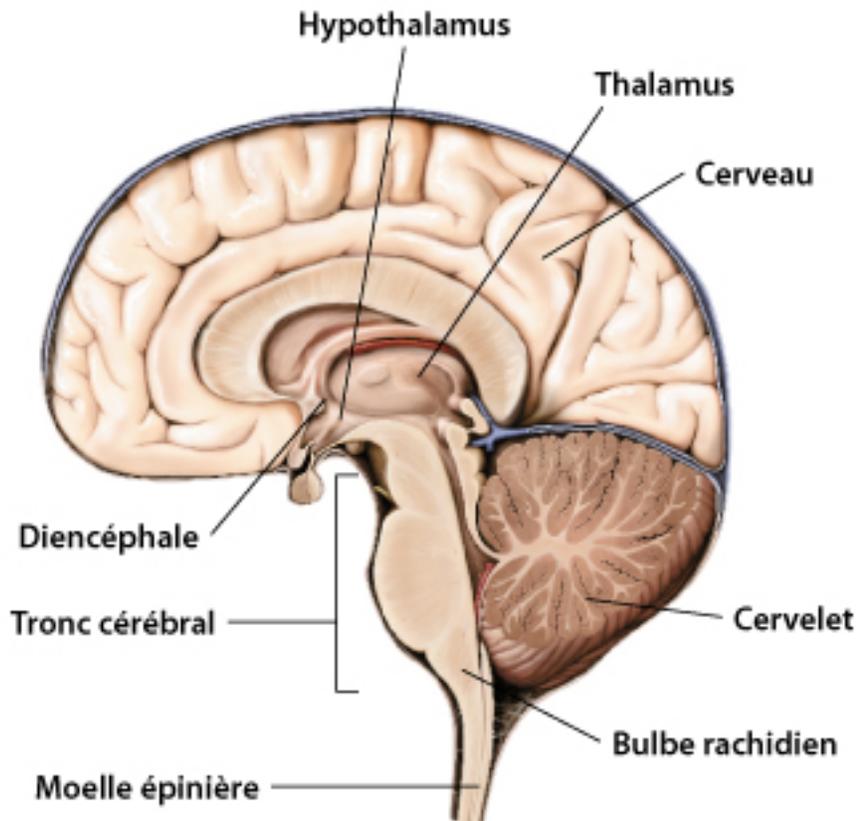


Figure 1. Schéma d'une coupe latérale d'un cerveau humain. L'encéphale est composé du cerveau ou télencéphale, du diencephale, du tronc cérébral et du cervelet. La moelle épinière, connectée à l'encéphale par le tronc cérébral, complète les parties du SNC. Tiré de http://www.ikonet.com/fr/ledictionnairevisuel/static/qc/le_systeme_nerveux, 25 mai 2016

1.2 Composantes du SNC

1.2.1 Les neurones

Chez l'homme, on estime le nombre de neurones constituant le SNC à environ 10^{13} et ceux-ci forment l'unité fonctionnelle de base du système nerveux en formant des réseaux permettant la dissémination d'influx nerveux et la transmission d'informations d'un endroit à un autre (Pelvig *et al.*, 2008). La morphologie et la structure des connexions entre les neurones diffèrent énormément dépendamment de la région du SNC ou du type de neurone. Cependant, certaines structures comme le corps cellulaire ou soma, l'axone et les dendrites sont conservés, peu importe le type de neurones. Ainsi, le corps cellulaire contient le noyau et l'essentiel du

cytoplasme incluant la machinerie nécessaire à la synthèse des différentes protéines structurales ou catalytiques du neurone. Le corps cellulaire constitue aussi le centre de la cellule d'où s'étendent les prolongements axonaux, à savoir les dendrites et l'axone (Takano *et al.*, 2015). Les dendrites émergent donc du corps cellulaire pour assurer un contact avec les autres neurones au niveau de la synapse qui permet le passage d'influx nerveux entre les neurones. Les dendrites sont caractérisées par une diminution du diamètre de leur structure depuis le corps cellulaire jusqu'à leur extrémité et par la présence de nombreux ribosomes pour la synthèse de protéines, notamment ceux régulant les neurotransmetteurs. Ainsi, les dendrites forment les régions d'intégration post-synaptique. Certaines protéines associées aux microtubules (MAP) sont spécifiques aux neurones; par exemple, MAP2 est localisée uniquement aux dendrites alors que MAP3 est retrouvée dans les axones. À l'inverse des dendrites, les axones sont lisses et adoptent une structure régulière. Le transport de protéines membranaires, d'enzymes et de précurseurs de neurotransmetteurs à travers l'axone s'effectue à l'aide des protéines du cytosquelette et de vésicules qui peuvent se déplacer du corps cellulaire à l'extrémité de l'axone (transport antérograde) ou l'inverse (transport rétrograde). Les prolongements axonaux permettent la conduction des potentiels d'action qui déclenche la libération de neurotransmetteurs aux extrémités axonales ramifiées, ce qui transfère l'influx nerveux à travers le bouton synaptique et la propagation de l'information d'un neurone à un autre (Y. N. Jan *et al.*, 2010, Koch *et al.*, 1993). D'ailleurs, les neurones ont la capacité de produire et de transmettre un potentiel d'action ou influx nerveux d'un neurone à un autre à partir d'une suite successive de dépolarisation membranaire. L'axone est parcouru de transporteurs membranaires qui laissent passer des ions, notamment le potassium, le sodium, le calcium et le chlore. La différence de la concentration en ions de part et d'autre de la membrane plasmique détermine localement le potentiel transmembranaire qui se déplacera le long de l'axone. La transmission de l'influx nerveux d'un neurone à un autre s'effectue à travers la synapse, qui peut être du type chimique ou électrique. Les synapses chimiques sont plus fréquentes que les synapses électriques et leurs fonctions sont davantage variées. En effet, les synapses électriques sont majoritairement retrouvées au niveau des neurones sensoriels du système nerveux périphérique (Szczupak, 2016). Ces synapses sont constituées de neurones extrêmement proches les uns des autres qui sont reliés entre-eux par des jonctions communicantes. Cette proximité est nécessaire puisque la transmission de l'influx nerveux n'utilise pas de neurotransmetteurs mais se propage directement d'un neurone à un autre (O'Brien, 2014, Pereda, 2014). Dans le cas d'une synapse chimique, l'influx nerveux au niveau de l'axone déclenche la fusion d'une vésicule synaptique transportant un neurotransmetteur

avec la membrane externe de l'axone terminal. La libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique lui permet d'atteindre le récepteur situé au niveau des dendrites et de poursuivre le passage de l'influx nerveux. Il existe plusieurs types de neurotransmetteurs qui ont des fonctions diverses. L'adrénaline et la noradrénaline sont les neurotransmetteurs qui sont produits lors de stress importants et qui commandent une action rapidement. À l'inverse, la sérotonine et l'acide aminobutyrique gamma (GABA) contribuent respectivement au bien-être, au cycle de sommeil, à la régulation du système digestif et au contrôle moteur, à la vision et à l'établissement d'un état calme. L'acétylcholine est majoritairement impliquée dans les processus liés à la mémoire et l'apprentissage alors que le glutamate, le neurotransmetteur le plus abondant dans le SNC, régule le développement mais également la mémoire et l'apprentissage. Enfin, l'endorphine est relâchée durant l'exercice et provoque l'euphorie ou un état de quiétude alors que la dopamine est associée aux sentiments de plaisir et à la dépendance (Rangel-Gomez *et al.*, 2016, Robinson *et al.*, 2016, Tritsch *et al.*, 2016). Ces neurotransmetteurs peuvent ensuite influencer le passage d'ions à travers la membrane cytoplasmique de l'axone et augmenter (excitateurs) ou diminuer (inhibiteurs) la probabilité du déclenchement du potentiel d'action (Kandel, 2000).

1.2.2 Les astrocytes

Les astrocytes sont sans contredit les cellules gliales les plus abondantes à travers le SNC et les plus importantes pour les neurones. En effet, quatre types différents d'astrocytes ont été identifiés et ceux-ci participent tous au maintien de l'homéostasie des neurones (Hu *et al.*, 2016). Parmi leurs nombreuses fonctions, les astrocytes guident les prolongements axonaux lors de la neurogenèse et la migration des neurones impliquées dans l'organisation du cortex cérébral en sécrétant des facteurs de croissance tels que le *Nerve growth factor* (NGF), le *Glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF) ou le *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Farina *et al.*, 2007, Nag, 2011). Les astrocytes maintiennent aussi le métabolisme en assurant l'apport en métabolites énergétiques aux neurones qui ne consomment que du glucose (Belanger *et al.*, 2011, M. R. Freeman, 2010). De plus, le flux sanguin ainsi que l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique sont régulés par les astrocytes (Quaegebeur *et al.*, 2011, Sofroniew *et al.*, 2010). Les astrocytes sont également responsables du contrôle des ions extracellulaires ainsi que du recyclage des neurotransmetteurs entre les synapses (Danbolt, 2001, Simard *et al.*, 2004). D'ailleurs, les astrocytes sont particulièrement importants à proximité des synapses glutamatergiques puisque ceux-ci, à l'aide des transporteurs de glutamate (GLT-1) et des transporteurs de glutamate-aspartate (GLAST), vont recycler le glutamate afin d'éviter son

accumulation et le développement de l'excitotoxicité glutamatergique éventuelle (Regan *et al.*, 2007, Rothstein *et al.*, 1996). Finalement, les astrocytes contribuent à la réponse immunitaire dans le SNC en sécrétant une panoplie de cytokines, de chimiokines et de *reactive oxygen species* (ROS) en réponse à la détection d'un pathogène (Farina *et al.*, 2007). Plusieurs études ont démontré la présence de récepteurs aux signaux de dangers (récepteurs aux *damage-associated molecular patterns*, DAMPs) et récepteurs de type Toll 2, 3 et 4 (*Toll-like receptor*, TLR) à la surface des astrocytes (Rossi, 2015). Par contre, la réponse immunitaire initiée par les astrocytes peut s'avérer délétère pour le SNC puisque l'activation de ces cellules gliales peut exacerber les dommages aux tissus. Cette dualité dans les conséquences d'une activation illustre bien la possibilité qu'une dérégulation des astrocytes puisse être impliquée dans les maladies neurologiques.

1.2.3 Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules gliales responsables de la production et du maintien de la myéline dans le SNC, structure responsable d'isoler et protéger les prolongements axonaux des neurones. Dans un premier temps, les cellules précurseuses d'oligodendrocytes (OPC) prolifèrent et migrent autour des neurones. Ensuite, ces OPC se différencient en oligodendrocytes en présence de *platelet-derived growth factor* (PDGF), de *fibroblast growth factor* : (FGF), d'insuline, d'hormones thyroïdiennes et de stéroïdes sécrétés par les neurones ou les astrocytes (Nishiyama *et al.*, 2009, Swiss *et al.*, 2011). Les oligodendrocytes forment alors une gaine de myéline autour des axones qui est constituée de 80% de lipides et de 20% de protéines. Le pourcentage de lipides est assez important étant donné que ces lipides proviennent d'une extension de la membrane des oligodendrocytes eux-mêmes. Les protéines constituant la myéline sont majoritairement la protéine basique de la myéline (*Myelin basic protein*, MBP), la glycoprotéine de myéline d'oligodendrocyte (*Myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG) et la protéine protéolipidique (*Proteolipid protein*, PLP). Un oligodendrocyte peut fournir la gaine de myéline à plusieurs axones et cette gaine est constituée d'une accumulation de couches concentriques (environ 50) autour de l'axone avec certains endroits laissés à découvert appelés nœud de Ranvier (Chong *et al.*, 2012, Nave, 2010). La gaine de myéline assure au neurone une étanchéité relative aux ions (sodium, potassium) afin que ce dernier puisse maintenir la propagation des signaux à travers l'axone (Michalski *et al.*, 2015). Suivant la myélinisation des axones, les oligodendrocytes occupent d'autres fonctions relatives au support métabolique des axones. En effet, à l'aide d'exosomes, la myéline est

capable d'excréter et de fournir du lactate aux axones, un métabolite utilisé pour produire de l'ATP (Fruhbeis *et al.*, 2013, Funfschilling *et al.*, 2012). Même si aucune molécule régulatrice spécifique pour la différenciation ou l'extension de la myéline n'ait été trouvée, le glutamate et la neuregulin-1 (Nrg1) auraient la capacité d'influencer ces processus (B. G. Brinkmann *et al.*, 2008, Wake *et al.*, 2011a).

1.2.4 Les microglies

Les microglies représentent les macrophages résidents du SNC et composent environ 5-10% de toutes les cellules constituant le SNC (Frost *et al.*, 2016). Contrairement aux autres cellules du SNC, les microglies ont comme origine les cellules précurseuses érythromyéloïdes qui, lorsque la barrière hémato-encéphalique devient plus sélective, se développent en microglie dans le SNC (Ginhoux *et al.*, 2015). Ces cellules gliales, lorsqu'elles sont activées, prennent une morphologie moins ramifiée et davantage de types amiboïdes, facilitant leurs fonctions de phagocytose et de motilité. De plus, les microglies peuvent également exprimer les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type I et II pour devenir des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et sécréter une panoplie de facteurs impliqués dans la réponse immunitaire, dont des cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- β , IL-10), des facteurs neurotrope (NGF, BDNF, GDNF) ou des composés potentiellement cytotoxiques (NO, glutamate) (Wake *et al.*, 2011b). Les microglies ne font pas qu'éliminer les débris cellulaires ou les cellules mortes dans le SNC mais ont de nombreuses autres fonctions et interagissent avec les astrocytes, oligodendrocytes et neurones. En effet, les microglies seraient impliquées dans la différenciation de cellules souches neurales en astrocytes par la sécrétion du *Leukaemia inhibitor factor* (LIF) et d'IL-6 et dans la différenciation des OPC en oligodendrocytes matures en produisant du NF- κ B, IL-6, IL-1 β et de l'*Insuline-like growth factor* (IGF-1) (Lu *et al.*, 2013, Nakanishi *et al.*, 2007, Nicholas *et al.*, 2001, O'Kusky *et al.*, 2012, Shigemoto-Mogami *et al.*, 2014). Finalement, les microglies participent également à la transmission synaptique, notamment en régulant le niveau basal de glutamate relâché par les astrocytes (Parkhurst *et al.*, 2013, Pascual *et al.*, 2012). Cette activation des microglies pourrait toutefois s'avérer délétère pour l'hôte dans certaines circonstances puisque celles-ci joueraient un rôle dans la démyélinisation lors d'infections virales ou pourraient être associées aux maladies neurodégénératives et neuroinflammatoires comme l'Alzheimer ou la sclérose en plaques (SEP) (Chatterjee *et al.*, 2013, Das Sarma, 2014).

1.2.5 La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une structure multi-cellulaire qui protège le SNC de l'entrée de composés toxiques ou de pathogènes présents dans la circulation sanguine et qui restreint le passage au SNC de leucocytes ou de grosses molécules comme notamment les cytokines ou les immunoglobulines. La majorité des vaisseaux sanguins entrant dans le SNC sont assujettis à cette barrière qui est constituée de *brain microvascular endothelial cells* (BMECs), d'astrocytes, de péricytes et de microglies. Les BMECs forment la structure de base à laquelle l'extrémité des astrocytes est rattachée et sécrètent des facteurs solubles qui assurent l'intégrité de la barrière et le maintien des jonctions serrées (Hawkins *et al.*, 2005). Les péricytes régulent quant à eux l'angiogenèse, l'intégrité des vaisseaux et le flux sanguin (Kutcher *et al.*, 2009). Enfin, les microglies répondent aux stimuli par la sécrétion de cytokines et de métalloprotéinases de la matrice (MMP) (Rock *et al.*, 2004). Malgré ces mesures, la perméabilité de la BHE peut tout de même être altérée lorsque l'intégrité des jonctions serrées entre les cellules constituantes est affectée, notamment par la présence des cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF α ou les MMP, favorisant du même coup, l'entrée de leucocytes (Miner *et al.*, 2016, Nair *et al.*, 2015). En réponse à la perméabilisation de la BHE, les cellules endothéliales peuvent, en présence d'interféron de type I et III (IFN I et III), stabiliser la structure par la formation de nouvelles jonctions serrées afin de contribuer à limiter la perméabilisation (Daniels *et al.*, 2014, Sorgeloos *et al.*, 2013). D'ailleurs, de nombreux virus sont aptes à briser l'intégrité de la BHE pour atteindre le SNC et une perméabilisation accrue de la BHE a été observée pour de nombreuses maladies neurologiques, notamment la SEP, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) ainsi que la maladie d'Alzheimer (Alvarez *et al.*, 2011, Bataveljic *et al.*, 2014, Deane *et al.*, 2007).

1.3 Système immunitaire en général

La présence de nombreux microorganismes dans l'environnement a poussé l'évolution du corps humain à se doter d'une panoplie de cellules et de plusieurs mécanismes capables de faire face aux différentes menaces afin de garder l'organisme en santé. L'ensemble des cellules agissant pour protéger l'organisme contre toutes agressions forme donc le système immunitaire et initie un large éventail de réponses.

La peau est considérée comme la première défense de l'organisme contre les pathogènes puisqu'elle est pratiquement imperméable à la majorité des pathogènes. Cette barrière physique est composée de cellules épithéliales solidement attachées les unes aux autres par des jonctions serrées et recouvertes par des cellules kératinisées. La production de kératine par ces dernières confère à la peau sa propriété imperméable à l'eau et la protection extérieure (J. X. Wang *et al.*, 2016). Les muqueuses représentent un prolongement de la peau où les tissus sont plus perméables à l'échange de divers composés avec l'environnement et sont retrouvées au niveau du tube digestif (Turner, 2009), des voies respiratoires (S. Sato *et al.*, 2012) et de l'appareil uro-génital (Mestecky *et al.*, 1999). Afin de réduire le risque d'invasion microbienne, les cellules constituant les muqueuses sécrètent du mucus, une épaisse couche de glycoprotéines, de protéoglycans et d'enzymes (Singh *et al.*, 2002). Le milieu acide de l'estomac et du vagin permet également de limiter la présence de pathogènes à ces endroits.

Le système immunitaire fait intervenir deux types de réponses à la présence d'un pathogène, les réponses immunitaires innée et adaptative. Les mécanismes du premier type de réponse sont toujours les premiers à être activés et sont rapidement mis en place bien qu'ils ne soient pas spécifiques au pathogène. Dans un premier temps, la réponse immunitaire innée peut compter sur de nombreux leucocytes circulants dans le sang et les tissus pour repérer et éliminer les débris cellulaires, les pathogènes et autres substances étrangères par phagocytose. La phagocytose est un processus effectué par différents phagocytes et qui consiste à ingérer le débris cellulaire, la cellule morte ou le pathogène à l'intérieur d'une vésicule intracellulaire appelée phagosome. La fusion subséquente du phagosome avec un lysosome, vésicule contenant des enzymes hydrolytiques et des ROS, entraîne la formation du phagolysosome qui permet l'élimination du contenu de ce dernier (S. A. Freeman *et al.*, 2014). Parmi les phagocytes, les neutrophiles sont les plus nombreux et arrivent généralement les premiers au site d'infection même si leur demi-vie est assez courte (environ 1-2 jours). En plus de la phagocytose, les neutrophiles libèrent le contenu de vésicules sécrétrices contenant plusieurs enzymes et molécules antimicrobiennes dans l'environnement (Ramadass *et al.*, 2016). Bien que moins nombreux, les macrophages sont les cellules les plus efficaces pour effectuer la phagocytose. À l'origine, les monocytes circulent dans la circulation sanguine et se différencient ensuite en macrophages lors de leurs migrations vers le tissu endommagé ou infecté. Les macrophages sont attirés aux lésions ou au site d'infection par la présence de chimiokines et peuvent persister plusieurs mois parmi les tissus endommagés (Lavin *et al.*, 2015). Les cellules dendritiques, retrouvées principalement dans les tissus et les muqueuses, sont également en

mesure de phagocyter les pathogènes et de les dégrader dans le phagolysosome (Mildner *et al.*, 2014). Bien que les basophiles et éosinophiles ne soient pas capables de phagocytose, ils sont impliqués dans la réponse innée, surtout lors de la présence de parasites, en sécrétant divers composés impliqués dans le processus inflammatoire (histamine, prostaglandine, leucotriène, $TNF\alpha$) et des molécules antimicrobiennes (ROS, enzyme protéolytique) (Stone *et al.*, 2010). Le contrôle de l'activation de ces leucocytes est primordial puisque les réactions allergiques ont pour origine la reconnaissance d'un allergène par ceux-ci, déclenchant alors une hypersensibilité du système immunitaire (S. H. He *et al.*, 2013). Finalement, les cellules *Natural killer* (NK) ne ciblent pas directement les pathogènes mais attaquent plutôt les cellules de l'hôte dont l'intégrité est compromise par la présence d'un pathogène intracellulaire ou par un état tumoral. Les cellules NK réussissent à identifier ces cellules "défectueuses" en interagissant avec le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I), une structure protéique retrouvée chez toutes les cellules nucléées (Vivier *et al.*, 2008). En effet, les protéines intracellulaires sont assujetties à la dégradation par le protéasome, qui génère ainsi plusieurs peptides qui seront associés au CMH de type I dans le réticulum endoplasmique. Ensuite, le CMH ainsi chargé de son peptide sera relocalisé à la surface de la membrane cytoplasmique (A. Williams *et al.*, 2002). À l'aide des récepteurs *Killer-cell immunoglobulin-like* (KIR), les cellules NK vont interagir avec ces structures CMH/peptides et déclencher une suite d'évènement pour éliminer la cellule dans le cas où le peptide présenté est d'origine microbienne. Ainsi, dans un contexte où la cellule est saine, la présentation d'un peptide de celle-ci entrainera l'inhibition de l'activité cytolytique de la cellule NK (Marcenaro *et al.*, 2011). Dans le cas où un pathogène prend le contrôle de la cellule et diminue ou inhibe l'expression des CMH de type I, les cellules NK possèdent également un récepteur de CMH qui détecte un changement dans l'expression de ce dernier. Ainsi, si les cellules NK ne détectent pas un niveau suffisant de CMH, un phénomène appelé *Recognition of missing-self* est déclenché par ces cellules pour provoquer la mort cellulaire (Raulet, 2006). À travers l'activation des cellules du système immunitaire, l'implication des cytokines, molécules assurant la communication cellulaire de la réponse du système immunitaire, est primordiale dans le processus d'inflammation qui consiste à repérer la menace, à recruter les cellules du système immunitaire, à éliminer la menace et les cellules mortes et enfin à réparer les tissus endommagés. Les cytokines regroupent les chimiokines, les interleukines, les interférons et le $TNF\alpha$ (Dinarello, 2007). Les chimiokines sont responsables du recrutement des cellules immunitaires aux régions touchées par un pathogène ou une blessure physique alors que les interleukines (IL) jouent différents rôles dépendamment du type. Certaines vont stimuler la prolifération (IL-1, 2, 3, 4, 11, 15, 17, 21), la différenciation (IL-2, 3, 4,

6, 7, 12, 13, 20, 21) ou l'activation (IL-1, 5, 6, 9, 10, 12, 18, 25-27) d'un type de cellule immunitaire alors que d'autres vont agir comme répresseur de la réponse immunitaire (IL-13, 14) (Dinarello, 2000, Kelso, 1998). Les interférons (IFN) sont regroupés et classés en trois groupes soient les IFN de type I, II et III. Pratiquement tous les types cellulaires du corps humain expriment les différents IFN de type I (IFN- α , - β , - ϵ , - κ et - ω) suite à la détection d'ARN bicaténaire dans le cytosol dont l'origine est majoritairement issue d'infections virales (de Weerd *et al.*, 2012). Suite à leur expression, les IFN sont relâchés dans l'environnement et se fixent à leur récepteur (*IFN α/β receptor*, IFNAR). La liaison des IFN α/β au IFNAR peut se faire sur la cellule ayant sécrété ces IFN (effet autocrine) ou sur le récepteur des cellules voisines (effet paracrine), permettant ainsi aux cellules à proximité d'un site d'infection de se prémunir contre l'infection virale (Uze *et al.*, 2007). Une fois le récepteur activé, la signalisation intracellulaire entraîne l'arrêt de la croissance cellulaire, la dégradation des ARN cellulaires et viraux par l'activation de la RNase L et inhibe la synthèse protéique à l'aide de la protéine kinase R (PKR), une enzyme qui phosphoryle et inhibe le *eukaryotic translation initiation factor* (eIF2a), sous-unité nécessaire à la traduction des ARNm (Randall *et al.*, 2008). De plus, les IFN de type I stimulent l'activation des macrophages, des cellules NK et des lymphocytes B et augmentent l'expression des CMH de type I pour accélérer la présentation des peptides viraux intracellulaires (Pogue *et al.*, 2004). L'IFN- γ est le seul type d'IFN de type II et est seulement produit par les cellules NK et les lymphocytes CD4 T_h1 et CD8 cytotoxiques. La présence de cet IFN entraîne l'activation des cellules NK et des macrophages, oriente la différenciation des cellules T vers le type T_h1 au détriment du type T_h2 et augmente l'expression des CMH de type I et II (Schoenborn *et al.*, 2007, Schroder *et al.*, 2004). Puisque découvert récemment, peu de choses sont connues sur les IFN de type III (IFN- λ 1, 2 et 3). Néanmoins, ceux-ci se lient à un complexe composé des récepteurs IL10R2 et IFNLR1 et seraient impliqués dans la réponse antivirale (Hermant *et al.*, 2014, Vilcek, 2003).

Par l'induction des phagocytes, la sécrétion des cytokines et le déclenchement des processus inflammatoires, la réponse immunitaire innée tente de contenir l'infection tout en préparant le terrain à la réponse immunitaire adaptative, plus spécifique. En plus d'éliminer le pathogène par la phagocytose et les protéines étrangères par endocytose, ces mécanismes permettent aux macrophages et cellules dendritiques d'activer la réponse immunitaire adaptative. Cette réponse débute par le transport des cellules dendritiques ou des macrophages à partir des sites d'infections vers les organes lymphoïdes secondaires. Les pathogènes ou les phagocytes circulant dans le sang se retrouvent dans la rate alors que ceux issus d'une infection

des tissus se déplacent dans la lymphe et arrivent au ganglion lymphatique le plus proche (Gray *et al.*, 2012, Randolph *et al.*, 2005). Arrivés aux organes lymphoïdes secondaires, les macrophages ou les cellules dendritiques présentent les peptides étrangers à leur surface à l'aide des CMH de type I ou II. Les complexes CMH/peptides sont alors soumis aux nombreuses cellules T naïves qui peuplent la rate et les ganglions lymphatiques (Mantegazza *et al.*, 2013, ten Broeke *et al.*, 2013). La reconnaissance de ces complexes par les lymphocytes T non différenciés est assurée par les *T-cell receptors* (TCR), déclenchant par la suite la différenciation, la maturation et l'activation de ces cellules (Huppa *et al.*, 2003, Paul *et al.*, 2013). Dépendamment du peptide présenté et du type de cytokines présentes, les cellules naïves deviendront des lymphocytes T CD8 cytotoxiques ou des lymphocytes T CD4, également appelées cellules T auxiliaires. Les lymphocytes T CD8 sont spécialisés dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires, notamment les virus, et utilisent leur TCR afin d'interagir avec les peptides chargés sur les CMH de type I des cellules infectées. Si la reconnaissance du peptide d'origine virale résulte en une forte affinité avec le TCR, en plus de signaux de co-stimulation, le lymphocyte T CD8 va sécréter plusieurs cytotoxines (perforine, granzyme, granulysine, ligand Fas) menant à la mort de la cellule infectée (Harty *et al.*, 2000, M. A. Williams *et al.*, 2007). Les lymphocytes T CD4 ont davantage un rôle d'assistance et orientent l'activation des autres cellules du système immunitaire. D'ailleurs, l'abondance ou l'affinité des complexes CMH/peptides pour les TCR influence la différenciation des cellules T auxiliaires en T_H1 ou T_H2 . En effet, les peptides présentés en grande quantité ou à forte affinité aux TCR engendrent les cellules T_H1 alors que l'inverse favorise les cellules T_H2 (Kaiko *et al.*, 2008). La présence de cellules auxiliaires T_H1 favorise un état inflammatoire, une activation plus importante des macrophages et la production d'IFN- γ (Mauri *et al.*, 2012, Y. Zhang *et al.*, 2016b). L'activation des lymphocytes T_H2 entraîne le développement d'une réponse plus large par l'activation et la production d'anticorps par les lymphocytes B (Hirahara *et al.*, 2013, Romagnani, 2006). De la même façon que pour les lymphocytes T, les cellules B naïves sont retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires. L'endocytose d'antigènes étrangers par les cellules B permet ensuite la présentation antigénique par les CMH de type II aux lymphocytes T_H2 . Ces derniers réagissent en sécrétant les cytokines nécessaires à la différenciation et à la prolifération des cellules B en plasmocytes. Ces plasmocytes sont alors responsables de la production et la sécrétion d'anticorps spécifiques à l'antigène (Mauri *et al.*, 2012, Y. Zhang *et al.*, 2016b). La présence de ces lymphocytes B va progressivement diminuer pour arrêter la réponse immunitaire mais certains de ces lymphocytes vont persister dans l'organisme et devenir des

cellules mémoires afin de contrer rapidement toutes nouvelles infections du pathogène ayant les mêmes antigènes (Kurosaki *et al.*, 2015).

1.4 Infection virale du SNC

1.4.1 Stratégies virales d'entrée au SNC

Considérant que le SNC est un endroit du corps où l'activation du système immunitaire en lien avec la présence d'antigènes étrangers est limitée, il n'est pas surprenant de constater que plusieurs virus se sont adaptés pour atteindre et envahir ce site, afin d'échapper à une réponse immunitaire rapide (McGavern *et al.*, 2011, Shrestha *et al.*, 2013). En effet, la proximité du système immunitaire à travers les différents tissus accélère la réponse à la présence de pathogènes, ce qui peut prendre davantage de temps lorsqu'un virus se retrouve au SNC où les différents leucocytes doivent passer à travers la BHE. Différentes stratégies virales se sont développées pour atteindre le SNC malgré la présence de la BHE dont le rôle est justement de rendre plus difficile l'entrée des virus au SNC. Ainsi, certains virus peuvent passer à travers la BHE soit par un transit direct impliquant la voie sanguine, soit en évitant la BHE par une route non-hématogène, c'est-à-dire via le système nerveux. Cela dit, certains virus ne sont pas confinés à une seule voie et peuvent avoir plus d'une façon d'entrer au SNC. La première voie d'entrée des virus au SNC impliquant la voie sanguine peut être sous-divisée en trois stratégies.

Fragilisation des jonctions serrées des BMEC. Avant de pénétrer dans le SNC, certains virus vont proliférer à leur site d'infection respectif et prendre la circulation sanguine avant d'atteindre et d'altérer indirectement la BHE. Le coronavirus murin (*Mouse hepatitis virus*, MHV) est capable d'inhiber la production d'IFN- β par les BMEC infectés, ce qui entraîne une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées ZO-1, VE-cadherine et occludine affectant ainsi la perméabilité de la BHE (Bleau *et al.*, 2015). De plus, le Virus T-lymphotrope humain (HTLV-1) (Afonso *et al.*, 2008), l'adénovirus murin de type 1 (MAV-1) (Gralinski *et al.*, 2009) ainsi que le virus du Nil occidental (WNV) (Verma *et al.*, 2010) ont également la capacité d'altérer l'intégrité des jonctions serrées pour passer dans le SNC. La production de cytokines et de molécules pro-inflammatoires suivant la virémie peut également altérer l'intégrité des protéines claudines et occludines, protéines transmembranaires qui assurent aussi l'étanchéité entre les cellules de la BHE, ce qui va faciliter le passage des virus au SNC (Sandoval *et al.*, 2008).

Infection des BMEC et transport des virions à la membrane basolatérale. L'utilisation de BMEC en culture a permis de constater que plusieurs virus ont la capacité de les infecter et les nouveaux virions sont transportés et relâchés à la membrane basolatérale située du côté du SNC. Parmi ces virus, notons le polyomavirus JC (Chapagain *et al.*, 2007), le virus de la poliomyélite (Coyne *et al.*, 2007), le virus Epstein-Barr (EBV) (Casiraghi *et al.*, 2011), le virus MAV-1 (Gralinski *et al.*, 2009), le virus HTLV-1 (Afonso *et al.*, 2008) ainsi que le virus WNV (Verma *et al.*, 2010).

Cheval de Troie ou l'infection de leucocytes. La méthode du cheval de Troie consiste à infecter les leucocytes présents dans le sang qui, éventuellement, traverseront la BHE pour atteindre le SNC en présence de cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires. L'un des virus les mieux caractérisés utilisant cette méthode est le VIH. En effet, ce virus, présent dans le sang, commence par infecter les lymphocytes T et les monocytes/macrophages circulants et devient latent (Alexaki *et al.*, 2008). Ensuite, on suppose que l'entrée initiale de ces leucocytes infectés dans le SNC serait due à une repopulation de cellules immunitaires en périphérie du SNC, en parallèle d'une altération de la perméabilisation de la BHE par la présence de cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires. En effet, suivant l'infection des leucocytes par le VIH, l'expression de chimiokines (CCL2 et CXCL12), de cytokines (IL-6) et de MMP (MMP-9) augmente, ce qui contribue à fragiliser l'intégrité de la BHE et à faciliter l'entrée des cellules immunitaires infectées au SNC (Ancuta *et al.*, 2006, Strazza *et al.*, 2011). Le virus JC possède également la capacité d'infecter le SNC par cette voie suite à sa réactivation à partir de réservoirs périphériques, notamment les cellules T CD4+ (Weber *et al.*, 2001). En effet, l'interaction entre les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes B permet probablement alors au virus de se propager aux lymphocytes B. Par la suite, le virus JC utilise les lymphocytes B pour migrer vers le SNC et traverse la BHE pour infecter les oligodendrocytes (Chapagain *et al.*, 2010, Houff *et al.*, 1988). Enfin, notons que le virus de la polio, le coxsackievirus (CVB) et l'entérovirus EV71 ont également la capacité d'infecter des leucocytes mais le lien entre la neuroinvasion reste à être confirmé (Freistadt *et al.*, 1996, Y. W. Lin *et al.*, 2009, Tabor-Godwin *et al.*, 2010).

La deuxième voie d'entrée virale au SNC consiste à utiliser le réseau du système nerveux et peut être subdivisée en deux stratégies.

Infection virale par le nerf olfactif. La connexion la plus courte entre le SNC et le milieu extérieur est le nerf olfactif, ce qui en fait un raccourci de choix pour les virus qui atteignent le SNC à partir de la cavité nasale. Le nerf olfactif est composé, entre autres, de neurones

récepteurs olfactifs (NRO) dont les dendrites sont dirigées vers la cavité nasale (côté apical) et le prolongement axonal (côté basal) se prolonge jusqu'au bulbe olfactif. Le virus de l'Influenza, le virus HSV-1, le virus de la poliomyélite, le virus Hendra, le virus Nipah, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus MHV (van Riel *et al.*, 2015) et fort probablement le coronavirus humain HCoV-OC43 (St-Jean *et al.*, 2004) sont capables d'atteindre le SNC en empruntant cette voie d'entrée.

Infection virale à partir des nerfs périphériques autre que le nerf olfactif. La capacité de certains virus à utiliser le SNP pour entrer au SNC procure l'avantage d'éviter la BHE. L'accès au SNC à partir des nerfs est donc plus facile, plus direct et ne provoque pas nécessairement l'activation d'une réponse immunitaire importante (van Riel *et al.*, 2015). Ainsi, le virus de la poliomyélite, l'adénovirus, le virus de la rage, le CVB ainsi que le virus herpes simplex (HSV-1) se lient à leur récepteur respectif, situé sur les neurones moteurs ou sensoriels et utilisent le transport neuronal rétrograde pour atteindre le corps cellulaire neuronal et entrer rapidement au SNC (H. I. Huang *et al.*, 2015a, McGavern *et al.*, 2011). Le HSV-1 est particulier alors qu'il commence par infecter les kératinocytes, afin de générer de nouveaux virions, pour ensuite se propager aux neurones sensoriels et atteindre le SNC (Mori *et al.*, 2005).

1.4.2 Réponse immunitaire en réponse aux infections virales

Une fois le SNC atteint, le virus tentera de s'établir dans les meilleures conditions possibles et mettre en place une réplication et une dissémination efficace tout en évitant le système immunitaire. Plusieurs facteurs influenceront la réponse cellulaire et l'activation du système immunitaire dans le SNC, notamment le type de virus, le type de cellules infectées (neurotropisme), la région du SNC infectée, la façon du virus à se propager, l'âge de l'hôte, etc (Figure 2).

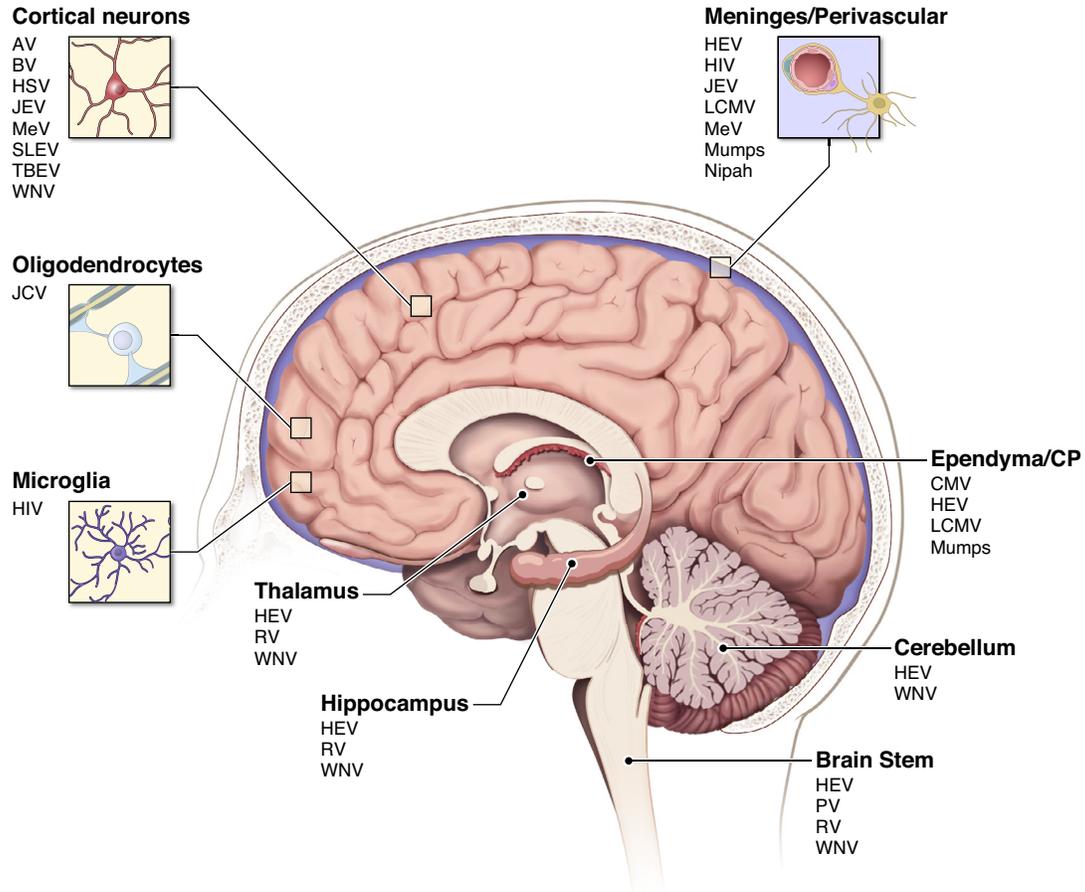


Figure 2. Schéma représentant les régions ou les types cellulaires du cerveau affectés par une infection virale. Les cellules neuronales et gliales peuvent être la cible de nombreux virus et différentes régions sont susceptibles d'être un foyer d'infection. Abréviations : AV, Adénovirus; BV, Bunyavirus; CMV, Cytomégalovirus; HEV, Entérovirus Humain; HIV, Virus d'immunodéficience humaine; HSV, Virus Herpès Simplex; JCV, Virus John Cunningham; JEV, Virus de l'encéphalite japonaise; LCMV, Virus de chorioméningite lymphocytaire; MeV, Virus de la rougeole; Mumps, oreillons; PV, Virus de la poliomyélite; RV, Virus de la rage; SLEV, Virus de l'encéphalite de St-Louis; TBEV, Virus de l'encéphalite transmis par les tiques; WNV, Virus de Nil occidental. Tiré de Swanson PA et McGavern DB, *Current opinion in virology*, 2015.

La réponse immunitaire innée est la première étape de défense de l'hôte contre la présence d'un virus et fait intervenir les mécanismes responsables de la reconnaissance de ce dernier. Cette reconnaissance est assurée par un ensemble de récepteurs, les *Pattern recognition receptors* (PRRs). Ces PRRs détectent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) et sont divisés en cinq classes, les TLR, les récepteurs de type RIG-I (RLR) et les récepteurs de type NOD (NLR), les récepteurs lectines de type C (CLR) ainsi que les récepteurs de type *Absent in myelona 2* (AIM2) (ALR) (Palm *et al.*, 2009, Shayakhmetov, 2010). Ces PRRs détectent des structures

différentes et ne sont pas retrouvés uniformément à travers les différents types de cellules neurales ou autres.

TLR. À ce jour, 10 TLR ont été identifiés chez l'humain et sont exprimés dans les endosomes (TLR3, 7, 8 et 9) ou à la surface de la cellule (TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10). Bien que la majorité des cellules du SNC expriment les TLR, les microglies, étant les cellules immunitaires de prédilection dans le SNC, expriment tout le répertoire de TLR (Jack *et al.*, 2005) et augmentent leur expression lorsqu'elles sont en présence d'un pathogène (Olson *et al.*, 2004). Les microglies peuvent également détecter les PAMPs qui sont issus d'infections systémiques même lorsque l'intégrité de la BHE n'est pas affectée, suggérant que ces motifs peuvent traverser la BHE et activer les microglies ou les macrophages résidents (Okun *et al.*, 2011). Les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes expriment également plusieurs TLR, notamment les TLR3, 4, 7/8 et 9 qui reconnaissent respectivement les ARN bicaténaires (double brin, db), les glycoprotéines virales, les ARN monocaténaires (simple brin, sb) et l'ADN riche en îlots CpG hypométhylés (Mukherjee *et al.*, 2015, Peltier *et al.*, 2010, Y. Zhou *et al.*, 2009). Les astrocytes expriment principalement le TLR3 bien que les TLR2, 4, 5 et 9 aient également été détectés, mais à des niveaux faibles (Bsibsi *et al.*, 2002, Jack *et al.*, 2005). Le TLR3 semble tout de même avoir un rôle prépondérant dans la reconnaissance et la limitation de la réplication virale autant chez les astrocytes infectés par le virus HSV (Reinert *et al.*, 2012) que les neurones infectés par le virus WNV (Daffis *et al.*, 2008).

NLR. Les NLR sont des structures impliquées dans la reconnaissance de pathogènes intracellulaires et qui initient la formation de l'inflammasome. Ce dernier active alors la caspase-1, nécessaire à la maturation des cytokines IL-1 β et IL-18 (Martinon *et al.*, 2002). Il existe six formes d'inflammasomes qui se distinguent par la présence ou l'absence de domaines spécifiques et la configuration de ceux-ci. Toutefois, quatre formes d'inflammasomes seulement sont retrouvées au SNC soit NLRP1 chez les neurones, le NLRP2 chez les astrocytes et le NLRP3 chez les microglies (Kigerl *et al.*, 2014). En plus de reconnaître le virus, l'inflammasome détecte la présence d'ATP au niveau cytoplasmique, notamment le NLRP2 des astrocytes, ce qui contribue à initier une réaction inflammatoire et une réponse immunitaire plus rapide contre l'infection (Minkiewicz *et al.*, 2013).

RLR. Les RLR sont des senseurs cytoplasmiques qui détectent l'ARN viral et activent la réponse à l'IFN. À l'heure actuelle, trois RLR ont été identifiés soient RIG-I, MDA5 et LGP2. Les deux premiers sont respectivement activés par l'ARN db court triphosphorylé en 5' (< 2kb), l'ARN db long (> 2 kb), alors que le stimulus activant le troisième est encore inconnu (Peltier *et al.*, 2010). Les neurones possèdent MDA5 et RIG-I et l'activation de ces deux RLR limite la

réplication virale, entre autres pour le virus WNV chez les neurones infectés du cerveau et de la moelle épinière (Fredericksen *et al.*, 2008). De plus, l'une des protéines adaptatrices des RLR, la protéine mitochondriale de signalisation antivirale (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*, MAVS), est essentielle dans l'élimination des virus WNV, Sindbis et JEV, suggérant l'importance de cette voie antivirale dans le SNC (Carty *et al.*, 2014). Les astrocytes possèdent également les mécanismes de reconnaissance RLR. D'ailleurs, la présence du virus VSV, dans le cerveau de souris infectées, provoque une augmentation des niveaux en ARNm et en protéines correspondant à RIG-I et MDA5 dans les astrocytes, contribuant ainsi à générer une réponse immunitaire protectrice contre ce virus neurotrope (Furr *et al.*, 2008).

CLR. Les CLR représentent un groupe hétéroclite de différents récepteurs cytosoliques ou endosomales qui reconnaissent des structures lectin de type C, notamment le mannose, le galactose, le B-glycan ou les asialoglycoprotéines, en présence de calcium (Geijtenbeek *et al.*, 2009). La reconnaissance de certains virus par les CLR participe à l'immunité anti-virale en diminuant l'inflammation et les dommages aux tissus infectés, notamment pour les virus HSV-1 (Zelenay *et al.*, 2012), Vaccinia (Iborra *et al.*, 2012) et Chikungunya (Long *et al.*, 2013). Cependant, pour certains virus neuroinvasifs, tels que le JEV ou le virus de la Dengue, leurs détections par les CLR semblent au contraire contribuer à accentuer l'inflammation au CNS (Hoving *et al.*, 2014). D'ailleurs, en bloquant cette voie lors d'une infection *in vivo* par le JEV, une réduction des dommages neuronaux, de la production de cytokines pro-inflammatoires, de la perméabilisation de la BHE et de l'infiltration cellulaire a été observé dans le SNC (S. T. Chen *et al.*, 2012).

ALR. Le récepteur AIM2 est le facteur le plus caractérisé dans ce groupe et est un senseur cytosolique qui détecte l'ADN bicaténaire principalement d'origine virale. Une fois l'ADN db associée à AIM2 via sa partie C-terminal, la partie N-terminal de la protéine interagit avec ASC pour former un complexe responsable du recrutement et de l'activation de la caspase-1. Cette dernière assure ensuite le clivage et l'activation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Hornung *et al.*, 2009).

Suivant la détection de virus dans le SNC par les PRRs, les TLR, RLR et NLR activeront les *Interferon regulated factors* (IRFs) et le *Nuclear factor* κ B (NF- κ B) menant respectivement à l'expression des IFN et de cytokines pro-inflammatoires. Suite à l'expression des IFN, la liaison des IFN de type I (IFN α et IFN β) à leur récepteur (IFNAR) mène à l'expression de divers gènes en réponse à l'IFN (ISGs), responsables d'inhiber l'entrée, la traduction de tous les ARNm présents dans la cellule et la réplication ou la sortie du virus

(Schneider *et al.*, 2014). D'ailleurs, plusieurs ISGs, notamment les ISG49, 54 et 56, sont exprimés dans le SNC suite à une infection virale (Fensterl *et al.*, 2012). Cette activation n'est pas limitée aux cellules gliales puisque les neurones peuvent aussi répondre activement suite à une infection virale par la sécrétion des IFN de type I (Delhaye *et al.*, 2006). En réponse à l'infection du SNC par les virus WNV, VSV, JEV, HSV-1 ou MHV, autant les neurones que les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies participent à la réponse liée à l'IFN pour restreindre la réplication virale par la production d'IFN de type I (H. Cho *et al.*, 2013, Lafaille *et al.*, 2012, Reinert *et al.*, 2012). Dans le cas du virus VSV, l'introduction intranasale de ce virus déclenche la sécrétion des IFN de type I dans le SNC, démontrant ainsi la portée de ce système pour prévenir la réplication et la dissémination virale au SNC (van den Pol *et al.*, 2014). Notons également l'activation de la protéine kinase R (PKR) ainsi que de l'endonucléase RNase L suite à l'activation des ISGs dans le SNC. La PKR détecte la présence cytoplasmique d'ARN db viral et inhibe la synthèse protéique de la cellule afin de restreindre la traduction des ARN viraux (Meurs *et al.*, 1992). La RNase L, quant à elle, dégrade l'ARNm cellulaire ou viral, inhibant du même coup, la réplication virale et la synthèse protéique du virus autant que de la cellule (Silverman, 2007). Ces systèmes antiviraux sont d'ailleurs impliqués dans le contrôle d'infection du SNC par les virus WNV (Samuel *et al.*, 2006) et MHV, bien que ce dernier semble être en mesure d'interférer et d'inhiber la RNase L (L. Zhao *et al.*, 2012b).

En parallèle à la réponse liée à l'IFN, la production de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires contribue à l'établissement d'un environnement propice à l'élimination du virus (Akira *et al.*, 2006). Les astrocytes sont les cellules gliales qui produisent et sécrètent le plus de cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α) et de chimiokines (MCP-1, CCL5, CCL20, CXCL12, CXCL2, CX3CL1), contribuant du même coup à activer les autres cellules gliales et à attirer les cellules du système immunitaire périphérique (Farina *et al.*, 2007). Les microglies, en plus d'acquérir un phénotype phagocytaire, sécrètent aussi les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF α ainsi que des espèces oxygénées réactives (ROS) et de l'oxyde nitrique (NO), accélérant ainsi l'élimination des cellules infectées (Chatterjee *et al.*, 2013, Lehnardt, 2010, Suh *et al.*, 2009).

Enfin, une réponse adaptative du système immunitaire périphérique se met également en place, entre autre par le recrutement au SNC de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, largement causé par la chimiokine CXCL12 produite par les astrocytes (Cruz-Orengo *et al.*, 2011) (Figure 3). Bien que la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ n'altère pas le recrutement des cellules T

CD8+, il semble que leur absence diminue la survie et l'action de ces dernières, empêchant un contrôle efficace de la réplication virale (Phares *et al.*, 2012). En plus de maintenir une réponse soutenue et efficace des cellules T CD8+, les cellules T CD4+ sécrètent également de l'IL-21, une cytokine qui participe à l'activation des cellules B pour la production d'anticorps (Phares *et al.*, 2013). Les lymphocytes T CD8+ sont particulièrement importants à la réponse antivirale dans le SNC, surtout lorsque les neurones sont infectés (Divito *et al.*, 2006). Les cellules T CD8+ vont utiliser un arsenal diversifié pour contrôler la propagation virale en produisant de l'IFN γ , du TNF α , de la perforine, des granzymes, les ligands Fas ou TRAIL et provoquer la mort des cellules infectées (Russo *et al.*, 2015). Les microglies et les macrophages pourront alors éliminer les débris et autres cellules mortes du SNC contribuant à la restauration du SNC. Hormis la présence de microglies comme CPA dans le SNC, les neurones peuvent aussi soutenir une expression assez importante des gènes codant le CMH, complexe responsable de la présentation d'antigènes viraux. En effet, alors que la présence de CMH de type I est fortement réprimée chez les neurones en santé, l'infection du SNC par le virus de la rage (Irwin *et al.*, 1999), le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Truong *et al.*, 2009), le virus HSV-1 (Abendroth *et al.*, 2000), le virus de la rougeole (Gogate *et al.*, 1996) ou le virus JEV (Das *et al.*, 2009) entraîne une augmentation de la présentation antigénique du neurone aux lymphocytes T par les CMH de type I. Les microglies peuvent également augmenter l'expression des CMH en contexte d'infection (Steel *et al.*, 2009). Lorsque l'infection virale est contrôlée, les CPA, incluant les microglies, vont mettre en place un processus pour réprimer l'activation de la réponse immunitaire adaptative et rétablir l'homéostasie. Ce processus passe par la production de deux ligands de mort programmée (PD-L1 ou PD-L2) qui sont sécrétés par les CPA, les lymphocytes T régulateurs (Treg), les cellules myéloïdes ainsi que les cellules endothéliales. La liaison de ces ligands aux récepteurs PD-1, présents à la surface des cellules NK, des lymphocytes T et des lymphocytes B, entraîne alors l'activation de l'apoptose et la mort des cellules stimulées (Nguyen *et al.*, 2015). La mort cellulaire des lymphocytes T est activée dans le SNC afin de mettre fin à la réponse immunitaire (Lafon *et al.*, 2008).

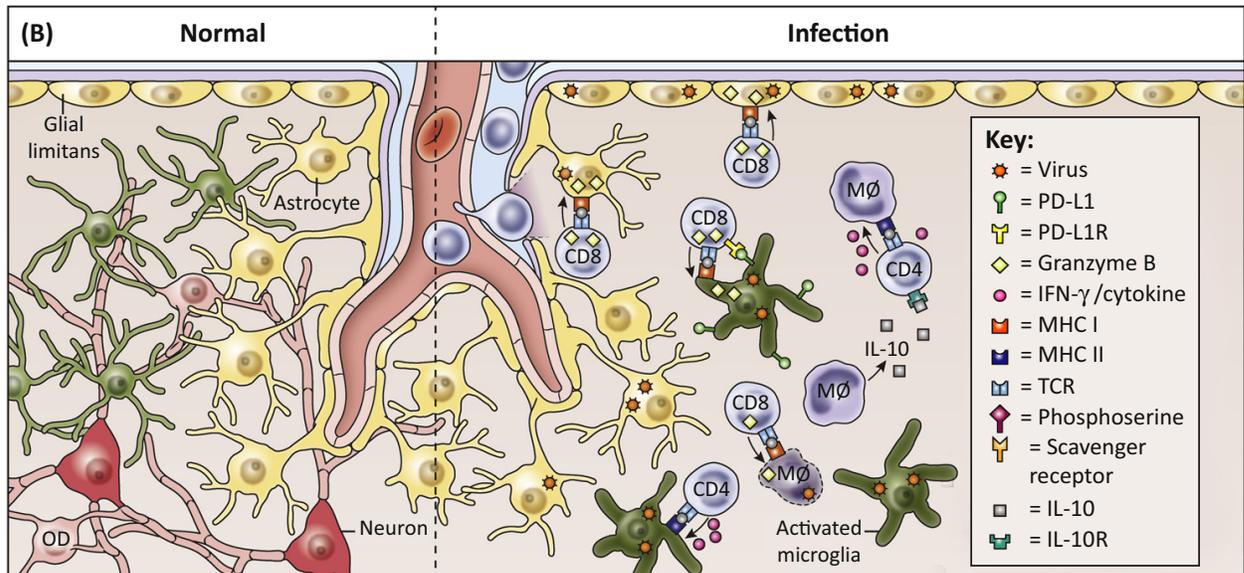


Figure 3. Réponse immunitaire adaptative dans le SNC suite à une infection virale. La sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les neurones et cellules gliales mène à l'entrée et l'activation des macrophages et des lymphocytes T CD4+ et CD8+ au SNC. Les lymphocytes T CD8+ reconnaissent les peptides viraux présentés par les CMH de type I à la surface des cellules infectées et sécrètent des molécules effectrices (i.e. granzymes B) à la cellule ciblée. Les lymphocytes T CD4+ reconnaissent les peptides présentés par les CMH de type II exprimés par les macrophages/microglies et produisent des cytokines antivirales (i.e. IFN γ). La présence de cytokines immunosuppressives (i.e. IL-10) ainsi que l'expression du ligand de mort PD-L1 par les microglies réduit la réponse inflammatoire et limitent les dommages induits par la réponse immunitaire. Tiré de Russo MV et McGavern DB, *Trends in immunology*, 2015

1.4.3 Adaptation, persistance et évasion virale

La présence de la BHE limite la libre circulation des composants du système immunitaire inné et l'absence de lymphocytes B, de macrophages et de cellules dendritiques pour activer rapidement les lymphocytes T fait en sorte que le SNC est immunologiquement moins rapide ou moins efficace par rapport à d'autres organes (Lauvau *et al.*, 2015). Or, cette particularité du SNC fait de cet organe, un endroit propice aux virus neurotropes qui cherchent à s'établir et à persister chez l'hôte à l'abri temporaire du système immunitaire (Koyuncu *et al.*, 2013). Ainsi, après une première phase aiguë où le virus neurotrope se réplique et se dissémine abondamment à travers le SNC, certains virus ont adopté différentes stratégies pour devenir persistants dans le SNC et ainsi se maintenir dans l'organisme (Galluzzi *et al.*, 2010, Ramakrishna *et al.*, 2002). La persistance virale au SNC peut découler du blocage des mécanismes cellulaires antiviraux ou de la répression de l'expression des gènes viraux (Kunz *et al.*, 2006, McGavern *et al.*, 2011, Weber *et al.*, 2007). Néanmoins, cette persistance virale peut découler d'une infection latente ou d'une infection chronique.

Infection latente. Une infection virale dite latente est définie comme un état dormant durant lequel la réplication virale est maintenue à sa plus faible expression ou cesse complètement pour n'avoir que le matériel génétique viral dans la cellule hôte, qui peut alors s'intégrer ou non au génome cellulaire. Cet état n'élimine donc pas le virus et un changement dans la condition immunologique de l'hôte, par exemple la suppression du système immunitaire, peut réactiver la réplication active du virus et provoquer une nouvelle phase aiguë. Plusieurs virus parmi la famille des *Herpesviridae* dont les virus HSV-1 et Varicelle zona (VZV) sont des virus latents (McGavern *et al.*, 2011). Lorsque les virions atteignent les neurones sensoriels des nerfs périphériques, ils deviennent quiescents et se réactivent lorsque les conditions deviennent favorables à leur dissémination. Par exemple, quand le système immunitaire perd de sa force à cause de l'âge, du stress ou d'une autre infection, le virus latent en profite pour sortir de sa torpeur et déclenche les mécanismes qui assurent la réplication et la dissémination des nouveaux virions. Le virus JC est également considéré comme latent puisque ce dernier se réactive à partir de réservoirs périphériques lorsque le système immunitaire est supprimé. Ensuite, les virions migrent vers le SNC pour infecter majoritairement les oligodendrocytes et causer une maladie appelée leucoencéphalopathie multifocale progressive (Weber *et al.*, 2001).

Infection chronique. L'infection chronique diffère de l'infection latente par une réplication constante où le système immunitaire n'est pas en mesure de restreindre le virus, ce qui engendre souvent des maladies chroniques caractérisées par un déséquilibre continu de l'homéostasie au SNC (Giraudon *et al.*, 2009, Karim *et al.*, 2014). La réplication virale peut être soutenue et constante, telle qu'observée pour le virus de la rougeole (Schonberger *et al.*, 2013), le virus de la poliomyélite (D. C. Miller, 1995), le virus de l'encéphalomyélite de Theiler (TMEV) (Lipton, 1975), le virus LCMV (Chakraborty *et al.*, 2010) et plusieurs entérovirus (H. I. Huang *et al.*, 2015a). Dans certains cas, la réplication virale produit une faible quantité de nouveaux virions, notamment pour les virus HIV et HTLV, ce qui engendre des pathologies dégénératives plus lentes (Lepoutre *et al.*, 2009, Petitto *et al.*, 1999).

1.4.4 Pathologies neurologiques associées aux infections virales

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à l'émergence ou à l'augmentation de la sévérité de maladies neurologiques suite à une infection virale au SNC. Le type de virus, l'efficacité de la réplication virale, la persistance virale, la route d'infection, l'âge, le fond génétique de l'hôte et l'étendue des dommages aux cellules neurales peuvent tous influencer la neuropathologie.

Ainsi, autant le virus lui-même que la réponse immunitaire découlant de l'infection peuvent être délétères pour le SNC et mener au développement ou à l'exacerbation de maladie(s) neurologique(s). D'une part, le virus peut causer des dommages aux cellules, altérer les fonctions neuronales ou induire la mort cellulaire et d'autre part, la réponse immunitaire à l'infection peut être détournée par mimétisme moléculaire ou devenir incontrôlable, ce qui provoque des dommages et la mort des cellules neurales (Fujinami *et al.*, 2006). Ainsi, les virus neurotropes peuvent être virulents (neurovirulence) et devenir des agents étiologiques de maladies neurologiques en initiant la pathologie ou en augmentant la sévérité des symptômes. Le Tableau 1 présente différents virus qui sont associés aux maladies neurologiques ou potentiellement reliés à la sévérité des symptômes.

Tableau 1. Infections virales du SNC et pathologies associées ou hypothétiques. Modifié de Desforges M, Meessen-Pinard M et Talbot P.J., 2016; McGavern DB et Kang SS, De chiara G et al, 2012; Huan HI et Shih SR 2015; Swanson PA et McGavern DB 2015

Virus	Hôte	Site d'infection	Pathologie
Arenaviridae			
LCMV	Humain	Microglie	Méningite, œdème cérébral
Bunyaviridae			
Virus de la Crosse	Humain		Encéphalite
Coronaviridae			
HCoV	Humain	SNC	SEP, Encéphalite?
MHV	Souris	Neurone, astrocyte, oligodendrocyte	Encéphalomyélite, modèle SEP
Flaviviridae			
JEV	Humains, bétails	SNC	Encéphalite, paralysie légère
TMEV	Souris	Neurone, microglie, oligodendrocyte	Encéphalomyélite
WNV	Humain		Encéphalite, paralysie légère
SLEV	Humain		Encéphalite, méningite
TBEV	Humain	SNC	Encéphalite, paralysie légère
Herpesviridae			

Virus	Hôte	Site d'infection	Pathologie
CMV	Humain, souris	Glandes salivaires, macrophage	Encéphalite, encéphalomyélite, SEP?
EBV	Humain	Cellules épithéliales, lymphocytes B	Encéphalite, méningite, SEP?
HSV-1	Humain	Neurone sensoriel	Méningite, SEP?, AD?
VZV	Humain	Neurone sensoriel	Méningite, encéphalite, SEP?
Orthomyxoviridae			
Virus influenza	Humain	Neurone, astrocyte	Encéphalomyélite, PD?, SEP?
Paramyxoviridae			
Virus de la rougeole	Humain	Neurone, astrocyte	Encéphalite, SEP?
Picornaviridae			
Coxsackievirus	Humain	Neurone, astrocyte	Méningite, encéphalite, SLA?, PD?
Poliovirus	Humain	Neurone moteur	Méningite, encéphalite, poliomyélite
Echovirus	Humain		Méningite
Enterovirus 71	Humain	Neurone	Méningite, encéphalite
Polyomaviridae			
Virus JC	Humain	Oligodendrocytes	Leucoencéphalopathie progressive multifocale
Rhabdoviridae			
Virus de la rage	Humain	Neurone	Encéphalomyélite, SEP?
Retroviridae			
HTLV-1	Humain	Lymphocytes T	Myélopathie, SEP?
VIH	Humain	Monocyte CD16+, microglie, astrocyte	Démence, AD?

AD : maladie d'Alzheimer; HCoV : Coronavirus humain; PD : maladie de Parkinson; SLA : Sclérose latérale amyotrophique; SLEV : Virus de l'encéphalite de St-Louis; SEP : Sclérose en plaques; TBEV : Tick-borne encephalitis virus

2. LES CORONAVIRUS

2.1 Généralité et taxonomie

Le terme *corona*, qui signifie couronne en latin, a été désigné pour nommer les coronavirus suite aux premières observations de ceux-ci par microscopie électronique. En effet, les coronavirus, par la présence de la protéine structurale S, retrouvée en grande quantité à la surface du virion, donne un aspect qui rappelle une couronne (Davies *et al.*, 1979). Les coronavirus sont des pathogènes ubiquitaires initialement identifiés comme étant des virus respiratoires et entériques pouvant infecter un large spectre d'hôtes, majoritairement les mammifères (rongeurs, porcs, chats, chiens) incluant l'humain mais également les oiseaux (Vabret *et al.*, 2009). Les premiers coronavirus humains (HCoV) qui ont été identifiés à la fin des années 60 sont les souches 229E et OC43 causant des infections relativement bénignes dont le rhume (Hamre *et al.*, 1966, McIntosh *et al.*, 1967). Ce n'est qu'en 2002 qu'un regain d'intérêt pour les coronavirus humains s'est manifesté, suite à l'émergence d'une nouvelle souche, le SARS-CoV. Cette souche, hautement contagieuse, est devenue pandémique et cause, entre autres, une détresse respiratoire importante. Cette pandémie a affecté principalement les pays asiatiques du sud-est (Chine, Hong Kong, Singapour, Taiwan) et l'Amérique du Nord (Canada, USA), et a été suivie par la découverte de deux autres souches circulantes chez l'humain, également majoritairement associés aux rhumes, soient les souches NL63 et HKU1. Environ 10 ans après l'apparition du SARS-CoV, un autre coronavirus, causant une pathologie respiratoire similaire moins contagieuse mais davantage sévère chez l'Homme, a émergé au Moyen-Orient et a été nommé *Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV). Le MERS-CoV serait potentiellement issu d'une transmission zoonotique du chameau, animal réservoir présentant des signes cliniques modérés, à l'homme suite à une adaptation du virus au niveau du récepteur viral à la surface des cellules (Reusken *et al.*, 2016).

Selon la classification de Baltimore, les coronavirus font partis de l'ordre des *Nidovirales*, de la famille des *Coronaviridae* (suivi de la sous-famille des *Coronavirinae*) et sont répartis à travers quatre genres soient les α -, β -, γ - et δ -coronavirus (Figure 4). Parmi les quatre souches endémiques chez l'humain, HCoV-229E et -NL63 se retrouvent dans le genre α -coronavirus alors que les deux autres souches HKU1 et OC43 sont situées dans le genre β -coronavirus. À l'intérieur du genre β -coronavirus, il existe quatre subdivisions identifiées par les lettres A, B, C et D (de Groot *et al.*, 2013). Les souches HKU1 et OC43 se retrouvent dans la sous-division A

alors que les souches émergentes SARS-CoV et MERS-CoV sont respectivement situées dans les subdivisions B et C.

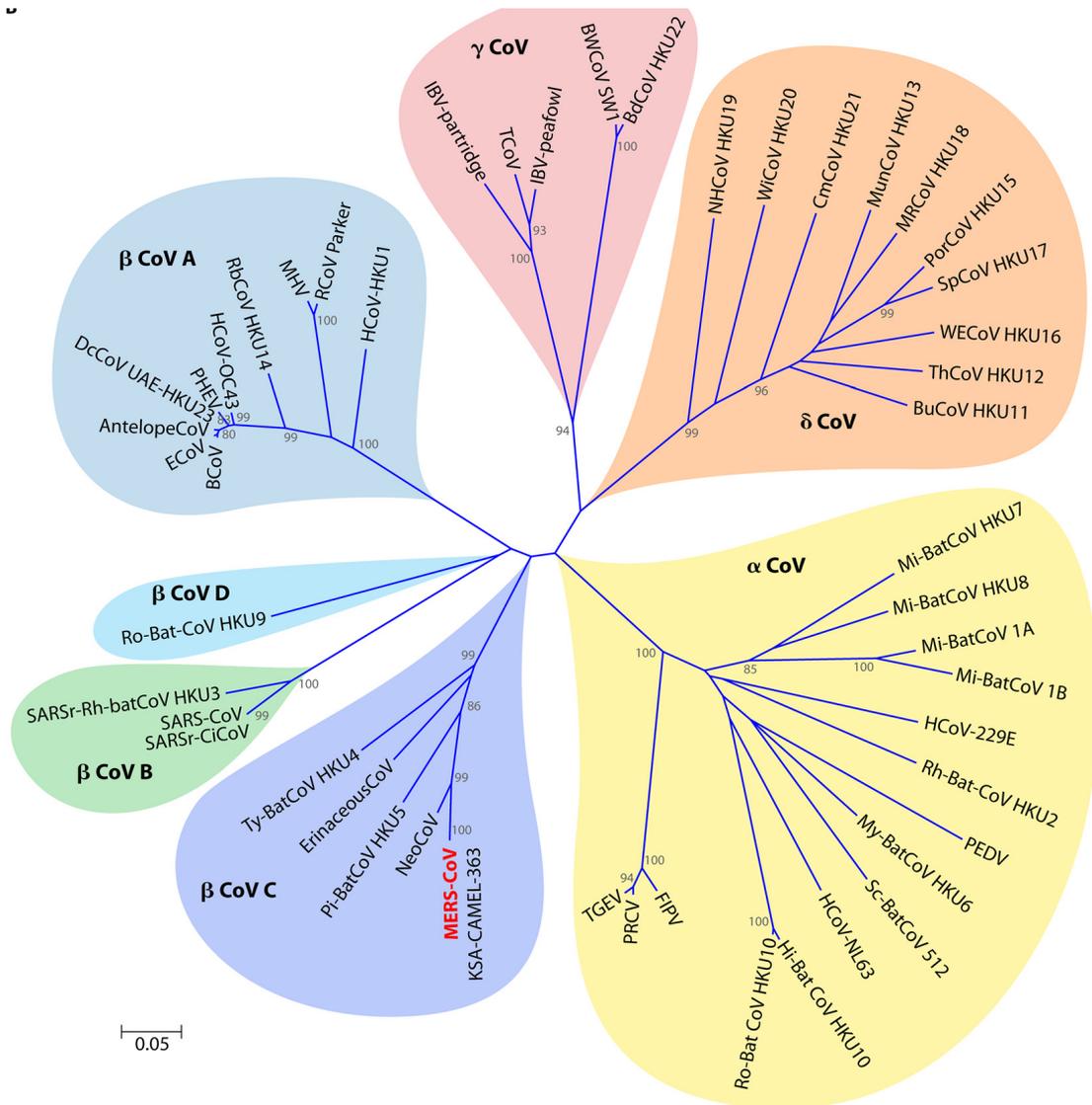


Figure 4. Arbre phylogénétique représentant la classification des coronavirus de l'ordre des *Nidovirales* en fonction de leurs genres (α , β , γ ou δ) et des groupes à l'intérieur du genre *beta* (A, B, C ou D). L'arbre et ses ramifications ont été construits à l'aide de la méthode *neighbor joining* qui tient compte des différences de vitesse d'évolution basées sur les séquences de l'ARN polymérase ARN dépendante. L'échelle correspond aux nombres estimés de substitution par 20 nucléotides. Tiré de Chan JF et al., *Clinical microbiology reviews*, 2015.

2.2. Structures et fonctions des protéines virales

2.2.1 Généralités

Les coronavirus sont des virus enveloppés d'environ 120 nm de diamètre englobant une capsidie hélicoïdale protégeant un génome d'ARN monocaténaire linéaire de polarité positive d'environ 27 000 à 32 000 bases, ce qui en fait les virus à ARN ayant le plus gros génome à ce jour. Le génome viral code des protéines non-structurales, responsables de la réplication du matériel génomique et de la synthèse des protéines virales alors que les gènes encodant les protéines structurales sont nécessaires à la formation des nouveaux virions. Le génome des coronavirus possède également des gènes codant des protéines accessoires qui ne sont ni impliquées dans la structure du virion, ni directement associées à la réplication virale. Ces protéines, qui varient en nombre selon l'espèce virale, influencent une grande variété de processus notamment la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, la production de cytokines ou le processus de pathogenèse (Cruz *et al.*, 2013, Dedeurwaerder *et al.*, 2014, D. X. Liu *et al.*, 2014a).

2.2.2 Protéines non-structurales

La portion du génome viral encodant les protéines non structurales (*nsp*) se retrouve dans le cadre de lecture 1ab (ORF1ab), qui occupe les deux tiers du génome. Cette portion regroupe tous les gènes viraux qui ne sont pas impliqués dans la structure du virion mais qui sont nécessaires à la synthèse de l'ARN viral. Suite à la transcription du génome par l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp) du virus, la traduction de l'ORF1ab débute par la synthèse de la polyprotéine pp1a (correspondant à l'ORF1a seulement) qui sera ensuite clivée pour donner les protéines nsp1 à nsp6 (Namy *et al.*, 2006). Dans environ 20 à 30% de la traduction de l'ORF1a, le ribosome poursuit son chemin et traduit le cadre de lecture en entier (ORF1ab), ce qui produit la polyprotéine pp1ab et donne les protéines nsp1-nsp16 après clivage protéolytique (Ziebuhr *et al.*, 2000). Ce phénomène, appelé *Programmed ribosomal frameshift*, est provoqué lorsque le ribosome glisse d'un nucléotide (+1 ou -1), modifiant ainsi le codon à traduire et du même coup le cadre de lecture. Parmi les protéines nsp, plusieurs possèderaient des rôles non reliés à la synthèse ou à la transcription de l'ARN viral. En effet, certaines évidences semblent indiquer que les protéines nsp sont impliquées dans le détournement de la

machinerie cellulaire (Lokugamage *et al.*, 2015, Narayanan *et al.*, 2015), la perturbation de la réponse immunitaire innée (Mielech *et al.*, 2014) ou le tropisme tissulaire (Roth-Cross *et al.*, 2009).

Tel que mentionné un peu plus haut, des protéines accessoires situées à l'extérieur de l'ORF1ab ont été identifiées chez la majorité des coronavirus et ayant des fonctions diverses qui affectent principalement la pathogenèse de ceux-ci. Parmi les alphacoronavirus, le ou les gènes codant ces protéines accessoires ont été répertoriés dans le génome des virus FIPV (Haijema *et al.*, 2004), TGEV (McGoldrick *et al.*, 1999), PRCoV (D. X. Liu *et al.*, 2014a) et HCoV-229E (D. X. Liu *et al.*, 2014a) et jouent un rôle associé à la virulence. Dans le cas du FIPV, la protéine 7a est aussi nécessaire à la réplication *in vitro* et participe comme antagoniste aux IFN de type I (Dedeurwaerder *et al.*, 2013). Chez les betacoronavirus, plusieurs protéines accessoires ont été identifiées et leurs fonctions varient d'antagoniste à la production d'IFN ou de l'activation des ISRE notamment pour le SARS-CoV et le MERS-CoV (D. X. Liu *et al.*, 2014a). Les génomes des virus BCoV, HCoV-OC43 et MHV codent également la protéine ns2 qui s'est avérée, à tout le moins pour le MHV et le MERS-CoV, être un inhibiteur de l'endonucléase cellulaire RNase L responsable de la dégradation d'ARN db étranger (Thornbrough *et al.*, 2016, L. Zhao *et al.*, 2012b).

2.2.3 Protéines structurales

Parmi les différentes protéines structurales (Figure 5), la protéine membranaire M est la plus abondante dans le virion. Cette glycoprotéine membranaire de type III, formée d'environ 218 à 263 acides aminés, est principalement impliquée dans le bourgeonnement et la formation des virions (Klumperman *et al.*, 1994, Mounir *et al.*, 1992). Cependant, la présence d'autres protéines structurales telles que la protéine N ou E faciliterait l'assemblage ou la stabilité de la particule virale (Y. L. Siu *et al.*, 2008). D'ailleurs, l'hypothèse la plus récente propose que la protéine M forme une matrice par interaction homotypique avec elle-même, entraînant la formation d'une structure en treillis qui permettrait ensuite aux protéines N et E de s'insérer et de compléter la formation du virion (de Haan *et al.*, 1998, de Haan *et al.*, 2000, Neuman *et al.*, 2006, Neuman *et al.*, 2011).

La protéine de la nucléocapside N est une phosphoprotéine qui s'associe à l'ARN viral lors de son encapsidation durant le processus de formation des nouveaux virions (Davies *et al.*,

1981, Davies *et al.*, 1979). Cette protéine chaperonne pour l'ARN joue également un rôle dans l'assemblage du virus (Escors *et al.*, 2001, Hurst *et al.*, 2005, Narayanan *et al.*, 2003), la réplication/transcription du génome viral (Baric *et al.*, 1988, Denison *et al.*, 1999, van der Meer *et al.*, 1999, Zuniga *et al.*, 2010), la traduction de l'ARNm viral (Tahara *et al.*, 1994) ainsi que d'antagonistes à l'interféron (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007, Ye *et al.*, 2007).

La protéine d'enveloppe E représente la plus petite protéine structurale chez les coronavirus, composée de seulement 76 à 109 acides aminés. Étrangement, cette protéine, qui est retrouvée en très faible quantité dans les virions (environ 20 copies par particule), semble avoir un rôle primordial dans la production de particules virales bien que l'importance relative de cette protéine est variable d'une espèce de coronavirus à une autre (Nieto-Torres *et al.*, 2015, Ortego *et al.*, 2002, Ye *et al.*, 2007). D'ailleurs, la protéine E se retrouve dans la membrane du *Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment* (ERGIC) et présente des caractéristiques similaires aux viroporines, protéines qui affectent la perméabilité cellulaire mais qui participent à certaines fonctions virales (Gonzalez *et al.*, 2003). En effet, la protéine E peut agir comme canal ionique et augmenter la virulence ou *le fitness* de l'infection tel qu'observé pour plusieurs coronavirus, notamment le SARS-CoV (Liao *et al.*, 2004, Liao *et al.*, 2006, Nieto-Torres *et al.*, 2014 (Jimenez-Guardeno *et al.*, 2014), le MERS-CoV (Surya *et al.*, 2015), le MHV (Madan *et al.*, 2005) et l'IBV (Ruch *et al.*, 2011). De plus, chez le SARS-CoV, la protéine E intervient également dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Nieto-Torres *et al.*, 2015), l'altération des jonctions serrées (Teoh *et al.*, 2010) et la régulation de la réponse au stress cellulaire (DeDiego *et al.*, 2011).

La protéine hémagglutinine-estérase HE est particulière, en ce sens qu'elle est seulement présente chez les coronavirus du sous-groupe 2A du genre β -coronavirus, dont HCoV-OC43, -HKU1, BCoV et MHV. Cette protéine transmembranaire de type I possède une fonction hémagglutinine, potentiellement impliquée dans l'interaction du virus avec son récepteur ayant les acides sialiques 4- ou 9-O-acétylé, mais également une fonction acétyl-estérase qui permet au virus de détruire sa liaison avec l'acide sialique lors de la relâche virale à la fin du cycle répliatif (de Groot, 2006) ou lors de l'entrée (Rottier, 1990). Ces deux fonctions seraient très importantes lors de l'infection ou lors de la relâche du virus de sa cellule hôte, du moins pour certaines espèces (Rottier, 1990). Pour les coronavirus humains HCoV-OC43 et -HKU1, la fonction acétyl-estérase de la protéine HE influence la virulence en augmentant la production de particules infectieuses ou en facilitant le relargage des nouveaux virions à la fin du

cycle de réplication (Desforges *et al.*, 2013a, X. Huang *et al.*, 2015b). Toutefois, chez le coronavirus murin (MHV-A59), cette protéine n'est pas exprimée due à une mutation dans la séquence régulatrice de transcription du gène (Luytjes *et al.*, 1988, Shieh *et al.*, 1989) alors que pour la souche JHM (MHV-JHM), HE augmente la dissémination virale au SNC et la neurovirulence (Kazi *et al.*, 2005).

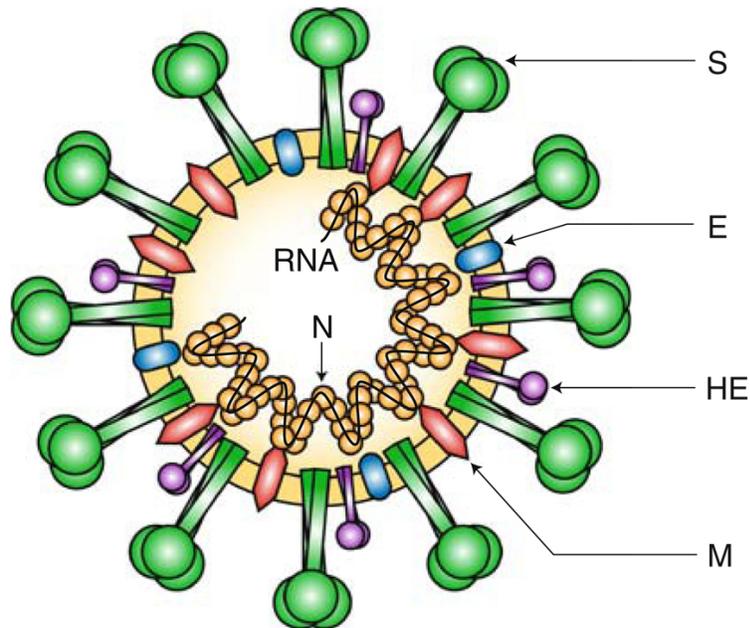


Figure 5. Représentation du virion des Coronaviridae. Le génome viral est représenté par la ligne, lequel est associé aux protéines de la nucléocapside (N), formant ainsi la capsid virale. Les protéines de structure de la membrane (M), de l'enveloppe (E), de la glycoprotéine de surface (S) ainsi que la protéine Hemagglutinin-Estérase (HE) sont associées à l'enveloppe lipidique. Tiré de Bender SJ et Weiss SR, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 2010.

2.3 Glycoprotéine S de spicule

2.3.1 Généralités

Étant donné l'importance de cette protéine, qui dépasse largement sa simple fonction structurale, la glycoprotéine S se doit d'avoir un sous-chapitre à elle seule, en plus d'être sans contredit la protéine virale la plus étudiée chez les coronavirus. Cette protéine

transmembranaire de type I possède plusieurs fonctions biologiques largement associées à la reconnaissance de la cellule hôte par le virus mais également reliées au tropisme tissulaire, à la virulence et à la propagation virale.

2.3.2 Structure

La glycoprotéine S est la protéine la plus abondante à la surface du virion et est retrouvée sous forme trimérique (Krueger *et al.*, 2001). Cette protéine d'environ 1300 acides aminés est hautement glycosylée et possède de 21 à 35 sites potentiels de N-glycosylation situés dans sa partie externe à l'enveloppe (Beniac *et al.*, 2006). Cette section de la protéine S est composée de deux domaines soit le domaine S1, distal par rapport à l'enveloppe, et le domaine S2 qui est rattaché à l'enveloppe lipidique du virion (de Haan *et al.*, 1999). Le domaine S1 est responsable de la liaison au récepteur cellulaire de l'hôte et est constitué d'une région de liaison au récepteur (*Receptor Binding Domain*, RBD) ainsi que d'une région hypervariable, possiblement responsable de l'évitement de la reconnaissance de cette protéine par les anticorps (Ujike *et al.*, 2015).

Le domaine S1 est séparé du domaine S2 par un site potentiel de clivage protéolytique cellulaire nommé S1/S2 (Belouzard *et al.*, 2012). Cependant, ce site n'est pas systématiquement retrouvé chez tous les coronavirus. En effet, seules les protéines S des souches coronavirales MHV-A59, MHV-JHM, MHV-3, BCoV, SRAS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-HKU1 et HCoV-OC43 sont clivées au site S1/S2 par différentes protéases cellulaires telles que la furine, les cathepsines ou les protéases sérines transmembranaires (*Transmembrane serine protease*, TMPRSS) (Belouzard *et al.*, 2010, Bertram *et al.*, 2013, Hasoksuz *et al.*, 2002, Le Coupanec *et al.*, 2015, Qian *et al.*, 2013, K. L. Siu *et al.*, 2014a, Walls *et al.*, 2016a). Un deuxième site théorique de clivage (nommé S2') a également été identifié à l'intérieur de la portion S2, en amont du peptide fusion, chez la majorité des coronavirus (Belouzard *et al.*, 2009, Millet *et al.*, 2015). Le clivage au niveau de ces sites peut avoir lieu lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte, lors de la biosynthèse de la protéine S ou lors de la sortie du virus. Le clivage de la protéine S est assuré par l'action de protéases cellulaires mais cette action est variable selon la souche coronavirale ou le type cellulaire infecté (Millet *et al.*, 2015). Concernant la protéine S de la souche de laboratoire (référence de l'ATCC) du virus HCoV-OC43 (rOC/ATCC), la protéine S ne semble pas être clivée efficacement au site S1/S2.

Toutefois, une mutation (G758R), située entre la portion S1 et S2 et retrouvée chez tous les HCoV-OC43 issus d'isolats cliniques humains provenant des voies respiratoires, a été identifiée comme étant un site de clivage fonctionnel qui mène au clivage de la protéine S. Cette mutation en position 758 remplace l'acide aminé glycine en arginine, prédisposant ce site à un probable clivage par la furine et par quelques autres proprotéines convertases (Le Coupanec *et al.*, 2015).

Le domaine S2 de la protéine S est responsable de l'entrée virale et de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et contient deux régions répétées (*Heptad Repeat 1* et 2, HR1 et HR2), une région transmembranaire (TM) et un segment de fusion peptidique (*Fusion peptide*, FP) probablement impliqué dans la fusion membranaire du virus à la cellule-hôte (Supekar *et al.*, 2004, Y. Xu *et al.*, 2004).

2.3.3 Fonctions

La principale fonction de la glycoprotéine S est de se lier au récepteur cellulaire, ce qui implique des changements conformationnels, la fusion de l'enveloppe du virion à la membrane plasmique et/ou une entrée virale par endocytose (Belouzard *et al.*, 2012, Heald-Sargent *et al.*, 2012). La portion S1 de la protéine S détermine également le tropisme cellulaire du virus et les différentes souches de coronavirus n'ont pas toutes le même récepteur cellulaire. En effet, parmi les α -coronavirus, la souche humaine HCoV-229E et la souche féline FCoV reconnaissent le récepteur *Aminopeptidase-N* (APN) alors que dans le même genre, la protéine S de la souche HCoV-NL63 s'associe avec le récepteur cellulaire *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2) (Pohlmann *et al.*, 2006, M. K. Smith *et al.*, 2006). L'APN est une métalloprotéase de type I exprimée dans une multitude d'organes et de cellules et qui est impliquée dans la régulation du système immunitaire, l'angiogenèse et la prolifération cellulaire (Luan *et al.*, 2007). Concernant ACE2, cette exopeptidase est principalement sécrétée par les cellules endothéliales vasculaires ou respiratoires et catalyse la conversion de l'angiotensine I ou II en angiotensine 1-7 ou 1-9 respectivement (Keidar *et al.*, 2007). La présence de la lectine DC-SIGN (CD209) peut également être utilisé par la protéine S du virus HCoV-NL63 pour augmenter l'infection de cellules susceptibles mais ACE2 demeure absolument nécessaire à l'infection (Hofmann *et al.*, 2006). Ces récepteurs sont également reconnus par la souche émergente SARS-CoV, un β -coronavirus, à la différence que la lectine DC-SIGN/CD209 peut agir comme récepteur alternatif à ACE2 (W. Li *et al.*, 2003). Parmi les β -coronavirus, le récepteur cellulaire des coronavirus

murins (MuCoV) est la glycoprotéine de surface *Carcinoembryonic cell adhesion molecule 1a* (CEACAM1a), qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines et qui possède un rôle d'adhésion (Hemmila *et al.*, 2004, R. K. Williams *et al.*, 1991) alors que la souche émergente MERS-CoV utilise la peptidase dipeptidyl 4 (DPP4), une glycoprotéine qui joue plusieurs rôles, notamment dans le métabolisme du glucose, l'adhésion cellulaire, etc. (Raj *et al.*, 2013). En ce qui concerne HCoV-OC43, aucun récepteur cellulaire spécifique n'a été identifié pour l'instant bien que les acides sialiques acétylés en position C9 sont impliqués dans la liaison du virus à la cellule cible (Schwegmann-Wessels *et al.*, 2006) et sont essentiels pour l'infection (M. Desforges, communication personnelle).

Suite à la liaison à son récepteur, la protéine S va subir des changements conformationnels lui permettant d'exposer un ou deux sites de clivage (S1/S2 et/ou S2') dépendamment de l'espèce virale ou du type cellulaire ciblé. L'hypothèse acceptée à ce jour est que le site S2' est préférentiellement clivé chez tous les coronavirus alors que le site de clivage S1/S2, subséquent au clivage de S2', est variable d'une espèce à une autre (Burkard *et al.*, 2014). Ces clivages auraient comme fonction de rapprocher et d'insérer le peptide de fusion dans la membrane cellulaire. Le repliement de la protéine S permettrait alors aux régions répétées (*Heptad Repeat*, HR) d'adopter une conformation finale pour entamer la fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte (Bosch *et al.*, 2003, Hulswit *et al.*, 2016, Walls *et al.*, 2016b). D'ailleurs, il a été suggéré que la souche murine MHV-JHM peut fusionner directement avec la membrane plasmique de la cellule hôte et mener à l'internalisation du virus même si ce dernier peut également infecter la cellule par endocytose (Nash *et al.*, 1997). Par contre, suite au repliement de la protéine S, la majorité des coronavirus sont en mesure d'entrer dans la cellule hôte par endocytose, tel que démontré pour les coronavirus HCoV-229E (Nomura *et al.*, 2004), SARS-CoV (Y. Inoue *et al.*, 2007), MHV (K. S. Choi *et al.*, 2005) and FCoV (Van Hamme *et al.*, 2008). Certaines études ont également démontré que le clivage en S1/S2 pourrait favoriser une propagation virale de cellules en cellules en formant des syncytiums mais ce mécanisme reste à être confirmé chez les coronavirus (de Haan *et al.*, 2004, Yamada *et al.*, 2009a). Étrangement, chez HCoV-OC43, le clivage en S1/S2 pourrait nuire à la dissémination du virus, à tout le moins dans le SNC, même si ce virus ne produit apparemment pas de syncytiums (Le Coupanec *et al.*, 2015).

2.3.4 Évolution et adaptation

Les coronavirus ont la particularité d'acquérir des mutations dans leur génome, ce qui leur permet de produire de nouveaux variants ou différents génotypes et d'accroître leur diversité génétique (Herrewegh *et al.*, 1998, Woo *et al.*, 2006a, Woo *et al.*, 2006b). Cette diversité est le résultat de trois caractéristiques particulières des coronavirus : (1) la très faible fidélité de la polymérase virale (RdRp) lors de la réplication virale, (2) la grande fréquence de recombinaison homologe, ainsi que (3) un génome dont la taille est la plus grande parmi tous les virus à ARN. Premièrement, la RdRp des coronavirus possède un taux d'erreur d'environ 1 nucléotide à tous les 1000 à 10 000 nucléotides répliqués, contribuant ainsi à induire énormément de mutations dans le génome viral (Duffy *et al.*, 2008, Jenkins *et al.*, 2002). Par contre, il a été démontré récemment que les coronavirus peuvent compter sur une exonucléase qui augmente la résistance à l'incorporation de mutations dans le génome viral, ce qui rend ces virus davantage fidèles comparativement aux autres virus à ARN (E. C. Smith *et al.*, 2013a, E. C. Smith *et al.*, 2013b). Ensuite, le processus de réplication de l'ARN, basé sur un patron copié-collé (voir section 1.5 portant sur la réplication des coronavirus), augmente les chances d'avoir de la recombinaison homologe au niveau des ARN (Lai, 1992, Pasternak *et al.*, 2006). Enfin, les coronavirus ayant un très gros génome (environ 27-32 kb), ceux-ci sont ainsi dotés d'une plasticité dans l'intégration, la modification et l'adaptation de leurs gènes (Forni *et al.*, 2016, Woo *et al.*, 2009).

La diversité génétique ne s'applique pas uniquement aux protéines structurales (Y. Zhang *et al.*, 2014) mais les mutations acquises au niveau de la protéine S peuvent influencer de façon assez importante la biologie du virus, notamment le tropisme cellulaire ou la virulence. Ainsi, chez le coronavirus porcin (*Porcine epidemic diarrhea virus*, PDEV), l'apparition de mutations dans la protéine S, après plusieurs passages en culture cellulaires, procure au virus une réplication virale plus efficace mais atténue sa virulence chez l'animal (T. Sato *et al.*, 2011). Il a également été démontré chez le coronavirus aviaire (*Infectious bronchitis virus*, IBV) que l'augmentation de la propagation virale par fusion cellule-cellule est issue de plusieurs substitutions en acides aminés dans sa région S1, ce qui permet au virus IBV d'élargir son tropisme cellulaire et de se propager plus facilement (Yamada *et al.*, 2009b). Chez le coronavirus murin (MHV), l'apparition de plusieurs mutations au sein de la région S2 est suffisante pour altérer la spécificité du type cellulaire ou l'affinité au récepteur du virus et permet d'établir une persistance virale (Baric *et al.*, 1999). Un autre exemple frappant de mutations

affectant le tropisme cellulaire d'un coronavirus concerne le coronavirus félin (FCoV). En effet, FCoV peut modifier son tropisme cellulaire, passant des cellules épithéliales du système gastro-intestinal aux macrophages, ce qui fait augmenter considérablement sa virulence (Licitra *et al.*, 2013). Ainsi, les mutations qui peuvent survenir dans la protéine S peuvent également affecter la virulence associée au virus. La présence d'une seule mutation dans la protéine S de la souche MHV-JHM contribue à augmenter de façon importante sa virulence dans le SNC, probablement en lien avec une augmentation de la réplication virale (Ontiveros *et al.*, 2003). Le coronavirus canin (CCoV) est également plus virulent suite à l'apparition de mutations dans sa glycoprotéine S (Licitra *et al.*, 2014).

Chez la souche HCoV-OC43, le principal intérêt de cette thèse, plusieurs mutations situées dans la glycoprotéine S ont été répertoriées suite à l'infection persistante de lignées neurales humaines représentatives du SNC (Figure 6). Parmi la multitude de mutations ponctuelles acquises au sein de la protéine S, quatre seulement se sont avérées prépondérantes et conservées à travers les passages cellulaires (St-Jean *et al.*, 2006b). Ces mutations (D24Y, S83T, H183R et Y241H) ont ensuite été introduites dans un clone moléculaire infectieux (pBAC) afin de mieux étudier leur(s) rôle(s) biologique(s) (St-Jean *et al.*, 2006a). Ainsi, en parallèle avec le virus de référence (rOC/ATCC) qui provoque une encéphalite en souris, une activation des processus inflammatoires ainsi que de la dégénérescence neuronale, le virus ayant les quatre mutations (rOC/U_{s24-241}) entraîne une aggravation de ses symptômes et accentue la mortalité des souris infectées (Jacomy *et al.*, 2006, Jacomy *et al.*, 2003). En plus des symptômes décrits ci-haut, le virus rOC/U_{s24-241} provoque également une paralysie des membres inférieurs, des lésions dans la moelle épinière, une infiltration plus importante de lymphocytes T ainsi qu'une production accrue de cytokines et de chimiokines au SNC, tout en causant une mortalité beaucoup plus importante des souris infectées, passant de 10% à 80-90% (Jacomy *et al.*, 2010). La dissémination accrue dans le SNC et la moelle épinière est fort probablement impliquée dans l'augmentation de la neurovirulence de ce virus mutant comparativement au virus de référence. D'ailleurs, le virus mutant rOC/U_{s241} (qui contient une seule mutation à l'acide aminé 241) et dont la réplication virale dans le SNC ou la moelle épinière est similaire au virus de référence entraîne aussi une paralysie des membres inférieurs impliquant l'excitotoxicité glutamatergique, sans toutefois provoquer une mortalité importante des souris, suggérant que cette mutation est davantage reliée aux dommages à la moelle épinière. D'un autre côté, le virus ayant les deux mutations H183R et Y241H, (rOC/U_{s183-241}) augmente la mortalité des souris infectées et accélère la réponse cellulaire associée aux

protéines mal repliées (*Unfolded protein response*, UPR) et augmente la mortalité cellulaire de cultures neuronales murines et humaines (Favreau *et al.*, 2009, Favreau *et al.*, 2012).

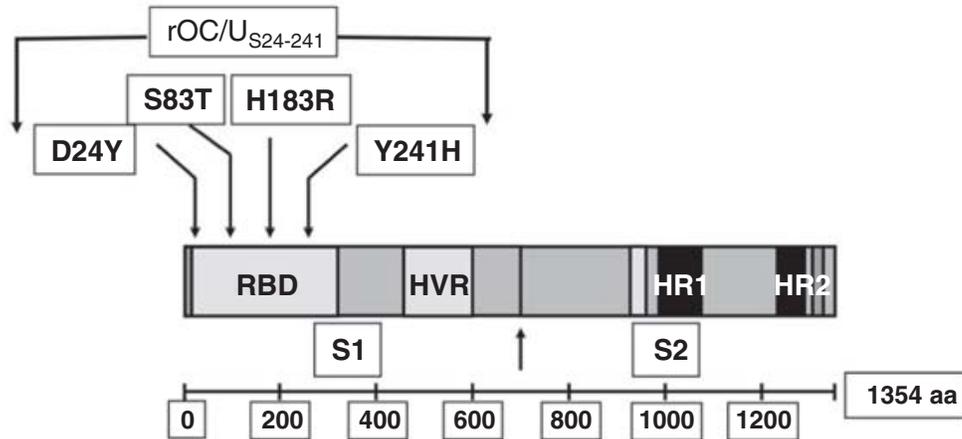


Figure 6. Représentation des domaines du virus HCoV-OC43 de la glycoprotéine S (S1 et S2) et localisation des mutations prédominantes acquises suite à l'infection persistante du virus sur des lignées neuronales humaines (D24Y, S83T, H183R et Y241H). Les quatre mutations ont tous été identifiées dans la région de liaison aux récepteurs. Ces quatre mutations ont été réintroduites dans un clone infectieux afin de générer un virus recombinant. La flèche représente le site putatif du clivage de la protéine S. Abréviations : RBD, Région de liaison aux récepteurs; HVR, Région hypervariable; HR1-2, Région Heptad 1-2. Tiré de Jacomy H *et al.*, *Journal of Neurovirology*, 2010.

2.4 Le cycle répliatif

Les coronavirus possèdent un cycle répliatif particulier ayant donné le nom à l'ordre des *Nidovirales*. En effet, *Nido* veut dire nid en latin, ce qui est directement relié à la façon dont le génome est traduit par la production d'une multitude d'ARNm sous-génomiques (Figure 7). Ainsi, suite à l'entrée du coronavirus à l'intérieur de la cellule-hôte et de la décapsidation du virus infectieux, l'ARN viral, est relâché dans le cytosol. Dans un premier temps, comme l'ARN des coronavirus est de polarité positive et possède une extrémité méthylée (coiffe) en 5', les cadres de lecture ORF1a et ORF1ab sont immédiatement traduits, produisant les polyprotéines pp1a et pp1ab. Cependant, la synthèse de la polyprotéine pp1ab requiert un décalage dans le cadre de lecture par le ribosome (*Ribosomal frame shifting*). Ce changement dans le cadre de lecture permet la continuation de la traduction de l'ARNm (Namy *et al.*, 2006). Ces polyprotéines (pp1a et pp1ab) sont alors clivées par deux protéases virales soit *papain-like protease* (PL^{Pro}) ou *protease 3C-like* (3CL^{Pro}) et génèrent environ 16 protéines non-structurales nécessaires pour la suite de la répliation et de la traduction des gènes viraux (Sawicki *et al.*, 2007). En présence de

la protéine de structure N et de l'hélicase, la RdRp formera le complexe RTC responsable de générer un brin d'ARN à polarité négative qui servira de patron pour la réplication du génome des nouveaux virions (Zuniga *et al.*, 2010). Le complexe RTC va également copier le génome de façon discontinue ce qui produira plusieurs ARN de polarité négative de différentes longueurs ayant des séquences régulatrices en 3' (*transcription-regulating sequences*, TRS). Ces ARN seront ensuite retranscrits par les complexes RTC pour former des brins d'ARN sous-génomiques (ARNsg) de polarité positive, nécessaires à la synthèse des protéines structurales. Les motifs TRS seront reconnus ou non par les complexes RTC, ce qui entrainera l'arrêt ou la continuation de la transcription des ARNsg (Enjuanes *et al.*, 2006). Les protéines virales ainsi traduites seront alors acheminées dans la lumière de vésicules à double-membranes (*double-membrane vesicles*, DMV) pour l'assemblage des nouveaux virions. La formation de ces DMV ferait intervenir une partie de la machinerie cellulaire associée à l'autophagie (Maier *et al.*, 2012) et aurait comme origine les membranes issues des endosomes (van der Meer *et al.*, 1999) ou du réticulum endoplasmique (Knoops *et al.*, 2010). L'utilisation d'un tel environnement pour la synthèse des virions permet au virus d'entamer les procédures de production de nouvelles particules infectieuses dans un microenvironnement protégé contre les systèmes de défense de la cellule, par exemple les IFN ou les enzymes qui détectent l'ARN étranger (Gosert *et al.*, 2002). Par la suite, les nouveaux virions fraîchement assemblés seront éventuellement relâchés de la cellule-hôte par exocytose à partir du Golgi en acquérant leur enveloppe lipidique (de Haan *et al.*, 1999).

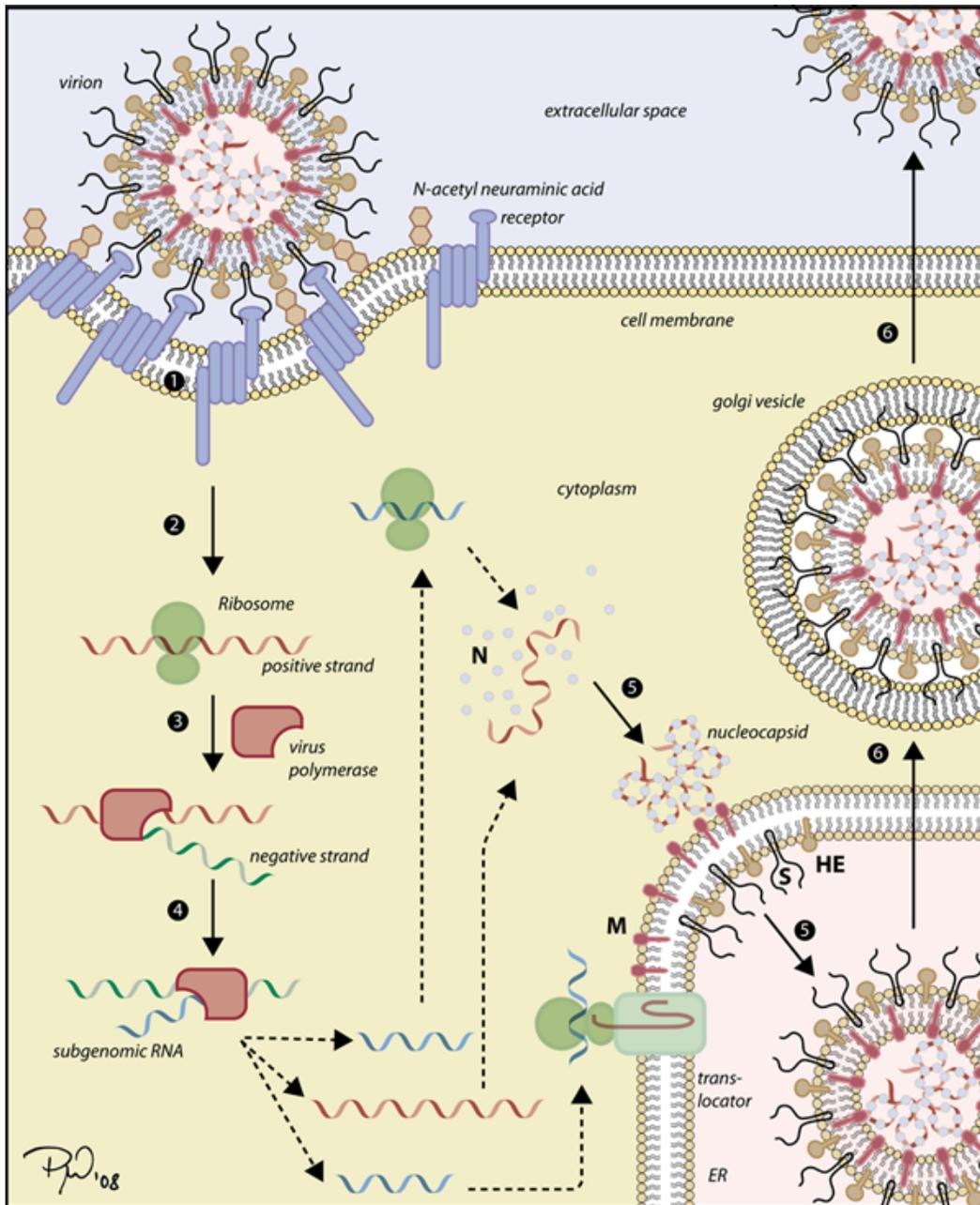


Figure 7. Cycle répliatif des Coronaviridae. 1. Le virion, via la glycoprotéine S, se lie à son récepteur situé à la surface de la membrane cellulaire de la cellule hôte. Dépendamment du virus, la protéine HE est également impliquée dans cette interaction. 2. L'entrée virale s'effectue fort probablement par endocytose du virion dans la cellule. 3. L'ARN de polarité positive permet au virus de traduire directement ses protéines dans le cytosol sans passer par une étape de répliation de l'ARN de polarité négative à positive. Le virus commence par exprimer son ARN polymérase qui produira les ARN viraux de l'ORF1ab. Ensuite, l'ARN polymérase utilise le brin d'ARN positif pour générer un brin d'ARN négatif. 4. L'ARN à polarité négative servira de patron pour la transcription des ARN sous-génomiques qui seront utilisés pour la synthèse des protéines virales structurales et la répliation de nouveaux ARN positif. 5. La protéine N s'associe au brin d'ARN positif et les protéines structurales M, S et HE sont incorporées dans la membrane du RE. La nucléocapside entre finalement dans la lumière du RE et est intégrée dans la membrane lipidique. 6. Les nouveaux virions sont transportés jusqu'à la membrane cytoplasmique par les vésicules du golgi où ceux-ci sortent par exocytose. Tiré de Lai MM, Cavanagh D, *Adv Virus Res.*, 1997.

2.5 Pathologies et réponses immunitaires associées aux infections coronavirales

2.5.1 Coronavirus murin

Les coronavirus murins (MuCoV) regroupent une grande variété de souches qui possèdent des tropismes différents, influençant par le fait même la pathogénèse et la réponse immunitaire subséquente. Les différentes souches de MuCoV ont été divisées en deux sous-groupes à savoir ceux regroupant les virus uniquement entérotropes et ceux ayant un tropisme plus large. Ainsi, la sous-division des souches entérotropes regroupent les virus MHV-D, -Y, RI-S, LIVIM et DVIM et produisent des infections qui sont confinées au niveau du système gastro-intestinal (Homberger *et al.*, 1998). Chez les souris adultes immunocompétentes, la présence de MHV entérique se limite au niveau du petit intestin, du colon et du caecum et l'infection reste relativement bénigne (Barthold *et al.*, 1993). Chez les souris immunosupprimées ou nouveau-nées, les virus MHV peuvent entraîner des entérites sévères et même la mort des souris infectées (Barthold *et al.*, 1993, Compton *et al.*, 2003). En effet, la réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes B est responsable de l'élimination du virus de la muqueuse intestinale alors que les lymphocytes T seraient nécessaires pour prévenir la propagation du virus de l'intestin et des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (*Gut-associated lymphoid tissues*, GALT) vers d'autres organes (Compton *et al.*, 2004a, Compton *et al.*, 2004b).

Le deuxième sous-groupe de souches murines contient les souches MHV-1, -2, -3, -JHM et -A59 dont le tropisme est plus large et qui sont capables d'infecter autant les voies respiratoires que le foie ou le SNC. Bien que ces souches soient principalement entérotropes et neurotropes, elles entrent généralement dans l'organisme via les voies respiratoires (Carthew *et al.*, 1981). Dans la majorité des cas, le virus infecte d'abord la muqueuse nasale avant de se disséminer ailleurs dans les voies respiratoires causant une pneumonie mais peut également infecter d'autre organe comme le foie. Les cytokines IFN- γ , TNF α et la chimiokine (MCP-1/CCL-2) sont généralement sécrétées afin de contrer l'infection.

Les souches MHV ont été initialement identifiées comme étant des pathogènes infectant le foie et causant des hépatites de sévérité variable. L'évolution de la maladie varie selon la souche virale ou le génotype de la souris. Alors que la souche MHV-2 cause une hépatite sévère, la souche MHV-A59 induit une pathologie entérique modérée, caractérisée par une

nécrose hépatique qui peut également mener à la destruction des organes lymphoïdes et de la rate (T. Hirano *et al.*, 1965, Lamontagne *et al.*, 1989). La dissémination virale subséquente peut aussi provoquer l'infection d'autres organes tels que la rate, le cœur, les muscles, les tissus lymphoïdes et le cerveau. La souche MHV-3 infecte principalement les macrophages, provoquant la mort de ceux-ci par apoptose, ce qui pourrait contribuer à la pathologie hépatique (Belyavsky *et al.*, 1998). La production de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ et d'IL-1 de même que la reconnaissance d'épitopes viraux (protéines N et S) par les lymphocytes T CD4^+ serait impliquée dans la réponse immunitaire établie par l'hôte (Chung *et al.*, 1994, Pope *et al.*, 1995).

Le tropisme neurologique des souches MHV, notamment MHV-JHM et MHV-A59, a été particulièrement étudié puisque celles-ci ont été associées à l'apparition d'encéphalites chez des souris infectées et reliées à des pathologies démyélinisantes au SNC, ce qui en fait un modèle d'étude pour la sclérose en plaques (Marten *et al.*, 2001). La première souche MHV neurotrope (MHV-JHM) fut isolée en 1949 chez des souris paralysées qui démontraient des symptômes d'encéphalomyélite avec une destruction importante de la myéline (Bailey *et al.*, 1949, Cheever *et al.*, 1949). Ces résultats ont également été observés chez le rat (Wege *et al.*, 1998). Cette neurovirulence accrue de la souche MHV-JHM pourrait être attribuée à la capacité de la protéine S virale d'augmenter l'efficacité du virus à se disséminer à travers le SNC et à infecter un grand nombre de neurones (Gallagher *et al.*, 1992, Ontiveros *et al.*, 2003). Comparativement à la souche JHM, la souche MHV-A59 est beaucoup moins neurovirulente et létale chez la souris alors que 1000 fois plus de virus sont nécessaires pour causer le même taux de mortalité (Lavi *et al.*, 1984). Puisque la souche MHV-A59 cause moins de mortalité chez les souris infectées, celles-ci survivent plus longtemps et présentent davantage de symptômes cliniques en lien avec la démyélinisation, notamment au niveau de la paralysie des membres. Il est donc plus facile d'étudier ces effets démyélinisants issus de l'infection à l'aide de souris infectées par MHV-A59 que par MHV-JHM. Dans tous les cas, MHV infecte plusieurs types cellulaires du SNC, principalement les astrocytes, oligodendrocytes, microglies et dans une moindre mesure les neurones. Le virus se rend également à la moelle épinière, causant la mort de la majorité des souris infectées (Marten *et al.*, 2001). D'ailleurs, le niveau important de particules infectieuses produites et la dissémination des virus à la moelle épinière sont deux éléments primordiaux dans le phénomène de démyélinisation observé (Marten *et al.*, 2000). L'infection aiguë par MHV conduit assez rapidement à une réponse immunitaire innée par la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires ou antivirales comme l'IFN de type I ($\text{IFN-}\alpha$, β), $\text{IL1-}\alpha$, $\text{IL1-}\beta$, IL-6, IL-12 et $\text{TNF}\alpha$ ainsi que des chimiokines (Iacono *et al.*, 2006, Pearce *et al.*, 1994, Rempel *et al.*,

2004). Les macrophages et les cellules *Natural Killer* (NK) sont également recrutés au SNC pour éliminer les cellules infectées (Templeton *et al.*, 2008, Zuo *et al.*, 2006). Bien que le rôle des neutrophiles soit mineur dans l'élimination du virus, ceux-ci facilitent l'accès des leucocytes au SNC en sécrétant des MMP, ce qui dégrade la BHE. L'élimination subséquente du virus requiert l'activation des lymphocytes T CD8+ qui, aidés par les lymphocytes T CD4+, produisent des granzymes et perforines afin d'éliminer les astrocytes et les oligodendrocytes infectés (Bergmann *et al.*, 2001, M. T. Lin *et al.*, 1997, Sussman *et al.*, 1989). L'ARN viral peut tout de même persister au niveau du SNC même si aucune particule virale n'est détectée. Différents mécanismes pourraient expliquer la persistance virale telle l'apparition de quasi-espèces qui permet au virus d'éviter d'être reconnu par le système immunitaire ou l'épuisement des cellules T CD8+ qui réduit la pression exercée sur le virus. Les souris ayant survécu à l'infection aiguë développent généralement une pathologie chronique démyélinisante et il s'avère qu'au niveau de la moelle épinière, la perte de myéline est associée à la présence continue de cellules immunitaires pro-inflammatoires et d'antigènes viraux (Stohlman *et al.*, 2001). De plus, bien que l'infection des oligodendrocytes par le MHV mène à la mort de ceux-ci par apoptose ou nécrose et que des marqueurs apoptotiques ont été détectés parmi des oligodendrocytes localisés dans des lésions de patients atteints de sclérose en plaques, il semble que la mort des oligodendrocytes participe faiblement à la condition démyélinisante (M. H. Barnett *et al.*, 2004, Matute *et al.*, 2005). La réponse antivirale médiée par les cellules T CD8+, l'accumulation de dommages et la présence de lésions provoquées par les macrophages/microglies semblent plutôt représenter des causes plus probables de démyélinisation liée à cette neuropathogénèse (Hosking *et al.*, 2010, Lampert *et al.*, 1973, G. F. Wu *et al.*, 1999).

2.5.2 Coronavirus félin

Les infections causées par le coronavirus félin (FCoV) sont endémiques parmi la population de chats et restent généralement asymptomatiques bien que certains cas provoquent des problèmes entériques assez bénins. Néanmoins, dans environ 5% des cas, l'apparition de mutations dans la glycoprotéine S provoque l'émergence d'une nouvelle souche, le FIPV, extrêmement virulente ayant un taux de mortalité avoisinant les 100% chez les félins infectés (Kipar *et al.*, 2014). L'intestin est reconnu pour être le site de persistance virale mais les monocytes/macrophages sont également susceptibles d'être infectés (Kipar *et al.*, 2010). L'infection de ces cellules permet au virus de se disséminer à travers l'organisme et de provoquer de l'inflammation, causant des dommages aux vaisseaux sanguins (vasculite), la

perte de fonctions de plusieurs organes et éventuellement la mort. L'utilisation des monocytes/macrophages par le FIPV pour se disséminer à travers l'organisme provoque également la neuroinvasion dans environ un cas sur trois (Foley *et al.*, 1998). La présence du virus au SNC engendre également de l'inflammation à ce site par le recrutement de leucocytes et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Foley *et al.*, 2003), contribuant ainsi à l'apparition de pathologies neurologiques telles que la méningite ou des atteintes à la moelle épinière (Legendre *et al.*, 1975, Slauson *et al.*, 1972).

2.5.3 Coronavirus porcine

Les porcs sont également susceptibles à un coronavirus, le *Porcine hemagglutinating encephalitis virus* (PHEV), qui cause des gastroentérites mais également des encéphalomyélites, principalement chez les porcelets (Jung *et al.*, 2016). Bien que le virus ait été retrouvé dans le cerveau de porcelets démontrant des signes d'encéphalomyélites, la présence de ce dernier n'induit pas d'inflammation de façon très importante à travers le SNC et les cellules infectées ne subissent pas d'effets pathologiques importants (N. Hirano *et al.*, 2004).

2.5.4 Coronavirus bovin

Les bovins n'échappent pas à l'infection par les coronavirus puisque le coronavirus bovin, BCoV, cause trois pathologies distinctes soient la diarrhée chez le veau, la dysenterie hivernale avec hémorragie chez l'adulte ainsi qu'une infection respiratoire parmi les bovins à tous âges. Ce virus infecte le système gastro-intestinal et les voies respiratoires supérieures et inférieures (Saif, 2010). La différence de tropisme observée entre les pathologies n'est pas totalement élucidée et reste controversée mais il semble que la présence de mutations dans la glycoprotéine S de BCoV influence la capacité du virus à infecter les voies respiratoires ou gastro-entériques (Yoo *et al.*, 2001).

2.5.5 Coronavirus humains et souches coronavirales émergentes

Tous les coronavirus humains (HCoV), c'est-à-dire les souches HCoV-OC43, -229E, -NL63 et -HKU1, ont été initialement et principalement reconnus comme des pathogènes

respiratoires dont la transmission se fait essentiellement par contact aérosol. Les infections par HCoV s'amorcent par la présence de gouttelettes de sécrétions oropharyngées infectées qui atteignent les muqueuses nasales. Les primo-infections surviennent généralement en bas âge et les réinfections sont fréquentes tout au long de la vie. Pour une personne adulte et ayant un système immunitaire compétent, l'infection par HCoV se limite aux voies respiratoires supérieures, délimitées par les cavités nasales, le larynx et le pharynx (Vabret *et al.*, 2009). Toutefois, ces virus peuvent également atteindre les voies respiratoires inférieures soit la trachée, les bronches et les poumons et provoquer des pathologies plus sévères telles que des pneumonies, des bronchites, des bronchiolites ou l'exacerbation de l'asthme. Il est à noter que de telles complications sont davantage observées chez les personnes âgées, les nouveau-nés ainsi que chez les personnes immunodéprimées (Gagneur *et al.*, 2002, Gerna *et al.*, 2006, Johnston *et al.*, 1995, Woo *et al.*, 2005). Les souches -OC43 et -229E ont également été associées à l'apparition de myocardites et méningites (Riski *et al.*, 1980) et de diarrhées sévères (Gerna *et al.*, 1985). Bien que le tropisme d'organe des HCoV soit principalement respiratoire, le tropisme cellulaire entre les différentes souches de HCoV est méconnu et assez complexe, tel qu'illustré par les différents récepteurs cellulaires utilisés (voir Chapitre I, section 2.3.3.). Quelques études sur la souche HCoV-229E ont tout de même révélé que cette souche ne polarise pas systématiquement son infection sur les cellules épithéliales des voies respiratoires en relâchant les nouveaux virions autant du côté apical (vers la lumière des voies respiratoires), évitant probablement ainsi l'exposition au système immunitaire (G. Wang *et al.*, 2000), que basolatéral, donnant ainsi la capacité d'infecter d'autres types cellulaires (Dijkman *et al.*, 2013). HCoV-229E possède également la capacité d'infecter autant des cultures primaires que des lignées immortalisées de monocytes/macrophages ainsi que les cellules dendritiques murines qui expriment l'APN (Desforges *et al.*, 2007, Mesel-Lemoine *et al.*, 2012, Wentworth *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent que HCoV-229E pourrait se disséminer ailleurs dans l'organisme et être associé à d'autres pathologies.

L'émergence récente de deux nouvelles souches de coronavirus pouvant infecter l'humain, le SARS-CoV et le MERS-CoV, a bouleversé la présomption que les coronavirus ne causaient que des infections bénignes. Ces deux coronavirus auraient traversé le réservoir zoonotique dans lequel ils résidaient, à savoir la chauve-souris dans le cas du SARS-CoV (Guan *et al.*, 2003, W. Li *et al.*, 2005) et le chameau dans le cas du MERS-CoV (Reusken *et al.*, 2016), pour infecter l'être humain. D'ailleurs, comme leur nom l'indique, ces deux virus causent des infections sévères au niveau des voies respiratoires inférieures. Toutefois, la facilité à se

transmettre d'un hôte à un autre par aérosol et le taux de mortalité diffèrent grandement entre ces deux virus. En effet, le SARS-CoV s'est avéré plus contagieux que le MERS-CoV mais moins virulent, puisqu'environ 10 % des personnes infectées par le SARS-CoV sont décédées (Peiris *et al.*, 2004) comparativement à environ 35% des patients atteints du MERS-CoV (J. Zhou *et al.*, 2015). Le virus SARS-CoV infecte principalement les pneumocytes de type I, cellules responsables des échanges gazeux (Haagmans *et al.*, 2004). Cependant, le virus ne semble pas se restreindre au niveau des poumons puisque celui-ci a également été retrouvé dans le tractus gastro-intestinal, le foie, les reins et le cerveau (Gu *et al.*, 2005). Chez les individus infectés par le SARS-CoV, la maladie se traduit par une pneumonie atypique, des dommages importants aux alvéoles, de l'oedème pulmonaire, de l'inflammation au poumon, une perte de fonction de plusieurs organes, des complications thromboemboliques et la pathologie peut progresser pour devenir un syndrome de détresse respiratoire aiguë (Graham *et al.*, 2013, Kong *et al.*, 2009). Or, la sévérité de la pathologie réside en partie dans la dérégulation de la réponse immunitaire subséquente à l'infection. En effet, les niveaux de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1) et de chimiokines (CXCL-1, -2, CCL3 et 5) sont rapidement augmentés, entraînant une inflammation systémique au niveau des poumons, inflammation qui s'avère dommageable pour l'organisme, une immunopathologie par « tempête de cytokines (J. Chen *et al.*, 2010, L. He *et al.*, 2006, Kong *et al.*, 2009). Environ 48h après l'infection, la réponse cellulaire antivirale liée à l'interféron est littéralement ciblée par le virus pour en prévenir l'activation. En effet, plusieurs protéines virales ont été identifiées comme étant en mesure d'inhiber l'activation des ISGs (Yoshikawa *et al.*, 2010). La protéine nsp1 du SARS-CoV est capable d'inhiber l'IFN de type I de trois façons différentes : en inactivant la machinerie traductionnelle de l'hôte, en dégradant l'ARNm de l'hôte et en inhibant la phosphorylation et donc l'activation du *Signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1), un facteur de transcription impliqué dans l'expression des ISGs (C. Huang *et al.*, 2011b, Wathelet *et al.*, 2007). De plus, la protéase virale *papain-like* (PLP), également appelée nsp3, bloque la phosphorylation et la translocation nucléaire de l'*Interferon regulatory factor 3* (IRF3) ainsi que la réponse liée au facteur de transcription NF- κ B (Devaraj *et al.*, 2007, Frieman *et al.*, 2009). Les protéines ORF3b et ORF6 seraient également en mesure de bloquer la voie liée à l'IFN en inhibant la voie NF- κ B et la voie JAK-STAT respectivement (Frieman *et al.*, 2007, Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007). Les protéines structurales N et E du SARS-CoV ont également la capacité d'interférer dans la réponse immunitaire innée en inhibant la voie de l'IFN et en activant l'inflammasome NLRP3 (Nieto-Torres *et al.*, 2015, Totura *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que le virus SARS-CoV retarde aussi délibérément la réponse à l'IFN pour augmenter

la présence de monocytes/macrophages dans les poumons, ce qui entraîne une augmentation des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, une perméabilisation vasculaire accrue et un dysfonctionnement dans la réponse des cellules T spécifiques au virus (Channappanavar *et al.*, 2016). Ainsi, le virus tente de répondre rapidement à la réponse immunitaire innée à l'aide de ses diverses protéines pour contrer toutes mesures destinées à l'éliminer. D'ailleurs, la réponse immunitaire adaptative, liée à l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+, s'avère essentielle pour éliminer les cellules infectées et fournir une protection significative contre les complications respiratoires issues de l'infection. C'est probablement la raison pour laquelle le virus SARS-CoV s'est également adapté pour diminuer le nombre de cellules T CD4+ et CD8+ (T. Li *et al.*, 2004a) et pour retarder l'activation de celles-ci (Cameron *et al.*, 2008). Même si les mécanismes sous-jacents la diminution de la réponse des cellules T CD4+ et CD8+ ne sont pas connus, l'hypothèse la plus probable serait une interférence du virus sur les CPA et une activation de l'apoptose sur ces cellules T. Évidemment, l'âge de l'hôte influence aussi le retard dans l'activation du système immunitaire imposé par le virus (K. D. Kim *et al.*, 2007).

Le virus MERS-CoV infecte également les pneumocytes mais de type II; les cellules responsables de la production de surfactant au niveau des poumons (Haagmans *et al.*, 2004). À l'instar du SARS-CoV, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques sont susceptibles au MERS-CoV mais non permissive à sa réplication (Tynell *et al.*, 2016, J. Zhou *et al.*, 2014a). De plus, les cellules épithéliales bronchiales non-ciliées, alvéolaires et des vaisseaux pulmonaires sont susceptibles à l'infection (R. W. Chan *et al.*, 2013). Cette capacité à infecter divers types cellulaires représente sans aucun doute une façon pour le virus de se disséminer ailleurs dans l'organisme. Ainsi, même si aucune particule virale n'a été détectée ailleurs que dans les poumons, l'ARN viral a été retrouvé libre dans le sang, l'urine et les fèces de patients atteints du MERS-CoV. De plus, en laboratoire, l'ARN viral a été détecté dans le cerveau de souris transgéniques exprimant le récepteur humain du virus, le facteur DDP4 (Agrawal *et al.*, 2015, Corman *et al.*, 2016). L'infection par le MERS-CoV cause une pathologie similaire à celle du SARS-CoV en provoquant également une pneumonie atypique et un syndrome de détresse respiratoire aiguë. De même, la réplication du MERS-CoV induit une forte expression de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, notamment IL-8, IL-12, RANTES et MCP-1 (Chu *et al.*, 2014, J. Zhou *et al.*, 2014a). Toutefois, les symptômes peuvent s'aggraver et conduire notamment à de l'insuffisance rénale (Graham *et al.*, 2013), ce qui n'est pas le cas lors d'une infection par le SARS-CoV, même si ce dernier peut infecter les cellules épithéliales du tube rénal (Gu *et al.*, 2005). Plusieurs groupes de recherche se sont donc penchés sur

l'apparente similarité des pathologies entre ces deux virus en cherchant la cause de la différence de sévérité durant l'infection. Ainsi, bien que les deux virus soient en mesure de retarder ou d'inhiber l'activation de la voie de l'IFN chez la cellule-hôte, le virus du MERS-CoV semble avoir adopté une stratégie unique ciblant le réarrangement structural de la chromatine condensée, ce qui empêche la transcription de plusieurs ISGs (Menachery *et al.*, 2014). Ensuite, l'infection par le MERS-CoV induit une diminution d'expression des gènes impliqués dans le processus de présentations d'antigènes, phénomène totalement inverse chez le SARS-CoV (Josset *et al.*, 2013). En effet, l'expression du gène *C/ITA*, un facteur de transactivation des CMH de type II, est fortement diminuée tout comme d'autres gènes liés à la régulation de ces CMH lors de l'infection par le MERS-CoV. Suite à des expérimentations effectuées sur des cultures de cellules des voies respiratoires infectées, on a observé une diminution de l'expression des gènes PSMB8 et 9, deux gènes impliqués dans la formation de l'immunoprotéasome (Josset *et al.*, 2013). Enfin, le MERS-CoV est également en mesure d'infecter et de provoquer la mort cellulaire des lymphocytes T, évitant ainsi une réponse immunitaire adaptative efficace (Chu *et al.*, 2016). Ces modulations des réponses cellulaires et immunitaires par le MERS-CoV empêchent l'organisme d'initier une réponse immunitaire appropriée contre l'infection et participe sans aucun doute à augmenter la sévérité de la maladie.

2.5.6 HCoV-OC43

Bien que la souche OC43 soit un virus respiratoire et un des agents causaux du rhume, c'est avant tout sa capacité à atteindre le SNC (propriétés neuroinvasives), à se répliquer et se disséminer parmi les neurones du SNC (propriétés neurotropes) et à causer des pathologies neurologiques en souris (propriétés neurovirulentes) qui ont attiré l'intérêt du laboratoire pour ce pathogène.

Plusieurs éléments ont démontré que le virus HCoV-OC43 possède bien des propriétés neuroinvasives, c'est-à-dire la capacité d'envahir le SNC à partir de la périphérie. D'une part, lorsque le virus est administré par injection intranasale chez des souris, le virus infectieux ou l'ARN viral est détecté aussi tôt que 3 jours post-infection dans plusieurs zones du cerveau dont le bulbe olfactif, l'hippocampe et le neo-cortex, dépendamment du variant utilisé (Desforges *et al.*, 2013b, Jacomy *et al.*, 2003, Le Coupanec *et al.*, 2015). L'ARN viral a également été détecté

dans le SNC de souris jusqu'à 1 an après infection, démontrant que HCoV-OC43 peut aussi persister au SNC (Jacomy *et al.*, 2006). Or, même si aucune particule virale n'a été détectée dans le cerveau de patients atteints de maladies neurologiques, incluant l'Alzheimer, le Parkinson ou la sclérose en plaques, ni chez les patients ne présentant pas de maladies neurologiques, l'ARN viral a été détecté dans une proportion significative de divers cerveaux humains, ce qui confirme la neuroinvasion naturelle de HCoV-OC43 chez l'humain et suggère la possibilité de persistance virale au SNC (Arbour *et al.*, 2000). Jusqu'à aujourd'hui, deux hypothèses sont proposées pour expliquer comment le virus peut atteindre le SNC à partir de la périphérie; soit par la route hématogène, soit par les différents nerfs qui innervent les muqueuses buccales et respiratoires. De plus, il n'est pas exclu que le virus puisse prendre les deux voies. Dans le premier cas, l'infection du SNC implique la présence du virus dans le sang, sous forme libre ou associé aux leucocytes, d'où il peut infecter les cellules endothéliales qui composent la BHE ou les leucocytes circulants, ce qui constituerait un premier réservoir pour l'amplification du virus et le passage au SNC. Or, HCoV-OC43 est en mesure d'infecter les monocytes/macrophages humains bien que la réplication virale ne semble pas efficace (Collins, 2002, Desforges *et al.*, 2007). La deuxième voie implique que le virus utilise le transport rétrograde des nerfs périphériques et remonte jusqu'au SNC. Le nerf olfactif, qui fait le lien direct entre la muqueuse nasale et le bulbe olfactif au niveau de l'encéphale dans le SNC, est le nerf le plus probable pour ce genre de dissémination. Quoi qu'il en soit, il n'est pas impossible que le virus puisse utiliser les nerfs lingual, facial et trijumeau pour atteindre le SNC, comme le font déjà les virus HSV-1 (Flowerdew *et al.*, 2013), VZV (Gilden *et al.*, 2015), VSV (Detje *et al.*, 2009), influenza A (Park *et al.*, 2002) ainsi que le virus de la maladie Borna (Mori *et al.*, 2005).

Suite à la neuroinvasion, le virus HCoV-OC43 est aussi en mesure d'infecter les cellules qui composent le SNC. Même si le neurone représente la cible principale du virus, d'autres types cellulaires (astrocytes, microglies et même oligodendrocytes) sont également susceptibles à une infection abortive qui ne produit pas de nouvelles particules virales (Jacomy *et al.*, 2006, Jacomy *et al.*, 2003). De plus, le virus est en mesure d'infecter et d'établir une infection persistante à l'intérieur de différentes lignées représentatives de tous les types cellulaires retrouvés dans le SNC (Arbour *et al.*, 1999a, Arbour *et al.*, 1999b, Arbour *et al.*, 1998).

Le virus HCoV-OC43 est aussi neurovirulent à divers degrés chez les souris infectées, dépendamment des mutations présentes dans la glycoprotéine S. En effet, certains variants ayant deux (rOC/U_{s183-241}), ou quatre mutations (rOC/U_{s24-241}) entraînent un taux de mortalité très

important (environ 60-80%) chez les souris infectées par voie intracérébrale comparativement aux souris ayant reçu le virus de référence rOC/ATCC où 20% seulement des souris sont mortes (Brison *et al.*, 2011). Or, les souris ayant reçu une dose intracérébrale du variant rOC/U_{s241} survivent à un taux assez élevé (80%) mais davantage de problèmes moteurs et de paralysies des membres inférieurs ont été observés par rapport au souris infectées par le virus de référence (Brison *et al.*, 2011). La capacité de ce variant à induire une neuropathologie associée à la paralysie et de la démyélinisation appuie l'hypothèse d'un lien entre HCoV-O43 et les maladies neurodégénératives et neuroinflammatoires, notamment la sclérose en plaques. D'ailleurs, l'infection du SNC par le variant rOC/U_{s241} entraîne une dérégulation homéostatique du glutamate, un des nombreux neurotransmetteurs présents dans le SNC, ce qui déclenche l'excitotoxicité glutamatergique. Ce phénomène est caractérisé par la diminution de l'expression du transporteur de glutamate, GLT-1, situé sur les astrocytes, ce qui empêche le recyclage efficace du glutamate et son accumulation dans l'espace inter-synaptique. Cette accumulation active alors différents récepteurs tels que le récepteur AMPA et le récepteur NMDA, qui dépendent du glutamate et qui sont situés à la surface des dendrites des neurones post-synaptiques. Cette situation déclenche alors une entrée massive d'ions calcium à l'intérieur du neurone et entraîne alors la dysfonction du dit neurone (Sattler *et al.*, 2000). L'utilisation d'inhibiteurs chimiques des récepteurs AMPA et NMDA diminue considérablement les symptômes cliniques liés aux problèmes moteurs ainsi que la réplication virale du variant rOC/U_{s241}, démontrant ainsi le rôle important de ces récepteurs dans les neuropathologies observées chez les souris infectées. Même si l'infection virale en elle-même peut contribuer aux neuropathologies, l'activation du système immunitaire participe probablement aussi à provoquer des dommages neuronaux. En effet, suite à l'infection de souris par HCoV-OC43, la sécrétion de plusieurs cytokines (TNF α , IFN- γ , IL-1, IL-6), chimiokines (CCL5, CCL2 et CXCL10) ainsi que l'infiltration de lymphocytes T (CD4+ et CD8+) ont été détectées dans le cerveau ou la moelle épinière (Jacomy *et al.*, 2010). D'ailleurs, la présence de lymphocytes T autoréactifs capables de reconnaître à la fois le virus HCoV-OC43 et/ou HCoV-229E et les protéines de la myéline a été mise en évidence chez les patients atteints de SEP mais pas chez les témoins sains, suggérant que le système immunitaire peut exacerber les neuropathologies d'individus susceptibles (Boucher *et al.*, 2007). En effet, la présence des lymphocytes autoréactifs chez les patients atteints de SEP indique que ces cellules sont devenues sélectives pour la détection des épitopes viraux mais ont également la capacité de reconnaître certaines protéines composant la myéline, ce qui peut entraîner l'élimination de celles-ci et accroître la démyélinisation des neurones. De plus, l'utilisation de souris dont l'expression du gène *recombination activation*

gene (RAG) a été inactivée a permis de proposer que le système immunitaire est partiellement responsable des neuropathologies induites par HCoV-OC43 (Butler *et al.*, 2006) bien que l'utilisation de cyclosporine A, un composé immunosuppresseur, n'a pas permis de réduire les neuropathologies en souris C57BL/6 (Jacomy *et al.*, 2003). Finalement, chez l'homme, une étude portant sur le décès d'un jeune garçon de 11 mois suite à une encéphalite virale a démontré la présence du virus HCoV-OC43 au niveau du cerveau (Morfopoulou *et al.*, 2016). Même s'il est impossible d'affirmer que le coronavirus est responsable de la mort de l'enfant, dont le système immunitaire était affaibli, cet exemple démontre la neurovirulence du virus parmi des individus susceptibles à l'infection et alimente l'hypothèse de l'implication de ce virus parmi l'émergence ou la sévérité des maladies neurologiques.

3. LES MÉCANISMES DE MORT CELLULAIRE

3.1 Généralité

Au cours de leur existence, les cellules eucaryotes doivent répondre à une multitude de stress et de perturbations environnementales qui peuvent survenir en tout temps et qui peuvent déstabiliser l'homéostasie cellulaire. Heureusement, il existe différents mécanismes pour rétablir cette homéostasie. La cellule doit, dans un premier temps, détecter le stimulus pour ensuite mettre en place une réponse au stress et se protéger contre d'éventuels dommages (Galluzzi *et al.*, 2016). Même si l'organisme bénéficie d'un système immunitaire qui fait intervenir des réponses innées et adaptatives, les cellules en elles-mêmes possèdent également des outils pour réagir rapidement au stress. La mort cellulaire régulée (MCR) est l'un de ces outils qui représentent un moyen extrême de protéger le reste de l'organisme contre un danger, notamment en présence de cellules cancéreuses ou lors d'une infection virale par exemple (Linkermann *et al.*, 2014). D'ailleurs, l'un des modèles proposés par Kroemer pour expliquer la dynamique de l'activation de la mort cellulaire nous montre la compétition existante entre les facteurs qui inhibent la mort cellulaire et ceux qui l'activent. Ce modèle propose que suite à un stress, telle une infection virale, l'expression des facteurs qui inhibent la MCR va augmenter afin de donner à la cellule une période de temps pour établir une réponse du système immunitaire adaptatif. Dans le cas où le stress perdure et que la réponse cellulaire n'est pas en mesure d'éradiquer la menace, l'expression des facteurs activant la MCR va progressivement augmenter jusqu'à atteindre un niveau où la quantité de signaux inhibant la MCR va chuter, initiant ainsi les mécanismes de mort cellulaire subséquente (Figure 8). Ainsi, la MCR représente un système de défense ultime contre un danger incontrôlable dans l'optique de préserver l'homéostasie de l'organisme. De plus, il est primordial de garder en tête que l'activation de la MCR peut également avoir des fonctions bénéfiques pour l'organisme. En effet, la MCR est impliquée dans l'embryogenèse ainsi que dans la sélection clonale de lymphocytes T mais cet aspect de la MCR, appelé mort cellulaire programmée, ne sera pas abordé dans cette thèse (Dillon *et al.*, 2016).

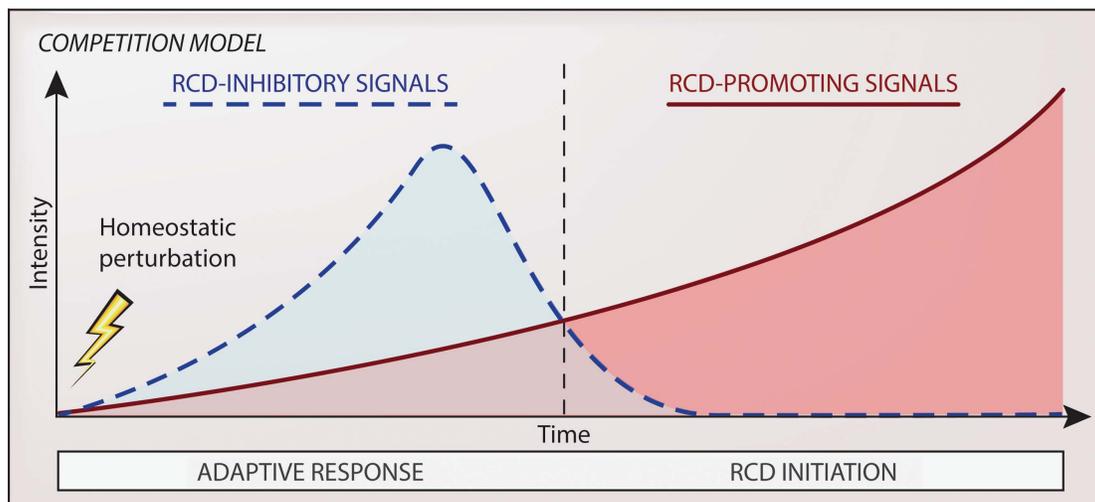


Figure 8. Dynamique de la réponse cellulaire en fonction de la MCR. Le modèle de compétition entre les signaux pro-MRC et les signaux anti-MRC postule qu'une perturbation homéostatique va provoquer une augmentation plus rapide de l'activation de signaux qui inhibent la MCR que l'activation de signaux qui l'activent. Si la réponse cellulaire ne permet pas de mettre fin à la perturbation, les signaux pro-MRC vont augmenter jusqu'à provoquer la mort cellulaire. Tiré de Galluzzi L *et al.*, *Cell death and Differentiation*, 2015.

3.2 Classification des divers types de MCR

Tracer la ligne entre la vie et la mort cellulaire représente un défi beaucoup plus complexe que ce que l'on croyait jusqu'ici. En 1842, le scientifique allemand Carl Vogt fut le premier à émettre le principe de mort cellulaire et fut suivi par plusieurs scientifiques qui ont tenté de mieux définir ce concept, surtout en se basant sur l'observation de cellules soumises à différents stress (Paweletz, 2001). Il a fallu attendre en 1972 pour que la mort cellulaire soit caractérisée par des observations phénotypiques et pour lui donner le nom d'apoptose, qui en grec veut dire "tomber de" (Kerr *et al.*, 1972). À cette époque, l'apoptose faisait référence à un mécanisme régulé par l'action de facteurs cellulaires spécifiques, à l'opposé de la nécrose qui représente une mort cellulaire davantage accidentelle qui ne fait pas intervenir de protéines précises. Depuis, la science s'est énormément intéressée au concept de mort cellulaire, au point de le faire évoluer et d'émettre une nouvelle classification. En 2009, le *Nomenclature committee on cell death* (NCDD), regroupant plusieurs chercheurs spécialisés, a émis la recommandation de reclassifier les types de mort cellulaire en fonction de caractéristiques biochimiques (ex. facteurs cellulaires) au lieu de simples observations (Kroemer *et al.*, 2009) et de faire la distinction entre la mort cellulaire régulée (MCR), qui comprend le concept de mort cellulaire

programmée (MCP) et celui de mort cellulaire accidentelle (MCA) (Galluzzi *et al.*, 2015). Ainsi, toute mort cellulaire faisant intervenir un mécanisme moléculaire, dont les composantes sont génétiquement codées, est considérée comme une MCR. À l'inverse, la MCA peut être causée par une blessure sévère de nature physique (ex. température, pression), chimique (variation de pH ou osmotique) ou mécanique (coupure) mais ne fait pas intervenir directement l'expression d'un ou de facteur(s) cellulaire(s). La mort cellulaire programmée fait référence à un type de mort dont les conséquences sont reliées au développement foetal, à l'homéostasie de tissus ou à la sélection clonale des lymphocytes (Galluzzi *et al.*, 2015). D'ailleurs, le NCCD a publié une liste exhaustive des différents types de MCR basée sur les facteurs biochimiques associés (Tableau 2). Les types de MCR se distinguent entre eux par les facteurs cellulaires associés mais également vis-à-vis l'implication des caspases ou de l'inflammation, ce qui peut influencer les conséquences sur l'organisme. Il faut tout de même considérer que cette classification a été faite dans un but de simplification et pour faciliter la compréhension du concept de différentes MCR. Dans les faits, il semble que la frontière tracée entre les MCR ne soit pas toujours bien établie puisque l'activation de certains facteurs cellulaires peut être observée dans plus d'un type, ce qui complique la caractérisation du phénomène.

Tableau 2. Classification fonctionnelle des différents types de MCR. Modifié de (Galluzzi *et al.*, 2012, Linkermann *et al.*, 2014).

Type de RCD	Caractéristiques biochimiques	Dépendant aux caspases	Cause de l'inflammation
Apoptose (voie intrinsèque)	MOMP Libération des protéines de IMS Implique un récepteur de mort (Fas,	+/-	--
Apoptose (voie extrinsèque)	TRAIL, TNFaR) Activation des caspase initiatrices (8,10) Activation des caspase effectrices (3,6,7)	++	--
Netosis	Production de NETs	--	--
Ferroptose	Inhibition GPX4 Peroxydation des lipides	--	++
MPT-RN	MOMP persistant Implique la cyclophiline D Libération AIF ?	--	++
Nécroptose	Activation de RIP1, RIP3 et MLKL	--	++
Parthanatos	Hyperactivation PARP-1 Accumulation des polymères PAR Libération AIF	--	++
Pyroptose	Activation inflammasome Activation caspase 1, 7 et 11 Production IL-1 β , -18	++	--

Abréviations: AIF : Apoptosis-inducing factor; GPX4 : Peroxydase glutathione 4; IL : interleukine; IMS : Espace intramembranaire de la mitochondrie; MLKL : Mixed lineage kinase like domain; MPT-RN : Nécrose régulée médiée par la perméabilisation mitochondriale; MOMP : Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe; NETs : Neutrophil extracellular traps; PAR : poly(ADP-ribose); PARP : poly(ADP-ribose) polymérase; RHO : rhodopsine; ROCK1 : Protéine kinase associé à RHO; RIP : Receptor-interacting protein kinase.

3.3 Mécanismes d'action de la MCR

3.3.1 Apoptose

Étant donné que l'apoptose a été étudiée depuis les années 70, il n'est pas surprenant de constater qu'elle soit la mieux caractérisée de toutes les MCR. L'activation de l'apoptose, représentée à la Figure 9, peut suivre deux voies, soit la voie extrinsèque qui fait intervenir la présence de récepteurs de mort ou la voie intrinsèque, reliée au stress intracellulaire et à l'état des mitochondries (Danial *et al.*, 2004).

La voie extrinsèque est initiée par la liaison d'un des trois ligands suivants à leurs récepteurs respectifs : ligand Fas (FasL/CD95L), TNF α ou TNF α *superfamily member* 10 (*TNF-related apoptosis inducing ligand*, TRAIL) (Wajant, 2003). De façon générale, la liaison du ligand à son récepteur provoque la trimérisation du récepteur suivi d'un changement conformationnel au niveau cytosolique permettant la formation d'un complexe protéique qui diffère légèrement dépendamment du ligand (Kroemer *et al.*, 2007). Les complexes protéiques cytosoliques, formés après la liaison des ligands FasL ou TRAIL, se ressemblent beaucoup et font intervenir la protéine kinase interagissant avec les récepteurs 1 (*Receptor-interacting protein kinase 1*, RIP1), la protéine associée à FAS avec un domaine de mort (*FAS-associated protein with a death domain*, FADD), plusieurs isoformes de c-FLIP, la protéine cellulaire inhibitrice de l'apoptose (*cellular inhibitor of apoptosis protein*, cIAP), la ligase ubiquitine E3 ainsi que les procaspases-8 et 10 (Lavrik *et al.*, 2005). Dans le cas du récepteur impliquant le ligand TNF α , le facteur FADD est remplacé par la protéine TNFR associée à un domaine de mort (TRADD) en plus d'autres facteurs notamment les facteurs associés à TNFR 2 et 5 (TRAF2, 5) (Micheau *et al.*, 2003). Fait à noter, la protéine cIAP ubiquitine le facteur RIP1 au niveau de la lysine 63 pour empêcher ce dernier de s'associer à d'autres facteurs et maintenir son état inactif (Bertrand *et al.*, 2008). Ce complexe devient une plateforme pour le recrutement d'autres protéines kinases dont le facteur de croissance transformant β (*Transforming growth factor β -activated kinase 1*, TAK1) ainsi que les protéines liant TAK1 (*TAK-binding protein 2 and 3*, TAB2, 3) (Ea *et al.*, 2006). Ce nouveau complexe, également appelé complexe I, ne déclenche pas forcément l'apoptose puisqu'il va d'abord activer le facteur de transcription NF- κ B et permettre l'expression des gènes encodant différentes protéines kinases activées par les mitogènes (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPK) favorisant la survie cellulaire et l'activation de processus inflammatoires (Hacker *et al.*, 2006). Bien que les étapes subséquentes menant à l'apoptose ne soient pas

complètement élucidées, il semble que la présence du facteur Cylindromatosis (CYLD), une protéine qui possède une activité de déubiquitination, favorise le détachement du complexe protéique de la partie cytosolique du récepteur en enlevant la chaîne d'ubiquitine sur la protéine RIP1 (Wright *et al.*, 2007). La formation de ce complexe II assure principalement l'activation des caspases 8 et 10, deux cystéines protéases initialement présentes sous forme de pro-caspases, qui deviennent fonctionnelles lorsqu'elles se sont autoclivées (J. Wang *et al.*, 2001). L'inhibition des facteurs cIAP, qui ubiquitinent RIP1, favoriserait également la formation du complexe II (L. Wang *et al.*, 2008). Les caspases 8 et 10 sont considérées comme des caspases initiatrices puisqu'elles vont cliver et activer les pro-caspases effectrices 3, 6 et 7. Ces dernières poursuivent la cascade d'activation de l'apoptose en clivant de nombreux substrats cellulaires. Parmi ces substrats, la polymérase de poly(ADP-ribose) (PARP), retrouvée au noyau cellulaire, est responsable de la réparation de l'ADN (Krishnakumar *et al.*, 2010). Les caspases 3, 6 et 7 vont également cliver le *Inhibitor of caspase-dependent DNase* (iCAD), retrouvé dans le cytosol, libérant ainsi CAD au noyau et provoquant la fragmentation de l'ADN génomique (Sakahira *et al.*, 1998). Fait intéressant, la caspase 8 peut également cliver le facteur cytosolique Bid et générer une forme active (tBid), qui interagit avec des facteurs pro-apoptotiques à la membrane de la mitochondrie pour favoriser sa perméabilisation, faisant ainsi un lien avec la voie intrinsèque de l'apoptose (X. M. Yin, 2006).

La voie intrinsèque fait suite à la présence de stress intracellulaires tels que la présence de dommages à l'ADN, une accumulation de calcium dans le cytosol, une augmentation de protéines mal repliées au réticulum endoplasmique, l'apparition de stress oxydatif, etc. Cette voie possède comme point central la mitochondrie, siège de la production d'ATP, qui est la cible de plusieurs facteurs pro-apoptotiques. D'ailleurs, la régulation de cette voie à la mitochondrie est assurée par les protéines de la famille Bcl-2 qui contiennent un ou plusieurs domaines homologues à Bcl-2 (*Bcl-2 homologous domains*, BH) selon leur(s) fonction(s). Ainsi, les facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bok) possèdent les domaines BH1-3 et leur activation provoque leur relocalisation et leur oligomérisation à la membrane externe de la mitochondrie afin d'y former des pores qui brisent l'intégrité de la membrane de cet organelle et permet le relargage d'autres facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol (Kroemer *et al.*, 2007). Les facteurs ayant les domaines BH1-4 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) sont anti-apoptotiques et interfèrent dans l'activité des protéines Bax et Bak lorsque celles-ci sont dans le cytosol ou déjà insérées dans la membrane mitochondriale externe. Les facteurs ne possédant que le domaine BH3 sont responsables de la régulation et de l'initiation de l'apoptose, avec une efficacité variable. Parmi

ceux-ci, les facteurs Noxa, PUMA, Bim et Bik antagonisent directement les facteurs anti-apoptotiques alors que les facteurs Bid et Bcl-2 favorisent l'activation des facteurs pro-apoptotiques (Garcia-Saez, 2012, Lalaoui *et al.*, 2015, Zheng *et al.*, 2015). L'intervention des facteurs pro-apoptotiques au niveau de la membrane mitochondriale conduit à la formation de pores dont le diamètre permet la relâche de molécules excédant 5 kDa (Walther *et al.*, 2009). Suite à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, plusieurs facteurs liés à la voie intrinsèque de l'apoptose sont relâchés, dont SMAC/DIABLO et Omi/HtrA2, qui inhibent XIAP, lui-même un facteur qui inhibe d'autres caspases (Chai *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2003). De plus, le cytochrome C, un transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire, est également relâché de la mitochondrie pour se retrouver dans le cytosol où il s'assemble avec la pro-caspase 9, le facteur Apaf-1 et de l'ATP. Ce complexe, appelé apoptosome, permet l'activation de la caspase 9 dont le substrat est la pro-caspase 3, dont le clivage produit la forme active de cette caspase effectrice (Cain *et al.*, 2002). Évidemment, en plus de l'activation des caspases, la perméabilisation de la membrane des mitochondries génère une dissipation du potentiel membranaire et perturbe la chaîne respiratoire, contribuant ainsi au processus d'apoptose (Kroemer *et al.*, 2007). Le réticulum endoplasmique (RE) joue également un rôle non négligeable dans la voie intrinsèque de l'apoptose puisque plusieurs facteurs pro-apoptotiques peuvent s'y retrouver. En effet, Bax et Bak sont notamment en mesure de se déplacer au RE pour augmenter la perméabilisation de ce dernier et libérer des ions calcium (Ca^{2+}) dans le cytosol. La mitochondrie peut aider à maintenir l'homéostasie ionique en absorbant une partie des ions Ca^{2+} présents dans le cytosol. Toutefois, une trop grande quantité de ces ions peut contribuer à déstabiliser la mitochondrie et mener à la mort cellulaire (Oakes *et al.*, 2005, L. Zhao *et al.*, 2012a, Zong *et al.*, 2003).

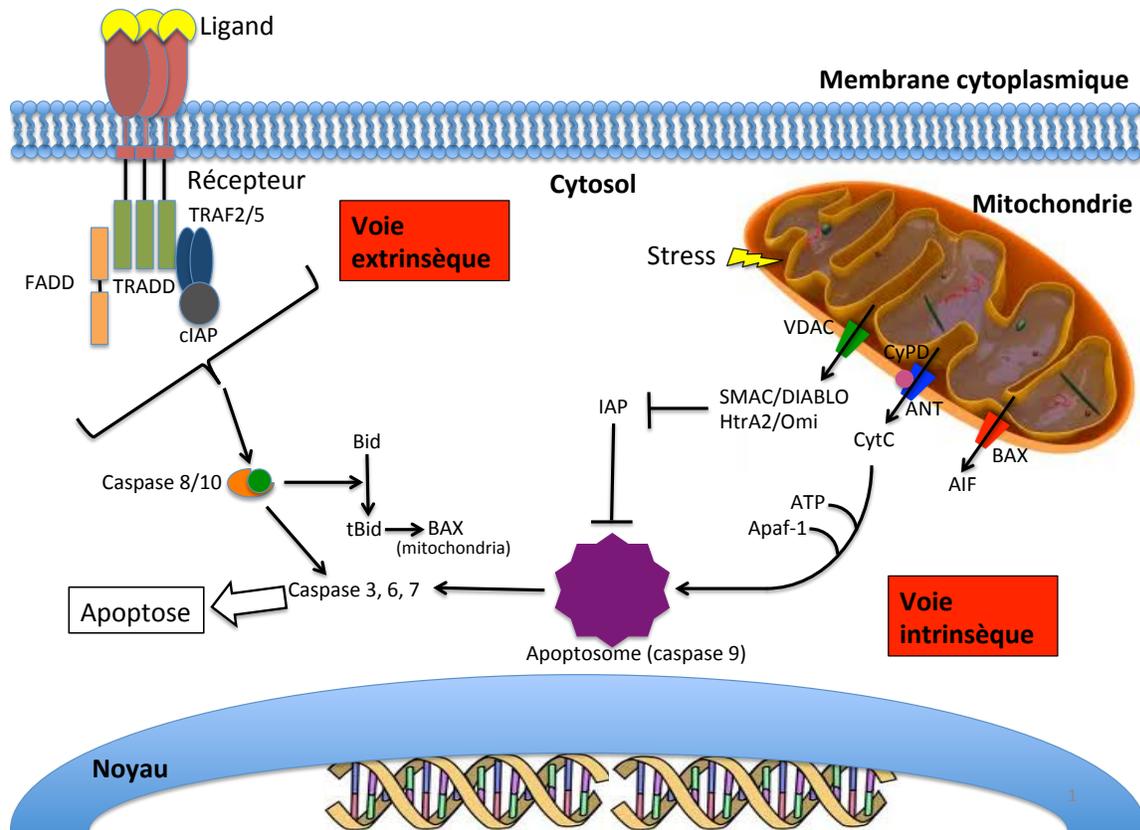


Figure 9. Activation de l'apoptose associée à la voie extrinsèque ou intrinsèque. La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par la liaison d'un ligand à son récepteur, provoquant la formation d'un complexe protéique qui permet l'activation de la caspase 8 ou 10. Ces caspases initiatrices clivent les caspases effectrices 3, 6 et 7 qui mèneront à l'apoptose. La caspase 8 est également reconnue pour cliver le facteur Bid, qui permet à ce dernier de rejoindre la mitochondrie et de participer à la stabilisation du facteur Bax. La voie intrinsèque fait suite à un stress intracellulaire et mène à l'activation des facteurs pro-apoptotiques, dont Bax. Une fois activé, le facteur Bax s'oligomérisse avec lui-même ou avec Bak pour s'insérer dans la membrane externe mitochondriale et former des pores laissant sortir une multitude d'autres facteurs pro-apoptotiques vers le cytosol. Le cytochrome C, avec la pro-caspase 9, le facteur Apaf-1 et de l'ATP forment l'apoptosome, complexe protéique qui active les caspases effectrices 3, 6 et 7.

3.3.2 Nécroptose

Pendant très longtemps, la nécrose a été observée et décrite comme étant un mécanisme de mort cellulaire accidentelle sans régulation. Or, la caractérisation plus poussée de la mort cellulaire a permis d'établir que, dans certaines circonstances, la nécrose est un processus hautement régulé, faisant intervenir certains facteurs cellulaires bien précis. C'est

ainsi que l'on a découvert la nécroptose. Comme son nom l'indique, la nécroptose provoque des changements morphologiques similaires à la nécrose, à savoir la rupture des membranes cytoplasmiques, la destruction des organelles et la libération du contenu cytosolique dans l'environnement (Vanden Berghe *et al.*, 2013). Ce type de mort cellulaire peut être activé de plusieurs façons, dépendamment du type cellulaire, de la présence de certains facteurs cellulaires ou du stimulus (Figure 10) (Moriwaki *et al.*, 2014).

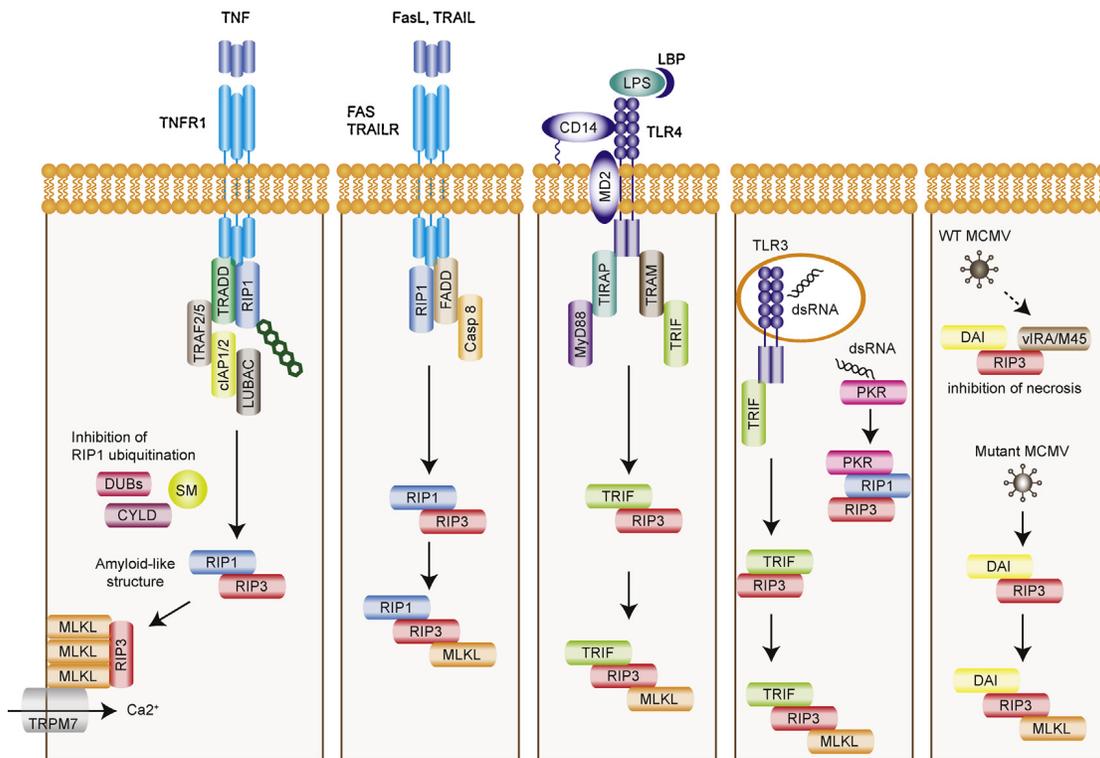


Figure 10. Activation de la nécroptose associée aux facteurs RIP1 et RIP3. Différents stimuli peuvent activer la nécroptose et faire intervenir les facteurs RIP1, RIP3 et MLKL. La liaison de ligands (TNF α , ligand de Fas ou TRAIL) à leur récepteur respectif entame la formation de complexes cytosoliques où RIP1 est ubiquitiné et maintenu dans une forme inactive. En l'absence de caspase 8 active et en présence d'enzymes qui déubiquitine RIP1, ce dernier s'associe avec RIP3 et permet l'assemblage de RIP3 avec plusieurs monomères de MLKL qui affecteront la membrane cytoplasmique. La stimulation des TLR3, 4 ainsi que de PKR mène également à la formation du complexe RIP1/RIP3 et éventuellement à l'assemblage de RIP3 avec MLKL. Le virus MCMV encode une protéine virale (vIRA/M45) capable d'empêcher la formation du complexe RIP1/3, contrairement au virus mutant. Moriwaki K et Chan FK, *Cytokine and growth factor reviews*, 2014.

La voie d'activation la plus connue et la plus étudiée de la nécroptose est initiée par la liaison des mêmes ligands (FasL, TNF α , TRAIL) que ceux utilisés pour la voie extrinsèque de l'apoptose. Or, la différence d'activation entre l'apoptose et la nécroptose réside au niveau des partenaires du complexe protéique cytoplasmique I et de la capacité de la caspase 8 à cliver ou non le facteur RIP1. En effet, lorsque la caspase 8 est fonctionnelle, celle-ci clive RIP1 au

niveau du domaine intermédiaire tel qu'illustré à la Figure 11. Ce domaine est situé entre le domaine kinase et le domaine de mort et son clivage inactive RIP1, ce qui promeut l'apoptose (Y. Lin *et al.*, 1999). Dans le cas où la caspase 8 n'est pas fonctionnelle ou ne peut cliver le facteur RIP1, ce dernier se détache du complexe protéique I et s'associe avec le facteur RIP3 via leurs motifs d'interactions homotypiques (*Receptor-interacting protein homotypic interaction motif*, RHIM) pour former le nécrosome, complexe qui inclut également le facteur MLKL, nécessaire à la destruction des membranes plasmiques (X. Sun *et al.*, 2002). La nécroptose peut également être initiée par la stimulation des TLR3 et 4 par l'ARN db ou le LPS, en absence d'activité de la caspase 8. Après activation des TLR3 ou 4, le facteur TRIF, qui possède aussi un domaine RHIM, va s'associer au nécrosome pour la suite de la nécroptose. Fait intéressant, TRIF s'associe avec RIP1 et RIP3 pour déclencher la nécroptose chez les macrophages alors que chez les cellules endothéliales et les fibroblastes, seul RIP3 est impliqué (Kaiser *et al.*, 2013). L'initiation de la nécroptose peut également faire intervenir des voies du système immunitaire autres que les TLR, telles que l'activateur dépendant à l'ADN des facteurs régulateurs de l'interféron (DAI). Ce senseur cytosolique détecte l'ADN db et mène généralement à l'expression de l'IFN de type I mais peut également s'associer à RIP3 via son domaine RHIM (Upton *et al.*, 2012). Finalement, malgré l'absence de domaine RHIM, la protéine kinase dépendante à l'ARN db (PKR) est également un partenaire pro-nécroptotique puisqu'il peut s'associer avec RIP1 et RIP3 et déclencher la nécroptose en absence de FADD ou de caspase 8 (Thapa *et al.*, 2013).

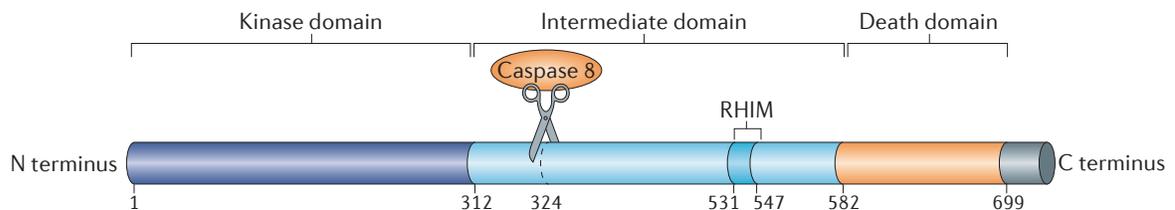


Figure 11. Représentation des différents domaines du facteur RIP1. La caspase 8 clive le facteur RIP1 en position 324 dans le domaine intermédiaire qui comprend le motif RHIM, nécessaire pour l'interaction avec les autres protéines portant ce motif, notamment RIP3. Le domaine kinase en N-terminal de la protéine est responsable de la phosphorylation du facteur RIP3 alors que le domaine de mort situé en C-terminal est impliqué dans la liaison de RIP1 au complexe cytosolique. Tiré de Ofengeim D et Yuan J, *Nature reviews*, 2013.

Suite à la formation du nécrosome, les facteurs RIP1 et RIP3 subiront une série de phosphorylation et d'autophosphorylation à de multiples sites qui stabilisent le complexe (Y. S. Cho *et al.*, 2009). L'importance de la phosphorylation de ces différents sites a été mise en évidence lorsqu'on a découvert un inhibiteur de l'activité kinase de RIP1, le nécrostatin (Nec-1),

qui inhibe du même coup la nécroptose associée à RIP1 (Degterev *et al.*, 2005, Degterev *et al.*, 2013). Par la suite, l'utilisation de la mutagenèse dirigée pour inactiver les domaines kinases de RIP1 ou RIP3, ainsi que la synthèse d'inhibiteurs contre RIP3, a également démontré la nécessité de la phosphorylation dans la cascade d'activation de la nécroptose (Mandal *et al.*, 2014, Newton *et al.*, 2014). D'ailleurs, la phosphorylation du facteur RIP3 en position sérine 227 est nécessaire pour la suite de la nécroptose par la liaison au nécrosome du facteur *Mixed lineage kinase domain-like* (MLKL), un facteur clé dans la mort cellulaire par nécroptose. De plus, il a récemment été démontré que la protéine chaperonne *Heat shock protein 70* (Hsp70) est essentielle pour maintenir la liaison du nécrosome à MLKL, pour la phosphorylation de MLKL et assurer la suite de la nécroptose (X. M. Zhao *et al.*, 2016). Suite à sa phosphorylation, le facteur MLKL se relocalise principalement, mais pas uniquement, à la membrane cytoplasmique puisqu'il a également été retrouvé dans la membrane du RE, de la mitochondrie et des endosomes (Rodriguez *et al.*, 2016, H. Wang *et al.*, 2014a). À ce jour, on croit que le domaine en hélice (*four-helical bundle domain*, 4HBD), situé en N-terminal, serait responsable du recrutement et de l'insertion du facteur MLKL dans les membranes lipidiques, avec une plus grande affinité pour les lipides de type phosphatidylinositol et les cardiolipines (Dondelinger *et al.*, 2014, J. Zhang *et al.*, 2016a). L'insertion du facteur MLKL dans les membranes favorise son accumulation et son homo-oligomérisation formant ainsi des pores dans la membrane cytoplasmique. Pour l'instant, certaines études ont avancé que la présence de MLKL pourrait perturber certains canaux ioniques, notamment TRPM7, et provoquer une entrée massive d'ions Na^{2+} et Ca^{2+} dans la cellule (Cai *et al.*, 2014, X. Chen *et al.*, 2014). Quoi qu'il en soit, il est fort probable que MLKL contribue à déstabiliser l'homéostasie osmotique de la cellule et mène à la rupture des membranes cytoplasmiques. MLKL a également été observé au noyau, guidé par un signal de localisation nucléaire (SLN) qui se trouve dans la région pseudo-kinase en C-terminal, suggérant différentes contributions de ce facteur encore inconnues à ce jour (Yoon *et al.*, 2015).

En provoquant la rupture des membranes cytoplasmiques, MLKL contribue également à libérer dans l'environnement extracellulaire différents signaux moléculaires associés aux dommages (*Damage-associated molecular patterns*, DAMPs). Parmi les DAMPs relâchés, notons l'ATP, IL-1 α , IL-6, IL-33, l'ADN mitochondrial (ADNmt) et HMGB1 dont les rôles exacts lorsque libérés restent encore à être éclaircis (Kaczmarek *et al.*, 2013). Étant donné que ces facteurs sont pour la plupart pro-inflammatoires, on présume qu'ils participent à l'établissement d'un environnement inflammatoire en plus de sensibiliser les cellules voisines au danger en cours. Finalement, l'accumulation d'espèces réactives oxygénées (ROS), causant le stress

oxydatif, reste sujet à débat quant à une réelle implication durant le processus de nécroptose. Certains groupes de recherche ont démontré que la production de ROS suivant l'activation de la nécroptose par la présence de $TNF\alpha$ contribuait à la mort cellulaire (Vanlangenakker *et al.*, 2011a) alors que d'autres ont confirmé l'absence de lien de cause à effet entre les ROS et la nécroptose (Tait *et al.*, 2013). En somme, bien que l'implication de la mitochondrie et des ROS dans la nécroptose reste controversée, ces éléments pourraient être davantage liés au contexte d'activation de la nécroptose comme le type cellulaire ou le stimulus. (Fulda, 2016, K. D. Marshall *et al.*, 2014).

3.3.3 Autres formes de MCR

Parthanatos. Ce type de MCR fait suite à l'accumulation de dommages à l'ADN génomique de la cellule et fait intervenir PARP-1, une enzyme qui, en conditions physiologiques, participe à la réparation de l'ADN (Jeggo, 1998). Lorsque les dommages à l'ADN deviennent trop importants, PARP-1 est surexprimé et suractivé, ce qui engendre une production excessive de poly(ADP-ribose) ou PAR, synthétisés à partir de molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). D'une part, la consommation du pool de NAD⁺ entraîne une diminution importante de ceux-ci et une accumulation de la forme réduite (NADH), empêchant ainsi la synthèse de nouvelles molécules énergétiques, d'autant plus que la formation des PAR nécessite l'hydrolyse de l'ATP (Ethier *et al.*, 2012, Rouleau *et al.*, 2010). De plus, la production excessive de PAR qui dépasse la capacité de la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) à dégrader ces polymères contribue à leur accumulation au noyau (Andrabi *et al.*, 2006). Ensuite, l'accumulation des PAR entraîne leur relocalisation à la mitochondrie où ils interagissent avec le facteur AIF, une protéine transmembranaire de la membrane interne de la mitochondrie qui, en conditions physiologiques, participe à la phosphorylation oxydative et à la production d'ATP (Y. Wang *et al.*, 2009a). Le processus par lequel les PAR facilitent le clivage d'AIF à la membrane mitochondriale n'est pas encore totalement élucidé; certaines études avancent la participation de la calpaine, une protéase cellulaire (Kar *et al.*, 2010), d'autres non (Y. Wang *et al.*, 2009b). Quoi qu'il en soit, une fois clivé, AIF se déplace au cytosol où il s'associe avec la cyclophiline A (CypA), facteur nécessaire pour la relocalisation d'AIF au noyau, probablement via les pores nucléaires (Krietsch *et al.*, 2012). Une fois rendu au noyau, l'attachement de l'histone H2AX à AIF-CyPA complète la formation du complexe qui possède alors une activité endonucléase et provoque la fragmentation aléatoire de l'ADN génomique à environ tous les 50 kpb (Baritaud *et al.*, 2010).

Pyroptose. Ce type de MCR se situe entre l'apoptose et la nécroptose en ce sens qu'elle fait intervenir certaines caspases (caspase 1, 7 et 11) mais entraîne l'activation de l'inflammation, ce qui en fait une mort immunogène. Ainsi, la pyroptose est initiée suite à l'activation de différentes plateformes reliées à l'inflammasome, notamment les récepteurs NOD (NLR) ou le senseur d'ADN cytosolique absent du mélanome 2 (AIM2) (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007, Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009). Les différents complexes de l'inflammasome provoquent le clivage et donc l'activation des caspases. La caspase 1 est aussi utilisée pour la maturation protéolytique des cytokines pyrogènes IL-1 β et IL-18 (Sansonetti *et al.*, 2000).

MPT-RN. La *Mitochondrial permeability transition-regulated necrosis* (MPT-RN) est une mort cellulaire distincte de l'apoptose ou de la nécroptose où la mitochondrie est au cœur du processus en faisant intervenir la cyclophiline D (CyPD), une protéine de la matrice mitochondriale (Baines *et al.*, 2005, Nakagawa *et al.*, 2005). Une accumulation brusque de Ca²⁺ cytosolique ou l'augmentation du stress oxydatif sur la mitochondrie serait suffisante pour provoquer la formation d'un complexe comprenant la cyclophiline D et l'ATP synthétase (Kroemer *et al.*, 2007, Lemasters *et al.*, 2009). Pour l'instant, seule la cyclophiline D a été identifiée comme un facteur responsable de la formation du pore mitochondrial, notamment démontré par la protection cellulaire conférée par un inhibiteur de la CyPD, la cyclosporine A (S. Y. Kim *et al.*, 2014). L'identification d'autres partenaires à la CyPD et la caractérisation approfondie du mécanisme restent à être effectuées.

Netosis. Ce type de MCR fait référence aux pièges extracellulaires (*Neutrophile extracellular traps*, NETs) sécrétés par les cellules granulocytaires (neutrophiles ou éosinophiles) et qui sont des structures composées de chromatines nucléaires, d'histones et de protéines antimicrobiennes (V. Brinkmann *et al.*, 2004, Yousefi *et al.*, 2008). En effet, la présence d'un pathogène déclenche une vacuolisation massive du cytoplasme, une décondensation rapide de la chromatine et une destruction des membranes nucléaires et granulaires des neutrophiles ou des éosinophiles afin de piéger le pathogène et de faciliter son élimination (Fuchs *et al.*, 2007). Bien que peu de choses soient connues sur ce type de MCR, les ROS semblent y jouer un rôle important puisque l'enzyme NADPH oxydase génère énormément de superoxydes, probablement dans le but de faciliter l'éclatement de la cellule et de ses organelles.

Ferroptose. La ferroptose est le dernier né dans la classification des MCR. Comme son nom l'indique, cette MCR est associée à la présence du fer et est caractérisée par la peroxydation

des lipides reliée à la présence de fer. Ce type de MCR est déclenché par l'inhibition de la protéine transmembranaire Xc⁻, une protéine qui laisse sortir la cystéine pour faire entrer dans le cytosol du glutamate; ce dernier étant nécessaire pour la biosynthèse de glutathion et d'autres protéines. L'enzyme *glutathion peroxidase* (GPX4) utilise justement le glutathion comme substrat afin de réduire les hydroperoxydes phospholipidiques qui peuvent s'accumuler dans la cellule. Ainsi, suite à une diminution de glutathion intracellulaire, GPX4 n'est plus en mesure d'éliminer les composés lipidiques oxydatifs qui endommagent les lipides, ce qui entraîne inexorablement la détérioration des membranes lipidiques et la rupture de l'intégrité du cytosol.

3.4 Stratégies virales en réponse à la MCR

3.4.1 Activation de la MCR

Considérant le caractère parasitaire des virus, la survie de ces pathogènes dépend de leurs capacités à profiter de leurs hôtes. La MCR peut donc s'avérer un moyen efficace pour limiter la réplication et la propagation virale dans l'organisme. Il peut donc paraître assez contradictoire que certains virus aient acquis la capacité « d'inciter » les cellules à activer les différents mécanismes de MCR. Or, les virus peuvent prendre avantage à accélérer la mort cellulaire de leur hôte afin de (i) faciliter la sortie et la dissémination virale, (ii) prévenir la présentation d'antigènes viraux par les cellules infectées ou (iii) provoquer la mort de cellules immunitaires qui pourrait limiter la propagation virale (Neumann *et al.*, 2015). Le Tableau 3 présente plusieurs protéines virales qui possèdent la capacité de moduler positivement la MCR chez la cellule hôte, soit par un effet direct (ex. interaction avec un facteur cellulaire pro-MCR) soit par un effet indirect (ex. interférence avec les facteurs anti-MCR). Parmi les effets directs, certaines stratégies virales consistent à faciliter la perméabilisation de la membrane mitochondriale (perte de potentiel mitochondrial, relâche de facteurs pro-MCR, production de ROS) ou à apporter des modifications post-traductionnelles sur les facteurs pro-MCR afin de les activer (clivage, phosphorylation). Afin d'activer la MCR par des stratégies indirectes, certains virus vont chercher à augmenter l'expression des facteurs pro-MCR au niveau transcriptionnel ou traductionnel ou vont plutôt tenter de stabiliser les complexes ou facteurs impliqués dans l'activation de la MCR (Galluzzi *et al.*, 2008, Sridharan *et al.*, 2014).

Tableau 3. Virus et protéines virales qui activent la MCR.

Virus	Protéines virales	Facteurs cellulaires	Effet
APOPTOSE			
ADV	E4orf4	Activation de PP2A	Indirect
HPV	E7	Activation de p53	Indirect
EBV	EBNA1	Activation de l'apoptose lorsque la protéine virale est exprimée	?
HBV	HBx	Augmente activité de p53 Interaction avec VDAC	Indirect Direct
VIH-1	Tat	Augmente l'expression de FasL	Indirect
	Vpr	Interaction avec ANT	Direct
SINV	E1, E2	Augmente l'activité de NF-kB	Indirect
HCV	Core	Association avec la région cytosolique TNFR	Indirect
NDV	HN	Induction de l'expression de TRAIL	Indirect
VSV	M	Mécanisme inconnu	?
RABV	Glycoprotéine	Activation caspase 3 et 8	Direct
WNV	NS3	Activation caspase 3	Direct
	Protéine capside	Séquestration HDM2 (antagoniste Bax)	Indirect
SFV	?	Activation de Bak, Bid et caspase 8	Direct
JEV	NS3	Activation caspase 3 et 9	Direct
TMEV	Protéine Leader	Activation de Bax Activation caspase 3 et 9	Direct
CVB	3CPro	Clivage de Unc93b qui active apoptose	Indirect
MERS-CoV	?	Activation caspase 3	Direct
SARS-CoV	Protéine M	Activation caspase 8 et 9	Direct
	7a	Inhibition de Bcl-x	Indirect
NÉCROPTOSE			
VACV	?	Interaction avec RIP1 et RIP3 Phosphorylation de RIP1	Direct
MCMV	?	Augmentation ARNm RIP1	Indirect
Reovirus	?	Activation RIP1 Augmentation relâche HMGB1	? Indirect
HIV-1	Tat	Activation de RIP1 et RIP3	?

Virus	Protéines virales	Facteurs cellulaires	Effet
TMEV	?	Phosphorylation de RIP1	Direct
HSV-1	ICP6, 10	Phosphorylation de RIP1, RIP3 et MLKL	Direct

Parfois, l'activation de la MCR en réponse à un pathogène viral ne se limite pas qu'à un seul facteur mais fait intervenir plusieurs protéines associées à plusieurs types de MCR différents. Un exemple intéressant illustrant ce propos est le virus humain CMV causant une infection de la rétine (rétinite) chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Cette pathologie est causée par la destruction des tissus de la rétine suivant l'activation de plusieurs facteurs dont le $TNF\alpha$, plusieurs caspases (1, 3, 8), RIP1, RIP3, IL-1b et IL-18. Ces facteurs étant associés à l'apoptose, la nécroptose et la pyroptose, les auteurs concluent que plusieurs types de MCR agissent de concert et contribuent par le fait même à la pathologie (Chien *et al.*, 2012). Un autre virus, le virus nécrotique pancréatique infectieux (IPNV) a également la capacité d'induire l'apoptose via les facteurs Bad et Bid et la nécroptose reliée à RIP1 (W. L. Wang *et al.*, 2011). Ces exemples illustrent bien les interactions possibles entre les différents facteurs et font également ressortir la complexité de ces mécanismes.

3.4.2 Neutralisation de la MCR

À l'inverse des stratégies précédentes, il n'est pas surprenant de constater que certains virus ont adopté, à travers leur évolution, la stratégie d'inhiber les mécanismes de MCR. Cette stratégie est particulièrement essentielle durant les étapes précoces du cycle infectieux afin d'éviter une mort cellulaire prématurée privant la production de particules infectieuses. Ainsi, la stratégie virale peut consister à cibler directement les facteurs pro-MCR et à les inactiver soit par clivage, soit en les gardant dans une conformation inactive ou incapable de s'associer aux autres facteurs. À l'inverse, d'autres virus ont adopté une approche indirecte en ciblant les facteurs anti-MCR en encodant des facteurs homologues (ex. vBcl-2) ou en augmentant l'expression de facteurs anti-MCR.

Tableau 4. Virus et protéines virales qui inhibent la MCR.

Virus	Protéines virales	Facteurs cellulaires	Effet
APOPTOSE			
HCMV	vICA (UL36)	Inhibition de caspase 8	Direct
	vMIA (UL37)	Séquestration de Bax	Direct
HHV-8	K7	Activation de Bcl-2	Indirect
		Inhibition de caspase 3	Direct
VACV	N1L	Homologue Bcl-2	Indirect
	F1L	Prévient interaction entre Bax et Bak	Direct
	B13R	Inhibition de caspases (serpin)	Direct
Cowpox	CrmA	Inhibition de caspases (serpin)	Direct
	CrmB, C	Antagoniste TNFR	Direct
HSV-1	US3	Inhibition de Bad	Direct
EBV	LMP-1, EBNA4	Augmente expression Bcl-2	Indirect
Adenovirus	E1B-19K	Homologue Bcl-2	Indirect
MYXV	M11L	Homologue Bcl-2	Indirect
		Interférence avec Bax	Direct
MCMV	vICA (M36)	Inhibition de caspase 8	Direct
	vMIA (M38.5)	Inhibition de Bax	Direct
	vIBO (M41.1)	Inhibition de Bak	Direct
HCV	NS2	Inhibition de la relâche CytC	Direct
VIH	Tat	Augmente expression Bcl-2	Indirect
HTLV	Tax	Diminution expression Bim et Bid	Indirect
HCoV	PLPs	Initie dégradation de p53	Direct
NÉCROPTOSE			
MCMV	vIRA (M45)	Perturbe interaction entre RIP1 et RIP3	Direct
HCMV	IE1	Inhibition de la phosphorylation RIP3 et MLKL	Direct
HSV-1,2	ICP6, 10	Perturbe interaction entre RIP1 et RIP3	Direct
CVB	3CPro	Clivage de RIP3	Direct

L'apparition d'une variété de MCR à travers l'évolution des cellules eucaryotes a permis à ces dernières d'avoir un véritable arsenal pour répondre à l'incessante attaque des virus. En

parallèle, les virus se sont également adaptés à ces réponses en développant des stratégies pour contrer les mécanismes antiviraux, notamment ceux faisant intervenir les MCR. Il n'est donc pas surprenant que certains virus se soient dotés de plusieurs stratégies pour contrer plus d'une MCR. À ce jour, deux virus de la famille des *herpesviridae*, HSV-1 et CMV, sont reconnus pour bloquer autant l'apoptose que la nécroptose. Le virus HSV provoque une infection qui peut devenir latente et dont le contrôle sur l'activation de la mort cellulaire par la cellule s'avère essentiel à la persistance du virus (Yu *et al.*, 2016). La protéine ribonucléase réductase R1 chez HSV-1 (ICP6) et HSV-2 (ICP10) est en mesure d'interférer avec la caspase 8 et de bloquer l'apoptose mais également d'inhiber l'activation de la nécroptose en perturbant l'interaction entre RIP1 et RIP3 (H. Guo *et al.*, 2015a). L'autre exemple intéressant concerne le CMV qui peut également interférer dans l'activation de l'apoptose et la nécroptose, autant chez la forme murine (MCMV) que humaine (HCMV) du virus. En effet, pour ces deux virus, plusieurs protéines virales agissent de concert et ciblent la caspase 8 et les facteurs Bax et RIP1, empêchant donc autant l'apoptose que la nécroptose de s'activer (Brune, 2011, Handke *et al.*, 2012, Omoto *et al.*, 2015). Comme les CMV sont des virus dont le cycle réplcatif est relativement long, il apparaît donc essentiel de ralentir le processus, peu importe le type de MCR activé. En somme, la biologie du virus peut influencer sa capacité à interagir avec les facteurs cellulaires associés à la MCR pour en tirer un bénéfice. Il est évident que la poursuite de la caractérisation des interactions entre les virus et les MCR apportera davantage d'exemples de virus ayant la capacité de moduler la MCR à leur avantage.

3.5 Implication de la MCR dans les maladies neurologiques

3.5.1 Généralités

Par définition, les maladies neurologiques sont toutes pathologies qui touchent le SNC ou le SNP, ce qui comprend un large éventail de maladies allant de la schizophrénie à l'Alzheimer. La vaste majorité des pathologies neurologiques impliquant la mort neuronale sont les maladies neurodégénératives caractérisées par la présence d'inflammation et l'activation de MCR. Ainsi, bien que plusieurs facteurs cellulaires associés à la MCR soient impliqués dans une multitude d'autres pathologies, elles ne seront pas exposées ici.

3.5.2 Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (PD) est une pathologie neurodégénérative qui touche principalement le système moteur du SNC. La manifestation de cette maladie se traduit par une perte progressive de la motricité et éventuellement par des problèmes cognitifs. La mort des neurones dopaminergiques est particulièrement importante au niveau de la *substantia nigra*, une région du mésencéphale, où l'on observe également une accumulation excessive de corps de Lewis, un amas de protéines α -synucléine associé à de l'ubiquitine et qui sont sous forme d'inclusions cytoplasmiques (Davie, 2008, Michel *et al.*, 2016). Bien qu'à l'heure actuelle, l'analyse d'échantillons de cerveaux de patients atteints de Parkinson, jumelés à l'utilisation de modèles animaux et de systèmes de cultures cellulaires n'ont pas permis d'identifier un seul facteur cellulaire relié à un type de MCR précis, certains éléments commencent à nous donner des pistes intéressantes.

Une diminution de l'activité de GPX4, enzyme nécessaire à la réduction de radicaux lipophiles, a été observée chez des patients atteints de Parkinson. Une diminution d'activité de ce facteur est l'une des caractéristiques de la ferroptose, ce qui laisse croire que cette MCR pourrait être impliquée dans cette pathologie (Bellinger *et al.*, 2011, Bellinger *et al.*, 2012, Hauser *et al.*, 2013). La nécroptose pourrait également avoir un rôle à jouer, par l'intermédiaire de l'excitotoxicité glutamatergique, puisque le traitement d'un modèle de cultures cellulaires pour le Parkinson avec Nec-1, un inhibiteur de RIP1, diminue la mort cellulaire de ceux-ci (X. Xu *et al.*, 2007). Finalement, l'utilisation de souris transgéniques en tant que modèles pour la maladie de Parkinson a permis de démontrer que la suractivation de PARP-1, facteur associé à la parthanatos, provoque la mort des neurones dopaminergiques, suggérant la possible implication de cette MCR dans la maladie de Parkinson (Lee *et al.*, 2013).

3.5.3 Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la cause la plus fréquente de détérioration neurologique à travers le monde. L'accumulation extracellulaire de peptides β -amyloïdes ainsi que l'hyperphosphorylation et l'ubiquitination de la protéine Tau, causant un enchevêtrement des neurofilaments, sont des caractéristiques typiques de cette pathologie. La principale région du cerveau touchée par l'importante perte neuronale se situe au niveau de l'hippocampe et l'apoptose serait grandement impliquée dans ce phénomène (Mufson *et al.*, 2016). En effet, une

augmentation importante de l'expression du facteur pro-apoptotique Bax ainsi que sa localisation au niveau des plaques de peptide β -amyloïdes ont été observée chez des coupes de cerveaux de patients atteints de cette maladie (MacGibbon *et al.*, 1997, J. H. Su *et al.*, 1997). Le facteur RIP1 et la nécroptose seraient également impliqués dans la mort neuronale au niveau de l'hippocampe. La molécule 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC), responsable de l'élimination du cholestérol dans le cerveau, augmente drastiquement chez les patients qui souffrent de la maladie d'Alzheimer. Or, en utilisant une lignée humaine de type neuroblastome, la présence de 24S-OHC provoque une mort cellulaire par nécroptose, mort neuronale qui est inhibée par le traitement avec Nec-1, l'inhibiteur de RIP1 (Kolsch *et al.*, 2001, Yamanaka *et al.*, 2011). De plus, une diminution de marqueurs reliés à l'Alzheimer (Tau, β -amyloïdes, mGlu2, mGlu5) et l'augmentation de l'apprentissage et de la mémoire ont été observées dans un modèle de souris pour l'Alzheimer lorsque Nec-1 était administré (Qinli *et al.*, 2013).

3.5.4 Sclérose en plaques (SEP)

La sclérose en plaques est une maladie démyélinisante et inflammatoire de la matière blanche du cerveau et de la moelle épinière accompagnée de dégénérescence axonale où la mort cellulaire touche principalement les oligodendrocytes mais également les neurones et les microglies (Buck *et al.*, 2011, Mahad *et al.*, 2015).

La mort cellulaire observée serait principalement attribuable aux facteurs RIP1, RIP3 et MLKL, tous associés à la nécroptose, tel que démontré à l'aide du modèle animal de sclérose en plaques (*Experimental autoimmune encephalitis*, EAE). De plus, des études faites à partir d'échantillons de cerveaux de patients atteints de la SEP ainsi que des cultures cellulaires d'oligodendrocytes ont également démontré le rôle potentiel de ces facteurs dans cette pathologie. En effet, une diminution de l'activité de la caspase 8, caractéristique associée à l'activation de la nécroptose, de même qu'une expression significative des facteurs RIP1, RIP3 et MLKL, ont été observées dans les lésions corticales de la matière blanche chez les patients atteints de SEP. De plus, à partir de cultures d'oligodendrocytes traitées avec le cuprizone pour détruire la myéline, une augmentation de l'expression de RIP1 a été observée, suivie par une protection importante contre la démyélinisation en présence de Nec-1. Finalement, le modèle EAE a permis de constater la faible activité de la caspase 8 ainsi qu'une augmentation de l'activité de RIP1 (Dhib-Jalbut *et al.*, 2015, Ofengeim *et al.*, 2015b). Ces données permettent

d'émettre l'hypothèse que la nécroptose et les facteurs cellulaires associés jouent un rôle dans cette pathologie.

3.5.5 Sclérose latérale amyotrophique (SLA)

La SLA, ou maladie de Lou Gehrig, est une pathologie neuromusculaire qui cible majoritairement les neurones moteurs du cerveau et de la moelle épinière, ce qui entraîne progressivement une paralysie du corps (Kanning *et al.*, 2010). Bien que peu de choses soient connues sur cette maladie, la forme héréditaire de la SLA serait reliée à la présence de mutations au niveau de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), enzyme responsable de la détoxification de radicaux libres (Clement *et al.*, 2003, Rosen *et al.*, 1993).

La dégénérescence des neurones, mais également celle des astrocytes, impliquerait également la nécroptose. En effet, à l'aide de modèles en culture cellulaire représentant les formes héréditaires et sporadiques de la maladie, plusieurs groupes de recherche ont démontré que les facteurs RIP1 et MLKL sont activés et que la présence de Nec-1 diminue considérablement la perte des neurones moteurs (Pirooznia *et al.*, 2014, Re *et al.*, 2014, H. Zhao *et al.*, 2015). Toutefois, une étude réalisée par hybridation *in situ* sur des coupes de moelles épinières de patients atteints de SLA, a démontré une diminution de l'expression de Bcl-2, un facteur anti-apoptotique, concomitante à une augmentation de l'expression du facteur pro-apoptotique Bax (Mu *et al.*, 1996). Ainsi, il est possible que l'apoptose et la nécroptose puissent jouer un rôle dans la mort des motoneurones et l'apparition de la SLA.

3.5.6 Maladie de Huntington

La maladie de Huntington est une maladie qui survient lorsqu'un individu hérite d'une mutation dominante autosomale qui provoque une répétition de poly-glutamine au niveau de la protéine Huntingtine (HTT). Ces répétitions entraînent l'agrégation des protéines HTT entre elles, ce qui entrave leur fonction qui consiste à transporter des vésicules contenant le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). Ce dysfonctionnement des protéines HTT peut éventuellement causer la mort des neurones atteints. Cette maladie assez rare se caractérise par des problèmes cognitifs et moteurs (Walker, 2007, Zuccato *et al.*, 2010).

La maladie étant rare, peu d'études ont été effectuées afin d'identifier les mécanismes inhérents à la dégénérescence observée. Toutefois, en 2011, une étude utilisant le modèle de souris transgénique (R6/2) qui développe spontanément la maladie et une lignée neuronale striatale (ST14A) qui exprime les fragments Htt, a démontré que le facteur RIP1 et la nécroptose seraient fort probablement impliqués dans la mort neuronale. En effet, les auteurs ont constaté que l'administration de Nec-1 chez les souris R6/2 ralentissait la progression de la maladie et que la présence de l'inhibiteur de RIP1 apportait une protection partielle contre la mort cellulaire de la lignée ST14A. Cependant, l'effet protecteur attribué à l'inhibition de la nécroptose reste somme toute modeste, suggérant que plus d'un mécanisme de MCR est impliqué (S. Zhu *et al.*, 2011).

3.6 Implication de la MCR suite une infection virale du SNC

Tel que mentionné à la section 1.3.4, les conséquences d'une infection virale au SNC peuvent s'avérer néfastes pour l'organisme et le virus peut devenir un agent étiologique d'une maladie neurologique, ou à tout le moins, participer à la sévérité de cette dernière. Dans certains cas, la maladie ou les symptômes neurologiques peuvent découler de l'activation de la MCR, dépendamment du pathogène, des cellules ciblées, de la zone touchée ou de l'intensité dans l'activation des processus de mort cellulaire. À ce jour, la presque totalité de la littérature scientifique portant sur les mécanismes de MCR activés au SNC suite à une infection virale a majoritairement identifié l'apoptose comme étant le mécanisme en jeu. Quoi qu'il en soit, il est évident que la caractérisation approfondie des processus de mort cellulaire suivant une infection virale au SNC permettra d'identifier l'implication d'autres MCR parmi ces maladies ou symptômes neurologiques.

Encéphalite. L'encéphalite est l'une des manifestations les plus fréquemment retrouvées lors d'une infection du SNC par un virus neurotrope. L'encéphalite, définie comme une inflammation intense d'une partie ou de l'ensemble du cerveau, peut découler de l'infection et de la propagation d'un virus à travers l'encéphale (Swanson *et al.*, 2015). Cette inflammation peut être le résultat de l'activation des divers processus inflammatoires du système immunitaire suite à la détection du virus mais peut également être la conséquence de l'activation de la MCR chez les cellules infectées. Plusieurs virus, dont les alphavirus (J. T. Jan *et al.*, 1999), le virus de la poliomyélite (Autret *et al.*, 2007), le coxsackievirus B (Feuer *et al.*, 2003), l'entérovirus 71 (Kuo *et al.*, 2002), le WNV (van Marle *et al.*, 2007), le HSV-1 (Perkins *et al.*, 2003) ainsi que le virus de la rage (Morimoto *et al.*, 1999) sont reconnus pour infecter et déclencher l'apoptose chez les

neurones, en parallèle à l'établissement d'encéphalite. Dans le cas des alphavirus, ceux-ci peuvent également causer la mort des neurones infectés indirectement par la relâche de cytokines pro-inflammatoires des cellules gliales (Schoneboom *et al.*, 2000) ou par une exacerbation de l'excitotoxicité glutamatergique (Nargi-Aizenman *et al.*, 2001).

Myélite. L'inflammation de la moelle épinière, également appelée myélite, peut aussi faire intervenir la MCR, dépendamment du virus. La présence du WNV à la moelle épinière et l'infection des neurones dans cette région alimentent l'inflammation (Morrey *et al.*, 2008). L'activation d'une MCR peut également avoir des conséquences différentes dépendamment du type cellulaire infecté. L'infection des oligodendrocytes par le coronavirus murin MHV provoque également la mort de ces cellules par apoptose, ce qui entraîne la perte de myéline autour des neurones (Y. Liu *et al.*, 2006, Schwartz *et al.*, 2002). Le virus JC infecte également les oligodendrocytes mais la dégénérescence de ces cellules par apoptose s'effectue uniquement suite à un état immunodéprimé de l'hôte infecté (Swanson *et al.*, 2015).

Encéphalomyélite. Dans le cas d'une inflammation du cerveau ainsi que de la moelle épinière, on parle alors d'encéphalomyélite. Le virus Sindbis, un alphavirus transmis à un hôte par un moustique infecté, infecte les neurones et provoquent la mort neuronale (Griffin, 2011). Bien que les mécanismes de mort cellulaire ne soient pas élucidés, la mort des neurones infectés, de même que la présence du virus au SNC participe à l'établissement des processus inflammatoires et de la pathologie (Griffin, 2016). L'infection de neurones par le virus TMEV déclenche également la mort neuronale, potentiellement par apoptose et/ou nécroptose, contribuant ainsi à la pathologie inflammatoire (Jelachich *et al.*, 1996, Son *et al.*, 2015).

Troubles neurocognitifs associés au VIH. Même si le VIH n'infecte pas les neurones, la présence de certaines protéines virales (gp120, tat) est associée à la dégénérescence neuronale observée sur des cultures neuronales de rats (Chi *et al.*, 2011, C. Xu *et al.*, 2011) ou humaines (Y. Zhang *et al.*, 2012, Q. Zhu *et al.*, 2015). L'activation de cette mort neuronale, possiblement par apoptose, serait également l'une des causes des troubles neurocognitifs associés au VIH. Ces troubles neurologiques comprennent la démence, l'encéphalopathie, des problèmes de mémoire et de concentration (Jones *et al.*, 2006).

4. CONCLUSION

Le coronavirus humain HCoV-OC43 a démontré qu'il ne se limite pas à être seulement un virus respiratoire mais est également capable d'opportunisme en infectant le SNC. Considérant que la neuroinvasion et le neurotropisme du virus HCoV-OC43 ne sont plus à démontrer, il n'en reste pas moins à établir la relation entre la neurovirulence et l'infection au SNC. L'importance de l'infection au SNC par HCoV-OC43 pourrait jouer un rôle dans l'apparition ou accentuer la sévérité des maladies neurodégénératives et neuroinflammatoires. D'ailleurs, certaines mutations retrouvées dans la glycoprotéine S, acquises suite à une infection persistante de lignées neurales humaines, ont permis au virus mutant d'être davantage neurovirulent en modèle murin et de provoquer une mort cellulaire plus importante des neurones en cultures cellulaires. Sachant que le virus HCoV-OC43 provoque la mort cellulaire des neurones infectés, la caractérisation du ou des mécanisme(s) ainsi que les facteurs associés ont été le cœur de ce projet. Les résultats de notre étude, présentés dans cette thèse, ont permis d'établir que l'apoptose ne joue pas de rôle prépondérant dans la mort des neurones, même si cette voie semble initialement activée. Dans notre modèle cellulaire, la nécroptose, une voie de mort cellulaire encore méconnue, semble être davantage impliquée. D'une part, l'activation de ce processus semble être une réponse neuronale à l'infection pour limiter la réplication et la propagation virale dans l'optique éventuelle à protéger l'ensemble du SNC. D'autre part, le suicide cellulaire pourrait également contribuer à une importante perte neuronale et la mise en place d'un environnement inflammatoire qui accentuent les neuropathologies suivant l'infection du SNC par le coronavirus HCoV-OC43.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Le coronavirus humain HCoV-OC43 est un pathogène respiratoire qui possède également des propriétés neuroinvasives et neurotropes puisqu'il est en mesure d'infecter le SNC à partir de la périphérie en infectant principalement les neurones, autant chez l'humain que chez la souris. Alors que le virus de référence est aussi neurovirulent en causant des encéphalites chez le modèle murin, la souche possédant les deux mutations H183R et Y241H, localisées dans la glycoprotéine S, acquises lors d'infections persistantes de cultures neurales humaines, provoque une augmentation de la mort cellulaire en cultures cellulaires. La relation entre la neurovirulence et la mort neuronale induite par le virus n'est pas établie de même que les mécanismes de mort cellulaire régulée (MCR) ne sont pas caractérisés.

Ainsi, considérant le caractère neuroinvasif, neurotrophe et neurovirulent du virus HCoV-OC43 et que la réponse neuronale à l'infection se traduit par une mortalité importante des neurones, nous avons émis l'hypothèse que la réponse neuronale pourrait se traduire notamment par l'activation de divers mécanismes de MCR pouvant accentuer les neuropathologies.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons établi, d'une part, l'importance des mutations dans la protéine S du virus mutant dans la neurovirulence chez le modèle murin. D'autre part, en comparant le virus de référence au virus mutant, nous avons utilisé deux modèles de cultures neuronales (murines et humaines) afin d'identifier les facteurs cellulaires impliqués dans la mort neuronale et de mieux comprendre les mécanismes en jeu.

CHAPITRE II : PUBLICATION

**Pivotal role of RIP1 and MLKL in neuronal cell death
induced by the human neuroinvasive coronavirus OC43**

Mathieu MEESEN-PINARD¹, Alain LE COUPANEC¹,
Marc DESFORGES^{1#} and Pierre J. TALBOT^{1#}

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

Running title: RIP1&MLKL-dependent neuron death after HCoV infection

Keywords: Coronavirus, Human Coronavirus, Human Coronavirus OC43, Regulated
cell death, Necroptosis, RIP

Word count: Abstract: 225 words Text: 7 147 words

Co-correspondent footnote:

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

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

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

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

RÉSUMÉ

Les coronavirus humains (HCoV) sont des pathogènes respiratoires qui possèdent des propriétés neuroinvasives, neurotropes et neurovirulentes, ce qui illustre l'importance d'étudier l'implication possible de ces virus dans les maladies neurologiques. La souche OC43 (HCoV-OC43) induit la mort neuronale, ce qui peut contribuer à la neuropathogénèse. Ici, nous avons démontré que le virus HCoV-OC43 ayant deux mutations ponctuelles parmi la glycoprotéine S (rOC/U_{s183-241}) est davantage neurovirulent en souris comparativement au virus de référence (rOC/ATCC) et induit davantage de mortalité cellulaire parmi les modèles de cultures neuronales humaines et murines. Afin d'évaluer le rôle de la mort cellulaire régulée (MCR) dans la neuropathogénèse induite par HCoV-OC43, nous avons évalué si l'inhibition de Bax, un facteur régulateur dans l'apoptose, ou RIP1, un facteur régulateur dans la nécroptose, a affecté le pourcentage de mortalité neuronale après infection avec le virus HCoV-OC43. Nous avons trouvé que l'apoptose liée au facteur Bax ne joue pas de rôle significatif durant la MCR suivant l'infection étant donné que l'inhibition d'expression de ce facteur par ARN interférent ne confère pas de protection cellulaire contre la mort cellulaire. Cependant, nous avons démontré que les facteurs RIP1 et MLKL sont impliqués dans la mort neuronale puisque l'inhibition de l'expression de RIP1 par ARNi et MLKL par un inhibiteur chimique a augmenté la survie cellulaire. Ensemble, ces résultats indiquent que RIP1 et MLKL contribuent à la mort cellulaire par nécroptose après infection avec HCoV-OC43 afin de réduire la réplication virale. Cependant, cette MCR pourrait mener à une perte neuronale au SNC de la souris et accentuer les processus inflammatoires, ce qui se répercute dans la sévérité de la neuropathogénèse.

ABSTRACT

Human coronaviruses (HCoV) are respiratory pathogens with neuroinvasive, neurotropic and neurovirulent properties, highlighting the importance to study the potential implication of these viruses in neurological diseases. The OC43 strain (HCoV-OC43) was reported to induce neuronal cell death which may participate in neuropathogenesis. Here, we show that HCoV-OC43 harboring two point mutations in the spike glycoprotein (rOC/U_{s183-241}) was more neurovirulent than the wild-type HCoV-OC43 (rOC/ATCC) in mice and induced more cell death in murine and human neuronal cells. To evaluate the role of regulated cell death (RCD) in HCoV-OC43-mediated neural pathogenesis, we determined if knockdown of Bax, a key regulator of apoptosis, or RIP1, a key regulator of necroptosis, altered the percentage of neuronal cell death following HCoV-OC43 infection. We found that Bax-dependent apoptosis did not play a significant role in RCD following infection, as inhibition of Bax expression mediated by RNA interference did not confer cellular protection against the cell death process. On the other hand, we demonstrated that RIP1 and MLKL were involved in neuronal cell death as RIP1 knockdown and chemical inhibition of MLKL significantly increased cell survival after infection. Taken together, these results indicate that RIP1 and MLKL contribute to necroptotic cell death after HCoV-OC43 infection to limit viral replication. However, this RCD could lead to neuronal loss in the mouse CNS and accentuate the neuroinflammation process reflecting the severity of neuropathogenesis.

IMPORTANCE OF THE STUDY

Because they are naturally neuroinvasive and neurotropic, human coronaviruses are suspected to participate in the development of neurological diseases. Given that the strain OC43 is neurovirulent in mice and induces neuronal cell death, we explored the neuronal response to infection by characterizing the activation of RCD. Our results revealed that classical apoptosis associated with the Bax protein is not playing a significant role in HCoV-OC43-induced neuronal cell death and that RIP1 and MLKL, two cellular proteins usually associated with necroptosis (a RCD back-up system when apoptosis is not adequately induced), both play a pivotal role in the process. As necroptosis disrupts cellular membranes and allows the release of damage-associated molecular patterns (DAMP) and may induce the production of pro-inflammatory cytokines, it may represent a pro-inflammatory cell death mechanism that contributes to excessive neuroinflammation and neurodegeneration and eventually to neurological disorders after a coronavirus infection.

INTRODUCTION

Human coronavirus (HCoV) are largely associated with common cold whereas elders, newborns, infants or immune-compromised individuals are more susceptible to develop severe lower respiratory infection such as pneumonia or bronchitis (Vabret *et al.*, 2009). Over the years, evidence has accumulated to support the idea that HCoV can act as opportunistic pathogens that can be associated with other pathologies, including neurological disorders (Arabi *et al.*, 2015, Forgie *et al.*, 2009, McGavern *et al.*, 2011, Riski *et al.*, 1980, Yeh *et al.*, 2004). Moreover, HCoV-OC43 has recently been detected in the brain of an immunodeficient child who died from fatal encephalitis (Morfopoulou *et al.*, 2016).

Like its murine counterpart, mouse hepatitis virus (MHV), which is recognized to induce neurological disorders in mice models (Buchmeier *et al.*, 1987, Hosking *et al.*, 2010), we have previously demonstrated that the human coronavirus strain OC43 (HCoV-OC43) possesses neuroinvasive and neurotropic properties that allow the virus to invade, spread and persist within the murine central nervous system (CNS) where neurons represent the main target during the acute phase of infection (Jacomy *et al.*, 2006, Jacomy *et al.*, 2003). Furthermore, HCoV-OC43 is also naturally neuroinvasive in humans as RNA was detected in human brain samples of patient suffering neurological diseases such as Alzheimer's, Parkinson's disease, multiple sclerosis and in controls (Arbour *et al.*, 2000). Furthermore, we have previously demonstrated that HCoV-OC43 has the capacity to induce neuronal cell death (Favreau *et al.*, 2009, Jacomy *et al.*, 2006) associated with the induction of the unfolded protein response (UPR) and ER stress, as well as degeneration of neurons (Brison *et al.*, 2011, Brison *et al.*, 2014, Favreau *et al.*, 2009,

Favreau *et al.*, 2012, Jacomy *et al.*, 2010). However, the exact underlying mechanism of neuronal cell death induced during HCoV-OC43 infection remains poorly understood and its involvement in neuropathogenesis is still unclear.

Regulated cell death (RCD) represents a large homeostasis system that controls several aspects of a cell life (Linkermann *et al.*, 2014). One of these roles may be considered as a defense mechanism against viral infection in order to control or limit propagation and protect the entire organism (Galluzzi *et al.*, 2008, Upton *et al.*, 2014). Different RCD pathways are now identified based on biochemical features in order to improve our understanding of cell response to stress (Galluzzi *et al.*, 2012). The most known and studied form of RCD is caspase-dependent apoptosis, characterized by extracellular stress signals sensed by receptors (extrinsic apoptosis) or intracellular stress (intrinsic apoptosis), which activates specific cellular factors, including caspase-8 and the pro-apoptotic Bax protein, which converge to trigger the activation of downstream effector caspases (Lettau *et al.*, 2011, Seol *et al.*, 2001, Wajant *et al.*, 2003). More recently, necroptosis, another form of RCD, has gained attention as this regulated necrosis independent of caspases can act to replace classical apoptosis pathways (Feoktistova *et al.*, 2012). Necroptosis often involves attachment of TNF α to its receptor (TNFR1) on the cell surface, which can induce a downstream death signal characterized by a core component composed of receptor-interacting protein kinase 1 (RIP1) and RIP3 interacting with each other (Meylan *et al.*, 2005). In the case where caspase-8 activity is somehow abrogated, RIP1 can interact with RIP3 and the complex is activated by phosphorylation (Y. S. Cho *et al.*, 2009, Christofferson *et al.*, 2012, Dunai *et al.*, 2011, Y. Y. Zhang *et al.*, 2013). The RIP1-RIP3 complex then participates in the cell-membrane disruption mediated by the

phosphorylated form of mixed lineage kinase domain-like (MLKL) and ultimately in cell death (Baines, 2010, Cai *et al.*, 2014, X. Chen *et al.*, 2014).

In the present study, we sought to further investigate the underlying mechanisms of HCoV-OC43-induced neuronal cell death after infection, by identifying cellular factors involved in the different pathways associated with RCD and their potential association with neuropathogenesis during a CNS infection. Overall, the global portrait suggests that Bax-dependent apoptosis is not significantly involved during infection of human neuronal cells by HCoV-OC43, but that necroptosis, which involves RIP1 and MLKL, seems to play a central role in the regulation of neuronal cell death in order to limit viral replication and propagation.

MATERIALS AND METHODS

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

Cell lines, viruses and reagents. The human neuroblastoma LA-N-5 cell line (a kind gift from Dr Stephan Ladisch, George Washington University School of Medicine, USA) was routinely cultured at 37°C with 5% CO₂ in RPMI (Life Technologies) supplemented with 15% (vol/vol) of fetal bovine serum (FBS, GE Healthcare), 10 mM HEPES, 1 mM Sodium Pyruvate (NaPy) and 100 µM nonessential amino acids (Life Technologies). The LA-N-5 cells were differentiated into neurons as previously described (Favreau *et al.*, 2009, Hill *et al.*, 1998) for all experiments. Briefly, cells were seeded in RPMI supplemented with 15% (vol/vol) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM NaPy, 100 µM non-essential amino acids and the next day and every two days for a period of 6 days, 10 µM all-trans retinoic acid (Sigma-Aldrich) was added to the same medium supplemented with 10% (vol/vol) of FBS. The HRT-18 cells (kind gift from the late David Brian, University

of Tennessee) were cultivated in minimal essential medium alpha (MEM-alpha, Life Technologies) supplemented with 10% (vol/vol) FBS.

The recombinant wild-type (wt) reference HCoV-OC43 (rOC/ATCC) virus and the recombinant mutant HCoV-OC43 virus (rOC/US₁₈₃₋₂₄₁), containing two point mutations within the S spike glycoprotein (H183R and Y241H), were generated using full-length cDNA clone as previously described (Favreau *et al.*, 2009, St-Jean *et al.*, 2006a). LA-N-5 cells were infected at a multiplicity of infection (M.O.I.) of 0.2 during two hours at 37°C for adsorption and then incubated with RPMI supplemented with 2.5% (vol/vol) FBS for indicated time post-infection. For infection of LA-N-5 cells with the wild-type Indiana strain of Vesicular Stomatitis Virus (VSV), a MOI of 1 was used and viruses were incubated in a minimal volume for 1h at 37°C. The media was replaced by RPMI with 2.5 % (vol/vol) FBS and then cells were incubated at the indicated times.

Staurosporine (STS) was purchased from Sigma-Aldrich and used to treat LA-N-5 cells at a final concentration of 500 nM and incubated overnight at 37°C. Necrosulfonamide (NSA) was purchased from Abcam and used at 2 µM.

Mice, survival curve, body weigh variation and evaluation of clinical scores.

Twenty-two day-old female BALB/c mice (Charles River) were inoculated by the intracerebral route with $10^{2.5}$ Tissue Culture Infective Dose (TCID)₅₀ of wt or mutant virus, as previously described (Jacomy *et al.*, 2010). Groups of 10 mice were subjected to observation on a daily basis for survival and body weight variations over a period of 22 days post-infection. Clinical scores were evaluated using a scale with 4 distinctive levels, as previously described (Le Coupanec *et al.*, 2015). Briefly, asymptomatic mice were classified as number 0; 1 for mice symptoms of abnormal flexion of the four limbs; 2 for

mice presenting social isolation, ruffled fur and hunched backs and number 3 was attributed to mice that were in moribund state or dead.

Primary cultures of mouse CNS. Embryos at 14 to 16 days of gestation were removed from pregnant anesthetized CD1 mice. The cortex and hippocampus of the embryonic pup brains were harvested and placed in Hanks balanced salt solution (HBSS) medium, without Ca^{2+} and Mg^{2+} , supplemented with 1.0 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES buffer. The tissues were incubated in 5 ml of solution of HBSS and trypsin-EDTA 0.5% (ratio 10:1 respectively) for 15 min at 37°C with gentle tilting to mix. After digestion, the tissues were washed 5 minutes three times with HBSS, and the medium was removed and replaced by fresh HBSS medium (without Ca^{2+} and Mg^{2+} , supplemented with 1.0 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES buffer). Tissues were gently pipetted up and down with a Pasteur pipette to dissociate the cells. After a decantation step of 5 min at room temperature, supernatants were then transferred into a 50 ml tube with 36 mL of neurobasal medium (Life Technologies) supplemented with 0.5 mM GlutaMAX-I (Life Technologies), 10 mM HEPES buffer, B27 supplement (Life Technologies), gentamycin and 10% of Horse serum. This step was realized twice to increase the final amount of cells. Cells were then seeded at approximately 1×10^5 cells/cm² and grown on collagen-poly-D-lysine (3:1 for a final concentration at 50µg/mL)-treated glass coverslips for immunofluorescence assay in the same medium, which was replaced by fresh neurobasal medium without horse medium the next day. The medium was changed every 2 days after and the cultures were ready for infection after 7 days in culture. For experiments where RNA/proteins or virus was harvested, cells were seeded without glass coverslips in 24 or 6-well plates respectively.

Cell viability assay. Cell viability of LA-N-5 cells was monitored using PrestoBlue (Life Technologies) through reduction of resazurin-like reagent according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were plated at 2.5×10^3 per well, grown and differentiated with all-trans retinoic acid (Sigma-Aldrich) in Cell+ 96-well plates (Starstedt). After indicated time post-infection, PrestoBlue was added in each well and optical density read as subtraction from 570nm-600nm every hour for three hours with a microplate reader (Bio-Rad). Cell viability was determined according to slope regression analysis for each sample and compared to the slope from mock-infected cells. Cell viability of murine primary cultures of CNS was monitored using the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide dye (MTT assay) following the manufacturer's instruction (Roche). Briefly, after indicating time post-infection, 50 μ l of MTT labeling reagent were added in primary cultures of mouse CNS seeded in 24-well plates containing 500 μ l of NeuroBasal medium. After incubation of cells at 37°C for 1 h, 550 μ l of MTT solubilisation buffer were added in each wells and then incubated at 37°C for 18 h. From each well of the 24-well plate, 200 μ l were transferred in 5 new wells of 96-well plates and the OD was measured in replicates at 570 nm using a microplate readers (Bio-rad).

Quantification of infectious virus production by IPA. Indirect immunoperoxidase assay (IPA) was performed to evaluate viral production as free virus (in the cell culture medium) and as cell-associated virus, as previously described (Lambert *et al.*, 2008). Briefly, serial dilution of infected LA-N-5 cells supernatant (free virus) or frozen/thawed whole cell lysates (cell-associated virus) were added on HRT-18 cells seeded in 96-well plates and incubated at 37°C with 5% CO₂ for four days. The cells were

washed once with PBS and fixed with methanol containing 0.1% v/v hydrogen peroxide. The primary antibody was the mouse mAb 4.3E4 (1/2) added to each well to detect viral S glycoprotein and incubated at 37°C with 5% CO₂ for two hours then washed three times with PBS. The cells were then incubated with the goat anti-mouse secondary antibody (KPL) conjugated with horseradish peroxidase at 37°C without CO₂ for two hours and washed again with PBS three times. Immune complexes were detected with 0.2 mg/ml of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich) and 0.01% hydrogen peroxide (H₂O₂) in PBS. Viral titers were analyzed by the Karber method, as previously described (Lambert *et al.*, 2008).

RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative PCR. Total RNA from cells was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Total RNA quantification was determined using a Nanodrop N-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) and cDNA synthesis was performed using the Superscript III First-Strand kit (Life Technologies) with 2 µg of RNA according to the manufacturer's instructions. Detection and quantification of gene expression of each gene of interest were performed using specific primers and the SsoFast EvaGreen Supermix (BIORAD). PCR products were detected and quantified using the Rotor-Gene 6000 quantitative real-time PCR (qPCR) instrument (Corbett Life Science).

Protein extraction and Western Immunoblotting. Total proteins were extracted from whole cell lysates in Petri dishes (cells kept on ice) with cell scraper (Sarstedt) and washed with 5 ml of PBS. Cells were centrifuged at 3500 rpm for 5 min at 4°C and washed once with 1 ml of PBS. The cells were transferred to a microtube and centrifuged again at 3500 rpm for 5 min at 4°C and the pellet was resuspended in RIPA buffer (0.15

mM NaCl, 1% (vol/vol) Nonidet P-40, 0.5% (wt/vol) deoxycholate, 0.1% (wt/vol) SDS and 0.05 M Tris pH 8.0) containing fresh Protease inhibitor cocktail set I (Calbiochem). Cell lysates were incubated on ice for 20 minutes and centrifuged at 14 000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatants were transferred to a new tube and conserved at -80°C for further analysis.

Protein concentrations were measured using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Novagen) according to the manufacturer's protocol. Equal amounts of proteins were subjected to Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 10% or 4-15% Criterion XT Precast gels (BIORAD) and then transferred to Polyvinyl difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad) with a trans-Blot semidry transfer cell apparatus. The membranes were blocked for one hour at room temperature (RT) with 5% wt/vol nonfat milk in Tris-Buffered saline containing 0.1% (vol/vol) Tween 20 (TBS-T) and incubated with TBS-T containing primary antibodies with 5% (wt/vol) nonfat milk at 4°C overnight. Western blots were performed for detection of Bax, RIP1, RIP3 and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins using rabbit anti-human Bax antibody (1/2000; sc-493, Santa Cruz Biotech), mouse anti-human/mouse RIP1 antibody (1/2000; clone38, BD Biosciences), rabbit anti-human RIP3 antibody (1/2000; 27-361, ProSci) and rabbit anti-human GAPDH antibody (1/10 000; sc-25778, Santa Cruz Biotech) as primary antibodies respectively. The membranes were washed three times with TBS-T at RT for 5 min before being incubated with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (GE Healthcare) coupled to horseradish peroxidase (HRP) for 1 h at RT. After three washes, the bands were visualized by chemiluminescence using the Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) and loading was normalized to the housekeeping protein GAPDH.

Lentivirus production, transduction, overexpressing clones and generation of knock-down LA-N-5 cell populations. Lentiviral pseudoparticles used for gene silencing were produced following transfection of HEK293T cells with pLP1, pLP2, pVSV-G (Sigma-Aldrich) and short hairpin RNA (shRNA) vectors. The Mission pLKO.1 shRNA vector against Bax (shRNA #1: TRCN0000312626, shRNA #2: TRCN0000312627), RIP1 (shRNA #1: TRCN00000705, shRNA #2: TRCN00000709) and the control shRNA (non-target shRNA) were purchased from Sigma-Aldrich. Overall, 5×10^6 cells were plated in petri dishes pre-coated with sterile PBS containing gelatin 0.1% (vol/vol). Then, cells were co-transfected with 6 μg of each vectors per petri dish and Lipofectamine 3000 (Life Technologies) according to manufacturer's protocol. After 5 h, the medium was replaced by DMEM supplemented with 10% (vol/vol) FBS and then incubated for 96 h at 37°C with 5% CO_2 . The supernatant was harvested and lentiviral pseudoparticles were concentrated using the Lenti-X Maxi Purification Kit (Clontech) before being purified and eluted in sterile PBS with PD-10 columns according to manufacturer's protocol (GE Healthcare).

For the transient knock-down of RIP1 expression, LA-N-5 cells were differentiated into neurons with retinoic acid for 6 days and lentiviral pseudoparticles were added to a MOI of 10. After 24 h, the medium was replaced with RPMI containing retinoic acid to complete the differentiation and the cells were incubated for another 48 h before proceeding to infection with HCoV-OC43.

For stable Bax knock-down, undifferentiated LA-N-5 cells were transduced with Bax lentiviral pseudoparticles and cell populations were selected with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin after 24h in RPMI supplemented with 20% (vol/vol) FBS. A population of LA-N-5 cells

transduced with empty vector (EV) selected as previously described were used as reference cells. All populations of Bax knock-down LA-N-5 cells were maintained in RPMI 15% FBS supplemented with 1 $\mu\text{g/ml}$ puromycin during all experiments. The expression level of Bax in all populations was analyzed by qPCR and western blots.

Immunofluorescence/Immunohistochemistry. For immunofluorescence assay, cells were washed with sterile PBS then fixed with 4% wt/vol paraformaldehyde (PFA, Fisher) for 30 min at RT. After another washing with PBS, cells were permeabilized with 100% methanol at -20°C for 5 min and washed once again with PBS. Cells were incubated with different primary antibodies: mouse anti-spike HCoV-OC43 protein (1-10.C3) monoclonal antibody (1/2; hybridoma supernatant), polyclonal rabbit anti-S protein of the bovine coronavirus (BCoV; 1/1000), monoclonal mouse anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2) antibody (1/1000; 556320, BD Biosciences), polyclonal rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (1/1000; Z0334, Dako), rabbit anti-MLKL (1/200; M6687, Sigma-Aldrich) or rabbit anti-phosphorylated MLKL (1/200; EPR9514, Abcam) for 1 hour at RT and then washed three times with PBS. Cells were incubated for 1 hour at RT with secondary antibodies (Life Technologies) anti-mouse AlexaFluor 488 (1/1000), anti-rabbit AlexaFluor 488 (1/1000), anti-mouse AlexaFluor 647 (1/1000) or anti-mouse AlexaFluor 568 (1/1000) and then washed three times with PBS. Nucleus were detected with 4', 6'-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) for 5 min at RT and washed once with PBS. For experiments of non-permeabilized LA-N-5 cells, antibodies were diluted in cold media (RPMI 5% FBS) and added on chilled cells on ice for 1 hour before been washed twice with cold media. Then, ice-cold cells were incubated with secondary antibody diluted in cold media for 1 hour, washed and fixed in PFA 4% for 20 min at RT.

For Immunohistochemistry (IHC), mice infected (wt or mutant virus) or not (sham) were perfused with 4% wt/vol PFA and whole brain were carefully harvested from mice infected at 5, 7 and 9 days after intracerebral injection of each virus. Brain tissues were sectioned using a vibratome (VT1000E, Leica) to yield 60- μ m sections. Prior to staining, sections were incubated with a solution of two droplets of H₂O₂ in PBS for 10 min at RT and washed with PBS. Sections were then blocked with a solution of PBS containing 1 droplet of horse normal serum according to the manufacturer's protocol (ABC kit Vectastain, Vector Laboratories) for 1 hour at RT. Tissue sections were incubated with primary antibodies for detection of N protein (1/1000; ascites fluid of the 4-E11.3 hybridoma) and activated astrocytes (1/1000; rabbit anti-glial fibrillary acidic protein antibody (GFAP), Dako) overnight at 4°C. Tissue sections were washed with PBS three times and then incubated with secondary biotinylated antibody against mouse immunoglobulin G before revealing with ABC Vectastain kit.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using SimStat or XLSTAT software. Data are represented as mean \pm SD. For experiments on mice, statistical significance for survival curves was analyzed using Kaplan-Meier followed by a post-test Log-rank (Mantel-Cox) and weight variation was analyzed with Kruskal-Wallis followed by Tukey's post hoc test. For cell experiments, statistical analysis were conducted by student T test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test.

RESULTS

rOC/U_{s183-241} is more neurovirulent than rOC/ATCC in mice despite a similar production of infectious viral particles in the CNS. We have previously shown that HCoV-OC43 infection leads to human neuronal cell death (Favreau *et al.*, 2009) and that a variant harboring two point mutations in the viral spike (S) glycoprotein (rOC/U_{s183-241}) showed a significant increase in virus-induced neuronal cell mortality compared to the reference variant (rOC/ATCC) (Favreau *et al.*, 2012). Some other variants of HCoV-OC43 were shown to have different levels of neurovirulence in infected mice. However, the relationship between neuronal cell death and neurovirulence remains poorly understood. In order to evaluate the neurovirulence of HCoV-OC43, we compared 22-day-old BALB/c mice infected by the intracerebral route (IC) with the wild-type (wt, rOC/ATCC) or the mutant virus (rOC/U_{s183-241}), the latter known to increase cell death of the infected human neuronal cell lines LA-N-5 (13). Neurovirulence of both viruses was monitored by survival curves, as already reported (Brison *et al.*, 2011), but weight loss and clinical scores of neurological symptoms (Le Coupanec *et al.*, 2015) were also evaluated and all these parameters indicated that the S mutant virus rOC/U_{s183-241} was more neurovirulent than the wt virus rOC/ATCC (Fig. 12A-C). Although we observed multiple clinical signs related to encephalitis for both viral infection as seen by social isolation, abnormal flexion of the four limbs, ruffled fur and hunched back, most of all mice infected by the mutant virus presented four levels of clinical scores more rapidly (Fig. 12C) and eventually a higher mortality rate compared to mice infected by the reference virus. To determine whether the difference in neurovirulence observed between rOC/U_{s183-241} and rOC/ATCC was related to viral replication in the CNS, we measured

infectious viral particles in brain and spinal cord every 2 days over a period of 22 days (Fig. 12D). Titers of infectious particles in the brain were the same for both viruses although rOC/U_{s183-241} could be cleared more rapidly than the wild-type virus as observed at 9 dpi (Fig. 12D, left panel). Similar to the brain, infection of the spinal cord by both viruses resulted in a similar production of viral particles, however the mutant virus replicated more rapidly in the spinal cord (Fig. 12D, right panel). Altogether, these results indicate that rOC/U_{s183-241} was more neurovirulent than the reference virus in mice infected after IC inoculation.

Viral dissemination and astrocyte activation are more important following rOC/U_{s183-241} infection compared to rOC/ATCC. Hippocampus is one of the first regions where HCoV-OC43 spreads in the mouse CNS (Jacomy *et al.*, 2010). Histological examination revealed that rOC/U_{s183-241} reached this portion of the brain faster than rOC/ATCC for which no antigens were observed before 7 dpi (Fig. 13A). The infection with either virus showed similar disseminated pattern in other regions of the brain such as olfactory bulb and cortex (data not shown). As both viruses spread within the CNS, astrogliosis, considered as a marker of inflammation, was also investigated and was detected in the hippocampus (Fig. 13B). Both viruses induced a mild and similar activation of astrocytes at 5 dpi however, unlike the reference virus, infection with the S mutant virus maintained a moderate activation of astrocyte until 7 dpi.

rOC/U_{s183-241} disseminates more rapidly than rOC/ATCC virus in neuronal cell cultures. In order to study the link between the neurovirulent properties and neuronal cell-death induced by either rOC/U_{s183-241} or rOC/ATCC, we compared two neuronal cell culture models. To establish whether the murine mixed primary CNS cultures and human

LA-N-5 cells were susceptible at the same rate to the infection between rOC/ATCC and rOC/U_{s183-241}, the kinetics of viral spread were evaluated by immunofluorescence up to 48 hpi (Fig. 14). In murine primary cultures of CNS, the mutant virus spread more rapidly than the wild-type virus in neurons as seen at 16 and 24 hpi (Fig. 14A). Although neurons are the primary target of infection in murine primary cultures, astrocytes were also infected later during infection by both viruses (data not shown). As observed in Fig. 14B, the mutant virus also spread more rapidly than the wt virus in LA-N-5 cells up to 32 hpi, a time when LA-N-5 cultures were almost all infected by rOC/U_{s183-241} compared to approximately only 50% infection by the wt virus. The difference in viral spread is similar to those observed by histological examination in the CNS of infected BALB/c mice (Fig. 13A).

rOC/U_{s183-241} infection increases neuronal cell death in correlation with more infectious particles production. Given that the S-mutant virus was more neurovirulent and was able to spread faster than the wt virus in the mouse CNS and in neuronal cell cultures, we sought to evaluate whether the neuropathogenesis could be related to neuronal cell death. Even though both viruses induced cell death in murine mixed primary cultures of CNS and human LA-N-5 cells, the mutant virus was significantly more cytotoxic compared to wt virus as seen in Fig. 15A and 15B, respectively. The production of infectious viral particles in cell culture medium (free virus) was significantly higher for mutant virus in LA-N-5 cells whereas no difference was observed in primary cultures (Fig. 15C and 15D, upper panel), however, there was a significant increase of cell-associated infectious particles production for rOC/U_{s183-241} compared to rOC/ATCC virus for both types of cell cultures (Fig. 15C and 15D, lower panel). Taken together, these

results indicate that for both neuronal cell cultures, the infection with the mutant virus produced more infectious particles that led to an increase in neuronal cell death compared to the infection with the wild-type virus.

Bax-dependent apoptosis does not play a significant role in neuronal cell death following HCoV-OC43 infection. To push further our understanding of the difference in cytotoxicity between viruses (Fig. 15 and ref 14) and to further characterize the neuronal response associated with RCD after infection, we sought to identify which cellular factors were involved in both neuronal cell models and to evaluate their relative importance after infection by either virus. Bax-dependent apoptosis is one of the best described cell death pathway and we have previously reported that Bax was relocated to mitochondria after HCoV-OC43 infection (Favreau *et al.*, 2012). As the regulation of this pro-apoptotic factor can also be at the transcriptional level (Miyashita *et al.*, 1994, Miyashita *et al.*, 1995), we evaluated its mRNA level and found that infection induced a significant increase in Bax gene expression between 48 hpi and 72 hpi for both viruses (Fig. 16A). Infection with the mutant virus led to a significantly higher increase in Bax gene expression compared to the wt virus, which correlated with the induction of a stronger induction of neuronal mortality in both neuronal cell cultures (Fig. 15A and 15B). On the other hand, the level of Bax protein remained stable and did not correlate with the increase in mRNA (Fig. 16B).

Since neuronal response to infection led to an increased expression of the Bax gene and mostly because we already showed that the corresponding protein was relocated to the mitochondria (Favreau *et al.*, 2012), we sought to evaluate the role of this factor in neuronal cell death. Interestingly, even the most efficient knockdown of Bax expression

(Fig. 17A; population shRNA Bax #1) did not protect LA-N-5 cells from damages induced by rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} infection at 48 hpi compared to control as seen by the same cytopathic effect (rounding of cells and loss of axon indicated by arrowheads and arrows respectively) (Fig. 17B, left panels). In order to verify the functionality of the Bax protein, we assessed the morphology of LA-N-5 cells in the presence of staurosporine (STS) or infected by Vesicular Stomatitis Virus (VSV), both known to induce apoptosis through a Bax-dependent cell death pathway (Sharif-Askari *et al.*, 2007, W. Xu *et al.*, 2015). Knockdown of Bax expression with the shRNA #1 abolished the cytopathic effect induced by STS or VSV as seen at 24 hpi and reduced the retractions of axons and dendrites (Fig. 17B, right panels) whereas the protection of neurons was moderate for population shRNA #2 (mild inhibition of Bax expression) following treatment with STS or VSV (data not shown). In order to quantify the apparent absence of cellular protection in populations infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241}, we measured cell viability and confirmed that Bax knockdown did not confer any protection against neuronal cell death induced during HCoV-OC43 infection (Fig. 17C) even though this knockdown led to a strong protection against neuronal cell death induced by STS or VSV at 24 hpi in a dose-dependent manner compared to the control population (Fig. 17D). Together, these results indicate that the pro-apoptotic factor Bax seems functional in the LA-N-5 neuronal cells but does not play a significant role in HCoV-OC43-induced neuronal cell death.

HCoV-OC43 infection induces an increase in RIP1 and RIP3 gene expression.

To further investigate RCD following coronavirus infection of neuronal cells and again evaluate whether there was a difference between viruses, we explored the possible involvement of receptor-interacting protein kinase 1 and 3 (RIP1 and RIP3) (Y. S. Cho *et*

al., 2009, Vanlangenakker *et al.*, 2012) largely associated with necroptosis and potentially involved in neurological diseases or viral infections (Degterev *et al.*, 2005, King *et al.*, 2014, Mack *et al.*, 2008, Upton *et al.*, 2012). In murine primary cultures of CNS, an increase in RIP1 (Fig. 18A, upper panel) or RIP3 mRNA (Fig. 18A, lower panel) was detectable at 48 hpi for both viruses compared to mock-infected cultures even though rOC/U_{s183-241} infection tended to transcribe more RIP1 and RIP3 mRNA. On the other hand, there was no significant increase in the level of corresponding proteins following infection with either virus, compared to mock-infected, in murine primary cultures of CNS (Fig. 18C). In LA-N-5 cells, an increase in RIP1 and RIP3 mRNA was observed for mutant infection compared to mock-infected whereas the wild-type virus infection induced a modest increase in RIP1 gene expression only (Fig. 18B). Surprisingly, our results of Western immunoblotting showed that the amount of the RIP1 protein did not increase following wt or mutant infection compared to mock-infected LA-N-5 cells (Fig. 18D) even if the corresponding gene expression was up-regulated at 48 and 72 hpi (Fig. 17B). Similarly to RIP1, RIP3 protein expression was stable during wt or mutant virus infection.

Inhibition of RIP1 and MLKL protects against neuronal cell death induced by both HCoV-OC43 variants and increases viral replication. Given that neuronal response to HCoV-OC43 infection induced an increase in RIP1 gene expression, an observation usually associated with necroptosis (Chien *et al.*, 2012), we sought to evaluate the importance of this cell death pathway in neuronal cell death and viral production. By using RNAi to knockdown the expression of RIP1, we transduced LA-N-5 cells with two different shRNA (#1 and #2) and quantified the amount of RIP1 mRNA and protein (Fig.

19). Quantitative PCR and Western blot revealed that the shRNA #2 was more efficient to knock-down expression of RIP1 (Fig. 19A). Inhibition of RIP1 by knockdown decreased the HCoV-OC43-induced cell death at 72 hpi in a dose-dependent manner compared to infected LA-N-5 cells transduced with control shRNA (NT) (Fig. 19B). As expected, inhibition of RIP1 expression protected LA-N-5 cells more efficiently against wt virus infection compared to the mutant infection, as the mortality rate induced by the latter is more important. In addition, to establish if viral replication was affected following cellular protection conferred by RIP1 knockdown, we quantified the production of wt and mutant infectious viral particles. Surprisingly, a significant increase in cell-associated mutant infectious particles production was observed at 48 and 72 hpi when RIP1 expression was reduced (Fig. 19C). In fact, in the LA-N-5 cells transduced with the most efficient shRNA to knockdown RIP1 expression (shRNA #2), almost 50-fold more rOC/ATCC particles and 100-fold more rOC/U_{s183-241} particles were harvested compared to cells that have been transduced by non-target shRNA. Thus, these results indicate that a reduction of RIP1 expression delayed neuronal cell death induced by both viruses allowing an increase in the production of cell-associated infectious viral particles.

To further describe the cascade of events possibly associated with necroptosis and involving RIP1 during neuronal cell death induced by HCoV-OC43, we studied the activation of the factor Mixed Lineage Kinase domain-like (MLKL), a known downstream effector that act as an ion channel, which disturbs the osmotic homeostasis and disrupts the integrity of plasma membrane (Cai *et al.*, 2014, Dondelinger *et al.*, 2014). Necrosulfonamide (NSA), a chemical inhibitor of MLKL, significantly increased the survival of LA-N-5 cells infected by either virus suggesting a role of MLKL in neuronal cell death induced by HCoV-OC43 (Fig. 20A). Following infection of LA-N-5 cells by

the mutant virus, NSA increased survival up to 86% compared to DMSO-treated cells, for which viability was only 44.5%. Inhibition of MLKL also protected cells against mortality during infection with the reference virus by increasing viability by 30% compared to DMSO-treated cells. Inhibition of MLKL activation did not interfere with viral replication (Fig. 20B). To confirm the activation of MLKL following HCoV-OC43 infection, we proceeded by detecting its phosphorylated form. Indeed, phosphorylated MLKL was observed only after infection whereas in the presence of NSA, both infections showed less phosphorylation of MLKL (Fig. 20C). Following activation, MLKL is known to homo-oligomerize and to translocate to the plasma membrane, therefore we sought to evaluate if it was the case during HCoV-OC43 infection. We infected LA-N-5 cells with the reference or mutant virus and then the cells were labeled with antibody against the N-terminal epitope of MLKL, without previous membrane permeabilization to ensure that staining detected only the protein inserted into the plasma membrane with the N-terminal epitope of MLKL located on the outer side of the membrane. Confocal microscopy revealed that MLKL was at the cell surface after HCoV-OC43 infection compared to mock-infected cells (Fig. 20D) and that this translocation to the cell surface was more important after infection by the mutant virus. Together, these results indicate that MLKL is involved in neuronal cell death following HCoV-OC43 infection and that this activation is more substantial during infection by the S-mutant virus compared to wt virus.

DISCUSSION

The human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) has been demonstrated to be more than just a respiratory pathogen as it possesses neuroinvasive and neurotropic properties, which raises the interest to study the potential relationship between HCoV-OC43 and neurological disease (Jacomy *et al.*, 2006, Jacomy *et al.*, 2003). In the current study, we demonstrated that neurovirulent HCoV-OC43 infection leads to a neuronal response associated with the activation of regulated cell death (RCD). Moreover, two point mutations in the spike (S) glycoprotein (H183R and Y241H) are sufficient to accelerate viral dissemination as well as neuronal cell death. Accordingly, we introduced these mutations in the infectious cDNA clone of HCoV-OC43 (pBAC-OC43^{FL}) to produce a recombinant mutated rOC/U_{s183-241} virus. Activation of necroptosis-like pathway may represent a neuronal response to HCoV-OC43 infection to limit viral propagation, but could also result in deleterious consequences associated with neuronal loss and neuropathology in the infected host.

Several neurotropic viruses such as HIV, HSV-1 and Influenza A virus (IAV) were reported to induce neuronal insults such as protein aggregates, oxidative stress, ER stress and synaptic alterations during infection, all contributing to neuropathogenesis (Brask *et al.*, 2005, Kavouras *et al.*, 2007, J. Xu *et al.*, 2009). Indeed, neurons in the CNS are particularly vulnerable to intracellular dysfunction where protein misfolding or synaptic alterations could result in neuronal loss (Butterfield *et al.*, 2007, Mattson, 2003, Schondorf *et al.*, 2014, Soto, 2003). Our previous studies demonstrated that rOC/U_{s183-241} infection enhanced the unfolded protein response (UPR) and protein synthesis inhibition (Favreau *et al.*, 2009), suggesting that this mutant virus could increase ER stress in neurons

associated with neurodegeneration and neuropathogenesis in infected mice. These observations can also relate to other data, which demonstrated that HCoV-OC43 interferes with neurotransmitter homeostasis and induces glutamate excitotoxicity (Brison *et al.*, 2011, Brison *et al.*, 2014), thus promoting neuronal stress and eventual neuropathogenesis in infected mice.

Herein, our results indicate that the S-mutant rOC/U_{s183-241} acquired the capacity to disseminate more rapidly and to produce more infectious particles than the reference virus in the CNS of infected mice as well as in neuronal cell cultures, resulting in an increased neurovirulence and induction of cell-death (Figs. 12-15). Moreover, mutations in the viral S protein appear to modulate the neuronal cellular response involving inflammation, neuronal damage and eventually loss of neurons by RCD activation as seen in other viral infection such as MHV, HSV-1 and flavivirus, (Das Sarma *et al.*, 2009, Leyssen *et al.*, 2003, Zambrano *et al.*, 2008). Indeed, RCD is sometimes known to favor a pro-inflammatory environment and contribute to neuroinflammation by mediating the release of damage-associated molecular pattern (DAMPs) and production of pro-inflammatory cytokines (Kaczmarek *et al.*, 2013, Pasparakis *et al.*, 2015). We previously reported that HCoV-OC43 infection leads to the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1, TNF α , IL-6 and T-lymphocytes infiltration (CD4⁺ and CD8⁺) in the CNS (Jacomy *et al.*, 2010). This, together with the increased astrogliosis observed in the CNS of S mutant-infected mice (Fig. 13B), suggest that infection by this mutant virus could contribute to enhance pro-inflammatory cytokine secretion and to a deleterious neuroinflammation process. Similarly, neurovirulence of the murine coronavirus MHV-A59 was linked to the

excessive production of pro-inflammatory cytokines by astrocytes and microglial cells in brain and spinal cord of infected mice (Y. Li *et al.*, 2004b).

Apart from activation of neuroinflammation and neuronal damage, RCD activation during HCoV-OC43 infection could also serve to restrict the pathogen spread. We previously demonstrated that HCoV-OC43 infection induced neuronal cell death in the mouse CNS (Jacomy *et al.*, 2006). Despite the lack of precise identification of RCD, these results suggest that, while contributing to the elimination of infected neurons, RCD could participate in virus-initiated neuropathogenesis. Our data on neuronal cell death indicate that the infection by the mutant virus induces more neuronal cell death (Fig. 15). Surprisingly, even though we previously showed relocalization of the Bax protein to the mitochondria (Favreau *et al.*, 2012) and considering that the murine counterpart of HCoV-OC43, the mouse hepatitis virus (MHV), was reported to induce Bax-dependent apoptosis in oligodendrocytes (Y. Liu *et al.*, 2006, Y. Liu *et al.*, 2007), the pro-apoptotic cellular factor Bax was not involved in neuronal cell death induced by HCoV-OC43. This suggests that during a coronavirus infection, this pro-apoptotic factor could be activated in a cell-type specific manner or that the human virus possesses specific strategies to subvert Bax-dependent apoptosis and evade this type of RCD activation. Although Bax-dependent apoptosis is often activated during infection in order to limit viral propagation (Castedo *et al.*, 2001, Deng *et al.*, 2008, Parquet *et al.*, 2001), several viruses had acquired diverse strategies to block this form of RCD (Lytvyn, 2016). Indeed, cytomegalovirus (Poncet *et al.*, 2006), myxoma virus (J. Su *et al.*, 2006), vaccinia virus (Cooray *et al.*, 2007) and Epstein-Barr virus (W. L. Marshall *et al.*, 1999) all encode viral Bcl-2 homologs that interact with and inhibit Bax activation. Until now, no HCoV-OC43 proteins have been shown to have anti-apoptotic properties and further studies are warranted to explore how

HCoV-OC43 could interfere with Bax-dependent apoptosis in neuronal cells. On the other hand, it was already reported that some intracellular oxidative alterations could result in translocation of Bax to the mitochondria without any signs of apoptosis activation (D'Alessio *et al.*, 2005). As several viruses are known to destabilize cellular redox state during infection (Garofalo *et al.*, 2013, S. Kumar *et al.*, 2009, Nakamura *et al.*, 2002), it is possible that HCoV-OC43 infection induces a redox imbalance, promoting translocation of Bax to the mitochondria without any consequences on neuronal cell death.

Other types of RCD are now well described and are activated by different stimuli (Galluzzi *et al.*, 2012). Necroptosis is now considered as an alternative RCD pathway mostly involved when caspase-8 dependent apoptosis is inhibited or altered or when endogenous RIP3 expression is high enough to sensitize cells to necroptosis activation (Han *et al.*, 2011). Moreover, many neurological disorders, such as amyotrophic lateral sclerosis (Re *et al.*, 2014), Huntington's disease (S. Zhu *et al.*, 2011), multiple sclerosis (Ofengeim *et al.*, 2015b) and ischemic brain injury (Askalan *et al.*, 2015) may be related to necroptosis activation as observed by a significant expression or activity of RIP1, RIP3 and MLKL (Jouan-Lanhouet *et al.*, 2014). The expression and activation of these factors are also considered to be a defense mechanism against pathogen invasion (Lytvyn, 2016, W. Zhou *et al.*, 2014b). Several viruses, such as HIV (Pan *et al.*, 2014), reovirus (Berger *et al.*, 2013), IAV (Nogusa *et al.*, 2016), CMV and HSV (X. Wang *et al.*, 2014b) are known to engage activation of RIP1, RIP3 or MLKL in infected cells with HSV-1 and HSV-2, and CMV being able to interfere with necroptosis to block cell death (H. Guo *et al.*, 2015a, Omoto *et al.*, 2015). Our results show that infection of neuronal cultures by the S-mutant virus leads to an increase in RIP1 and RIP3 transcription compared to wt virus. As the S-mutant virus is disseminating faster, this could be due to an increased number of

infected neurons that are engaging a pro-necroptotic response but also to the fact that these mutant-infected cells produce more infectious particles (Fig. 15 and ref 13), which could induce a more intense disruption of the cell homeostasis and, in the end, trigger a stronger activation of RIP1 and RIP3. Furthermore, as previously suggested (Favreau *et al.*, 2012), the faster spreading and increased production of viral particles by the S-mutant virus may also implicate other viral factors involved in the regulation of RCD that are produced in larger amount compared to wild-type virus, as well as other host-cell factors. Even though there were no corresponding increased amounts of the RIP proteins, our results clearly indicate that RIP1-associated RCD plays a role in HCoV-induced cell death as seen by a significant increased survival of infected LA-N-5 cells in which RIP1 has been knocked-down (Fig. 19B) Moreover, inhibition of RIP1 expression also results in an increase of cell-associated infectious particles production (Fig. 19C), suggesting that RIP1 is potentially activated by neurons in response to the infection as an attempt to restrict viral replication. MLKL represents the major executioner factor in the necroptotic pathway; therefore the significant increased survival of LA-N-5 cells in the presence of MLKL inhibitor (NSA) and MLKL phosphorylation and relocalization at the surface of the neurons (Fig. 20) suggest that necroptosis-like pathway related to RIP1 and MLKL were involved for the cell death induced by HCoV-OC43. Recently, Nogusa and colleagues showed that RIP3 can activate both MLKL-driven necroptosis and FADD-mediated apoptosis in IAV infected cells to restrict viral propagation and suggested that this process may do so by reducing viral replication in infected cells and promoting activation of immune cells associated with the release of DAMPs from dying cells (Nogusa *et al.*, 2016). This is in accordance with our hypothesis that the necroptotic process engaged during HCoV-OC43 infection may serve to activate immunity. On the other hand, this

caspase-dependent pro-apoptotic role of RIP3 during IAV infection is highly interesting, as necroptosis and apoptosis are often seen as mutually exclusive alternative forms of RCD. Considering this observation, even though Bax-mediated apoptosis (Fig. 17) and caspases (Favreau *et al.*, 2012) are clearly not involved during neuronal cell death in our model, we cannot rule out that, in parallel to necroptosis, other forms of RCD may also participate during neuronal cell infection by HCoV-OC43.

As described before (13), HCoV-OC43 induces an ER stress associated with the activation of some components of the UPR system, including GRP78. The induction of ER stress and activation of GRP78 was previously reported to precede and lead to necroptosis activation by an unknown mechanism (Fan *et al.*, 2015, Saveljeva *et al.*, 2015). Therefore, one can hypothesize that infection by HCoV-OC43 induced an ER stress in neurons that initiate RIP1-MLKL-driven necroptosis. Furthermore, inhibition of cyclophilin D, an isomerase acting to modulate mitochondrial permeability transition pore, has been shown to reduce necroptosis-related cell death in mouse embryonic fibroblasts (S. He *et al.*, 2009, Nakagawa *et al.*, 2005). We previously reported that inhibiting cyclophilin D in HCoV-OC43-infected LA-N-5 partially protects neurons from cell death, supporting the hypothesis that this factor is also at least partially involved in RIP1-MLKL necroptosis-like pathway. In sum, HCoV-OC43-induced RCD appears to involve several host-cell factors and potential crosstalk between signalling pathways that implicate necroptosis. Further studies to continue to characterize the cascade of events that takes place during the process and whether the mutations in the viral S protein engage other pathways in infected cells are on-going.

The current study demonstrates that two point mutations located in the viral S glycoprotein are sufficient to increase the neurovirulence of HCoV-OC43 in mice. Again,

by improving the capacity of the mutant virus to produce more infectious particles and disseminate more efficiently, these mutations seem to engage an increased activation of RIP1-MLKL necroptosis-like pathway. Therefore, it is reasonable to think that host-cells respond to HCoV-OC43 infection within the CNS by engaging a necroptosis-like pathway in order to clear or at least limit the infection in case when other types of RCD (like the Bax-dependent apoptosis) are unable to accomplish this function. However, when infection triggers a stronger activation of this necroptosis-like pathway (mutant vs wild type virus), it may induce an excessive neuroinflammation associated with an enhanced release of DAMPs (40, 82) and the cellular response to the infection may become deleterious for the host. Depending on the viral infection within the CNS, the neuronal responses may engage specific factors or pathways of RCD to clear the pathogens but at the same time, generating damages that increase susceptibility to neurological disorders for the host. The challenge will be to target and modulate specific RCD activation without interfering in antiviral responses within the CNS to attenuate the deleterious effect following neuronal cell death and improve long term strategies for CNS protection against neurological diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jessie Tremblay for excellent technical assistance with confocal microscopy and Dr. Mathieu Dubé for helpful discussions.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by Grant No. MT-9203 from the CIHR's Institute of Infection and Immunity (III) to Pierre J. Talbot, who is the holder of the Tier-1 (Senior) Canada Research Chair in Neuroimmunovirology award. Mathieu Meessen-Pinard acknowledges a doctoral studentship from the *Fonds de recherche Québec – Santé* and Alain Le Coupanec acknowledges a doctoral studentship from *Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS*.

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

1. **Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F.** 2009. [Human coronaviruses]. *Pathol Biol (Paris)* **57**:149-160.
2. **Forgie S, Marrie TJ.** 2009. Healthcare-associated atypical pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* **30**:67-85.
3. **Riski H, Hovi T.** 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. *J Med Virol* **6**:259-265.
4. **Yeh EA, Collins A, Cohen ME, Duffner PK, Faden H.** 2004. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* **113**:e73-76.
5. **McGavern DB, Kang SS.** 2011. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nat Rev Immunol* **11**:318-329.
6. **Arabi YM, Harthi A, Hussein J, Bouchama A, Johani S, Hajeer AH, Saeed BT, Wahbi A, Saedy A, AIDabbagh T, Okaili R, Sadat M, Balkhy H.** 2015. Severe neurologic syndrome associated with Middle East respiratory syndrome corona virus (MERS-CoV). *Infection* **43**:495-501.
7. **Morfopoulou S, Brown JR, Davies EG, Anderson G, Virasami A, Qasim W, Chong WK, Hubank M, Plagnol V, Desforges M, Jacques TS, Talbot PJ, Breuer J.** 2016. Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal Encephalitis. *N Engl J Med* **375**:497-498.
8. **Buchmeier MJ, Dalziel RG, Koolen MJ, Lampert PW.** 1987. Molecular determinants of CNS virulence of MHV-4. *Adv Exp Med Biol* **218**:287-295.
9. **Hosking MP, Lane TE.** 2010. The Pathogenesis of Murine Coronavirus Infection of the Central Nervous System. *Critical Reviews in Immunology* **30**:119-130.
10. **Jacomy H, Talbot PJ.** 2003. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* **315**:20-33.

11. **Jacomy H, Fragoso G, Almazan G, Mushynski WE, Talbot PJ.** 2006. Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. *Virology* **349**:335-346.
12. **Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ.** 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J Virol* **74**:8913-8921.
13. **Favreau DJ, Desforbes M, St-Jean JR, Talbot PJ.** 2009. A human coronavirus OC43 variant harboring persistence-associated mutations in the S glycoprotein differentially induces the unfolded protein response in human neurons as compared to wild-type virus. *Virology* **395**:255-267.
14. **Favreau DJ, Meessen-Pinard M, Desforbes M, Talbot PJ.** 2012. Human coronavirus-induced neuronal programmed cell death is cyclophilin d dependent and potentially caspase dispensable. *J Virol* **86**:81-93.
15. **Brison E, Jacomy H, Desforbes M, Talbot PJ.** 2011. Glutamate excitotoxicity is involved in the induction of paralysis in mice after infection by a human coronavirus with a single point mutation in its spike protein. *J Virol* **85**:12464-12473.
16. **Brison E, Jacomy H, Desforbes M, Talbot PJ.** 2014. Novel treatment with neuroprotective and antiviral properties against a neuroinvasive human respiratory virus. *J Virol* **88**:1548-1563.
17. **Jacomy H, St-Jean JR, Brison E, Marceau G, Desforbes M, Talbot PJ.** 2010. Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. *J Neurovirol* **16**:279-293.
18. **Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders HJ.** 2014. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat Rev Immunol* **14**:759-767.

19. **Upton JW, Chan FK.** 2014. Staying Alive: Cell Death in Antiviral Immunity. *Mol Cell* **54**:273-280.
20. **Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G.** 2008. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog* **4**:e1000018.
21. **Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G.** 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**:107-120.
22. **Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P.** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**:45-65.
23. **Seol DW, Li J, Seol MH, Park SY, Talanian RV, Billiar TR.** 2001. Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res* **61**:1138-1143.
24. **Lettau M, Paulsen M, Schmidt H, Janssen O.** 2011. Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology. *Eur J Cell Biol* **90**:456-466.
25. **Feoktistova M, Geserick P, Panayotova-Dimitrova D, Leverkus M.** 2012. Pick your poison: The Ripoptosome, a cell death platform regulating apoptosis and necroptosis. *Cell Cycle* **11**:460-467.
26. **Meylan E, Tschopp J.** 2005. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* **30**:151-159.
27. **Dunai Z, Bauer PI, Mihalik R.** 2011. Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Pathol Oncol Res* **17**:791-800.

28. **Christofferson DE, Li Y, Hitomi J, Zhou W, Upperman C, Zhu H, Gerber SA, Gygi S, Yuan J.** 2012. A novel role for RIP1 kinase in mediating TNF α production. *Cell Death Dis* **3**:e320.
29. **Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK.** 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* **137**:1112-1123.
30. **Zhang YY, Liu H.** 2013. Connections Between Various Trigger Factors and the RIP1/RIP3 Signaling Pathway Involved in Necroptosis. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**:7069-7074.
31. **Baines CP.** 2010. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol* **1**:156.
32. **Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, Ward Y, Wu LG, Liu ZG.** 2014. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* **16**:55-65.
33. **Chen X, Li W, Ren J, Huang D, He WT, Song Y, Yang C, Li W, Zheng X, Chen P, Han J.** 2014. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res* **24**:105-121.
34. **Hill DP, Robertson KA.** 1998. Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain Res Brain Res Protoc* **2**:183-190.
35. **St-Jean JR, Desforages M, Almazan F, Jacomy H, Enjuanes L, Talbot PJ.** 2006. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J Virol* **80**:3670-3674.
36. **Le Coupanec A, Desforages M, Meessen-Pinard M, Dube M, Day R, Seidah NG, Talbot PJ.** 2015. Cleavage of a Neuroinvasive Human Respiratory Virus Spike

- Glycoprotein by Proprotein Convertases Modulates Neurovirulence and Virus Spread within the Central Nervous System. *PLoS Pathog* **11**:e1005261.
37. **Lambert F, Jacomy H, Marceau G, Talbot PJ.** 2008. Titration of human coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, by an indirect immunoperoxidase assay. *Methods Mol Biol* **454**:93-102.
 38. **Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC.** 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**:1799-1805.
 39. **Miyashita T, Reed JC.** 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**:293-299.
 40. **Sharif-Askari E, Nakhaei P, Oliere S, Tumilasci V, Hernandez E, Wilkinson P, Lin R, Bell J, Hiscott J.** 2007. Bax-dependent mitochondrial membrane permeabilization enhances IRF3-mediated innate immune response during VSV infection. *Virology* **365**:20-33.
 41. **Xu W, Jing L, Wang Q, Lin CC, Chen X, Diao J, Liu Y, Sun X.** 2015. Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. *Oncotarget*.
 42. **Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P.** 2012. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ* **19**:75-86.
 43. **Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J.** 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**:112-119.
 44. **King MD, Whitaker-Lea WA, Campbell JM, Alleyne CH, Jr., Dhandapani KM.** 2014. Necrostatin-1 reduces neurovascular injury after intracerebral hemorrhage. *Int J Cell Biol* **2014**:495817.

45. **Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES.** 2012. DAI/ZBP1/DLM-1 Complexes with RIP3 to Mediate Virus-Induced Programmed Necrosis that Is Targeted by Murine Cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe* **11**:290-297.
46. **Mack C, Sickmann A, Lembo D, Brune W.** 2008. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:3094-3099.
47. **Chien H, Dix RD.** 2012. Evidence for multiple cell death pathways during development of experimental cytomegalovirus retinitis in mice with retrovirus-induced immunosuppression: apoptosis, necroptosis, and pyroptosis. *J Virol* **86**:10961-10978.
48. **Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, Hulpiau P, Weber K, Sehon CA, Marquis RW, Bertin J, Gough PJ, Savvides S, Martinou JC, Bertrand MJ, Vandenabeele P.** 2014. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep* **7**:971-981.
49. **Xu J, Ikezu T.** 2009. The comorbidity of HIV-associated neurocognitive disorders and Alzheimer's disease: a foreseeable medical challenge in post-HAART era. *J Neuroimmune Pharmacol* **4**:200-212.
50. **Brask J, Chauhan A, Hill RH, Ljunggren HG, Kristensson K.** 2005. Effects on synaptic activity in cultured hippocampal neurons by influenza A viral proteins. *J Neurovirol* **11**:395-402.
51. **Kavouras JH, Prandovszky E, Valyi-Nagy K, Kovacs SK, Tiwari V, Kovacs M, Shukla D, Valyi-Nagy T.** 2007. Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. *J Neurovirol* **13**:416-425.
52. **Soto C.** 2003. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **4**:49-60.

53. **Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R.** 2007. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* **43**:658-677.
54. **Mattson MP.** 2003. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* **3**:65-94.
55. **Schondorf DC, Aureli M, McAllister FE, Hindley CJ, Mayer F, Schmid B, Sardi SP, Valsecchi M, Hoffmann S, Schwarz LK, Hedrich U, Berg D, Shihabuddin LS, Hu J, Pruszek J, Gygi SP, Sonnino S, Gasser T, Deleidi M.** 2014. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nat Commun* **5**:4028.
56. **Das Sarma J, Kenyon LC, Hingley ST, Shindler KS.** 2009. Mechanisms of primary axonal damage in a viral model of multiple sclerosis. *J Neurosci* **29**:10272-10280.
57. **Zambrano A, Solis L, Salvadores N, Cortes M, Lerchundi R, Otth C.** 2008. Neuronal cytoskeletal dynamic modification and neurodegeneration induced by infection with herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis* **14**:259-269.
58. **Leyssen P, Paeshuyse J, Charlier N, Van Lommel A, Drosten C, De Clercq E, Neyts J.** 2003. Impact of direct virus-induced neuronal dysfunction and immunological damage on the progression of flavivirus (Modoc) encephalitis in a murine model. *J Neurovirol* **9**:69-78.
59. **Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV.** 2013. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* **38**:209-223.
60. **Pasparakis M, Vandenabeele P.** 2015. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* **517**:311-320.

61. **Li Y, Fu L, Gonzales DM, Lavi E.** 2004. Coronavirus neurovirulence correlates with the ability of the virus to induce proinflammatory cytokine signals from astrocytes and microglia. *J Virol* **78**:3398-3406.
62. **Liu Y, Pu Y, Zhang X.** 2006. Role of the mitochondrial signaling pathway in murine coronavirus-induced oligodendrocyte apoptosis. *J Virol* **80**:395-403.
63. **Liu Y, Zhang X.** 2007. Murine coronavirus-induced oligodendrocyte apoptosis is mediated through the activation of the Fas signaling pathway. *Virology* **360**:364-375.
64. **Parquet MC, Kumatori A, Hasebe F, Morita K, Igarashi A.** 2001. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Lett* **500**:17-24.
65. **Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H.** 2008. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase 3-dependent pathway. *J Virol* **82**:10375-10385.
66. **Castedo M, Ferri KF, Blanco J, Roumier T, Larochette N, Barretina J, Amendola A, Nardacci R, Metivier D, Este JA, Piacentini M, Kroemer G.** 2001. Human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein complex-induced apoptosis involves mammalian target of rapamycin/FKBP12-rapamycin-associated protein-mediated p53 phosphorylation. *J Exp Med* **194**:1097-1110.
67. **Lytvyn DIB, Ya. B.; Desforges, M.; Meessen-Pinard, M.; Talbot, P.J.; Sabater, B. and Martin, M.** . 2016. Modulating regulated cell death: the virus way to influence cell fate, survive and persist. *In* Rice J (ed), *Programmed cell death in plants and animals*. Nova science publishers, New York.
68. **Poncet D, Pauleau AL, Szabadkai G, Vozza A, Scholz SR, Le Bras M, Briere JJ, Jalil A, Le Moigne R, Brenner C, Hahn G, Wittig I, Schagger H, Lemaire C, Bianchi K, Souquere S, Pierron G, Rustin P, Goldmacher VS, Rizzuto R, Palmieri F, Kroemer G.** 2006. Cytopathic effects of the cytomegalovirus-encoded apoptosis inhibitory protein vMIA. *J Cell Biol* **174**:985-996.

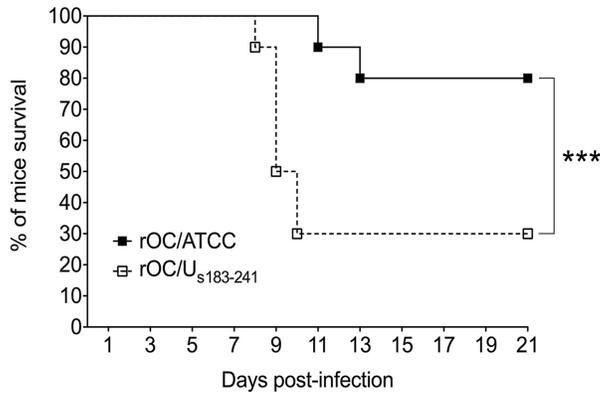
69. **Su J, Wang G, Barrett JW, Irvine TS, Gao X, McFadden G.** 2006. Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria. *J Virol* **80**:1140-1151.
70. **Cooray S, Bahar MW, Abrescia NG, McVey CE, Bartlett NW, Chen RA, Stuart DI, Grimes JM, Smith GL.** 2007. Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *J Gen Virol* **88**:1656-1666.
71. **Marshall WL, Yim C, Gustafson E, Graf T, Sage DR, Hanify K, Williams L, Fingerroth J, Finberg RW.** 1999. Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J Virol* **73**:5181-5185.
72. **D'Alessio M, De Nicola M, Coppola S, Gualandi G, Pugliese L, Cerella C, Cristofanon S, Civitareale P, Ciriolo MR, Bergamaschi A, Magrini A, Ghibelli L.** 2005. Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis. *FASEB J* **19**:1504-1506.
73. **Garofalo RP, Kolli D, Casola A.** 2013. Respiratory syncytial virus infection: mechanisms of redox control and novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **18**:186-217.
74. **Kumar S, Misra UK, Kalita J, Khanna VK, Khan MY.** 2009. Imbalance in oxidant/antioxidant system in different brain regions of rat after the infection of Japanese encephalitis virus. *Neurochem Int* **55**:648-654.
75. **Nakamura H, Masutani H, Yodoi J.** 2002. Redox imbalance and its control in HIV infection. *Antioxid Redox Signal* **4**:455-464.
76. **Han J, Zhong CQ, Zhang DW.** 2011. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol* **12**:1143-1149.
77. **Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariya S, Wichterle H, Henderson CE, Przedborski S.** 2014. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* **81**:1001-1008.

78. **Zhu S, Zhang Y, Bai G, Li H.** 2011. Necrostatin-1 ameliorates symptoms in R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Cell Death Dis* **2**:e115.
79. **Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, Zhang YY, Shan B, DeWitt JP, Ye JY, Zhang XM, Chang AS, Vakifahmetoglu-Norberg H, Geng JF, Py B, Zhou W, Amin P, Lima JB, Qi CT, Yu Q, Trapp B, Yuan JY.** 2015. Activation of Necroptosis in Multiple Sclerosis. *Cell Reports* **10**:1836-1849.
80. **Askalan R, Gabarin N, Armstrong EA, Fang Liu Y, Couchman D, Yager JY.** 2015. Mechanisms of Neurodegeneration after Severe Hypoxic-Ischemic Injury in the Neonatal Rat Brain. *Brain Res* doi:10.1016/j.brainres.2015.10.020.
81. **Jouan-Lanhouet S, Riquet F, Duprez L, Vanden Berghe T, Takahashi N, Vandenabeele P.** 2014. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Semin Cell Dev Biol* **35**:2-13.
82. **Zhou W, Yuan J.** 2014. Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol* **35**:14-23.
83. **Pan T, Wu S, He X, Luo H, Zhang Y, Fan M, Geng G, Ruiz VC, Zhang J, Mills L, Bai C, Zhang H.** 2014. Necroptosis Takes Place in Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)-Infected CD4+ T Lymphocytes. *PLoS One* **9**:e93944.
84. **Berger AK, Danthi P.** 2013. Reovirus activates a caspase-independent cell death pathway. *MBio* **4**:e00178-00113.
85. **Nogusa S, Thapa RJ, Dillon CP, Liedmann S, Oguin TH, 3rd, Ingram JP, Rodriguez DA, Kosoff R, Sharma S, Sturm O, Verbist K, Gough PJ, Bertin J, Hartmann BM, Sealton SC, Kaiser WJ, Mocarski ES, Lopez CB, Thomas PG, Oberst A, Green DR, Balachandran S.** 2016. RIPK3 Activates Parallel Pathways of MLKL-Driven Necroptosis and FADD-Mediated Apoptosis to Protect against Influenza A Virus. *Cell Host Microbe* **20**:13-24.

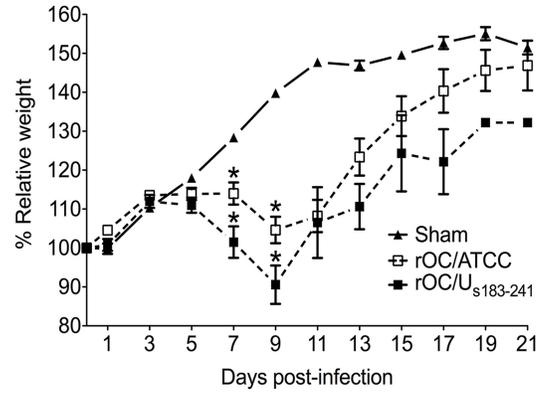
86. **Wang X, Li Y, Liu S, Yu X, Li L, Shi C, He W, Li J, Xu L, Hu Z, Yu L, Yang Z, Chen Q, Ge L, Zhang Z, Zhou B, Jiang X, Chen S, He S.** 2014. Direct activation of RIP3/MLKL-dependent necrosis by herpes simplex virus 1 (HSV-1) protein ICP6 triggers host antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:15438-15443.
87. **Guo H, Omoto S, Harris PA, Finger JN, Bertin J, Gough PJ, Kaiser WJ, Mocarski ES.** 2015. Herpes simplex virus suppresses necroptosis in human cells. *Cell Host Microbe* **17**:243-251.
88. **Omoto S, Guo H, Talekar GR, Roback L, Kaiser WJ, Mocarski ES.** 2015. Suppression of RIP3-dependent necroptosis by human cytomegalovirus. *J Biol Chem* **290**:11635-11648.
89. **Fan H, Tang HB, Kang J, Shan L, Song H, Zhu K, Wang J, Ju G, Wang YZ.** 2015. Involvement of endoplasmic reticulum stress in the necroptosis of microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neuroscience* **311**:362-373.
90. **Saveljeva S, Mc Laughlin SL, Vandenabeele P, Samali A, Bertrand MJ.** 2015. Endoplasmic reticulum stress induces ligand-independent TNFR1-mediated necroptosis in L929 cells. *Cell Death Dis* **6**:e1587.
91. **He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X.** 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* **137**:1100-1111.
92. **Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y.** 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**:652-658.

LEGENDS TO FIGURES

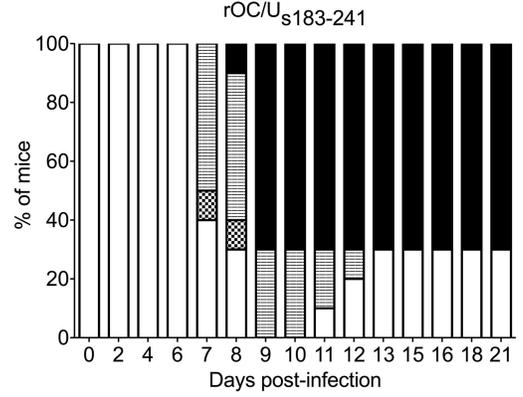
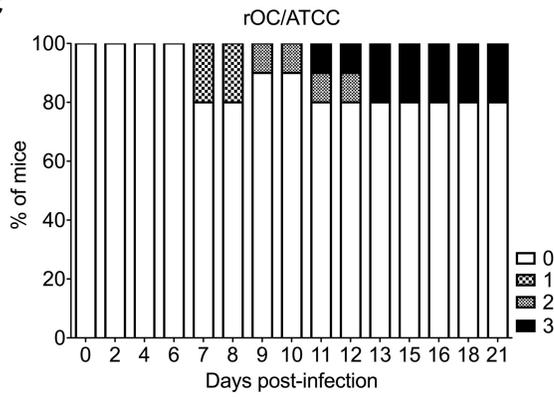
A



B



C



D

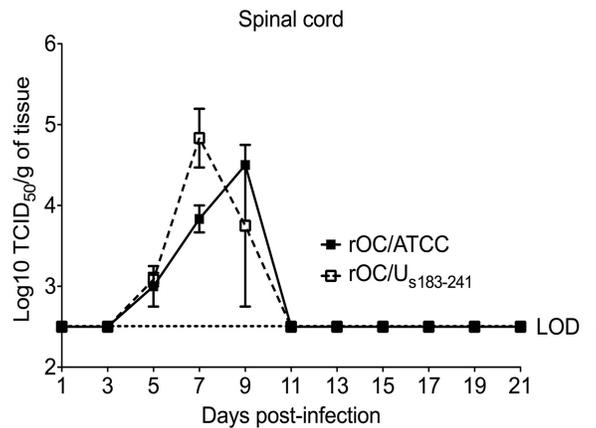
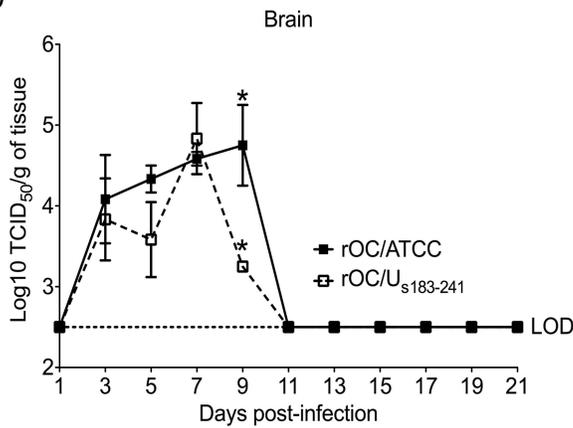
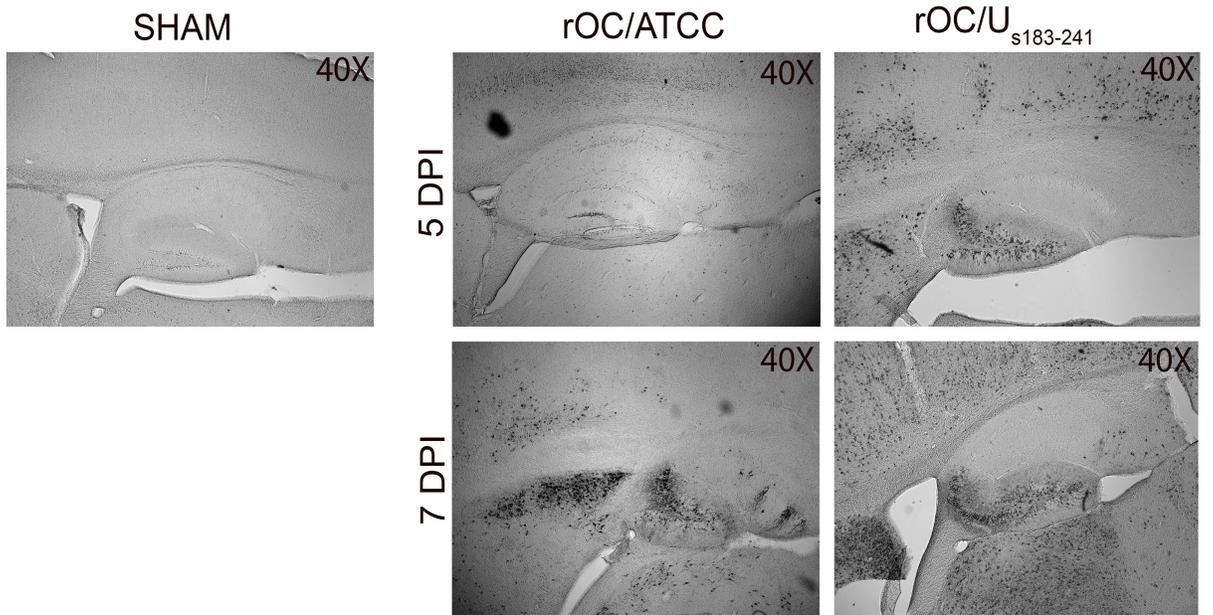


Figure 12. rOC/U_{s183-241} is more neurovirulent than rOC/ATCC in infected mice.

Twenty-two day-old BALB/c female mice received $10^{2.5}$ TCID₅₀/10 μ l of rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} or PBS by the IC route. (A) Survival curves of mice in % over a period of 22 days (dpi). (B) Weight variations were measured every two days during 22 days and expressed in % of variation compared to day 0. (C) Evaluation of clinical scores (% of mice at each level of the scale) of mice infected by rOC/ATCC (left panel) or rOC/U_{s183-241} (right panel). (D) Production of infectious particles was measured in the brain (left panel) and spinal cord (right panel) of infected mice. LOD represents Limit of Detection. Results are representative of two independent experiments and error bars represent standard deviation (SD). Statistical significance: *, P<0.05, ***, P<0.001.

A



B

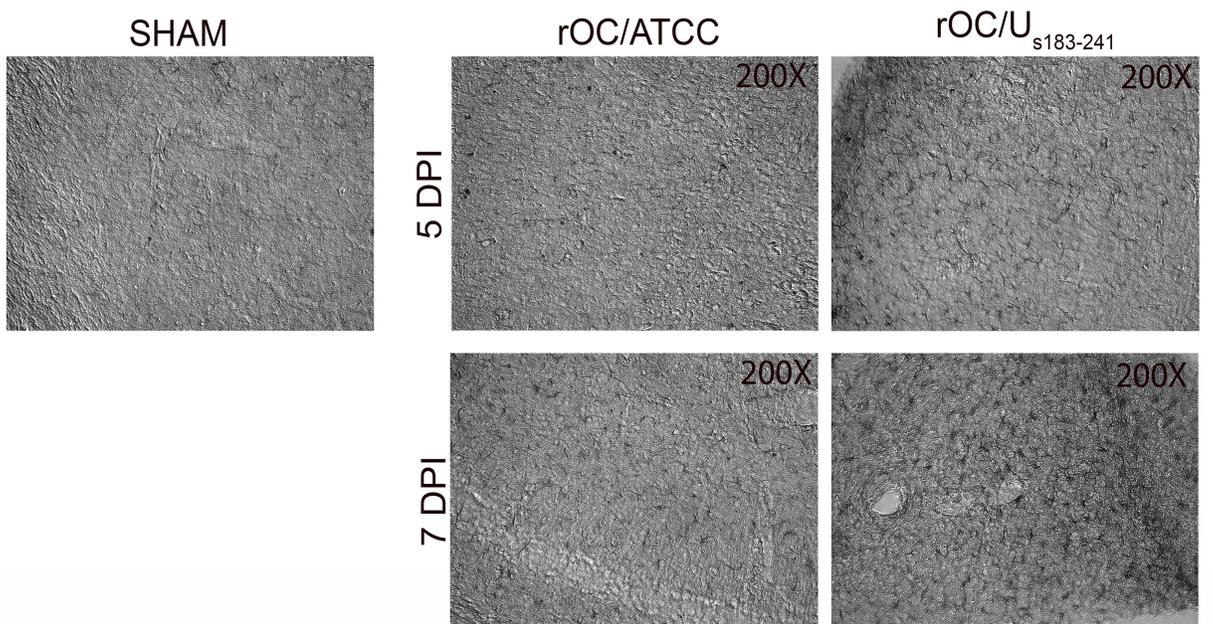


Figure 13. rOC/U_{s183-241} disseminates more rapidly in the brain and induces a stronger activation of astrocytes compared to rOC/ATCC in infected mice. Histological examination of hippocampus of 22 day-old BALB/c mice infected with 10^{2.5} TCID₅₀/10 µl of rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} or PBS. (A) Detection of viral antigen (N protein) at 5 and 7 dpi at magnitude 40X. (B) Detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes (marker of astrogliosis) at 5 and 7 dpi at magnitude 200X.

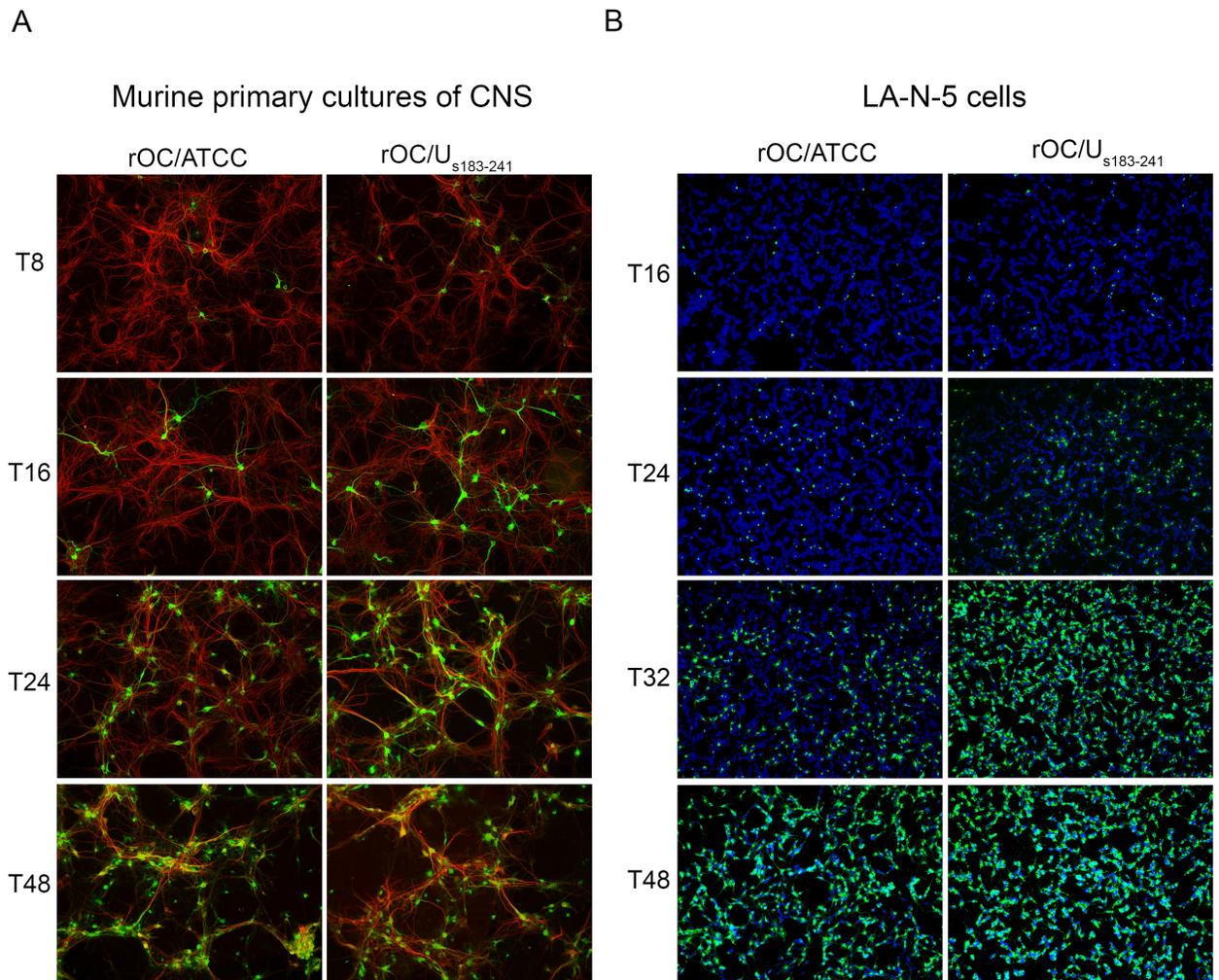
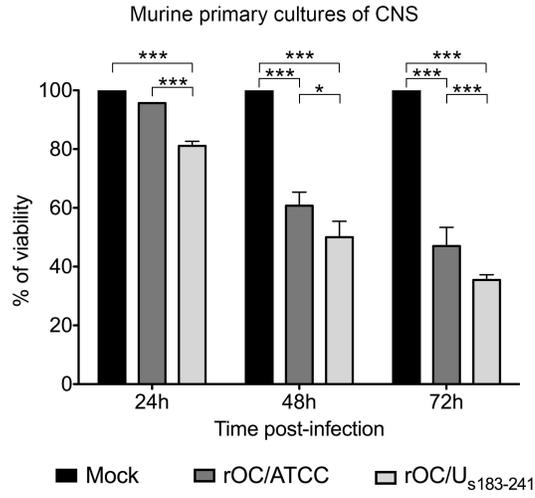


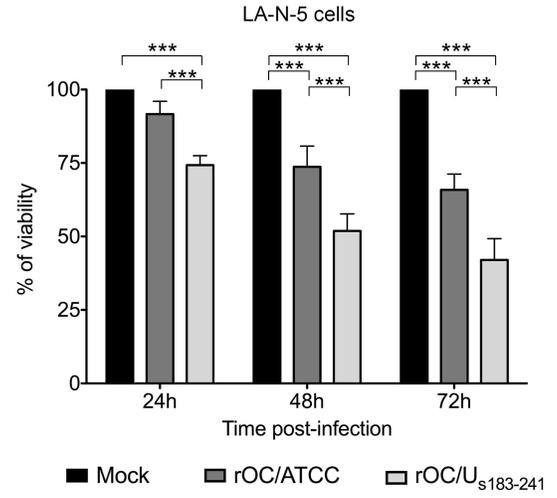
Figure 14. rOC/U_{s183/241} disseminates more rapidly than rOC/ATCC in neuronal cell cultures. Viral spreading was evaluated by immunofluorescence (IF). (A) Murine primary cultures of CNS infected at a MOI of 0.005 with both viruses at different time post-infection (hpi). Neurons (red) were stained with a mAb against microtubule-associated protein 2 (MAP2) and the S viral protein (green) was detected with a rabbit antiserum. (B) Differentiated human neuroblastoma LA-N-5 cells infected at a MOI of 0.2 with both viruses at different times post-infection. Cells were stained with a mAb against S viral protein (green) and DAPI (blue) was

used to observe nucleus. Results are representative of two independent experiments.
Magnification 100X.

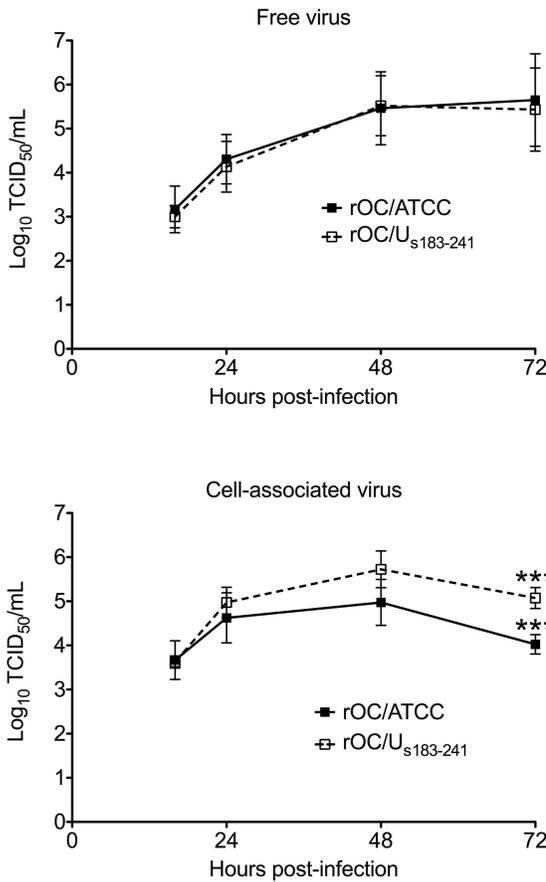
A



B



C



D

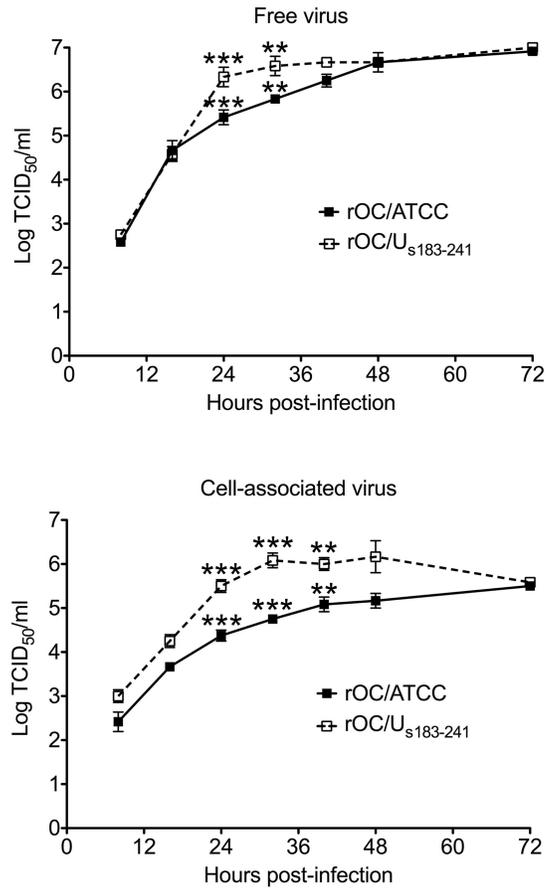


Figure 15. rOC/U_{s183-241} infection increases neuronal cell death and produces more infectious particles compared to rOC/ATCC infection. (A and C) Murine mixed primary cultures of CNS from BALB/c mice were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at a MOI of 0.03. (B and D) Differentiated human neuroblastoma LA-N-5 cells were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at a MOI of 0.2. (A) Cell viability was measured by MTT assay at indicated time post-infection and expressed as relative percentage compared to mock-infected culture at each time. (B) Cell viability was measured by Presto Blue assay at indicated time post-infection and expressed as relative percentage compared to mock-infected cells at each time. (C) Production of infectious viral particles of free virus (upper panel) and cell-associated virus (lower panel) from mixed primary cultures of CNS (C) and LA-N-5 cells (D). Results are shown as mean \pm SD of three independent experiments. Statistical significance: *, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001.

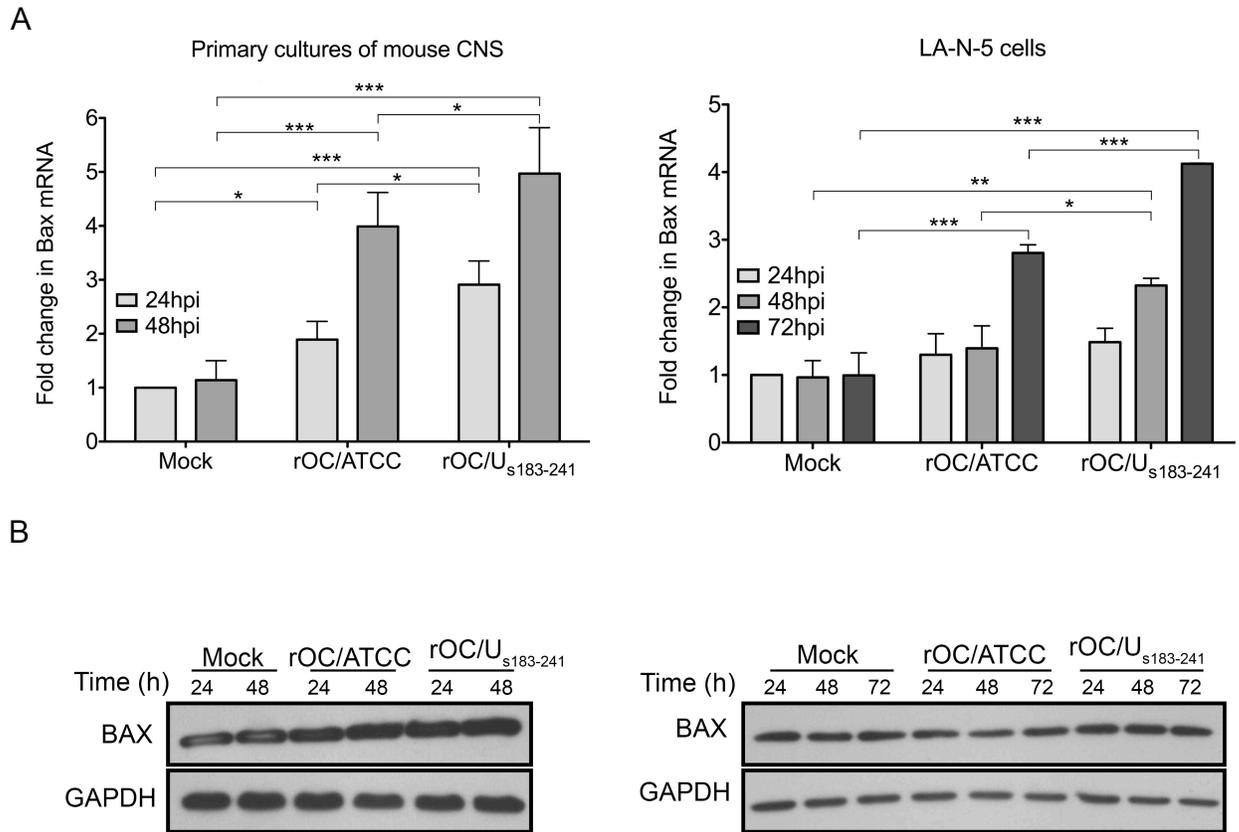


Figure 16. Bax gene expression is increased in neuronal cell cultures during neuronal response to HCoV-OC43 infection. (A) Level of Bax mRNA in murine mixed primary cultures of CNS (left panel) or differentiated human neuroblastoma LA-N-5 cells (right panel) infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} was measured by Quantitative Real-time PCR (qPCR) at indicated times post-infection. (B) Detection of Bax protein in murine mixed primary cultures of CNS (left panel) or differentiated human neuroblastoma LA-N-5 cells (right panel) infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at indicated times were determined by Western Blot analysis (WB). (A) Results are shown as mean \pm SD of three independent experiments. Statistical significance: *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ ***, $P < 0.001$. (B) Results are representative of three independent experiments.

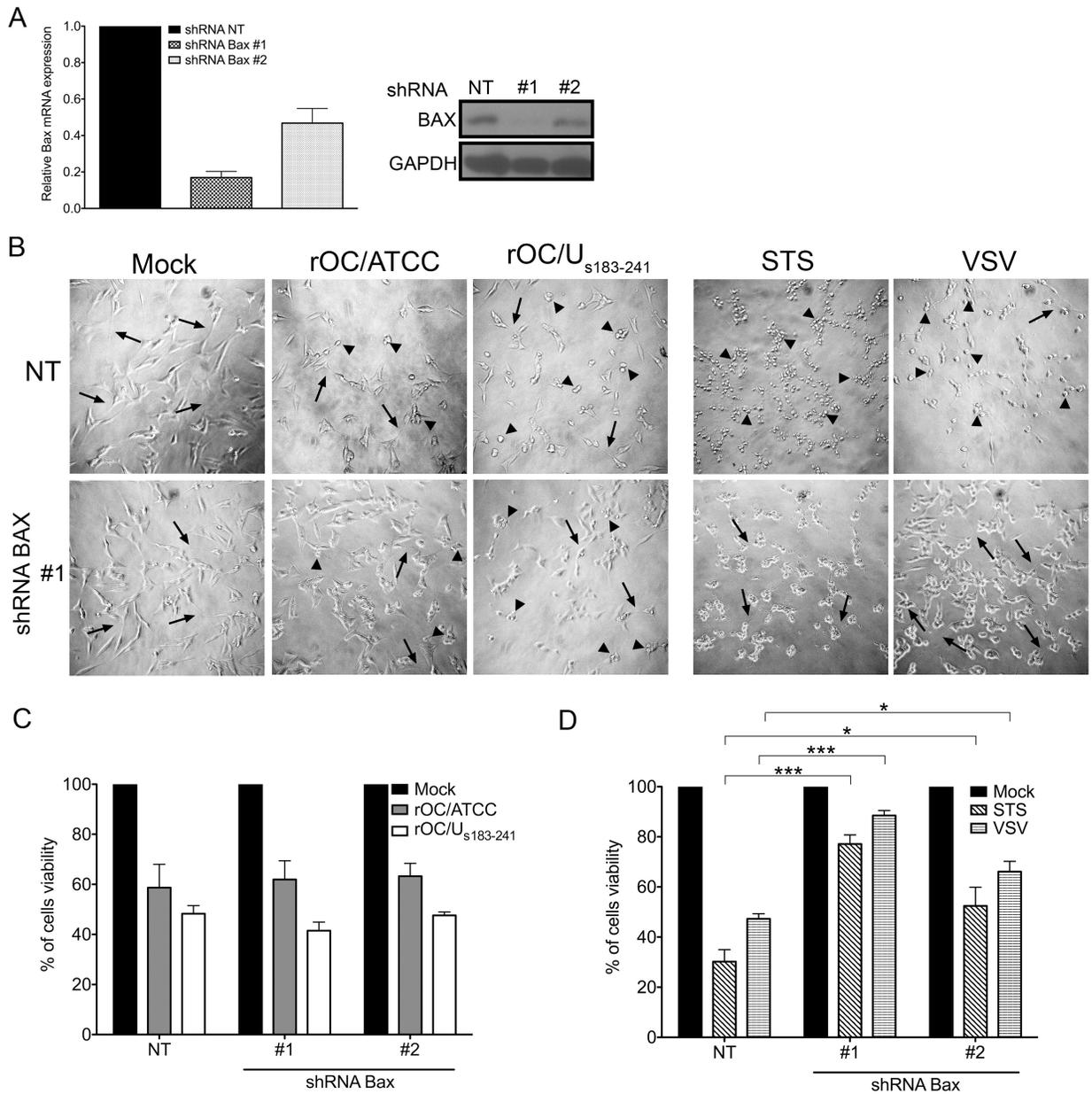


Figure 17. Bax-dependent apoptosis does not play a significant role in LA-N-5 cell death induced by HCoV-OC43 infection. (A-D) Human neuroblastoma LA-N-5 cells were transduced with control lentivirus (NT) or lentivirus containing either of two shRNA sequence against Bax (shRNA Bax #1 or #2). (A) mRNA and protein expression of Bax was analyzed by qPCR (left panel) and WB (right panel) respectively. (B) Images of phase-contrast microscopy

corresponding to differentiated LA-N-5 cells expressing shRNA NT or Bax #1 infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at 48 hpi or treated with staurosporine (STS) or infected with Vesicular stomatis virus (VSV) at 24 hpi. Arrows represent loss of axons or dendrites and arrowhead indicate rounding of cells. (C) LA-N-5 cells viability was measured by Presto Blue assay and expressed as relative % of viability compared to mock-infected cells at 48 hpi. (D) Cell viability was measured by Presto Blue assay and expressed as relative % of viability compared to mock-infected cells. Differentiated LA-N-5 cells transduced with the different shRNA were infected with Vesicular stomatitis virus (VSV) or treated with staurosporine (STS) for 24 hours. (A, B) Results are representative of two independent experiments. (C, D) Results are shown as mean \pm SD of two independent experiments. Statistical significance: *, P<0.05, **, P<0.01 ***, P<0.001.

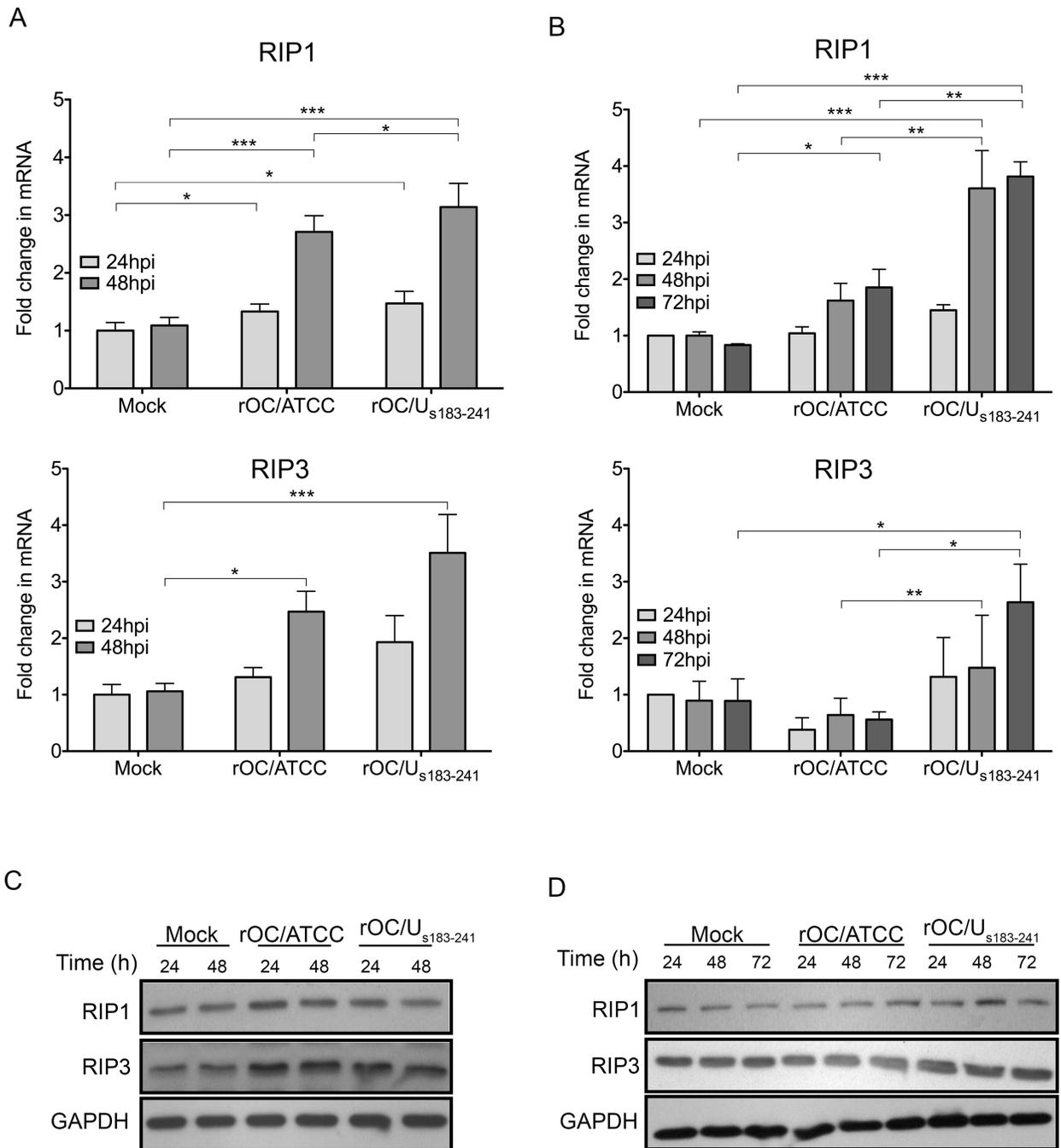


Figure 18. HCoV-OC43 infection increases RIP1 and RIP3 gene expression. Level of RIP1 (upper panels) or RIP3 (lower panels) mRNA in murine mixed primary cultures of CNS (A) or differentiated LA-N-5 cells (B) infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241}. Detection of RIP1, RIP3 and GAPDH proteins in murine primary cultures of CNS (C) or differentiated LA-N-5 cells

(D) infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at indicated times. (A, B) Results are shown as mean \pm SD of three independent experiments. Statistical significance: *, P<0.05, **, P<0.01 ***, P<0.001. (C, D) Results are representative of three independent experiments.

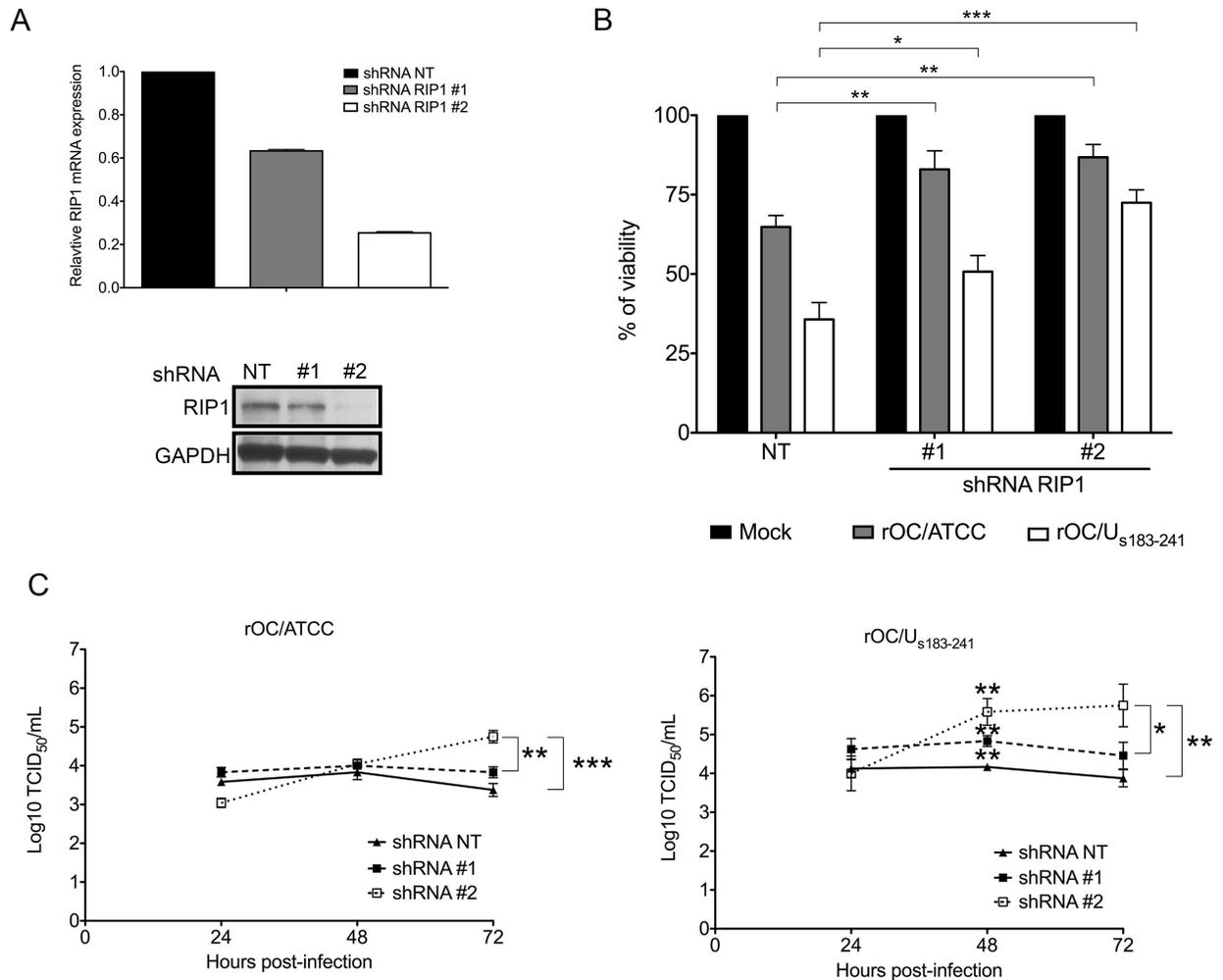


Figure 19. RIP1 is involved in HCoV-OC43-induced LA-N-5 cell death and limits production of infectious virus. Differentiated LA-N-5 cells were transiently transduced with control lentivirus (shRNA NT) or lentivirus containing either of two shRNA sequences against RIP1 (shRNA RIP1 #1 or #2). (A) Expression of RIP1 was analyzed by qPCR (upper panel) and WB (lower panel). (B) Cell viability was measured by Presto Blue assay and expressed as relative % of viability compared to mock-infected cells at 72 hpi. (C) Production of cell-associated infectious viral particles for rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at indicated times post-infection. (A) Results are representative of three independent experiments. (B-C) Results are

shown as mean \pm SD of three independent experiments. Statistical significance: *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ ***, $P < 0.001$.

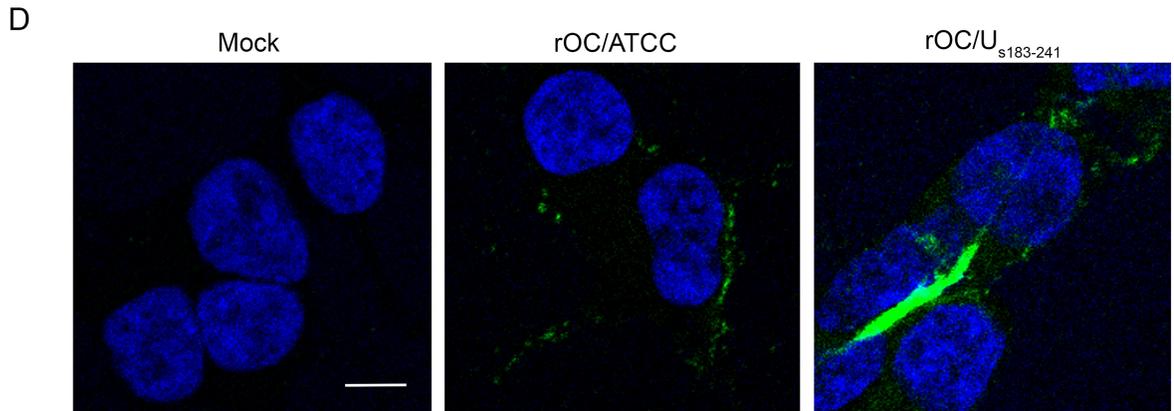
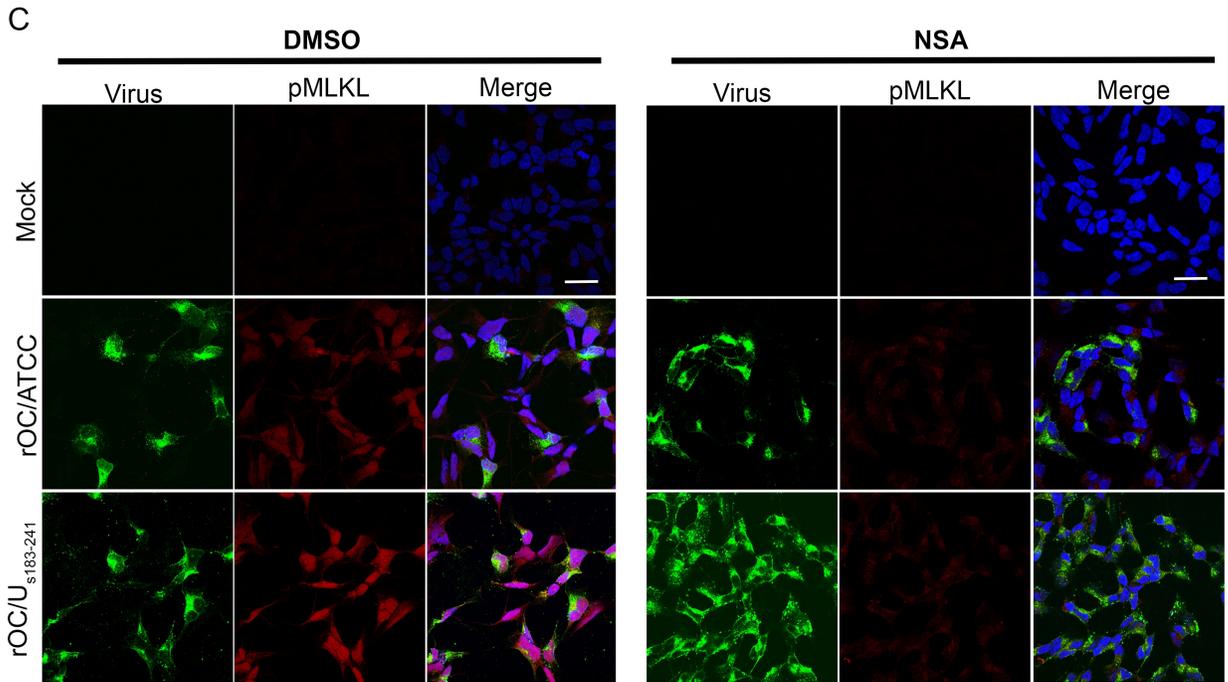
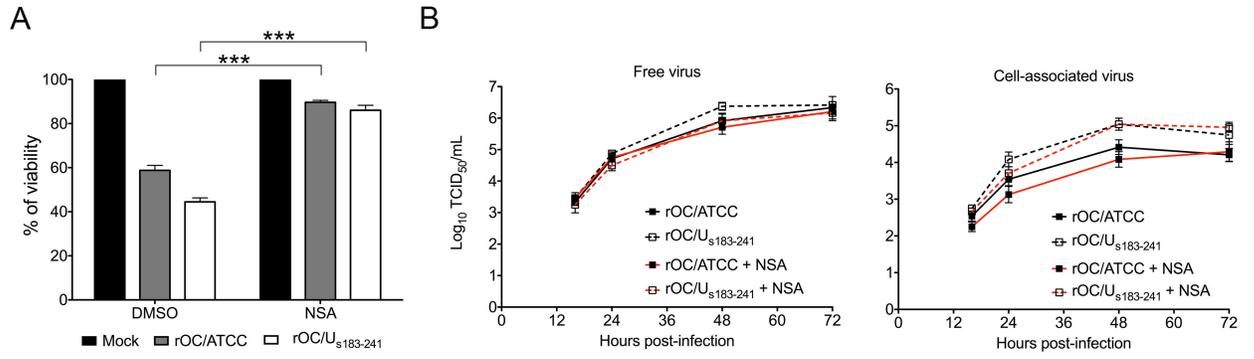


Figure 20. MLKL is involved in LA-N-5 cell death induced by HCoV-OC43. (A) Differentiated LA-N-5 cells were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at a MOI of 0.2 and then treated with 2 μ M NSA or DMSO. Cell viability was measured by Presto Blue assay and expressed as relative % of viability compared to mock-infected cells at 72 hpi. (B) Production of infectious free virus (left panel) or cell-associated virus (right panel) for rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at indicated times post-infection. (C) Differentiated LA-N-5 cells were treated with 2 μ M NSA or not (DMSO) after infection with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at a MOI of 1. Phosphorylated MLKL was stained in red, viral S glycoprotein in green and nucleus in blue and observed by confocal microscopy. Scale bar, 5 μ M. (D) Differentiated LA-N-5 cells were infected with rOC/ATCC or rOC/U_{s183-241} at a MOI of 1. The surface distribution of MLKL (green) and nucleus (blue) were detected by confocal microscopy. Scale bar, 20 μ M (A, B) Data are represented as mean \pm SD and were obtained from three independent experiments. Statistical significance: ***, $P < 0.001$. (C, D) Images shown are representative of two independent experiments.

CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE

1. TECHNIQUES

1.1 Activité enzymatique de la caspase 8

Les cellules LA-N-5 ont été infectées tel qu'indiqué dans la publication n°1 ou incubées durant 16h en présence de $TNF\alpha$ (R&D systems), cycloheximide (Sigma-Aldrich), staurosporine (Sigma-Aldrich) ou zVAD-fmk (Enzo Life sciences) à des concentrations finales respectives de 100 ng/ml, 2 μ g/ml, 5 μ M ou 20 μ M. Ensuite, les protéines totales ont été extraites au temps indiqué et 150 μ g de protéines ont été utilisées pour chaque réaction où l'activité enzymatique de la caspase 8 a été mesurée selon le protocole de la trousse colorimétrique de l'activité de la caspase 8 (*R&D systems*).

1.2 Inhibition chimique de RIP1

Les cellules LA-N-5 ou les cultures primaires murines ont été infectées tel qu'indiqué dans la publication n°1 pour ensuite être traitées avec l'inhibiteur de l'activité kinase de RIP1 nommé nécrostatin Nec-1, Nec-1s ou Nec-1i (Enzo Life sciences) à différentes concentrations tel qu'indiqué.

1.3. Analyse du profile de polysomes (*Polysome profiling analysis*)

Les cellules LA-N-5 ont été infectées tel qu'indiqué dans la publication n°1 et après 24h d'incubation à 37°C, la synthèse protéique a été arrêtée par l'ajout de cycloheximide (100 μ g/ml) au milieu de culture (RPMI avec 2.5% FBS) pendant 5 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées quatre fois avec une solution de PBS contenant du cycloheximide (100 μ g/ml) pour être récupérées par grattage. Par la suite, les cellules ont été culottées par centrifugation à 1000 x g pendant 10 min à 4°C et le culot a été resuspendu dans une solution contenant 425 μ l de tampon hypotonique de lyse (5 mM Tris pH 7.5, 2.5 mM $MgCl_2$ et 1.5 mM KCl), 10 μ l de DTT (500nM), 5 μ l de cycloheximide (100 mg/ml) et 5 μ l de RNaseIn (10 000 unité/ml). Après avoir vortexé le culot lysé, 25 μ l de Triton X100 10% (v/v) ainsi que 25 μ l de sodium déoxycholate 10%

(p/v) ont été ajoutés. Le DTT et la RNase-In proviennent de Promega alors que le Triton et le sodium désoxycholate de chez Sigma-Aldrich. La solution est ensuite centrifugée à 1000 x g pendant 2 minutes à 4°C et le surnageant est déposé sur un gradient de saccharose 5-50%. Le gradient avec l'échantillon est alors ultracentrifugé à 36 000 rpm pendant 2h à 4°C. Après ultracentrifugation, le tube est placé dans un lecteur UV (ISCO) où une aiguille perce le fond du tube pour y injecter une solution de sucrose à 60% poussant ainsi l'échantillon à travers le lecteur UV qui mesure en continu l'absorbance à 254 nm. Ensuite, l'échantillon est séparé en fonction de la densité par le collecteur et les différentes fractions sont récupérées dans des microtubes (Eppendorf). À partir de ces fractions, l'ARN est extrait par la méthode de trizol-chloroforme. En bref, 500 µl de chacune des fractions sont déposés dans leurs tubes respectifs contenant 750 µl de trizol (Qiagen) et conservés sur glace. Après inversion, 500 µl de chloroforme (Fischer Scientific) sont ajoutés à chacune des fractions et le tout est vortexé pendant 15 secondes. Après une incubation de 3 minutes à température de la pièce, la fraction est centrifugée à 5000 x g pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un autre microtube où de l'iso-propanol froid est ajouté et mélangé par inversion. La fraction est alors placée à -20°C pour la nuit afin de précipiter l'ARN et par la suite, centrifugée à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Après avoir enlevé le surnageant, le culot est lavé avec de l'éthanol 70% froid et centrifugé de nouveau à 5 000 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est asséché à l'air et resuspendu dans de l'eau. À partir de ces ARN, la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) et la quantification de l'expression de gènes par qPCR ont été effectuées telle que décrite dans la publication n°1.

CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. MODULATION DE LA NEUROPATHOLOGIE CHEZ LA SOURIS EN LIEN AVEC LA GLYCOPROTÉINE S

1.1 Contexte

Considérant les caractères neuroinvasif, neurotrophe et neurovirulent du virus HCoV-OC43, l'hypothèse émise par le laboratoire du Dr Talbot d'un lien existant entre l'infection du SNC et l'émergence ou l'augmentation de la sévérité des symptômes de maladies neurologiques est intéressante. Évidemment, plusieurs facteurs de l'environnement (e.g. pollution, alimentation, substances toxiques), génétiques (e.g. fond génétique, mutations) et biologiques (e.g. virus, bactérie, parasite) peuvent également influencer les pathologies du SNC. Néanmoins, la présence d'un virus au cerveau peut engendrer des dommages directement aux cellules neurales par l'infection de celles-ci ou indirectement par l'entremise de l'activation du système immunitaire, contribuant ainsi aux neuropathologies. Le laboratoire du Dr Talbot a démontré, au fil des ans, que l'infection du SNC par HCoV-OC43 provoque des dommages aux neurones et entraîne leur mort. De plus, la présence de deux mutations dans la glycoprotéine S, issues d'infections persistantes de lignées neurales humaines, confère au virus mutant (rOC/U_{s183-241}) la particularité d'être davantage neurovirulent suite à l'infection de souris. Ainsi, dans un premier temps, l'objectif des travaux présentés dans cette thèse était de poursuivre la caractérisation de cette propriété chez le virus mutant et ultimement d'expliquer ces observations par la caractérisation des mécanismes moléculaires reliés à la mort neuronale.

1.2 Influence des mutations acquises en infection persistante de lignées humaines sur la neuropathologie en souris

Toute population virale dont l'hétérogénéité génomique est grande possède invariablement un avantage afin de répondre rapidement aux pressions sélectives exercées par son hôte. De nombreux virus, notamment les virus à ARN, ont développé la stratégie de provoquer activement des mutations à travers leur génome viral afin d'augmenter leur capacité d'adaptation et leurs chances de survivre. En effet, ces mutations peuvent permettre au parasite viral d'échapper au système immunitaire, de devenir persistant chez leur hôte, d'avoir une réplication virale plus efficace, de changer de tropisme ou de développer de la résistance à la présence d'un composé antiviral. Les coronavirus possèdent trois caractéristiques qui favorisent

l'apparition de mutations à travers leur génome soit la grande taille du génome qui permet une grande plasticité, la RdRp qui entraîne une transcription infidèle et la recombinaison homologue (Duffy *et al.*, 2008, Pasternak *et al.*, 2006, Woo *et al.*, 2009). Ces caractéristiques qui affectent le génome en entier prennent leur importance lorsque ces mutations apparaissent dans des protéines structurales qui influencent la biologie du virus. Suite aux précédents travaux indiquant que HCoV-OC43 est neurotrope (Bonavia *et al.*, 1997), la persistance virale a été démontrée à travers plusieurs passages successifs de lignées humaines représentatives du SNC mais également par la détection de l'ARN viral après plus d'un an dans le SNC de souris ayant survécu à l'infection (Arbour *et al.*, 1999a, Arbour *et al.*, 1999b, Jacomy *et al.*, 2006). Ces observations alimentent l'hypothèse que le virus HCoV-OC43 peut persister dans le SNC en étant latent. En parallèle à cette persistance virale chez des cultures neurales, l'apparition de plusieurs mutations ponctuelles au niveau du domaine S1 de la glycoprotéine S a également été observé, suggérant que l'apparition de mutations dans cette protéine influence la biologie du virus relativement à son adaptation au SNC (St-Jean *et al.*, 2006b). D'ailleurs, le séquençage du gène codant la protéine S suite à cette persistance virale a permis d'identifier quatre mutations prépondérantes et conservées dans la région de liaison au récepteur soient D24Y, S83T, H183R et Y241H (St-Jean *et al.*, 2006b, St-Jean *et al.*, 2004). Cependant, il est primordial de se rappeler que le virus HCoV-OC43 est un virus humain et que ces mutations ont été acquises dans un environnement où la pression sélective du système immunitaire est absente. Ainsi, il n'est pas surprenant que ces mutations provoquent une augmentation de la réplication virale dont la finalité est d'assurer la propagation virale la plus efficace possible. Cette capacité à produire davantage de particules infectieuses n'est évidemment pas optimale dans un contexte d'infection *in vivo*, alors que le virus a tout intérêt à ne pas être détecté trop rapidement par le système immunitaire. En effet, la reconnaissance précoce du virus et l'activation rapide de la réponse immunitaire innée peuvent compromettre l'établissement de l'infection et empêcher le virus de survivre à la réponse de son hôte. Ainsi, malgré le tropisme murin de HCoV-OC43, la neurovirulence plus importante du virus mutant pourrait être la conséquence du fait que ce dernier n'est pas totalement adapté à cet hôte. Néanmoins, l'intégration de ces mutations dans un clone d'ADNc infectieux a permis de mieux étudier leur impact biologique, autant en cultures cellulaires qu'avec le modèle de souris *in vivo* (Favreau *et al.*, 2012, Jacomy *et al.*, 2010, Le Coupanec *et al.*, 2015). D'ailleurs, l'étude et la comparaison de la neurovirulence par l'inoculation intracérébrale du virus rOC/ATCC ou rOC/U_{s183-241} chez des souris a permis de constater que les deux mutations H183R et Y241H suffisent pour accélérer l'apparition des symptômes cliniques et augmenter la sévérité de ceux-ci, incluant un taux de mortalité très

important comparativement au virus de référence (Figure 12). Ces réactions chez les souris infectées justifient pourquoi il est important de comprendre comment le virus HCoV-OC43 est impliqué dans l'établissement de neuropathologies et comment la présence de deux mutations dans la glycoprotéine S peut induire une augmentation aussi importante de la neurovirulence.

1.3 Implication des mutations dans la neuroinvasion et la neuropropagation

Même si la neuroinvasion, définie ici comme la capacité du virus à infecter le SNC à partir de la périphérie, n'a pas été réellement étudiée dans cette thèse, il est important de rappeler que HCoV-OC43 est capable d'envahir le SNC suite à une infection des voies respiratoires supérieures (Jacomy *et al.*, 2010, Le Coupanec *et al.*, 2015). On conclut ainsi que le virus rOC/U_{s183-241} est en mesure d'atteindre le SNC à partir de la périphérie. Cependant, on ignore toujours comment le virus atteint le SNC et s'il doit, dans un premier temps, constituer un réservoir viral au niveau des voies respiratoires (supérieures ou inférieures) ou parmi les cellules épithéliales de la cavité nasale (qui font partie des voies supérieures) afin d'alimenter éventuellement une dissémination efficace vers le bulbe olfactif et le SNC. Étant donné le caractère respiratoire de HCoV-OC43, les voies respiratoires supérieures pourraient s'avérer un endroit logique où le virus constitue un réservoir. L'utilisation d'un modèle cellulaire *in vitro* (*Human airway epithelium*, HAE), qui possède une morphologie et des fonctionnalités similaires aux voies respiratoires *in vivo* a permis de mettre en lumière la possibilité que HCoV-OC43, ainsi que les trois autres souches de HCoV, puissent créer un réservoir aux voies respiratoires supérieures (Dijkman *et al.*, 2013). De plus, ce modèle a permis d'établir que HCoV-OC43 infecte les cellules du côté apical et relâche les nouveaux virions autant du côté apical que basolatéral. Étant donné le manque de données nous permettant de statuer sur le rôle de ces mutations lors de la neuroinvasion, il s'avère difficile de déterminer si la présence des mutations 183 et 241 influence l'entrée virale au SNC. Toutefois, il est possible que ces mutations influencent la polarisation de sortie des particules infectieuses. D'ailleurs, la présence d'une seule mutation dans la protéine Hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza (IAV) est suffisante pour affecter la polarisation apicale du virus en relocalisant la protéine du côté basolatéral et en modifiant ainsi le côté cellulaire utilisé pour la relâche des nouveaux virions (Brewer *et al.*, 1991, Mora *et al.*, 2002). Il est également possible que les mutations chez le virus rOC/U_{s183-241} entravent ou augmentent l'affinité potentielle entre la protéine S et les autres protéines virales, provoquant des changements lors de la propagation virale. En effet, chez le virus de la rougeole,

l'interaction entre la protéine M et les glycoprotéines structurales du virus sont essentielles pour assurer la sortie virale du côté basolatéral et, en absence d'interaction, les virions sont redirigés vers le côté apical (Naim *et al.*, 2000). De plus, une relâche plus importante des virions du côté basolatéral (vers la voie sanguine) pourrait accélérer la diffusion du virus des voies respiratoires au SNC. Certains coronavirus, dont le HCoV-229E et le SARS-CoV peuvent infecter les monocytes circulants, ce qui alimente l'hypothèse que ces virus entrent au SNC via la circulation sanguine (Collins, 2002, Law *et al.*, 2005). Cette dernière hypothèse s'avère très peu probable dans le cas de HCoV-OC43 puisque ce dernier n'infecte pas les monocytes/macrophages de façon efficace (Desforges *et al.*, 2007). Le nerf olfactif est aussi fortement suspecté d'être utilisé par le virus pour atteindre le cerveau puisque l'une des premières régions du SNC où l'on détecte le virus chez les souris infectées par la voie intranasale est le bulbe olfactif. Bien que l'utilisation d'autres nerfs crâniens ne soit pas exclue, le nerf olfactif se rend directement au bulbe olfactif, situé dans le SNC, suggérant qu'il est fort probablement utilisé par le virus HCoV-OC43 pour entrer au SNC. D'ailleurs, une grande variété de virus neuroinvasifs utilisent le nerf olfactif pour entrer au SNC, notamment le virus de l'influenza A, les herpèsvirus, le virus de la stomatite vésiculaire, le virus de la rage, le coronavirus murin MHV et le virus du Nil Occidental (van Riel *et al.*, 2015). Dans le cas du virus MHV-JHM, l'ablation chirurgicale du bulbe olfactif (bulbectomie) ou la destruction chimique des épithéliums olfactifs, sont suffisants pour empêcher le virus d'atteindre le SNC, confirmant ainsi l'utilisation de ce nerf par le virus pour se rendre au cerveau (E. M. Barnett *et al.*, 1993). Certains variants du HCoV-OC43, notamment le rOC/S_{G758R} qui diffère du virus de référence par la présence d'une seule mutation située entre la partie S1 et S2 de la protéine S, atteint également le SNC à partir de la périphérie avec sensiblement la même rapidité suite à une infection intranasale (Le Coupanec *et al.*, 2015). Ce variant diffère de rOC/ATCC, tout comme du variant rOC/U_{s183-241}, par une mutation entre la partie S1 et S2 qui facilite le clivage de la protéine S par des proprotéines convertases cellulaires fort probablement durant les étapes d'assemblage de la particule ou lors de la sortie des virions de la cellule hôte ou encore lors de la biogenèse de nouvelles protéines S (Le Coupanec *et al.*, 2015). Ainsi, la présence de mutations à cette position dans la protéine S ne semble pas influencer la neuroinvasion de façon importante. Bien que l'impact des mutations du variant rOC/U_{s183-241} dans la neuroinvasion n'a pas été étudié en détail, on peut supposer que ces mutations n'influenceront pas de façon significative la capacité de ce virus à atteindre le SNC. La virulence accrue du virus mutant ne serait donc pas influencée par sa capacité à atteindre le SNC plus ou moins rapidement comparativement au virus de référence.

Une fois au SNC, le virus HCoV-OC43 peut se propager d'une région à une autre et se disséminer à travers l'encéphale, notion appelée ici neuropropagation. Les premières régions infectées sont le bulbe olfactif et l'hippocampe, suivi de l'ensemble du cortex, du tronc cérébral et de la moelle épinière, autant suite à une inoculation intranasale qu'intracérébrale, suggérant une préférence pour ces sites lors de la primo-infection (Desforges *et al.*, 2013b). Or, en plus du ventricule latéral, le bulbe olfactif et l'hippocampe sont les régions du SNC qui ont la particularité d'être le site de la neurogenèse, soit la production de nouvelles cellules neuronales ou gliales (Gage, 2000, Kuhn *et al.*, 2005). On sait aujourd'hui que la neurogenèse est un phénomène qui fait intervenir la différenciation de cellules souches progénitrices neurales (CSPN) principalement en neurones. Ce phénomène est activé suite à l'expression de facteurs neurotropes (Bath *et al.*, 2010, Hurtado-Chong *et al.*, 2009), d'hormones de croissance (Aberg *et al.*, 2009), de neurotransmetteurs (Ryu *et al.*, 2016) et de neuropeptides Y (Decressac *et al.*, 2009, Stanic *et al.*, 2008). L'efficacité avec laquelle le virus HCoV-OC43 infecte le SNC pourrait donc être partiellement associée à l'infection des CSPN, créant ainsi un foyer d'infection qui permet une réplication virale efficace et une implantation facilitant la dissémination à travers l'encéphale et la moelle épinière. En effet, ces cellules peuvent migrer à travers le SNC afin de remplacer les neurones et cellules gliales endommagées ou mortes (Goncalves *et al.*, 2016, Magavi *et al.*, 2000). Ainsi, les dommages et la dégénérescence neurale provoqués par HCoV-OC43 pourraient engendrer un apport constant et stable de CSPN aux lésions et permettre au virus de faciliter sa dissémination à travers le SNC. D'ailleurs, le virus Varicelle-zona (VZV) est reconnu pour infecter les CSPN et s'assurer ainsi d'une première phase de réplication qui lui permet ensuite de se disséminer à travers le SNC (Dukhovny *et al.*, 2012, Pugazhenti *et al.*, 2011). Plus récemment, on a observé que le virus Zika, un flavivirus qui a provoqué une pandémie à travers plusieurs pays d'Amérique du Sud en 2015-16, peut également infecter les cellules souches neurales et arrêter la neurogenèse chez les embryons infectés, contribuant ainsi au développement de microcéphalie et d'éventuels problèmes de développement (Garcez *et al.*, 2016, C. Li *et al.*, 2016a). Sachant que le virus rOC/U_{s183-241} accumule davantage de protéines S (Favreau *et al.*, 2009) et que la production de nouvelles particules infectieuses est plus importante en cultures neuronales murines et humaines (Figure 15C-D), les CSPN représentent peut-être simplement un réservoir qui accélère la dissémination des nombreux virions synthétisés par le virus mutant au SNC.

Une autre hypothèse pouvant expliquer la différence de neuropropagation au SNC entre le virus de référence et mutant réside dans l'interaction entre la glycoprotéine S et d'autres

facteurs cellulaires qui sont détournés par le virus. Le virus de la rage possède aussi une glycoprotéine responsable de la reconnaissance du récepteur cellulaire, permettant ainsi au virus d'entrer dans la cellule hôte par endocytose (Lafon, 2005). Une fois dans l'endosome, cette glycoprotéine se lie au *p75 Nerve growth factor receptor* (p75NTR) et utilise ce dernier pour transporter le virus via les axones au corps cellulaire du neurone afin de réaliser le cycle infectieux (Beier *et al.*, 2013, Gluska *et al.*, 2014). La présence de quelques mutations de la glycoprotéine virale suffit au virus pour obtenir une liaison plus ou moins efficace à p75NTR, ce qui pourrait influencer la vitesse de propagation du virus à l'intérieur du neurone infecté et aux autres neurones (Langevin *et al.*, 2002, Morimoto *et al.*, 2000). Bien que le virus HCoV-OC43 semble se propager par différents moyens, le transport axonal pourrait être l'une des façons que ce dernier utilise pour se disséminer d'un neurone à un autre (communication personnelle, Dr Mathieu Dubé, stagiaire postdoctoral dans le laboratoire du Dr Pierre Talbot). Ainsi, la présence des deux mutations 183 et 241 pourrait permettre au virus mutant de naviguer plus rapidement à travers le cytosquelette du neurone et entamer la synthèse des nouveaux virions plus rapidement. De plus, ces mutations pourraient également accélérer le transport axonal des nouveaux virions aux synapses et accentuer sa propagation.

1.4 Implication des mutations dans le neurotropisme et l'entrée/sortie des nouveaux virions

La protéine S est responsable du tropisme et de l'entrée virale par la reconnaissance du récepteur cellulaire de la cellule hôte, bien que ce dernier ne soit toujours pas identifié avec précision pour HCoV-OC43 (Bosch *et al.*, 2003). La présence d'acides sialiques sont, pour l'instant, les seules structures connues qui semblent nécessaires à la reconnaissance de sa cellule-cible par le virus HCoV-OC43 (Kunkel *et al.*, 1993, F. Li, 2016, Vlasak *et al.*, 1988). L'affinité de la glycoprotéine D, une protéine structurale du virus HSV-1, régule justement l'interaction de ce virus avec différents récepteurs cellulaires pour une infection efficace des neurones (Montgomery *et al.*, 1996, Shukla *et al.*, 1999). La glycoprotéine du virus de la rage est également essentielle afin d'initier l'endocytose du virus, en plus de participer au transport rétrograde des virions à travers le neurone (Desmaris *et al.*, 2001, Mazarakis *et al.*, 2001). La différence de neurovirulence entre le virus ATCC et rOC/U_{s183-241} pourrait donc avoir comme origine l'affinité ou l'avidité de la glycoprotéine S pour son récepteur. Les deux mutations du virus rOC/U_{s183-241}, situées dans le domaine de liaison au récepteur de la protéine S aux positions 183 et 241, correspondent respectivement aux changements de l'acide aminé histidine

en arginine et tyrosine en histidine. Bien que l'histidine et l'arginine soient des acides aminés basiques, leurs structures diffèrent par la présence d'un cycle aromatique pour la première et par une conformation ouverte pour la seconde (Lundblad *et al.*, 2010). Concernant la deuxième mutation, le changement d'un acide aminé aromatique polaire (tyrosine) pour un acide aminé basique (histidine) modifie évidemment l'hydrophilicité de cette région, mais également la configuration de la protéine S dans son ensemble (Karplus, 1997). Ainsi, un changement dans la structure et/ou la polarité de la protéine S pourrait être suffisant pour stabiliser l'interaction entre la glycoprotéine S et son récepteur, accélérant du même coup l'entrée virale dans la cellule hôte.

Une fois la réplication virale effectuée, la sortie des nouveaux virions dans l'environnement pour infecter d'autres cellules peut également s'avérer une étape critique lors d'une infection au SNC. Plusieurs virus neuroinvasifs infectent le neurone et se répliquent dans le corps cellulaire pour bénéficier de la machinerie cellulaire, quitte à parcourir de grandes distances dans les axones pour atteindre cette région, tel qu'observé pour l'adénovirus (Salinas *et al.*, 2009), le virus de la rage (Klingen *et al.*, 2008) et le virus de la poliomyélite (Ohka *et al.*, 2009). Une fois le cycle réplicatif effectué dans la cellule hôte, les nouveaux virions peuvent se disséminer dans l'environnement principalement de deux façons, soient par diffusion libre ou suite à un contact cellule-cellule. La diffusion libre fait généralement intervenir une relâche massive ou progressive de virions dans le milieu extracellulaire à partir du corps cellulaire où les virions vont se disséminer selon un schéma aléatoire (Salinas *et al.*, 2010). L'adénovirus humain (ADV) est particulièrement reconnu pour utiliser principalement cette stratégie de dissémination (Yakimovich *et al.*, 2012). À l'inverse de la diffusion libre, la dissémination virale par contact cellule-cellule nécessite une production de particules infectieuses moins importante, mais davantage polarisée afin de permettre aux virions nouvellement synthétisés d'infecter une cellule proche de la cellule hôte. Cette stratégie de propagation est particulièrement observée chez les virus enveloppés où les protéines virales structurales sont relocalisées du côté apical ou basolatéral de cellules polarisées (Jayakar *et al.*, 2004) et serait davantage utilisée par les virus neurotropes (Koyuncu *et al.*, 2013). D'autres virus neurotropes sont plutôt connus pour se disséminer d'un neurone à un autre via la fente synaptique, l'espace qui sépare deux cellules nerveuses (Salinas *et al.*, 2010). La proximité qui existe entre deux neurones à la synapse neurochimique représente un endroit idéal pour la dissémination virale par contact cellule-cellule (Koyuncu *et al.*, 2013). D'ailleurs, le virus HSV-1 (Diefenbach *et al.*, 2008), le virus de la rage (Dietzschold *et al.*, 2008), le virus de la rougeole (Young *et al.*, 2009) et le virus du Nil occidental

(Samuel *et al.*, 2007) se disséminent tous via les fentes synaptiques. Le virus de la rougeole utilise une stratégie légèrement différente des autres virus en provoquant la microfusion des dendrites et de l'axone de la fente synaptique à l'aide de la protéine virale R, ce qui facilite le passage des virus d'un neurone à un autre sans se retrouver à l'extérieur de la cellule. Or, le marquage de la glycoprotéine S de HCoV-OC43 par immunofluorescence en cultures primaires murines ou en cellules humaines s'avère plus important au niveau du corps cellulaire, suggérant que la production de nouvelles particules infectieuses se situe également à cet endroit (Figure 14). De plus, la détection des protéines S le long des axones indique aussi la possibilité que le virus se déplace en direction des fentes synaptiques afin de se disséminer via contact cellule-cellule, bien que la présence d'axones matures et de synapses chez les cellules LA-N-5 différenciées n'est pas établie avec certitude. L'utilisation de milieux de culture restrictifs pour la diffusion libre de particules infectieuses a permis de supposer que le virus de référence est en mesure de se disséminer autant par diffusion libre que suite à un contact entre deux neurones (Dubé *et al.*, manuscrit en préparation). Cependant, la production plus importante de particules infectieuses du virus rOC/U_{s183-241} parmi les cellules LA-N-5, autant dans le milieu extracellulaire (*free virus*) qu'au niveau cellulaire (*cell-associated virus*), suggère que la diffusion libre sera plus importante dans ce cas, accélérant ainsi la propagation virale. De plus, il est possible que les mutations dans la protéine S influencent la stratégie de dissémination virale dans le neurone. En effet, la glycoprotéine D du virus herpétique PRV (*pseudorabies virus*) n'est pas essentielle à la neuroinvasion et à la dissémination virale via la synapse mais est nécessaire à la diffusion libre des particules des neurones infectés par un mécanisme encore inconnu (Ch'ng *et al.*, 2007, Peeters *et al.*, 1993). La présence de mutations dans la glycoprotéine S pourrait donc favoriser la diffusion libre des nouvelles particules infectieuses. Toutefois, la similarité des titres infectieux (production de particules virales infectieuses) dans le milieu extracellulaire des cultures primaires murines entre les deux virus (Figure 15C), de même que dans les cerveaux ou les moelles épinières de souris infectées (Publication n°1, Figure 12D) témoigne peut-être d'une plus grande difficulté des nouveaux virions à se propager entre les neurones par diffusion libre, à tout le moins chez la souris. Néanmoins, le virus rOC/U_{s183-241} se propage plus rapidement dans le SNC au point d'infecter la moelle épinière 2 jours plus tôt que le virus de référence (Figure 12D, panneau de droite). Le virus HCoV-OC43 s'est donc probablement adapté pour utiliser différentes stratégies de propagation, dépendamment de son hôte, du type de cellule infectée ou de l'architecture cellulaire. Il est donc évident que les étapes d'entrée dans la cellule hôte, de la réplication et de la diffusion sont toutes à même d'influencer la pathologie neurologique dépendamment de leur efficacité et de la façon d'opérer.

1.5 Implication des mutations dans la réponse immunitaire du SNC

La présence du HCoV-OC43 dans le SNC ne passe évidemment pas inaperçue alors que l'hôte tente de mettre en place une réponse immunitaire pour éliminer le virus. La balance du pouvoir s'établit alors entre les deux protagonistes alors que le virus cherche à restreindre son hôte dans la réaction immunitaire alors que l'hôte cherche à éviter la réplication et la propagation virale à tout l'organisme. L'infection du SNC par le virus HCoV-OC43 n'échappe pas à cette règle puisqu'elle provoque chez la souris, l'infiltration de lymphocytes T CD4+, CD8+ ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-6, IFN γ) et de chimiokines (CCL2, CCL5, CXCL10) dans le cerveau et la moelle épinière (Jacomy *et al.*, 2010). D'ailleurs, il a été observé que le coronavirus neuroinvasif MHV-A59 induit la production de différentes cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF α , par les astrocytes qui sont également infectés par le virus (Y. Li *et al.*, 2004b). Les auteurs de cette dernière publication ont démontré que, contrairement à la souche A59, l'infection d'astrocytes par le coronavirus avirulent MHV-2, n'engendre pas d'augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires, suggérant que l'activation des astrocytes et l'établissement d'un environnement inflammatoire sont associés avec la neurovirulence observée en souris. La corrélation entre la neurovirulence et la réaction inflammatoire médiée par les astrocytes dans le SNC a également été démontrée pour d'autres infections virales, notamment le coronavirus MHV-JHM (N. Sun *et al.*, 1995), le virus de Theiler (A. Inoue *et al.*, 1998) et le WNV (M. Kumar *et al.*, 2010). En 2010, Jacomy *et al.* ont utilisé le virus mutant rOC/Us₂₄₋₂₄₁, un variant possédant les mutations D24Y, S83T, H183R et Y241H (rOC/U_{s24-241}). À l'aide de ce variant, ils ont démontré que l'infection du SNC par rOC/Us₂₄₋₂₄₁ induit l'augmentation significative de l'infiltration des lymphocytes T et l'expression de certaines cytokines (IL-6) ou chimiokines (CCL2) pro-inflammatoires au SNC comparé au virus de référence. Même si le virus rOC/U_{s183-241} ne possède que deux des quatre mutations du variant précédent, on peut supposer que le virus rOC/U_{s183-241} provoque également une réponse immunitaire plus importante que le virus de référence, d'autant plus que l'activation des astrocytes, un marqueur d'inflammation dans le SNC, s'est avérée légèrement plus importante et davantage maintenue dans le temps au niveau de l'hippocampe (Figure 13B). Cette activation des astrocytes a été observée par la détection de la protéine acide fibrillaire gliale (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP), un filament intermédiaire exprimé par les astrocytes dont l'expression augmente lorsque ceux-ci sont activés (Pekny *et al.*, 2014). Même si on considère que le degré de détection du GFAP est proportionnel à l'activation des astrocytes, cette méthode ne peut pas identifier comment ces cellules participent à l'inflammation. La

différence d'activation des astrocytes entre l'infection par le virus de référence et le virus mutant apparait somme toute relativement modérée mais cela n'indique pas que le virus mutant ne peut pas déclencher une réponse immunitaire plus importante. Or, l'infection des cultures primaires murines mixtes du SNC, qui incluent entre autres des neurones et des astrocytes, a permis de constater que ces derniers peuvent également être infectés par le virus rOC/U_{s183-241}. Bien qu'il est difficile de mesurer la différence d'infektivité des astrocytes entre le virus de référence et le virus mutant, nous pouvons tout de même émettre l'hypothèse que la présence des deux mutations dans la glycoprotéine S peut influencer l'infection des astrocytes et engendrer leur activation de façon plus importante, contribuant ainsi à maintenir un environnement inflammatoire et induire une neurovirulence accrue. Cela illustre bien l'importance d'avoir, pour le SNC, un contrôle sur les mécanismes immunitaires afin d'éviter les effets délétères pour l'hôte d'une réaction immunitaire trop importante. Idéalement, la quantification des cytokines et des chimiokines présentes dans le SNC suivant l'infection par le virus rOC/U_{s183-241} nous permettrait d'établir un portrait plus complet de la réaction immunitaire et de comparer les effets du virus sur cette réaction. De plus, l'utilisation de souris *knockout* pour certains composants de l'immunité innée (IFNAR, TLR, etc.) pourrait nous permettre d'identifier les facteurs impliqués dans la réponse du système immunitaire et également évaluer les effets possiblement délétères de cette réponse dans la neuropathologie.

Finalement, la glycoprotéine S est la protéine structurale la plus reconnue par le système immunitaire, entraînant la production d'anticorps neutralisants et l'activation des lymphocytes T CD8+. La présence d'anticorps neutralisants peut à la fois neutraliser les particules virales en se fixant sur les protéines structurales externes à la capsid ou se fixer aux cellules infectées et entraîner l'élimination de celles-ci par opsonisation (Wentworth *et al.*, 2007). La présence de mutations dans la protéine S pourrait permettre au virus d'éviter la reconnaissance du système immunitaire via les anticorps neutralisants et ainsi échapper à tout contrôle par ce dernier. Or, la mutation de séquences dans les régions virales reconnues par le système immunitaire peut mener à un autre phénomène appelé mimétisme moléculaire. Ce phénomène se traduit par la présence de séquences similaires entre une protéine virale et une protéine de l'hôte et qui résulte par l'activation croisée de cellules T ou B autoréactives. En d'autres termes, la proximité séquentielle et structurale entre la protéine virale avec des protéines du soi engendre une maladie auto-immunitaire issue d'une infection virale (Guyen-Maiorov *et al.*, 2016). Quelques infections virales sont connues pour induire la prolifération et l'activation de cellules T ou B autoréactives conduisant à des pathologies auto-immunitaires. Par exemple, l'infection du SNC

par le virus EBV peut entraîner l'apparition de lymphocytes B autoréactifs qui produiront des anticorps dirigés contre l'une des protéines de la myéline la MBP, ce qui suggère que le virus EBV pourrait être l'un des agents causals de la sclérose en plaques, une maladie où la myéline est attaquée par le système immunitaire (Lang *et al.*, 2002, Pender *et al.*, 2014). Le TMEV est également connu pour induire une pathologie démyélinisante où la présence de lymphocytes T CD4+ autoréactifs cible et détruit l'une des protéines composant la myéline, la PLP (S. D. Miller *et al.*, 1997). Chez les coronavirus humains, la présence de cellules autoréactives, capables de reconnaître autant les antigènes viraux que ceux de la myéline, a été détectée de façon significative dans le sang de patients atteints de sclérose en plaques (Boucher *et al.*, 2007, Talbot *et al.*, 1996). Ainsi, la présence de mutations dans la glycoprotéine S pourrait accentuer sa détection par le système immunitaire et accélérer l'activation de la réponse immunitaire et de lymphocytes autoréactifs, contribuant ainsi à induire ou exacerber les pathologies neurologiques.

1.6 Implication des mutations dans les mécanismes cellulaires des cellules gliales

La signalisation et les mécanismes moléculaires des cellules composant le SNC étant essentiels à l'homéostasie du SNC, il n'est pas surprenant que la présence d'un virus qui interfère dans ces processus puisse induire des désordres neurologiques. D'ailleurs, le degré de neurovirulence associé à certains virus est directement relié au stress subit aux cellules du SNC. Parmi ces stress induits par les virus, notons le stress au réticulum endoplasmique (RE) et l'activation subséquente de la réponse aux protéines mal repliées (*unfolded protein response*; UPR). Par le passé, le laboratoire du Dr Pierre Talbot a démontré que le virus HCoV-OC43 provoque chez les neurones infectés un stress au RE, ce qui se traduit par une diminution de la synthèse protéique et l'activation partielle de la UPR (Favreau *et al.*, 2009). À l'exception de la protéine N, toutes les protéines structurales des coronavirus sont synthétisées au RE, en plus de subir dans le cas des protéines M, HE et S des modifications post-traductionnelles de glycosylation (Fung *et al.*, 2014b). Or, la grande quantité de protéines virales synthétisées et la complexité des modifications post-traductionnelles sur celles-ci vont provoquer un réarrangement morphologique du RE, une synthèse protéique excédant la capacité du RE et une diminution des composantes lipidiques du RE résultant en l'activation du système UPR (Fung *et al.*, 2014a). D'ailleurs, l'induction de stress au RE ainsi que la réponse du système UPR ont également été observées lors d'infections par les coronavirus SARS-CoV (C. P. Chan

et al., 2006), HCoV-HKU1 (K. L. Siu *et al.*, 2014b), IBV (Liao *et al.*, 2013) et MHV (Versteeg *et al.*, 2007). Dans tous ces cas, l'activation du système UPR a entraîné une diminution de la synthèse protéique cellulaire, la synthèse de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la mort cellulaire, contribuant d'autant plus à la virulence du virus. D'ailleurs, l'activation de la UPR est beaucoup plus importante en présence du virus HCoV-OC43 mutant. Hormis la production plus importante de protéines virales au RE, les raisons qui expliquent comment ce virus mutant peut avoir un tel effet sur le système UPR restent obscures. Néanmoins, la littérature recense plusieurs virus dont la neurovirulence est directement reliée au degré d'activation du système UPR, notamment chez certains rétrovirus murins (Peterson *et al.*, 2004), le virus Borna (B. L. Williams *et al.*, 2006), le WNV (van Marle *et al.*, 2007) ainsi que le MHV (Versteeg *et al.*, 2007).

La perturbation de la signalisation cellulaire peut également avoir une portée sur l'homéostasie existante entre les cellules neuronales et gliales. En effet, le virus HCoV-OC43 provoque une diminution de l'expression du *glial glutamate transporter* (GLT-1) (Brison *et al.*, 2014), une protéine transmembranaire située à la surface des astrocytes et qui recycle le glutamate au niveau de la synapse neurologique (Rimmele *et al.*, 2016). Cela entraîne une accumulation excessive de glutamate dans la fente synaptique qui provoque alors l'activation et l'ouverture des canaux ioniques AMPA ou NMDA. Ces deux protéines transmembranaires sont respectivement responsables de l'entrée cellulaire des ions sodium et calcium (Ribeiro *et al.*, 2016). L'entrée massive de ces ions, absorbés en partie par le RE et la mitochondrie, déséquilibre le potentiel électrique de la cellule et contribue à la dégénérescence neuronale en activant une multitude de phospholipases, d'endonucléases et de protéases. Le phénomène de dégénérescence neuronale attribué au dérèglement du glutamate est appelé excitotoxicité glutamatergique (Prentice *et al.*, 2015). Comparativement au virus de référence, le virus mutant rOC/U_{s241} induit davantage d'excitotoxicité glutamatergique, phénomène qui est possiblement la cause des dysfonctions motrices et de la paralysie des membres inférieurs observées chez les souris infectées (Brison *et al.*, 2011, Brison *et al.*, 2014). Bien que le neurone soit la cible principale du virus, il n'est pas impossible que l'infection éventuelle des astrocytes participe au dérèglement de l'expression de GLT-1 et à l'établissement de l'excitotoxicité glutamatergique. De plus, une expression importante de cytokines pro-inflammatoires, détectée chez les souris infectées par le virus ATCC et rOC/U_{s241} (Brison *et al.*, 2014), contribue également à diminuer l'expression de GLT-1 (Carmen *et al.*, 2009, Okada *et al.*, 2005, Prow *et al.*, 2008). Ainsi, il est plausible que la grande quantité de particules infectieuses produites par le virus rOC/U_{s183-241} épuise rapidement les neurones susceptibles à l'infection, provoquant ensuite l'infection des

astrocytes, en parallèle à l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Cette dynamique pourrait alors accentuer l'excitotoxicité glutamatergique, les dommages neuronaux et éventuellement la dégénérescence cellulaire, contribuant ainsi à la neurovirulence de ce virus. D'ailleurs, le virus neuroadapté Sindbis provoque la dégénérescence des motoneurons de la moelle épinière chez la souris ou le rat par excitotoxicité glutamatergique (Darman *et al.*, 2004).

Le virus HCoV-OC43 représente donc un pathogène neuroinvasif et neurotrophe qui, suivant l'infection des cellules du SNC, perturbe à différents niveaux l'homéostasie cellulaire. Le détournement de la machinerie cellulaire de ces cellules pour la synthèse de nouvelles particules infectieuses rend évidemment le SNC vulnérable à une accumulation de dommages qui se traduit par une neuropathologie, à tout le moins en souris. La virulence accrue du virus portant les mutations 183 et 241 sur la glycoprotéine S est probablement largement attribuée à sa capacité à produire davantage de nouveaux virions, ce qui accélère la propagation virale, de même que les dommages subséquents. Il est fort probable que l'instauration d'un état inflammatoire, l'activation de divers systèmes en réponse au stress intracellulaire et la réplication du virus en elle-même affectent la cellule-hôte et conduisent cette dernière à une mort certaine. Or, face à la menace virale, la réponse neuronale peut se manifester de diverses façons afin de contenir le parasite viral. D'ailleurs, la mort cellulaire est un moyen extrême et final, initiée par une cellule infectée pour tenter de mettre fin à la dissémination virale. De plus, la dégénérescence neuronale est l'une des caractéristiques communes des maladies neurodégénératives et peut faire intervenir un vaste éventail de facteurs cellulaires et de voies de mort différents qui contribue à l'émergence ou la sévérité des maladies neurologiques (Bredesen, 2008, Martin, 2001). Cependant, cette manifestation peut aussi s'avérer délétère pour l'hôte, surtout considérant le site d'infection, le SNC, qui représente un système complexe et méconnu. L'étude de ces mécanismes représente donc un point de départ intéressant pour mieux comprendre la virulence de HCoV-OC43 au cerveau et le possible lien existant entre ce virus et les maladies neurodégénératives.

2. LA DÉGÉNÉRESCENCE NEURONALE INDUITE PAR LE VIRUS HCoV-OC43 N'EST PAS RELIÉE À UNE APOPTOSE CLASSIQUE

2.1 Contexte

Dans un deuxième temps, l'objectif des travaux présentés dans cette thèse était de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la mort cellulaire régulée (MCR) induite par le virus HCoV-OC43 et par une caractérisation des facteurs cellulaires impliqués. De précédents travaux du laboratoire du Dr Talbot ont permis d'établir qu'en souris, l'infection du SNC par le virus de référence cause la mort des neurones, sans toutefois établir le mécanisme ou les facteurs cellulaires mis en cause (Jacomy *et al.*, 2006). En effet, la dégénérescence neuronale a été visualisée par la technique TUNEL détectant la fragmentation nucléaire mais qui n'est pas en mesure de discriminer parmi les différents types de MCR. Jusqu'à tout récemment, notre connaissance sur la MCR se réduisait à l'apoptose, un phénomène régulé par différents facteurs cellulaires, et la nécrose, un type de mort accidentelle sans réelle implication de la cellule (UV, osmose, pH, etc). À ce jour, le domaine de la mort cellulaire s'est considérablement complexifié et il existe maintenant une classification de MCR, différenciée selon les facteurs cellulaires associés. Initialement, le facteur pro-apoptotique Bax a été identifié comme étant un facteur potentiellement impliqué dans la mort neuronale induit par l'infection de HCoV-OC43 (Favreau *et al.*, 2012). Ainsi, dans un premier temps, je me suis intéressé à ce facteur afin de mieux caractériser son rôle dans la réponse neuronale à l'infection et l'implication de ce dernier dans la virulence.

2.2 Activation apparente du facteur Bax sans impact sur la mortalité neuronale induite par HCoV-OC43

La protéine Bax est un facteur pro-apoptotique qui se retrouve principalement dans le cytosol lorsqu'il reste sous forme inactive. En condition de stress, le facteur Bax est clivé dans sa partie N-terminale, principalement par les calpaines, ce qui entraîne sa relocalisation à la mitochondrie (W. S. Choi *et al.*, 2001, Wood *et al.*, 1998). Une fois inséré dans la membrane externe de la mitochondrie, le fragment de 18 kb correspondant à Bax peut s'associer avec d'autres facteurs pro-apoptotiques, notamment Bid, Bim ou Bak, afin de former un pore

transmembranaire (Billen *et al.*, 2008, Dewson *et al.*, 2009, Gavathiotis *et al.*, 2008). En plus de briser le potentiel membranaire et de perturber la phosphorylation oxydative, le pore formé par Bax libère plusieurs facteurs présents dans la lumière de la mitochondrie et qui seront impliqués dans la cascade de l'apoptose, notamment le cytochrome C (Ghibelli *et al.*, 2010). La publication de Favreau *et al.* 2012, a démontré que Bax est bien relocalisé à la mitochondrie suite à l'infection de neurones par HCoV-OC43 et que la présence de cytochrome C dans la mitochondrie diminue grandement, suggérant que le virus induit l'activation du facteur Bax qui perméabilise la membrane de la mitochondrie et contribue à la mort neuronale (Favreau *et al.*, 2012). Cependant, la façon par laquelle ce facteur est activé et le rôle joué par ce dernier dans la mort neuronale restaient à être précisés. Ainsi, nos données nous ont d'abord confirmé que l'infection par HCoV-OC43 augmente dans le temps la transcription de l'ARNm correspondant au facteur Bax (Figure 16A.), autant dans les cultures neuronales humaines que murines. Cette augmentation en ARNm suggère que la réponse neuronale s'active en partie par la synthèse de ce facteur afin de provoquer la mort cellulaire par cette voie. D'ailleurs, les virus WNV (Parquet *et al.*, 2001), TGEV (Y. Huang *et al.*, 2013), HCV (Deng *et al.*, 2008), VIH (Castedo *et al.*, 2001) et MHV (Y. Liu *et al.*, 2006) sont tous reconnus pour induire une augmentation de l'expression du facteur Bax durant le cycle infectieux et éventuellement de provoquer la mort de la cellule-hôte. De plus, l'augmentation de la transcription de Bax est également plus prononcée lors de l'infection par le virus mutant, probablement en réponse à la réplication virale plus importante ou par le plus grand nombre de cellules infectées comparativement au virus de référence. Étrangement, l'infection des cultures neuronales murines et humaines n'a engendré aucune augmentation de la protéine Bax, suggérant qu'aucune traduction significative de ce facteur ne suit l'augmentation en ARNm (Figure 16B). L'une des hypothèses pouvant expliquer ce phénomène se rapporte aux différents facteurs qui régulent Bax et qui pourraient être manipulés par le virus pour empêcher la cellule d'accomplir la mort cellulaire. Parmi les régulateurs du facteur Bax, le facteur de transcription p53 est, sans contredit l'un des plus étudiés. Ce facteur de transcription, exprimé dans la majorité des types cellulaires, dont les neurones, se rend au noyau et facilite la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, en plus d'activer plusieurs facteurs impliqués dans la mort cellulaire (Basu *et al.*, 1998, Morrison *et al.*, 2000). Bien qu'aucune interaction directe n'ait été identifiée entre Bax et p53, ce dernier est tout de même en mesure d'initier la perméabilisation de la mitochondrie en impliquant Bax par un mécanisme encore inconnu (Chipuk *et al.*, 2004, Vaseva *et al.*, 2009). Or, le coronavirus aviaire IBV engendre une mort cellulaire de type apoptotique qui n'implique pas p53 (F. Q. Li *et al.*, 2007) et dont les niveaux protéiques de Bax restent stables par rapport aux cellules non

infectées (Zhong *et al.*, 2012). Il est donc plausible que le virus HCoV-OC43 altère l'état de p53 ou interfère avec ce dernier, ce qui empêche la mort cellulaire de s'effectuer via la protéine Bax. Bien qu'aucune protéine virale de HCoV-OC43 n'ait été reconnue pour interagir avec p53 ou Bax, la protéase homologue à la papaine (*papain-like protease*, PLP) retrouvée chez le coronavirus HCoV-NL63 est capable de stabiliser la protéine oncogène MDM2 qui induit la dégradation protéosomale de p53 dans l'optique de restreindre l'activation des facteurs liés à l'interféron et de bloquer l'induction de l'apoptose (L. Yuan *et al.*, 2015). De plus, de nombreux virus ont développé différentes stratégies pour inhiber l'apoptose, notamment en ciblant le facteur Bax. Parmi ces stratégies virales, les ADV (Rao *et al.*, 1992), le CMV (Poncet *et al.*, 2006), le EBV (W. L. Marshall *et al.*, 1999), le *Herpesvirus saimiri* (Nava *et al.*, 1997), le MXV (J. Su *et al.*, 2006), le PPVO (Westphal *et al.*, 2007) et le VACV (Cooray *et al.*, 2007) encodent tous une ou des protéines virales considérées comme des analogues au facteur Bcl-2, l'antagoniste cellulaire direct de Bax, qui bloque la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. À ce jour, aucune protéine virale de HCoV-OC43 n'a été reconnue pour avoir une telle activité et la raison pour laquelle l'infection ne provoque pas d'augmentation plus importante de Bax reste inconnue. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène reste l'implication du virus à interférer dans la traduction du facteur cellulaire Bax. Or, la glycoprotéine S du SARS-CoV ainsi que d'IBV a la capacité d'interagir avec le facteur d'initiation de la traduction eIF-3f, ce qui résulte en l'inhibition de la synthèse protéique (Xiao *et al.*, 2008). Les auteurs ont ainsi démontré que la présence de ces virus induit la transcription des cytokines IL-6 et IL-8, mais l'interaction entre la protéine virale S et eIF-3f empêche celles-ci d'être traduites de façon efficace. Ainsi, il est possible que la protéine S chez HCoV-OC43 puisse également cibler d'autres facteurs cellulaires dont Bax.

L'utilisation d'ARN interférent (ARNi) pour inhiber l'expression de la protéine Bax (Figure 17) nous a permis de confirmer l'absence de rôle significatif de cette protéine dans la mort neuronale induite par le virus. De plus, l'approche complémentaire consistant à surexprimer le facteur anti-apoptotique Bcl-2 qui inhibe directement Bax (Figure 21), n'a pas permis de protéger davantage les cellules neuronales humaines LA-N-5 contre la mort cellulaire induite par HCoV-OC43. Le facteur cellulaire Bcl-2 est une protéine dont le rôle consiste à empêcher Bax de former un pore dans la membrane de la mitochondrie. Ce facteur peut autant s'associer avec Bax lui-même à la membrane externe de la mitochondrie ou interagir avec d'autres facteurs qui activent ce dernier (Zheng *et al.*, 2015). Ainsi, autant l'inhibition de l'expression du facteur Bax que la surexpression de son antagoniste ont permis d'illustrer l'absence de rôle significatif de ce

facteur durant la mort neuronale induite par HCoV-OC43. L'infection du modèle neuronal par le virus VSV ou le traitement des cellules avec la staurosporine, tous deux reconnus pour activer l'apoptose via le facteur Bax, a également permis d'établir que la mort cellulaire liée à Bax est totalement fonctionnelle (Figure 17D). Ces résultats suggèrent aussi que la modulation de ce facteur pro-apoptotique est probablement davantage issue d'une intervention du virus que liée à l'état immortalisé du modèle cellulaire. Le coronavirus HCoV-OC43 pourrait donc avoir développé une stratégie pour atténuer la mort cellulaire en ciblant la voie apoptotique dépendante au facteur Bax sans réussir à inhiber complètement la mort cellulaire.

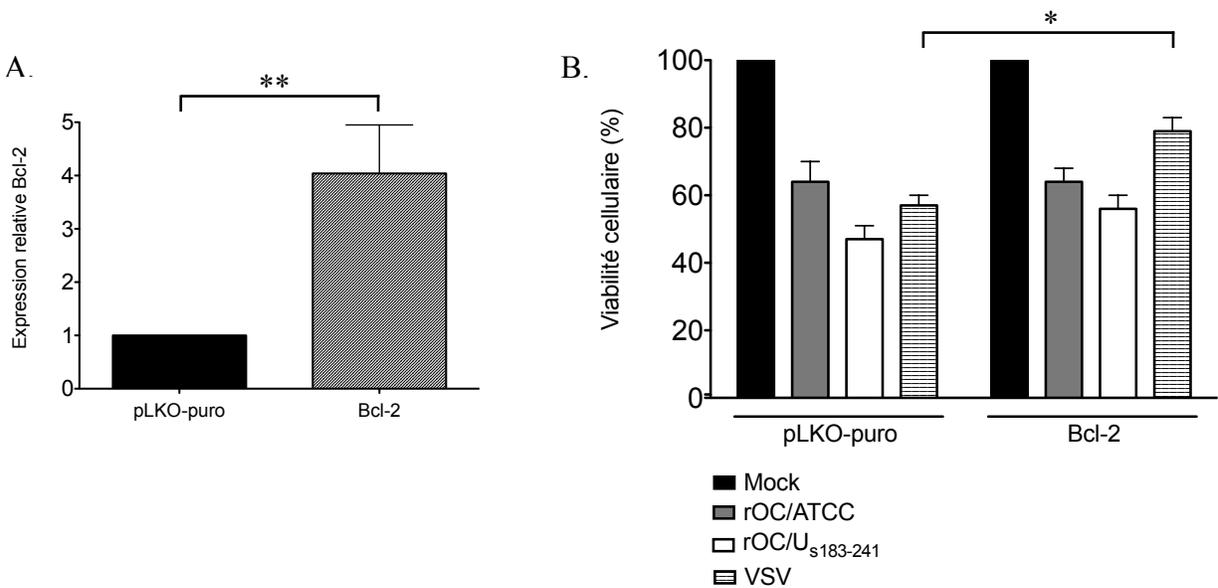


Figure 21. La surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 ne protège pas les cellules LA-N-5 contre la mort cellulaire induite par HCoV-OC43. (A) Niveau de surexpression du facteur Bcl-2 mesuré par PCR quantitatif (qPCR) sur les populations LA-N-5 contrôles (pLKO-puro) et qui surexpriment Bcl-2 (Bcl-2). (B) La mortalité cellulaire demeure inchangée entre les cellules infectées par HCoV-OC43 de référence ou mutant (MOI 0,2) lorsque le facteur Bcl-2 est surexprimé. À l'inverse de HCoV-OC43, l'infection par le VSV (MOI 1), reconnu pour induire une mort cellulaire impliquant le facteur Bax, provoque une mort cellulaire qui peut être atténuée par la surexpression du facteur Bcl-2. Les résultats sont représentés comme la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes. Statistiques : *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; Test de Student.

Tel que rapporté (Favreau *et al.*, 2012) le facteur Bax est relocalisé à la mitochondrie suite à l'infection des cellules LA-N-5 par HCoV-OC43, ce qui peut paraître contradictoire compte tenu de l'absence de participation de l'apoptose associée à ce facteur dans la mort neuronale. Or, l'infection des neurones par HCoV-OC43 influence l'état de la cellule, comme en témoigne le stress au RE et la modulation des facteurs associés à la UPR. La réplication virale de quelques coronavirus, notamment le MHV (S. Guo *et al.*, 2015b), le TGEV (L. Zhu *et al.*, 2016) et le

SARS-CoV (S. W. Li *et al.*, 2016c), entraîne aussi l'accumulation de *reactive oxygen species* (ROS), des composés chimiques issus de la respiration cellulaire qui s'avèrent toxiques pour la cellule lorsqu'ils s'accumulent en trop grande quantité. Le stress oxydatif qui en résulte est un phénomène qui se caractérise par un déséquilibre entre l'accumulation intracellulaire de radicaux libres et des ROS et la détoxification de ces composés par des protéines cellulaires dans la mitochondrie (Andreyev *et al.*, 2005). Or, un groupe de recherche a démontré que lorsqu'un certain niveau d'altération oxydative intracellulaire est atteint, le facteur Bax est relocalisé à la mitochondrie mais sans initier l'activation de l'apoptose (D'Alessio *et al.*, 2005). Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'une accumulation importante de ROS ou d'ions Ca^{2+} dans le cytosol modifie les charges sur la protéine Bax, ce qui serait suffisant pour sa relocalisation à la mitochondrie sans provoquer la libération du contenu mitochondrial. Le facteur Bax pourrait alors agir comme senseur physico-chimique de la composition intracellulaire et détecter un stress affectant la mitochondrie ou le RE. Il est donc possible que la réplication virale de HCoV-OC43 provoque des changements oxydatifs chez les neurones infectés suffisants pour induire le déplacement de Bax à la mitochondrie mais sans déclencher la fonction pro-apoptotique de ce dernier. Une étude plus approfondie serait nécessaire pour confirmer la modulation du facteur Bax par HCoV-OC43 et établir comment le virus interfère dans cette voie.

2.3 Possible implication de partenaire du facteur Bax

Considérant la complexité des éléments impliqués dans la MCR et les interactions potentielles existant entre eux, il est possible que des partenaires du facteur Bax interviennent en l'absence de ce dernier ou jouent un rôle plus important dans le processus de mort cellulaire induit par HCoV-OC43. Ainsi, l'inhibition de l'expression du facteur Bax par ARNi pourrait se traduire par la relève d'autres facteurs assurant la mort du neurone infecté. La protéine Bak, un autre facteur pro-apoptotique, est le seul partenaire connu qui participe activement à la mort cellulaire de façon similaire au facteur Bax. En effet, Bak, qui est systématiquement retrouvé dans la membrane externe de la mitochondrie, peut s'associer ou non avec Bax pour former un pore dont la grosseur permet la relâche de molécules de plus de 50 kDa (Kroemer *et al.*, 2007). Bien que la relation avec son partenaire et l'implication de cette interaction ne soient pas encore totalement caractérisées, il apparaît que dans certains cas, le facteur Bak pourrait agir comme facteur pro-apoptotique d'urgence lorsque Bax n'est pas en mesure d'assurer l'apoptose (Garcia-Saez, 2012, Zheng *et al.*, 2015). L'inhibition de ces deux facteurs semble donc être

dans certains cas, la façon la plus sûre de bloquer totalement l'apoptose. Ainsi, en parallèle à l'inhibition de Bax, il aurait été utile d'utiliser un autre ARNi pour bloquer également l'expression de Bak et avoir un modèle cellulaire double *knockout*. À l'aide d'un tel modèle, nous pourrions établir si le facteur Bak contribue seul ou en collaboration avec Bax à la mort neuronale suivant l'infection de HCoV-OC43.

Évidemment, nous ne pouvons écarter l'hypothèse que l'inhibition d'un facteur pro-apoptotique ait favorisé l'activation d'une autre voie de MCR, dans le contexte d'une infection virale par HCoV-OC43 sur des neurones. Toutefois, il reste difficile de démontrer le caractère alternatif d'une MCR par rapport à une autre. Néanmoins, des chercheurs ont utilisé le virus de Theiler (TMEV) pour démontrer l'utilisation alternative de la cellule infectée d'une MCR lorsque l'apoptose n'est pas en mesure de procéder à la mort cellulaire. En effet, en bloquant chimiquement l'apoptose induite chez des macrophages infectés par le TMEV, les auteurs ont démontré que les facteurs liés à la nécroptose étaient activés, permettant aux cellules infectées d'être éliminées, réduisant ainsi la propagation virale (Son *et al.*, 2015). Suite à l'absence de rôle prépondérant du facteur Bax dans la mort neuronale induite par HCoV-OC43, nous avons donc poursuivi l'identification de facteurs cellulaires impliqués dans la dégénérescence neuronale.

Bien que la cyclophiline D soit aujourd'hui plutôt associée à un autre type de MCR non apoptotique (MPT-RN, voir chapitre I, p. 58), ce facteur intervient également auprès de la mitochondrie pour assurer la mort cellulaire (Linkermann *et al.*, 2014). Ce facteur, qui régule l'ouverture du pore situé à la membrane interne de la mitochondrie, s'associe probablement avec d'autres partenaires, mais pas avec Bax ou Bak (Zamorano *et al.*, 2012). Or, le laboratoire du Dr Talbot a démontré que la cyclophiline D participe, quoique partiellement, à la mort neuronale induite par HCoV-OC43 (Favreau *et al.*, 2012). Ainsi, il est possible que dans ce contexte, la mitochondrie joue bel et bien un rôle durant le processus de mort cellulaire, mais en ne faisant pas intervenir le facteur Bax mais plutôt CypD. L'importance de la CypD dans le processus de perméabilisation de la mitochondrie, au détriment du facteur Bax, rend alors l'utilisation de techniques inhibant l'expression de Bax inutile. Toutefois, l'inhibition de la CypD par l'inhibiteur chimique cyclosporine A (CsA) ne permet pas d'augmenter de façon très importante la survie cellulaire (Favreau *et al.*, 2012), suggérant que le rôle de ce facteur dans la mort neuronale induite par HCoV-OC43 est somme toute modeste. Il est possible que ce dernier

travaille de concert avec d'autres facteurs ou d'autres voies de MCR dont l'implication est davantage certaine dans la mort des neurones infectés.

3. ACTIVATION D'UNE FORME DE MCR ANALOGUE À LA NÉCROPTOSE IMPLIQUANT LES FACTEURS RIP1 ET MLKL

3.1 Ubiquitination et caspase-8 précédant l'activation de la nécroptose

La mort neuronale activée suite à l'infection par HCoV-OC43 n'est pas diminuée lorsque l'activité des caspases est inhibée malgré leurs activations évidentes (Favreau *et al.*, 2012). La nécroptose, un type de MCR dont la caractérisation était à ses premiers balbutiements en 2012, a attiré notre attention. En effet, cette MCR est habituellement activée lorsque la caspase-8 n'est pas fonctionnelle ou est absente (de Almagro *et al.*, 2015). Ainsi, l'absence de protection contre la mort des neurones infectés par HCoV-OC43 en présence d'inhibiteurs de caspases nous a amené à penser qu'un autre type de MCR serait impliquée et que celle-ci pouvait être la nécroptose. D'ailleurs, on considère de plus en plus l'activation de la nécroptose chez un organisme comme un mécanisme alternatif à l'apoptose, dans l'optique d'éliminer les cellules incapables d'activer la mort cellulaire par la voie apoptotique classique (Vanden Berghe *et al.*, 2016, J. Yuan *et al.*, 2010). De plus, la sévérité de certaines maladies neurologiques ou pathologies associées au SNC a été reliée à l'activation de ces facteurs, notamment pour la sclérose en plaques (Ofengeim *et al.*, 2015b), la sclérose latérale amyotrophique (Re *et al.*, 2014), l'ischémie cérébrale (B. Yin *et al.*, 2015) et la maladie de Huntington (S. Zhu *et al.*, 2011). Finalement, à ce jour, quelques virus sont reconnus pour induire une réponse cellulaire qui fait intervenir l'un ou l'autre des facteurs associés à la nécroptose, soit le réovirus (Berger *et al.*, 2013), le VIH (Pan *et al.*, 2014), le coxsackievirus (Harris *et al.*, 2015), le virus de la vaccine (Y. He *et al.*, 2014) et deux virus de la famille des *herpesviridae*, le CMV (Upton *et al.*, 2010) et le HSV-1 (Z. Huang *et al.*, 2015c). Ainsi, la nécroptose et l'implication des facteurs cellulaires RIP1, RIP3 et MLKL se sont avérés des pistes intéressantes à explorer afin de comprendre comment les neurones meurent suite à l'infection par HCoV-OC43.

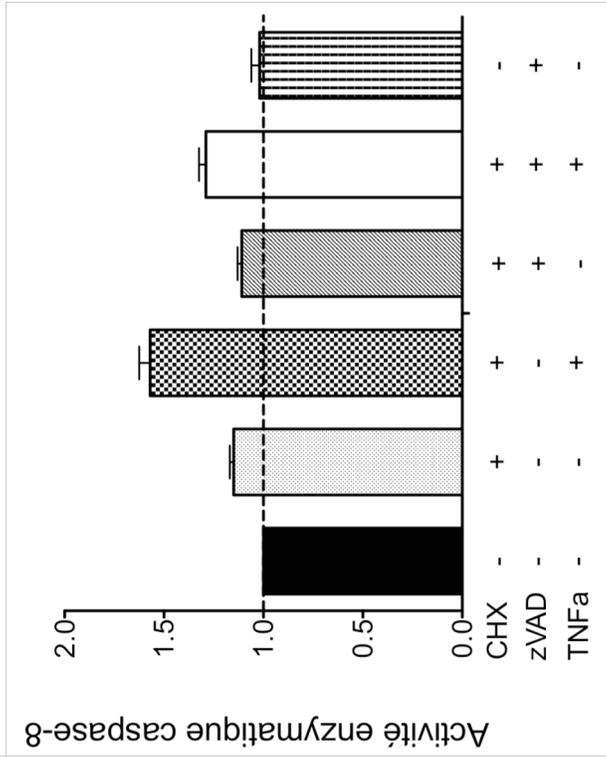
Au fil des dernières années, la caractérisation des processus reliés à la nécroptose s'est accélérée et plusieurs éléments du casse-tête qui mène à cette MCR sont maintenant connus. Pendant un certain temps, la seule voie d'activation de la nécroptose reposait sur la liaison du TNF α à des récepteurs de mort (TNFR1, TRAIL-R, Fas) situés à la membrane cytoplasmique, menant éventuellement à l'activation du facteur initiateur de cette MCR, RIP1 (Meylan *et al.*, 2005). Cette protéine kinase a longtemps gardé une partie de son secret mais aujourd'hui, on sait que des modifications post-traductionnelles d'ubiquitination et de dé-ubiquitination sont

essentielles pour orienter sa fonction qui peut s'avérer pro-survie tout comme pro-mort (Vanden Berghe *et al.*, 2014). Suivant le détachement du complexe TNF α /TNFR de la membrane pour sa relâche au cytosol, la simple présence du facteur RIP1 permet la formation de complexes protéiques essentiels à une activation de la voie NF- κ B, la production de cytokines pro-inflammatoires et une réponse pro-survie (Dondelinger *et al.*, 2015). Par contre, certaines conditions doivent être remplies pour que RIP1 participe aux processus de mort cellulaire. L'absence du facteur cIAP, une enzyme cellulaire qui ubiquitine RIP1, ou la dé-ubiquitination de RIP1 par CYLD ou A20, deux protéines qui enlèvent les chaînes d'ubiquitines, sont nécessaires pour permettre à RIP1 de poursuivre les étapes reliées à la mort cellulaire (Vanden Berghe *et al.*, 2016). D'ailleurs, la protéine cIAP est primordiale durant l'infection de souris par le virus influenza A puisqu'elle empêche l'activation de la nécroptose au niveau des tissus pulmonaires, augmentant ainsi la survie de l'hôte infectée (Rodrigue-Gervais *et al.*, 2014). À ce jour, aucun lien entre la virulence du HCoV-OC43 et cIAP n'a été identifié, ni aucune interaction entre une protéine virale et ce facteur cellulaire. Concernant, les enzymes dé-ubiquitinantes, la protéase analogue à la papaïne (PLP) des virus SARS-CoV et HCoV-NL63 semble posséder une activité enzymatique similaire à CYLD ou A20 puisque la protéine virale est capable d'enlever des chaînes d'ubiquitines sur différents facteurs cellulaires impliqués dans la réponse à l'IFN (S. W. Li *et al.*, 2016b, L. Sun *et al.*, 2012b). Bien qu'aucune expérience présentée dans cette thèse n'ait ciblé ces facteurs cellulaires, il reste plausible que ceux-ci jouent un rôle précédent l'activation des facteurs RIP et de la nécroptose dans le contexte d'infection neuronale par HCoV-OC43. D'ailleurs, une caractérisation plus complète des événements entourant la mort neuronale par le coronavirus humain OC43 devrait couvrir les modifications d'ubiquitination de RIP1 suivant l'infection cellulaire.

Comme mentionné ci-haut, l'activité de la caspase-8 se doit d'être compromise afin de permettre à la nécroptose de s'effectuer suite à la dé-ubiquitination de RIP1. Ainsi, une diminution de l'activité de cette enzyme pourrait également être considérée comme un indice indiquant l'activation de la nécroptose (Gunther *et al.*, 2011, Ofengeim *et al.*, 2015b). D'ailleurs, le HSV et le CMV encodent des protéines virales qui ciblent et perturbent l'activité de la caspase-8, entraînant un changement dans l'induction de la MCR de l'apoptose vers la nécroptose (Mocarski *et al.*, 2012). Ainsi, dans un premier temps, nous avons mesuré le niveau d'activité de la caspase-8 afin d'établir que cette caspase était impliquée durant la réponse neuronale à l'infection virale par HCoV-OC43 (Figure 22A). Une hausse précoce de l'activité de la caspase-8 suivie d'une diminution de cette activité chez les cellules infectées

comparativement aux cellules non-infectées aurait permis d'étayer l'hypothèse que l'infection virale initie l'activation de cette caspase mais que l'intervention du virus entrave le fonctionnement de celle-ci, favorisant du même coup, la nécroptose au détriment de l'apoptose. Or, tel qu'observé à la Figure 22A, nous avons constaté qu'il n'y avait pratiquement aucune différence dans l'activité de cette enzyme entre l'infection par le virus de référence et la condition non infectée (mock). Bien que l'infection par le virus mutant a entraîné une diminution modérée dans l'activation de la caspase-8 très tôt dans l'infection (8 hpi), la différence d'activité ne semble pas suffisante pour conclure que ce virus a la capacité d'influencer l'activité enzymatique de cette enzyme. À titre de comparaison aux essais en présence du virus, nous avons traité les cellules avec le cycloheximide (CHX) et le $TNF\alpha$, déjà reconnus dans la littérature pour induire l'activité enzymatique de cette caspase (L. Wang *et al.*, 2008). La présence de $TNF\alpha$ et de CHX provoque une augmentation, somme toute assez modeste comparativement à la condition non traitée, de l'activité enzymatique de la caspase-8 (Figure 22B). En présence de l'inhibiteur de caspases zVAD, cette activité diminue légèrement, suggérant que la caspase-8 peut être fonctionnelle, même si les niveaux observés ne sont pas très importants. Il est possible que le niveau de base de l'expression endogène de la caspase-8 ne soit pas très important chez les cellules LA-N-5 ou que les composés chimiques utilisés n'ont pas été en mesure d'activer suffisamment l'enzyme pro-apoptotique, contribuant ainsi à rendre difficile l'observation de changement d'activité. L'une des façons qui aurait permis d'établir la modulation de la caspase-8 par le virus HCoV-OC43 aurait été de pré-traiter les cellules avec le $TNF\alpha$ et CHX pour stimuler l'activité de cette caspase et d'ensuite infecter les mêmes cellules avec HCoV-OC43 pour mesurer une possible différence dans l'activité enzymatique de la dite caspase. Néanmoins, le groupe de Simone Fulda, qui travaille sur la mort cellulaire à l'aide de différents types neuronaux, incluant les cellules LA-N-5, a démontré que la caspase-8 peut être détectée chez ces cellules et que l'activation de cette caspase est possiblement tributaire de ce qui est utilisé pour l'activer (Abhari *et al.*, 2013). Ainsi, les composés chimiques utilisés ici comme témoin positif à l'activation de la caspase-8 ne sont probablement pas optimaux pour ce type cellulaire. De plus, dans le contexte d'une infection neuronale par HCoV-OC43, l'évaluation de l'activité enzymatique de la caspase-8 dans le but de démontrer l'activation précoce de la nécroptose semble plus complexe et difficile qu'escomptée. L'utilisation d'un autre modèle cellulaire ou d'un modèle *in vivo* dont l'expression ou l'activation de cette caspase est plus facile pourrait nous aider à déterminer si cette étape s'avère utile pour démontrer l'activation de la nécroptose par HCoV-OC43.

B.



A.

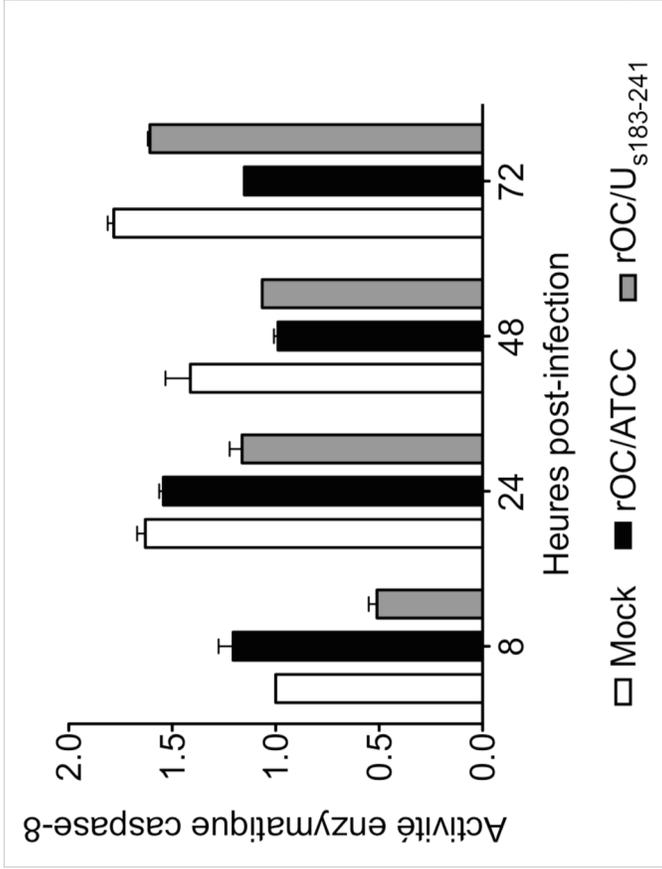


Figure 22. Activité enzymatique de la caspase-8 mesurée chez les cellules LA-N-5 lors de traitements chimiques ou de l'infection par HCoV-OC43. (A) Activation variable de la caspase-8 lors de l'infection par le virus de référence (rOC/ATCC) et mutant (rOC/U_{s183-241}) à une MOI de 0,2. (B) Activation modeste de la caspase-8 en présence de TNFa (100 ng/ml) et CHX (2 ug/ml) alors que l'ajout de zVAD (20 µM) diminue légèrement cette activité. Le traitement chimique des cellules a été effectué pendant 24h avant d'analyser l'activité enzymatique. CHX; cycloheximide et zVAD; inhibiteur de pan-caspases. Les résultats sont représentés comme la moyenne ± l'écart-type de deux expériences indépendantes.

3.2 Activation des facteurs RIP1, RIP3 et MLKL

Les outils permettant de démontrer l'activation de la nécroptose étant limités, l'augmentation de l'expression des ARNm correspondant aux facteurs RIP1 et RIP3 est considérée comme un des moyens pouvant être utilisés pour établir la prédisposition d'un tissu ou d'un type cellulaire à l'activation de cette MCR (Jouan-Lanhouet *et al.*, 2014). Tel qu'illustré à la Figure 18, les niveaux d'ARNm correspondant à RIP1 et RIP3 ont augmenté dans le temps suite à l'infection virale, autant chez le modèle cellulaire murin qu'humain. L'expression accrue de ces facteurs sous-entend que la réponse neuronale à l'infection passe par la nécroptose, possiblement associée à un plus grand nombre de cellules infectées. En effet, l'augmentation des niveaux d'expression des facteurs RIP est plus importante lors de l'infection par le virus mutant que par le virus de référence et l'expression du facteur RIP3 suivant l'infection des cellules LA-N-5 par le virus de référence est demeurée stable et plutôt faible par rapport à la condition non infectée (Figure 17B). Ce phénomène a déjà été observé dans une étude qui a démontré que les niveaux d'ARNm correspondant à RIP1 augmentaient de façon très importante suite à l'infection de rétines par le CMV murin chez des souris alors que le niveau d'expression de RIP3 restait stable et assez faible (Chien *et al.*, 2012). Bien qu'aucune explication n'ait été proposée pour expliquer ce phénomène, on peut élaborer quelques hypothèses afin d'expliquer la différence d'expression entre RIP1 et RIP3 observée ici. Le modèle cellulaire humain utilisé dans le cadre de cette thèse est la lignée immortalisée de type neuroblastome LA-N-5, l'un des modèles neuronaux humains les plus pertinents (Thiele, 1998). Cette lignée, comme tant d'autres, possède des modifications dans son génome qui, en parallèle de lui conférer un statut immortel, peut aussi affecter la signalisation intracellulaire ou la réponse à un stimulus (Thiele, 1998). De plus en plus d'études démontrent que certaines lignées immortalisées ou des cellules cancéreuses ont accumulé des mutations qui affectent l'expression des facteurs RIP, majoritairement RIP3 (S. He *et al.*, 2009, Morgan *et al.*, 2015, Nugues *et al.*, 2014). La raison pour laquelle RIP3 serait davantage ciblée chez ces cellules demeure inconnue mais l'hyperméthylation des régions avoisinant le site de transcription du gène *rip3* pourrait en être la cause (Fukasawa *et al.*, 2006, Koo *et al.*, 2015). Ainsi, il est possible que la présence de mutations chez les cellules LA-N-5 rende plus difficile l'expression et l'activation de RIP3 comparativement à RIP1. De plus, la réplication du virus de référence n'est peut-être pas suffisante pour induire un stress cellulaire qui se traduit par une augmentation de l'expression de RIP3 comparativement au virus mutant. Malgré l'expression du facteur RIP3 parmi les cellules LA-N-5 (Abhari *et al.*, 2013), la résistance de ces cellules à

engager le facteur RIP3 dans sa réponse neuronale à l'infection par HCoV-OC43 est donc possiblement issue du caractère intrinsèque de la relation hôte-pathogène observée ici. D'ailleurs, l'utilisation d'un autre modèle cellulaire nous a permis de mieux contextualiser les résultats obtenus par le modèle de cellules LA-N-5. La différence d'expression de RIP3 entre les deux modèles de culture cellulaire illustre aussi potentiellement la différence qui peut exister dans la facilité d'activation de cette MCR dépendamment du type cellulaire ou de la région impliquée. Parmi les cellules du SNC, les neurones (S. Liu *et al.*, 2014b), les oligodendrocytes (Ofengeim *et al.*, 2015a), les astrocytes (Fan *et al.*, 2016) et les microglies (S. J. Kim *et al.*, 2013) possèdent tous les facteurs nécessaires à l'activation de la nécroptose même s'il est possible que le degré d'expression de ceux-ci varie d'un type cellulaire à un autre. L'une des différences entre les cellules LA-N-5 et les cultures primaires murines du SNC est justement la présence non négligeable d'astrocytes parmi ce dernier modèle. Il est donc possible que l'infection des astrocytes, suivant celle des neurones, par HCoV-OC43 entraîne une augmentation significative de l'expression du facteur RIP3. D'ailleurs, la Figure 23 illustre que l'induction des facteurs RIP1 et RIP3 chez une lignée immortalisée de type astrocyte humain (U373) peut varier selon le stimulus. En effet, on peut remarquer l'absence du facteur RIP3 suite à l'amplification de ce gène à partir d'ARNm cellulaire en condition physiologique (Figure 23A). Par contre, lorsque ces facteurs sont stimulés par la présence de $TNF\alpha$ + zVAD (Figure 23B), un traitement chimique reconnu pour induire l'activation de la nécroptose ou par HCoV-OC43 (Figure 23C), les niveaux d'ARN correspondant à RIP3 augmentent, suggérant que la présence d'un inducteur peut amener la cellule à exprimer le facteur impliqué dans cette MCR.

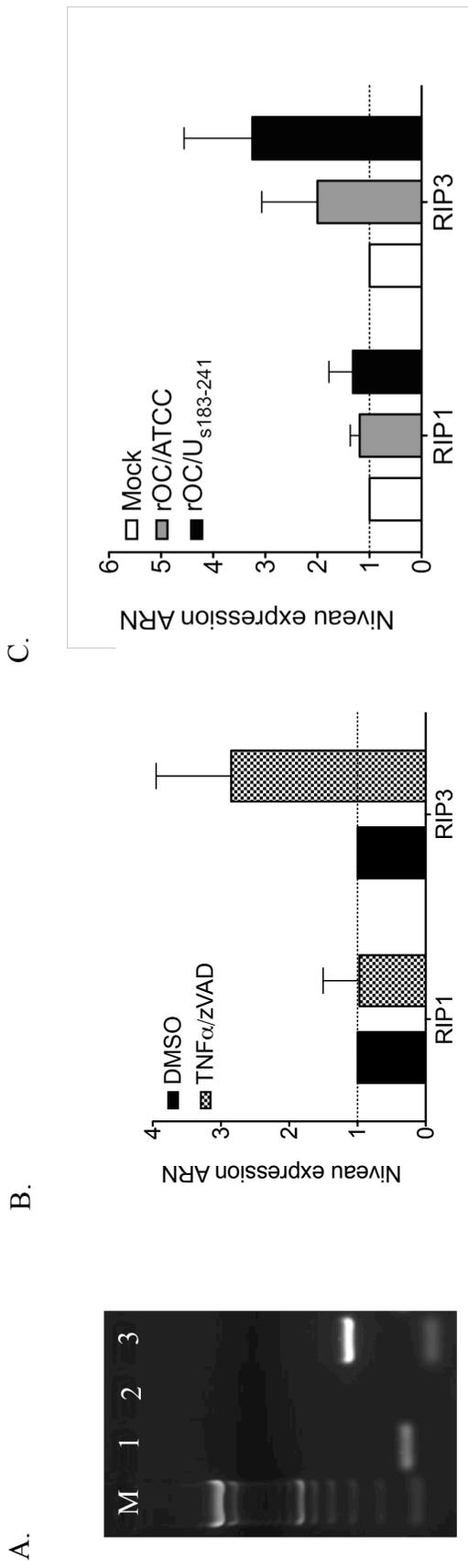


Figure 23. Augmentation de l'expression en ARNm du facteur RIP3 chez les cellules astrocytaires U373 suite à la présence de TNF α +zVAD ou lors de l'infection par HCoV-OC43. (A) Amplification par PCR des facteurs RIP1 (couloir 1), RIP3 (couloir 2) et GAPDH (gène contrôle, couloir 3) suite à la synthèse d'ADN complémentaires issus de l'ARNm cellulaire. (B) Niveau d'expression des facteurs RIP1 et RIP3 par qPCR en présence ou non de TNF α (100 ng/ml) et zVAD (20 mM) qui active la nécroptose après 24 h d'incubation. Lorsque stimulé, le facteur RIP3 est davantage exprimé qu'en condition non stimulée (DMSO). (C) Niveau d'expression des facteurs RIP1 et RIP3 par qPCR en contexte d'infection par les virus de référence (rOC/ATCC) et mutant (rOC/U_{s183-241}) après 24 h post-infection à une MOI de 0,2. Le virus mutant provoque une augmentation plus importante de l'expression du facteur RIP3 que le virus de référence. Les résultats sont représentés comme la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

La présence des astrocytes parmi les cultures primaires murines pourrait également accentuer l'activation des facteurs RIP1 et RIP3 et la nécroptose chez les neurones en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires. Le $TNF\alpha$ est connu pour être sécrété par les astrocytes suite à un stress et la nécroptose chez les neurones peut être activée suite à la liaison de cette cytokine à son récepteur (S. Liu *et al.*, 2014b). Ainsi, la composition cellulaire des cultures primaires murines pourrait contribuer à accentuer l'activation des facteurs associés à la nécroptose et causer la mort neuronale suivant l'infection de ces cellules par HCoV-OC43. Comparativement au virus de référence, le virus mutant semble activer davantage l'expression des ARNm pour RIP1 et RIP3, autant chez le modèle murin qu'humain, ce qui corrèle également avec la mort neuronale plus importante induite par ce virus. Même si l'efficacité de rOC/U_{s183-241} à infecter les neurones est plus importante que rOC/ATCC, on ne peut exclure que la production accrue de particules infectieuses par le virus mutant perturbe davantage l'homéostasie cellulaire d'où une réponse plus intense par le neurone infecté et une activation plus importante des facteurs RIP. Ainsi, lorsqu'un seuil de détection de la présence du virus est franchi, cela amène la cellule à répondre à la hauteur de la menace en activant plus rapidement ou de façon plus importante les facteurs responsables de provoquer le suicide de la cellule. En d'autres termes, la balance entre les facteurs pro-survies et pro-mort peut finir par pencher en faveur de ces derniers en fonction d'un stress induit sur la cellule qui perdure depuis trop longtemps.

Quoi qu'il en soit, l'absence d'augmentation en protéines des facteurs RIP1 et RIP3 suite à l'infection des modèles murins et humains représente un point non résolu. Considérant les résultats de qPCR, on se serait attendu à observer une tendance similaire au niveau protéique (Figure 18C-D). Or, l'absence de corrélation entre les niveaux de transcription et de traduction des facteurs RIP1/3 nous a amené à émettre l'hypothèse que le virus pourrait interférer entre les étapes post-transcriptionnelles et pré-traductionnelles, afin d'empêcher la cellule de pleinement traduire les protéines associées à la MCR et de permettre au virus de gagner du temps pour se répliquer et se disséminer. D'ailleurs, le protozoaire *Leishmania* est capable de modifier l'expression de certains gènes cellulaires pour son bénéfice, notamment en diminuant la traduction du répresseur traductionnel 4E-BP1, puisque ce dernier est activé par la cellule en guise de réponse anti-parasitaire (Jaramillo *et al.*, 2011). Cette manipulation du parasite sur l'expression de 4E-BP1 détourne la traduction des ARNm cellulaires vers ceux du parasite, et permet à ce dernier de survivre et de se propager à travers les macrophages. Afin d'évaluer le degré de traduction d'un ARNm, nous avons utilisé, en collaboration avec le Dr Maritza Jaramillo, une technique particulière appelée *Polysome Profile Analysis* qui établit si la

traduction de l'ARNm est modulée à la hausse ou à la baisse par rapport à une autre condition. Cette technique a déjà été utilisée pour démontrer que les virus VSV et EMCV emploient une stratégie de contrôle traductionnelle afin de restreindre la production des IFN de type I (Herdy *et al.*, 2012). Tel qu'observé à la Figure 24A, la technique de *Polysome Profile Analysis* consiste à séparer les ARNm issus de lysats cellulaires, en fonction de leur équilibre de sédimentation à travers un gradient de sucrose ultracentrifugé. Ainsi, les ARNm libres, c'est-à-dire sans ribosomes associés, se retrouveront dans la partie supérieure du gradient alors que ceux ayant un ou plusieurs ribosomes accrochés (polysomes) se déplaceront plus profondément en fonction du nombre de ribosomes attachés. Suite à la séparation des ARN, le gradient de sucrose est ensuite poussé à travers un détecteur UV qui mesure l'absorbance et trace un graphique où l'absorbance est proportionnelle à la quantité de transcrits (Figure 24B). Comme on peut s'y attendre, la quantité de transcrits en cours d'être traduits est légèrement supérieure pour les cellules LA-N-5 infectées par les virus de référence ou mutant comparativement aux cellules non infectées. La technique ne fait pas la différence entre les ARN cellulaires et viraux, ce qui implique que l'augmentation du nombre de transcrits en conditions infectées représente autant ceux d'origines virales que cellulaires. Cette augmentation n'est pas surprenante puisque d'une part, le virus va démarrer rapidement sa propre réplication et, d'autre part, la cellule va aussi engager une réponse antivirale qui impliquera la synthèse de nouveaux ARN encodant les protéines nécessaires à cette réponse. Quoi qu'il en soit, la présence de HCoV-OC43 augmente la traduction d'ARNm par rapport à la condition non infectée. Suite à la fragmentation du gradient, l'échantillon est séparé et récupéré en différentes fractions. À partir de ces fractions, l'ARN est isolé et purifié afin de quantifier l'expression du facteur RIP1 ou du gène témoin GAPDH par qPCR. La quantification de chacune des fractions est rapportée sur la somme de l'ensemble des fractions, ce qui permet d'établir un pourcentage d'expression du gène amplifié pour chacune des fractions. De plus, l'interprétation des courbes doit tenir compte du fait que les fractions les plus élevées (portion droite de la courbe) contiennent les ARNm ayant plusieurs ribosomes accrochés alors que plus on se déplace vers la gauche des courbes, moins de ribosomes seront rattachés aux ARNm. Tel qu'illustré sur la Figure 24C, la courbe représentant la condition non infectée montre un pic important dans les fractions élevées (11-15) indiquant que le facteur RIP1 est accroché à des polysomes et est théoriquement traduit. Par contre, l'allure des courbes correspondant aux fractions des échantillons infectés par le virus de référence ou le virus mutant se déplace légèrement vers la gauche, suggérant que les ARNm de RIP1 sont moins traduits. L'expression faible mais stable du gène contrôle GAPDH entre les différentes conditions (Figure 24D) nous assure que la différence observée entre les courbes

pour RIP1 ne provient pas d'une diminution généralisée de la traduction des ARNm dans la cellule par HCoV-OC43. Ainsi, la cellule réagit probablement à la présence du virus en augmentant la transcription et la traduction du facteur RIP1 afin d'initier la mort cellulaire pour tenter de limiter la réplication et la propagation virale. Toutefois, le virus pourrait avoir la capacité de perturber la traduction de ces ARNm et ainsi diminuer la quantité des protéines RIP correspondante, ce qui pourrait ralentir l'activation de la nécroptose. Malheureusement, la grande variabilité observée entre les différents réplicats biologiques nous empêche de conclure hors de tout doute que cette hypothèse soit correcte. Fait intéressant, la protéine nsp1, identifiée dans l'ORF1ab chez plusieurs coronavirus, peut inhiber l'expression de certains gènes de l'hôte au niveau post-transcriptionnel. En effet, cette protéine, chez le SARS-CoV (Lokugamage *et al.*, 2012) et le MERS-CoV (Lokugamage *et al.*, 2015), bloque la traduction des ARNm cellulaires en se fixant à la sous-unité ribosomale 40S et recrute des endonucléases cellulaires pour dégrader ces ARN. Lors d'infections par le TGEV, nsp1 provoque également l'arrêt de la traduction des gènes cellulaires mais le mécanisme reste à ce jour inconnu (C. Huang *et al.*, 2011a). Ainsi, même si cette fonction du facteur nsp1 chez HCoV-OC43 n'a pas été identifiée à ce jour, il est possible que ce dernier soit responsable de l'absence d'augmentation en protéines des facteurs RIP1 et RIP3 suite à l'infection des cellules LA-N-5 par les virus de référence et mutant. Quoiqu'il en soit, la caractérisation des facteurs initiateurs (RIP1, RIP3) et effecteurs (MLKL) de la nécroptose s'avèrera incontournable dans l'avenir, étant donné le rôle potentiel de ceux-ci dans la mort neuronale induite par HCoV-OC43.

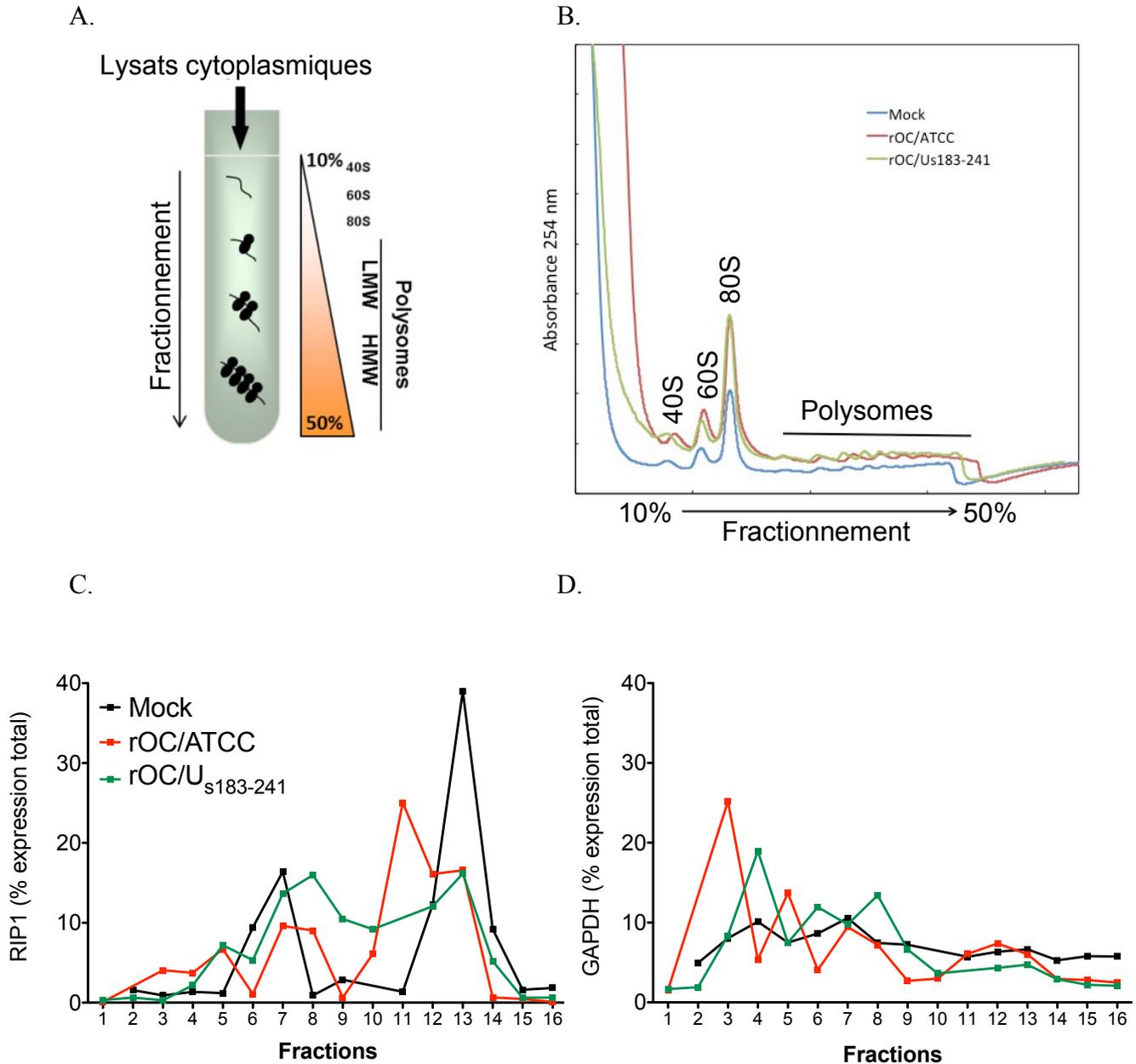


Figure 24. Diminution potentielle de la présence de polysomes et de la traduction des ARNm correspondant au facteur RIP1 lors de l'infection des cellules LA-N-5 par les virus de référence ou mutant. (A) Schéma représentant brièvement les premières étapes de la technique de Polysome Profile Analysis. À partir des cellules infectées, le contenu intracellulaire est extrait et ultracentrifugé dans un gradient de sucrose. Les ARN libres ainsi que les sous-unités ribosomales se retrouveront dans la partie supérieure du gradient alors que les ARN associés à un ou des ribosomes seront distribués vers la partie inférieure du gradient. Adapté de *Abdelmohsen K., 2012. Modulation of gene expression by RNA binding proteins : mRNA stability and translation, Binding protein.* (B) Profil d'absorbance des différentes fractions isolées du gradient de sucrose provenant des échantillons infectés (rOC/ATCC, rOC/Us₁₈₃₋₂₄₁) ou non. (C) Pourcentage d'expression du facteur RIP1 (C) et du gène témoin GAPDH (D) suite au qPCR des différentes fractions des échantillons infectés (rOC/ATCC, rOC/Us₁₈₃₋₂₄₁) ou non.

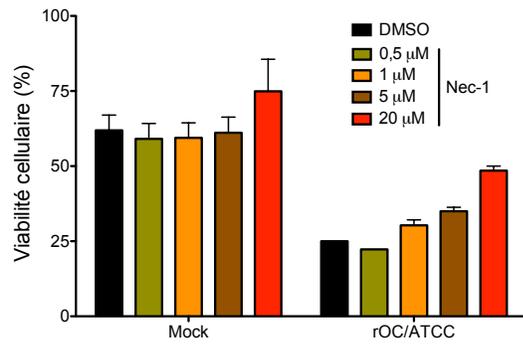
Selon la littérature, l'activation du facteur RIP3, suivant ou non l'interaction avec RIP1, provoque une accumulation de celui-ci sous sa forme phosphorylée, ce qui permet le recrutement de MLKL et la formation du nécrosome (Vanden Berghe *et al.*, 2016). La phosphorylation à la position 227 de l'acide aminé sérine est essentielle pour recruter le facteur MLKL. Ce dernier sera également phosphorylé aux sites 357 et 358 des acides aminés thréonine et sérine (L. Sun *et al.*, 2012a, J. Zhang *et al.*, 2016a). Ces étapes de phosphorylation stimulent l'oligomérisation de MLKL ainsi que sa translocation aux membranes intracellulaires et cytoplasmiques (H. Wang *et al.*, 2014a) (Dondelinger *et al.*, 2014). La Figure 20 démontre bien l'implication de MLKL durant la mort neuronale induite par HCoV-OC43. De plus, l'augmentation significative de la survie des neurones infectés suivant son inhibition par le composé chimique necrosulfonamide (NSA) prouve que MLKL joue un rôle primordial dans le processus de mort cellulaire. De plus, ce facteur est davantage activé en présence du virus mutant, probablement en raison du plus grand nombre de cellules infectées par ce dernier ou par la présence plus importante de particules infectieuses à l'intérieur des cellules. Le mécanisme par lequel MLKL provoque la rupture des membranes est encore sujet à débat. Certains ont observé que la protéine se fixe aux phosphatidylinositol phosphates (PIPs), insérés dans la membrane cytoplasmique, ce qui déclenche la destruction de celle-ci (Dondelinger *et al.*, 2014, H. Wang *et al.*, 2014a). D'autres ont plutôt constaté que MLKL favorise la formation de canaux ioniques perméables à l'entrée massive d'ions sodium ou calcium, ce qui fait imploser la cellule (Cai *et al.*, 2014, X. Chen *et al.*, 2014). Cette deuxième hypothèse est intéressante puisque l'excitotoxicité glutamatergique, observée chez des neurones infectés par HCoV-OC43, fait intervenir le calcium comme source de dysfonctionnement parmi ces cellules. En effet, HCoV-OC43 perturbe le recyclage du glutamate par les astrocytes, ce qui résulte en une accumulation de ce neurotransmetteur au niveau des fentes synaptiques et l'activation des récepteurs AMPA et NMDA. Ces deux récepteurs laissent alors entrer le calcium à l'intérieur du neurone (Brison *et al.*, 2011, Brison *et al.*, 2014). Même s'il est difficile de concilier la relation entre l'activation de MLKL et l'excitotoxicité glutamatergique, il n'en demeure pas moins que ces deux phénomènes pourraient contribuer à accentuer la mort neuronale induite par l'infection du coronavirus humain OC43.

3.3 Implication du facteur RIP1 dans le mécanisme antiviral

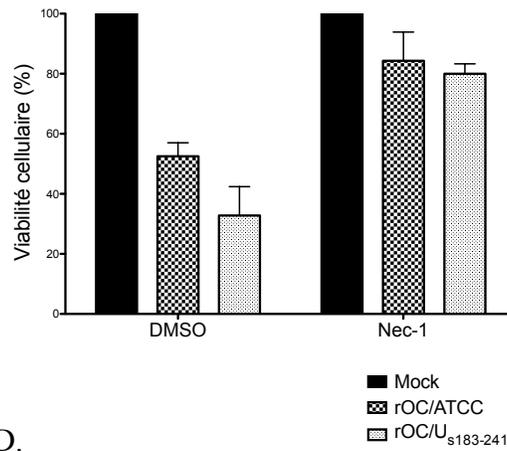
Afin d'établir le rôle joué par les facteurs associés à la nécroptose dans la mort des neurones infectés, nous avons ciblé, dans un premier temps, le facteur RIP1 puisque ce dernier initie généralement la nécroptose. Bien que le rôle de RIP1 dans la nécroptose semble plus complexe qu'on le pensait au départ, en raison d'une meilleure caractérisation de cette forme de mort cellulaire, ce facteur était considéré à l'époque comme l'élément initiateur de cette MCR (Christofferson *et al.*, 2012). En effet, en absence de répression par la caspase-8, RIP1 subit des modifications post-traductionnelles d'autophosphorylation et de phosphorylation sur l'autre protéine kinase impliquée, le facteur RIP3 (Y. S. Cho *et al.*, 2009). À l'époque, le rôle démontré de RIP1 était d'entamer la formation d'un complexe avec RIP3 afin de poursuivre la cascade d'activation de la nécroptose. Ainsi, la première approche utilisée pour inhiber le facteur RIP1 a été d'utiliser un inhibiteur chimique, le nécrostatin, également appelé Nec-1. Cet inhibiteur, découvert en 2005, empêche l'hydrolyse de l'ATP dans le domaine kinase de RIP1, ce qui bloque la phosphorylation du facteur RIP3 et son interaction avec celui-ci (Degterev *et al.*, 2008, Degterev *et al.*, 2005, Degterev *et al.*, 2013). Afin d'évaluer si l'inhibition de l'activité kinase de RIP1 et du blocage de la nécroptose aurait un impact sur la survie cellulaire, nous avons évalué la mortalité des cellules LA-N-5 infectées par le virus de référence en présence ou non de Nec-1 à différentes concentrations (Figure 25). Or, la présence de Nec-1 a augmenté la survie des cellules LA-N-5 infectées de façon croissante par rapport à la concentration de l'inhibiteur (Figure 25A). La concentration de 20 μ M est la concentration la plus efficace pour augmenter la survie cellulaire, autant pour le virus de référence que le virus mutant (Figure 25B) et était également la concentration utilisée dans la littérature (Y. Cho *et al.*, 2011, J. R. Wu *et al.*, 2015) pour inhiber l'activation de la nécroptose en réponse à différents stimuli chimiques. Par contre, cette protection cellulaire est fort probablement associée à une diminution dans la production de particules infectieuses puisque les titres infectieux libres ou associés aux cellules sont moins élevés comparativement aux cellules non traitées (Figure 25 C-D). De plus, tel qu'observé par immunofluorescence présentée à la Figure 25E, la dissémination du virus de référence est aussi moins importante en présence de concentrations croissantes de Nec-1 ce qui suggère que cet inhibiteur possède l'étonnante capacité de restreindre la réplication de HCoV-OC43. Il s'agirait de la première fois qu'un effet antiviral soit associé à cet inhibiteur et il s'avère assez complexe de comprendre le mécanisme sous-jacent. Toutefois, il n'est pas rare qu'un inhibiteur chimique, qui cible la fonction kinase d'un facteur cellulaire, possède également la capacité d'inhiber la réplication virale (Mohr *et al.*, 2015, Sasaki *et al.*, 2014, Yura *et al.*, 1997). Les virus détournent une panoplie de mécanismes cellulaires à leur avantage dont ceux qui font intervenir des

kinases. Ainsi, il n'est pas surprenant de constater qu'en ciblant des enzymes cellulaires, potentiellement utilisées aussi par le virus, cela entraîne des perturbations durant les processus de réplication virale. D'ailleurs, différents inhibiteurs contre l'activité kinase se sont révélés efficaces pour inhiber plusieurs virus hémorragiques notamment Ebola, Marburg et Lassa (Mohr *et al.*, 2015) mais également le virus influenza (Sasaki *et al.*, 2014) ou le HSV-1 (Yura *et al.*, 1997). De plus, la localisation et la fonction de la protéine structurale N chez le SARS-CoV et le coronavirus aviaire IBV est assurée par la phosphorylation à de nombreux sites sur cette dernière (Spencer *et al.*, 2008, Surjit *et al.*, 2005). Ainsi, il est possible que Nec-1 interfère dans la phosphorylation de diverses protéines virales, notamment la protéine N, ce qui empêche la formation complète des nouveaux virions et diminue grandement la production de particules infectieuses de HCoV-OC43. Il serait tout de même intéressant de comparer l'effet inhibiteur de Nec-1 sur d'autres virus pour vérifier la spécificité de cet effet antiviral ou en infectant différents types cellulaires afin d'établir si la protection cellulaire est restreinte à certains types cellulaires.

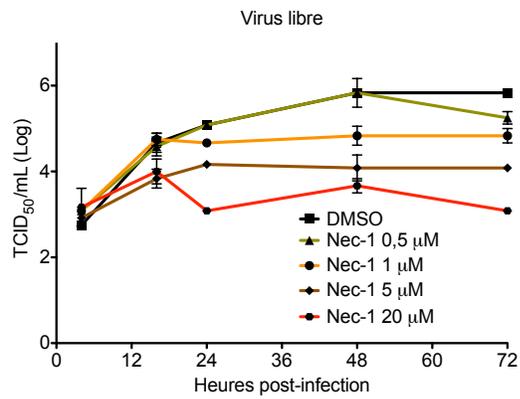
A.



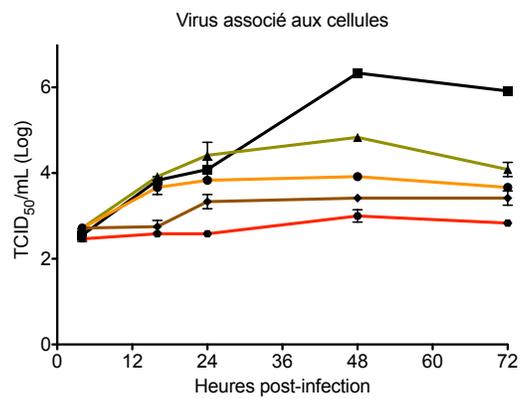
B.



C.



D.



E.

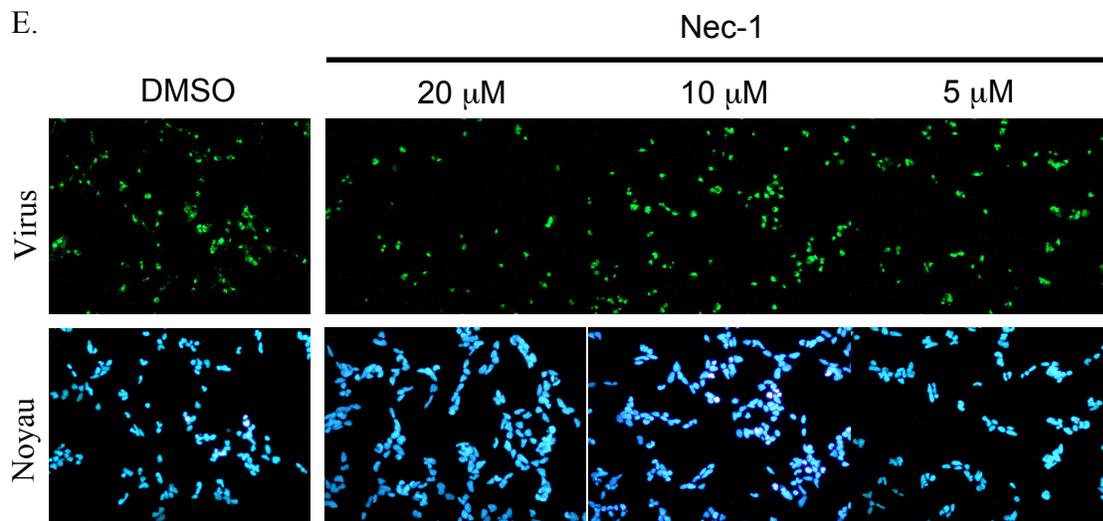


Figure 25. L'inhibiteur chimique ciblant RIP1 (Nec-1) augmente la survie cellulaire en diminuant la réplication virale en fonction de la concentration de ce dernier. (A) Survie cellulaire de cellules LA-N-5 infectées ou non par le virus HCoV-OC43 de référence après 72hpi et traitées ou non avec Nec-1 aux concentrations indiquées. (B) Survie cellulaire de cellules LA-N-5 infectées ou non par les virus HCoV-OC43 de référence ou mutant après 72hpi et traitées en présence de Nec-1 à 20 uM. (C) Production des particules virales libres (milieu extracellulaire) du virus de référence en présence de différentes concentrations de Nec-1 au temps indiqué. (D) Production des particules associées à la cellule (milieu intracellulaire) du virus de référence en présence de différentes concentrations de Nec-1 au temps indiqué. (E) Immunofluorescence de cellules LA-N-5 infectées par le virus HCoV-OC43 de référence après 72hpi et traitées ou non avec Nec-1 aux concentrations indiquées.

L'utilisation de Nec-1 par différents groupes de recherche a aussi permis d'établir que cet inhibiteur cible également la protéine indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO), enzyme qui catalyse la dégradation de l'acide aminé tryptophane en N-formylkynurenine (Muller *et al.*, 2005). L'effet inhibiteur de Nec-1 sur cette autre enzyme n'a aucun effet sur la nécroptose puisque l'inhibition de IDO n'influence en aucun cas la mort cellulaire. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur chimique spécifique contre IDO (1-MT) n'a pas été en mesure de bloquer l'activation de la nécroptose ni d'interférer avec l'activité kinase de RIP1, suggérant que IDO n'est pas impliqué dans la nécroptose (Takahashi *et al.*, 2012, Vandenabeele *et al.*, 2013). Néanmoins, la modification chimique de Nec-1, suivant ces observations, a permis de créer une version "améliorée" de l'inhibiteur appelé Nec-1s. Ce nouvel inhibiteur est davantage spécifique à RIP1 et n'interfère pas avec IDO et d'autres enzymes kinases. Les chimistes à l'origine de ces modifications ont également créé une version inactive de l'inhibiteur, Nec-1i, qui ne bloque pas RIP1 mais qui peut interférer auprès des autres enzymes (Degterev *et al.*, 2013). En utilisant ces inhibiteurs sur les cellules LA-N-5, les résultats se sont avérés quelque peu étonnants puisque Nec-1s n'a pas provoqué une diminution importante de la réplication virale comme Nec-1 (Figure 26) ni d'une augmentation significative de la survie cellulaire (résultats non montrés). Ce résultat tend à confirmer l'hypothèse que l'effet antiviral de Nec-1 est probablement issu d'une interférence de l'inhibiteur chimique avec une autre enzyme cellulaire nécessaire au virus ou à une des enzymes virales. Ce résultat nous apprend également une autre information intéressante. L'inhibition spécifique de RIP1 par Nec-1s ne modifie pas la réplication virale suggérant que l'activité kinase de RIP1 n'est pas impliquée dans une forme de restriction virale via l'activation de la nécroptose. Étant donné les rôles divergents entre l'activité kinase de la protéine RIP1 et la présence de la protéine dans son ensemble (Figure 19), il est donc possible que la structure de RIP1 soit impliquée dans la mort neuronale mais de façon indépendante de son activité kinase.

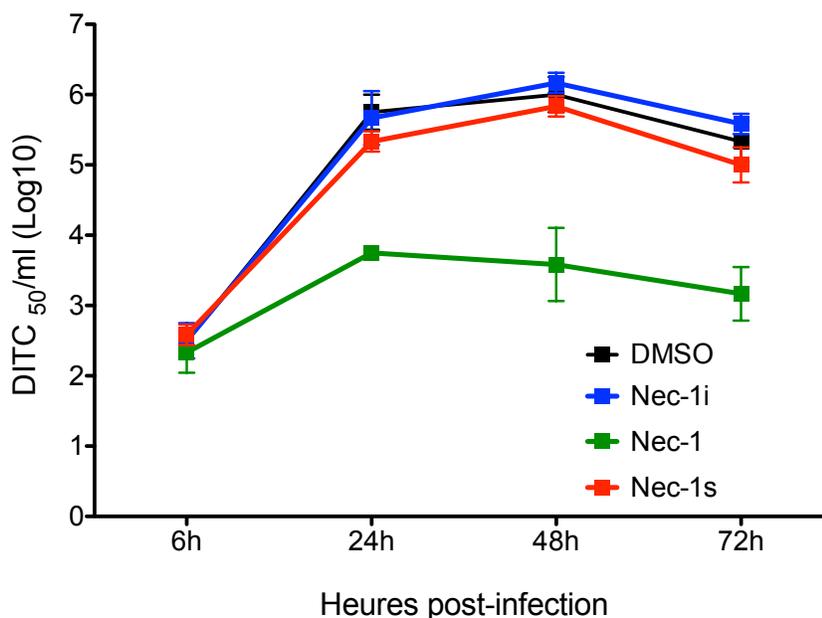


Figure 26. Effet antiviral de l'inhibiteur chimique (Nec-1) contre l'activité kinase de RIP1. L'inhibition de la réplication virale (rOC/ATCC) parmi les cellules LA-N-5 est probablement reliée au manque de spécificité de Nec-1 qui cible d'autres protéines kinases, contrairement à l'inhibiteur Nec-1s, plus spécifique à RIP1.

L'utilisation de l'ARN interférant (ARNi) nous a donc permis d'inhiber l'expression du facteur RIP1 et de démontrer que son absence entraîne une augmentation de la survie cellulaire mais également une augmentation de la réplication virale (Figure 19), illustrant les conséquences divergentes de l'absence de ce facteur durant l'infection des cellules LA-N-5 par HCoV-OC43. En effet, l'absence de RIP1 entrave probablement l'activation des processus de mort cellulaire mis en place par la cellule, ce qui augmente significativement la survie cellulaire en dépit de la présence du virus. Éventuellement, une autre MCR pourrait prendre le relais et mener à la mort cellulaire mais de façon beaucoup moins efficace et qui prendra davantage de temps. Or, le retard dans la mise en place des processus de mort neuronale infligés par l'absence de RIP1 a probablement permis au virus d'avoir davantage de temps (par rapport aux cellules témoins) pour se répliquer et assembler une plus grande quantité de nouvelles particules infectieuses. Le rôle antiviral de RIP1 a déjà été démontré lors d'infections par le CMV (Upton *et al.*, 2012) ou le HSV-1 (Z. Huang *et al.*, 2015c), corroborant ainsi la conclusion tirée ici en lien avec le rôle de RIP1 durant l'infection de neurones par HCoV-OC43. Les virus CMV et HSV-1 encodent des protéines virales dont la fonction est justement d'inhiber l'activation de la nécroptose ce qui confère évidemment un avantage à ces virus pour accomplir leur cycle

réplicatif sans encombre (Danthi, 2016). Toutefois, l'une des conséquences de l'utilisation de la nécroptose comme mécanisme antiviral par la cellule hôte est l'établissement d'un environnement davantage inflammatoire comparativement à d'autres MCR. En effet, suivant la destruction des membranes intracellulaires et cytoplasmiques, la nécroptose entraîne la libération de *DAMP* (IL-1 α , IL-1 β , IL-33, HMGB1, ATP), molécules qui agiront pour instaurer les processus inflammatoires et alermer les autres cellules d'un danger potentiel (Kaczmarek *et al.*, 2013). La mort cellulaire, couplée à l'instauration d'un environnement inflammatoire, peut paraître primordiale pour se débarrasser d'une infection virale mais peut également avoir des conséquences délétères pour l'hôte, surtout si ces processus surviennent au SNC. On sait que durant l'infection de souris par le virus de référence (rOC/ATCC) et par le virus mutant rOC/Us₂₄₋₂₄₁, un variant extrêmement virulent portant quatre mutations dans la glycoprotéine virale S, les cytokines IL-1 α , IL-1 β sont largement exprimés dans la moelle épinière (Jacomy *et al.*, 2010). Même si la différence d'expression de ces deux cytokines n'est pas statistiquement significative entre les deux virus, la présence de ces cytokines suggère que la nécroptose peut être activée et peut contribuer à la sévérité de la neuropathologie suivant la présence de ces virus au SNC. Ainsi, la perte neuronale et l'activation de processus inflammatoire reliés à l'activation de la nécroptose pourraient potentiellement être mises en place par l'hôte pour éliminer le coronavirus mais en provoquant également des dommages suffisants pour provoquer une pathologie neuronale observable chez la souris. La capacité intrinsèque du virus rOC/Us₁₈₃₋₂₄₁ à se répliquer et se disséminer plus efficacement engendre probablement davantage de dommages, ce qui se répercute au niveau de la sévérité de la pathologie. La poursuite de la caractérisation de ces processus devra tenir compte de modèles animaux où les différents acteurs de la nécroptose sont absents afin de mieux cerner l'impact de ceux-ci sur les pathologies neurologiques. Les considérations immunitaires devront aussi être abordées afin de déterminer quels éléments du système immunitaire sont mis en cause durant la nécroptose favorisant davantage l'homéostasie du SNC ou au contraire contribuant à la pathogenèse.

3.4 L'activation de la nécroptose chez le modèle neuronal humain ne suit pas la voie classique

L'implication des facteurs RIP1 et MLKL et l'établissement d'une forme de MCR analogue à la nécroptose durant la mort neuronale induite par HCoV-OC43 ont également soulevé la question de savoir comment cette MCR est activée. Pendant plusieurs années, la principale voie d'activation connue et majoritairement caractérisée a été la liaison du TNF α à divers récepteurs

de mort, lorsque la caspase-8 n'est pas fonctionnelle (W. Zhou *et al.*, 2014b). La majorité des cellules utilisées dans ces études ont été les *Mouse embryonic fibroblasts* (MEF) (Moujalled *et al.*, 2013) ainsi que les lignées immortalisées murines L929 (Y. Cho *et al.*, 2011) et humaines Jurkat (Laukens *et al.*, 2011). Dans cette thèse, la majorité des expérimentations ont été effectuée à l'aide des cellules LA-N-5, une lignée humaine de type neuroblastome, puisque ce modèle présentait des avantages indéniables. Facile d'utilisation pour une lignée neuronale et rapide à différencier, l'activation de la nécroptose par HCoV-OC43 n'a jamais été décrite. C'est pourquoi nous avons également entrepris de comprendre brièvement comment cette lignée peut déclencher cette MCR en réponse à la présence du virus. Telle qu'illustrée à la Figure 27, nous avons comparé la survie cellulaire de différentes lignées cellulaires en présence ou non de $TNF\alpha$ et d'un inhibiteur des caspases (zVAD-fmk), une combinaison reconnue pour activer la nécroptose (Christofferson *et al.*, 2012, Vanlangenakker *et al.*, 2011b) ainsi qu'en présence de l'inhibiteur de nécroptose Nec-1. À l'inverse des autres types cellulaires utilisés, connus pour être susceptibles à la nécroptose par ces traitements chimiques, les cellules LA-N-5 n'ont pas été affectées de façon importante en présence de $TNF\alpha$ et zVAD. En effet, d'une part cette combinaison n'a pu induire une mortalité significative des cellules LA-N-5 et d'autre part, la présence de Nec-1 n'a pas protégé davantage ces cellules contre la MCR comparée aux autres types cellulaires (Figure 27). L'absence de mort cellulaire ne signifie pas nécessairement que la nécroptose ne peut être activée chez les cellules LA-N-5 mais suggère plutôt simplement que l'induction de cette MCR ne peut l'être suivant la voie du récepteur aux $TNF\alpha$. D'ailleurs, la présence de ce récepteur n'est pas confirmée chez ces cellules, ce qui pourrait empêcher la nécroptose d'être activée de cette façon. Néanmoins, la nécroptose peut être déclenchée par la liaison du $TNF\alpha$ à son récepteur sur différents types cellulaires tel qu'observé à la Figure 27.

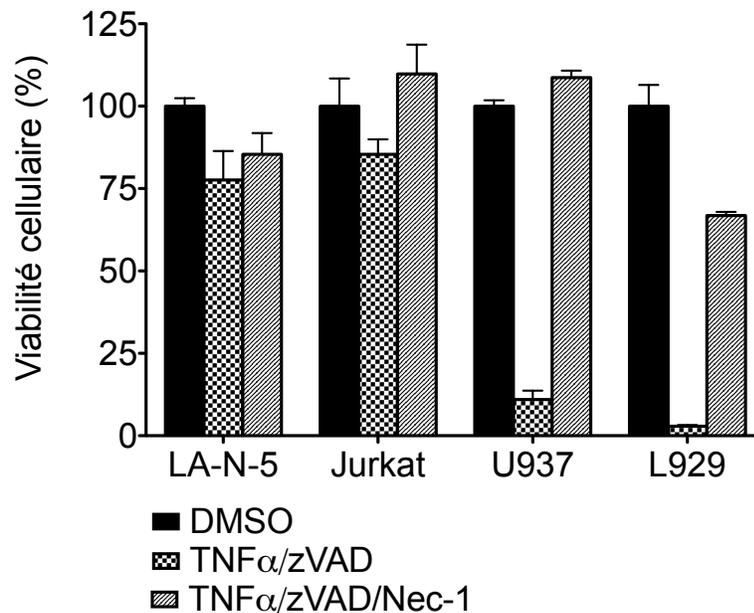


Figure 27. Survie cellulaire de différents types cellulaires en présence de composés chimiques qui activent la nécroptose (TNF α /zVAD) ou qui l'inhibent (TNF α /zVAD/Nec-1). Mis à part les cellules LA-N-5 où la nécroptose ne peut être déclenchée par ces traitements, les autres types cellulaires ont démontré, à des degrés variables, que la mort cellulaire induite est la nécroptose. Jurkat : lignée immortalisée humaine de lymphocyte T; U937 : lignée immortalisée humaine de monocytes, L929 : lignée immortalisée murine de fibrosarcome.

Les résultats présentés à la Figure 27 indiquent que, dépendamment du type cellulaire, la nécroptose peut être activée ou non selon la voie classique (TNF α et zVAD). Or, à ce jour, il existe trois autres voies menant à la nécroptose; certaines impliquent RIP1 et RIP3 alors que d'autres impliquent seulement RIP3. L'une de ces voies implique la protéine TRIF, un facteur intermédiaire dans la réponse cellulaire suivant la détection d'un PAMP par les TLR (Kaiser *et al.*, 2005). La liaison d'ARN bicaténaire ou de LPS, respectivement au TLR3 et 4, entraîne l'interaction entre le facteur TRIF et RIP3 via leur domaine de liaison RHIM (S. He *et al.*, 2011). Étrangement, l'exclusivité entre l'association de RIP3 à TRIF pour déclencher la nécroptose ne se retrouve que chez les cellules endothéliales et les fibroblastes, puisque RIP1 est également nécessaire pour activer cette MCR chez les macrophages. D'autres TLR, notamment les TLR2, 5 et 9, ont également la capacité d'activer cette mort cellulaire mais seulement à partir d'une

production autocrine ou paracrine de $TNF\alpha$ (Kaiser *et al.*, 2013). Ensuite, le *DNA dependent activator of IFN-regulatory factor* (DAI) qui détecte la présence de virus à ADN dans le cytosol, possède également un domaine RHIM qui lui permet de s'associer avec RIP3 et d'activer la nécroptose (Kaiser *et al.*, 2008, Upton *et al.*, 2012). Il est peu probable que cette voie soit utilisée par la cellule pour activer la nécroptose dans le contexte d'infection par HCoV-OC43 puisque ce dernier est un virus à ARN monocaténaire. Finalement, la détection d'ARN bicaténaire d'origine virale par la protéine kinase R (PKR) peut également activer la nécroptose suite à sa liaison avec RIP1, à condition que la protéine adaptatrice FADD soit absente (Thapa *et al.*, 2013). Cette dernière voie pourrait s'avérer intéressante afin d'expliquer l'activation de la nécroptose par le HCoV-OC43. En effet, l'infection par le SARS-CoV déclenche l'activation de la PKR suite au stress appliqué au RE et à l'induction de la UPR subséquente (C. P. Chan *et al.*, 2006), cette dernière étant également observée lors d'infections par HCoV-OC43 (Favreau *et al.*, 2009). De plus, l'activation de cette protéine kinase semble être responsable de la mort cellulaire par apoptose (Krahling *et al.*, 2009) et l'infection du SNC par le coronavirus murin JHM active également la PKR, ce qui module l'inflammation et l'encéphalite virale (Kapil *et al.*, 2014). Ainsi, il est plausible que la nécroptose induite suivant l'infection de neurones par HCoV-OC43 passe par la reconnaissance du virus via la PKR.

4. CONCLUSIONS

Le coronavirus humain HCoV-OC43 a démontré au fil des années qu'il n'est pas qu'un virus respiratoire. Ses capacités neuroinvasives et neurotropes représentent sans aucun doute une forme d'adaptation chez son hôte naturel, l'être humain. L'infection du SNC permet probablement au virus d'atteindre un environnement susceptible de lui assurer une survie plus efficace. D'ailleurs, la présence moins importante du système immunitaire adaptatif dans cet environnement favorise le virus à se maintenir dans un état latent et à persister chez son hôte. Par contre, cela ne veut pas dire que l'hôte est totalement démuni face à la menace que représente ce virus. Parmi les nombreux mécanismes de défense, l'activation des processus de mort cellulaire régulée est un moyen, certes définitif pour la cellule infectée, mais qui demeure un moyen efficace pour diminuer la dissémination du virus à travers l'organisme. Il existe plusieurs types différents de mort cellulaire régulée (MCR) qui font intervenir différents facteurs. Dépendamment du site d'activation, du type cellulaire, du stimulus ou d'une manipulation par un pathogène, la cellule privilégiera un processus de mort plutôt qu'un autre afin de s'assurer de sa finalité. De plus, la présence d'une panoplie de types de MCR permet aussi à la cellule de disposer de voies alternatives dans l'optique où un virus s'adapte et interfère dans l'une des MCR. Cette thèse a permis de comprendre davantage comment le neurone meurt suite à l'infection par le coronavirus humain HCoV-OC43 et quels facteurs cellulaires sont impliqués. Malgré l'apparente activation du facteur Bax, l'apoptose dérivée de ce dernier ne semble pas jouer de rôle significatif dans la mort neuronale, contrairement à une autre MCR, la nécroptose. Ainsi, d'une part, il serait fort intéressant de mieux comprendre comment le virus pourrait moduler l'apoptose à son avantage. D'autre part, il conviendrait d'établir si l'implication des facteurs RIP1 et MLKL durant la nécroptose est uniquement associée aux neurones et si l'importance du phénomène est également retrouvée *in vivo*, à l'aide d'un modèle murin.

L'infection du SNC de la souris par HCoV-OC43 a également démontré le degré de neurovirulence associé à ce virus. L'apparition de symptômes s'apparentant à une encéphalite virale de même qu'un taux non négligeable de mortalité est fort probablement issu de nombreux dommages au SNC ainsi que d'une perte neuronale. Il appert que ces conséquences pourraient être le résultat d'une activation soutenue de la nécroptose, mécanisme déployé par les cellules infectées en vue de réduire la propagation virale à travers le cerveau et éventuellement d'éliminer le pathogène. Par contre, cette MCR étant déjà reconnue pour induire un état inflammatoire très important, combiné à la perte neuronale, l'activation de ces processus peut

donc s'avérer davantage délétère pour l'hôte et être responsable de la virulence observée en souris. Ainsi, un processus de défense face à une menace peut être en partie responsable d'accélérer ou d'augmenter la sévérité de symptômes, dans ce cas-ci, au niveau du SNC. Étant donné que l'activation importante de certains facteurs associés à la nécroptose a été identifiée chez des patients atteints de maladies neurologiques, nos résultats laissent entrevoir que ce virus pourrait être un des facteurs impliqués dans l'apparition ou la sévérité de ces maladies neurologiques.

L'utilisation d'un virus portant deux mutations dans la glycoprotéine S nous a permis d'établir que ces mutations sont suffisantes pour procurer un avantage indéniable à ce virus mutant, à savoir une meilleure réplication virale et une dissémination plus rapide. Cette capacité à se propager de façon plus efficace est probablement la raison pour laquelle ce virus est plus virulent que le virus de référence en souris. Toutefois, ces mutations ont été acquises dans un contexte où aucune pression sélective du système immunitaire n'était présente puisqu'elles sont apparues suite à une infection persistante de lignées neurales humaines. Par contre, une sélection positive de ces mutations en contexte *in vitro* peut aussi favoriser une plus grande affinité du virus à son récepteur cellulaire ou une capacité à altérer des processus cellulaires, comme par exemple la réponse par l'IFN ou l'activation d'une MCR, reconnus pour moduler la persistance virale. Ainsi, la virulence de ce variant chez la souris est probablement associée à son manque d'adaptation à son hôte. Ces résultats nous suggèrent par contre qu'un virus davantage adapté à son hôte a peut-être tout intérêt à ne pas déclencher la nécroptose pour mieux persister et survivre.

L'apport de cette thèse, bien que modeste, cherche à éclairer davantage les mécanismes moléculaires impliqués dans les maladies neurologiques suivant l'infection du SNC par le coronavirus humain OC43 et possiblement par tout virus neurotrophe. Le portrait global de nos travaux laisse entrevoir des pistes de solutions afin de mieux comprendre comment ces maladies peuvent survenir mais aussi comment tenter de les traiter.

5. PERSPECTIVES

En perspective, le domaine de la mort cellulaire s'est considérablement développé durant les dernières années. Ainsi, de nouveaux outils moléculaires, plus sensibles et plus spécifiques pour la détection et la caractérisation des facteurs associés aux différentes MCR sont maintenant disponibles sur le marché. L'utilisation de ces outils pourrait nous permettre de mieux comprendre la dynamique qui s'opère entre les facteurs cellulaires de MCR lors de l'infection des neurones par HCoV-OC43. En effet, on considère aujourd'hui que ces facteurs ne sont pas simplement cantonnés à leurs MCR respectives, mais peuvent être activés simultanément ou en série, dépendamment du stimulus, de l'intensité de ceux-ci ou suite à l'interférence par un agent extérieur. D'ailleurs, certains résultats préliminaires nous laissent croire que d'autres facteurs cellulaires pourraient être impliqués dans la mort neuronale induite par HCoV-OC43, notamment le *Apoptosis-Inducing factor* (AIF) et la cyclophiline D, respectivement associés à la parthanatos et la MPT-RN. L'étude du rôle précis joué par ces facteurs pourrait nous permettre de mieux comprendre la relation complexe entre le virus et sa cellule hôte et l'importance relative de ceux-ci dans la mort de la cellule.

La presque totalité des résultats, issus d'expériences *in vitro*, présentés dans cette thèse, a été effectuée sur des cellules de type neuronal puisque ce projet a abordé la caractérisation de la mort cellulaire d'un point de vue neurologique. Or, HCoV-OC43 est avant tout un virus respiratoire. Il serait intéressant de comparer les facteurs et mécanismes de MCR déclenchés par le virus dans un contexte d'infection de cellule de type respiratoire. En effet, cette comparaison permettrait d'établir si la réponse à l'infection qui mène à l'activation de la MCR est spécifique au type cellulaire ou au contraire, associée au virus HCoV-OC43. D'autant plus que certains types cellulaires semblent avoir une propension à initier plus facilement la nécroptose, ou à tout le moins, ne pas nécessairement impliquer les mêmes facteurs cellulaires. De plus, il serait intéressant de savoir si les complications respiratoires suivant l'infection des voies respiratoires inférieures chez les personnes susceptibles sont liées à un type de MCR en particulier et l'impact de l'activation de ces mécanismes sur la sévérité de la pathologie respiratoire. Ces informations pourraient éventuellement aider la communauté médicale à identifier des cibles pour atténuer la réponse à l'infection et limiter ainsi les dommages aux tissus infectés. La difficulté à obtenir des cultures primaires de voies respiratoires ainsi que la faible infectivité de HCoV-OC43 pour plusieurs lignées cellulaires respiratoires complique cependant la faisabilité d'une telle caractérisation.

La caractérisation de la mort neuronale induite par HCoV-OC43 a permis de constater l'absence de rôle significatif du facteur pro-apoptotique Bax dans ce phénomène, malgré l'apparente activation de celui-ci. Il serait donc intéressant d'approfondir ce phénomène afin de confirmer si le coronavirus OC43 possède un mécanisme lui permettant de bloquer ou de détourner ce facteur et l'activation subséquente de l'apoptose. En effet, le virus HCoV-OC43 pourrait intervenir directement au niveau de la protéine Bax suite à une interaction entre cette protéine et un facteur viral. L'utilisation de techniques permettant d'identifier de possibles partenaires protéiques entre le facteur Bax et un facteur viral, notamment la co-immunoprécipitation, pourrait nous permettre de confirmer ou infirmer une telle association. La régulation de Bax par le virus pourrait également se faire de façon indirecte, par une interférence du virus sur les protéines régulatrices de Bax par exemple, ce qui pourrait potentiellement engendrer une incapacité de ce facteur pro-apoptotique à pleinement assumer son rôle. L'étude des facteurs cellulaires, responsables de la régulation de Bax, en contexte d'infection, pourrait ainsi nous indiquer l'existence d'une telle interférence. L'absence de corrélation entre l'expression en ARNm et en protéines de Bax lors de l'infection pourrait indiquer une intervention virale avant la traduction de la protéine cellulaire afin d'en réduire la traduction. En effet, plusieurs virus utilisent cette stratégie pour réduire la quantité d'ARNm de la cellule hôte et favoriser ainsi l'expression des ARN correspondant aux protéines des nouveaux virions. À noter que cette stratégie n'a jamais été associée à une régulation du facteur Bax lors d'une infection virale. Autrement, cette dichotomie entre l'ARN et le niveau en protéines du facteur Bax pourrait également être expliqué par une augmentation de la dégradation via le protéasome. L'utilisation d'inhibiteurs chimiques qui inhibent le protéasome (par exemple, le MG132) de même que la quantification du niveau d'ubiquitination du facteur Bax lors d'une infection virale pourraient nous permettre de vérifier cette hypothèse. Même si plusieurs virus ont développé, à travers leur adaptation à l'hôte, des mécanismes pour assurer leur survie et restreindre la capacité de la cellule à se défendre, notamment par l'inhibition de la MCR, à ce jour, aucune protéine virale chez HCoV-OC43 n'a été identifiée pour interagir ou interférer avec un facteur ou une voie de MCR.

Le rôle significatif de RIP1 et MLKL dans la mort neuronale est certes intéressant mais l'initiation de cette MCR associée à la nécroptose reste à être élucidée. En effet, à ce jour, plusieurs voies d'activation sont connues mais la façon dont HCoV-OC43 est détecté par la cellule hôte et comment cette reconnaissance mène à l'activation de RIP1 et MLKL représente

une perspective intéressante afin de mieux comprendre la dynamique de la relation hôte-pathogène. Dans certains cas, l'activation des facteurs pro-nécroptotiques et l'initiation de la nécroptose passe par la détection de ligands à la surface de la cellule alors que dans d'autres cas, une détection intracellulaire de matériels génétiques étrangers est suffisante pour démarrer cette MCR. Une meilleure compréhension de la signalisation cellulaire de cette MCR suivant l'infection de neurones par HCoV-OC43 pourrait donc nous renseigner sur la réponse antiviral déclenchée par la cellule. Ensuite, les étapes effectrices de la nécroptose, soit l'activation de MLKL, la destruction des membranes cytosoliques et l'augmentation de l'inflammation représentent également des événements à éclaircir. On sait maintenant que le facteur MLKL, en plus d'être responsable de la libération du contenu intracellulaire dans l'environnement, peut également participer à l'inflammation en activant l'inflammasome et la production de cytokines pro-inflammatoires. L'étude d'une possible intervention de MLKL sur l'activation de l'inflammasome pourrait nous permettre de mieux comprendre l'impact d'une telle conséquence sur la neurovirulence du virus HCoV-OC43 mais également sur le lien entre cette inflammation et les pathologies neurologiques observées en souris.

Les outils et les modèles animaux pour l'étude *in vivo* de la nécroptose et de ces facteurs ont considérablement progressé durant ces dernières années. À l'aide de ces outils moléculaires, il serait primordial d'établir si la nécroptose est réellement activée parmi les neurones du SNC de souris infectés par HCoV-OC43 et si le virus portant les deux mutations (rOC/U_{s183-241}) déclenche une activation plus importante de cette MCR. Bien que HCoV-OC43 induit des dommages et une perte neuronale parmi les souris infectées, le rôle de la nécroptose dans ces phénomènes n'a pas été formellement identifié. La création de souris transgéniques pour les facteurs cellulaires associés à la nécroptose a également connu un succès dans les dernières années et leurs utilisations nous permettraient de mieux comprendre les conséquences de l'activation ou de l'inhibition de cette MCR sur les pathologies neurologiques observées en souris. Cette approche serait utile afin d'établir si l'inhibition dans l'activation de la nécroptose au SNC se traduit par une diminution de la neurovirulence et des pathologies neurologiques en souris, malgré la présence du virus.

La compréhension des mécanismes moléculaires relatifs à la mort cellulaire de neurones infectés par HCoV-OC43 pourrait nous aider à d'une part, mieux comprendre l'implication de ces mécanismes dans les pathologies neurologiques, mais d'autre part, à élaborer une stratégie ciblant des facteurs précis de MCR et ainsi prémunir le SNC de dommages collatéraux.

ANNEXES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abendroth A, Simmons A, Efstathiou S & Pereira RA (2000) Infection with an H2 recombinant herpes simplex virus vector results in expression of MHC class I antigens on the surfaces of human neuroblastoma cells in vitro and mouse sensory neurons in vivo. *The Journal of general virology* 81(Pt 10):2375-2383.
- Aberg ND, Johansson I, Aberg MA, Lind J, Johansson UE, Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG & Isgaard J (2009) Peripheral administration of GH induces cell proliferation in the brain of adult hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 201(1):141-150.
- Abhari BA, Cristofanon S, Kappler R, von Schweinitz D, Humphreys R & Fulda S (2013) RIP1 is required for IAP inhibitor-mediated sensitization for TRAIL-induced apoptosis via a RIP1/FADD/caspase-8 cell death complex. *Oncogene* 32(27):3263-3273.
- Afonso PV, Ozden S, Cumont MC, Seilhean D, Cartier L, Rezaie P, Mason S, Lambert S, Huerre M, Gessain A, Couraud PO, Pique C, Ceccaldi PE & Romero IA (2008) Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS pathogens* 4(11):e1000205.
- Agrawal AS, Garron T, Tao X, Peng BH, Wakamiya M, Chan TS, Couch RB & Tseng CT (2015) Generation of a transgenic mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease. *Journal of virology* 89(7):3659-3670.
- Akira S, Uematsu S & Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Alexaki A & Wigdahl B (2008) HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. *PLoS pathogens* 4(12):e1000215.
- Alvarez JI, Cayrol R & Prat A (2011) Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochimica et biophysica acta* 1812(2):252-264.
- Ancuta P, Wang J & Gabuzda D (2006) CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *Journal of leukocyte biology* 80(5):1156-1164.
- Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL & Dawson TM (2006) Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48):18308-18313.
- Andreyev AY, Kushnareva YE & Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70(2):200-214.
- Arabi YM, Harthi A, Hussein J, Bouchama A, Johani S, Hajeer AH, Saeed BT, Wahbi A, Saedy A, AlDabbagh T, Okaili R, Sadat M & Balkhy H (2015) Severe neurologic syndrome associated with Middle East respiratory syndrome corona virus (MERS-CoV). *Infection* 43(4):495-501.

- Arbour N, Cote G, Lachance C, Tardieu M, Cashman NR & Talbot PJ (1999a) Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *Journal of virology* 73(4):3338-3350.
- Arbour N, Day R, Newcombe J & Talbot PJ (2000) Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *Journal of virology* 74(19):8913-8921.
- Arbour N, Ekande S, Cote G, Lachance C, Chagnon F, Tardieu M, Cashman NR & Talbot PJ (1999b) Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. *Journal of virology* 73(4):3326-3337.
- Arbour N & Talbot PJ (1998) Persistent infection of neural cell lines by human coronaviruses. *Advances in experimental medicine and biology* 440:575-581.
- Askalan R, Gabarin N, Armstrong EA, Fang Liu Y, Couchman D & Yager JY (2015) Mechanisms of Neurodegeneration after Severe Hypoxic-Ischemic Injury in the Neonatal Rat Brain. *Brain Res* 10.1016/j.brainres.2015.10.020.
- Autret A, Martin-Latil S, Mousson L, Wirotius A, Petit F, Arnoult D, Colbere-Garapin F, Estaquier J & Blondel B (2007) Poliovirus induces Bax-dependent cell death mediated by c-Jun NH2-terminal kinase. *Journal of virology* 81(14):7504-7516.
- Bailey OT, Pappenheimer AM, Cheever FS & Daniels JB (1949) A Murine Virus (Jhm) Causing Disseminated Encephalomyelitis with Extensive Destruction of Myelin : li. Pathology. *J Exp Med* 90(3):195-212.
- Baines CP (2010) Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Frontiers in physiology* 1:156.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J & Molkentin JD (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434(7033):658-662.
- Baric RS, Nelson GW, Fleming JO, Deans RJ, Keck JG, Casteel N & Stohlman SA (1988) Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. *Journal of virology* 62(11):4280-4287.
- Baric RS, Sullivan E, Hensley L, Yount B & Chen W (1999) Persistent infection promotes cross-species transmissibility of mouse hepatitis virus. *Journal of virology* 73(1):638-649.
- Baritaud M, Boujrad H, Lorenzo HK, Krantic S & Susin SA (2010) Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. *Cell Cycle* 9(16):3166-3173.
- Barnett EM & Perlman S (1993) The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology* 194(1):185-191.
- Barnett MH & Prineas JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Annals of neurology* 55(4):458-468.

- Barthold SW, Beck DS & Smith AL (1993) Enterotropic coronavirus (mouse hepatitis virus) in mice: influence of host age and strain on infection and disease. *Lab Anim Sci* 43(4):276-284.
- Basu A & Haldar S (1998) The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* 4(12):1099-1109.
- Bataveljic D, Milosevic M, Radenovic L & Andjus P (2014) Novel molecular biomarkers at the blood-brain barrier in ALS. *BioMed research international* 2014:907545.
- Bath KG & Lee FS (2010) Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Neurobiol* 70(5):339-349.
- Beier KT, Saunders AB, Oldenburg IA, Sabatini BL & Cepko CL (2013) Vesicular stomatitis virus with the rabies virus glycoprotein directs retrograde transsynaptic transport among neurons in vivo. *Front Neural Circuits* 7:11.
- Belanger M, Allaman I & Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14(6):724-738.
- Bellinger FP, Bellinger MT, Seale LA, Takemoto AS, Raman AV, Miki T, Manning-Bog AB, Berry MJ, White LR & Ross GW (2011) Glutathione Peroxidase 4 is associated with Neuromelanin in Substantia Nigra and Dystrophic Axons in Putamen of Parkinson's brain. *Mol Neurodegener* 6(1):8.
- Bellinger FP, Raman AV, Rueli RH, Bellinger MT, Dewing AS, Seale LA, Andres MA, Uyehara-Lock JH, White LR, Ross GW & Berry MJ (2012) Changes in selenoprotein P in substantia nigra and putamen in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2(2):115-126.
- Belouzard S, Chu VC & Whittaker GR (2009) Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(14):5871-5876.
- Belouzard S, Madu I & Whittaker GR (2010) Elastase-mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites within the S2 domain. *The Journal of biological chemistry* 285(30):22758-22763.
- Belouzard S, Millet JK, Licitra BN & Whittaker GR (2012) Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4(6):1011-1033.
- Belyavsky M, Belyavskaya E, Levy GA & Leibowitz JL (1998) Coronavirus MHV-3-induced apoptosis in macrophages. *Virology* 250(1):41-49.
- Beniac DR, Andonov A, Grudeski E & Booth TF (2006) Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat Struct Mol Biol* 13(8):751-752.
- Berger AK & Danthi P (2013) Reovirus activates a caspase-independent cell death pathway. *mBio* 4(3):e00178-00113.

- Bergmann CC, Ramakrishna C, Kornacki M & Stohlman SA (2001) Impaired T cell immunity in B cell-deficient mice following viral central nervous system infection. *J Immunol* 167(3):1575-1583.
- Bertram S, Dijkman R, Habjan M, Heurich A, Gierer S, Glowacka I, Welsch K, Winkler M, Schneider H, Hofmann-Winkler H, Thiel V & Pohlmann S (2013) TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *Journal of virology* 87(11):6150-6160.
- Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ & Barker PA (2008) cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Molecular cell* 30(6):689-700.
- Billen LP, Shamas-Din A & Andrews DW (2008) Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* 27 Suppl 1:S93-104.
- Bleau C, Filliol A, Samson M & Lamontagne L (2015) Brain Invasion by Mouse Hepatitis Virus Depends on Impairment of Tight Junctions and Beta Interferon Production in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Journal of virology* 89(19):9896-9908.
- Bonavia A, Arbour N, Yong VW & Talbot PJ (1997) Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *Journal of virology* 71(1):800-806.
- Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA & Rottier PJ (2003) The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of virology* 77(16):8801-8811.
- Boucher A, Desforages M, Duquette P & Talbot PJ (2007) Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 123(3):258-267.
- Brask J, Chauhan A, Hill RH, Ljunggren HG & Kristensson K (2005) Effects on synaptic activity in cultured hippocampal neurons by influenza A viral proteins. *Journal of neurovirology* 11(4):395-402.
- Bredesen DE (2008) Programmed cell death mechanisms in neurological disease. *Curr Mol Med* 8(3):173-186.
- Brewer CB & Roth MG (1991) A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *The Journal of cell biology* 114(3):413-421.
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Muller T, Wende H, Stassart RM, Nawaz S, Humml C, Velanac V, Radyushkin K, Goebbels S, Fischer TM, Franklin RJ, Lai C, Ehrenreich H, Birchmeier C, Schwab MH & Nave KA (2008) Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59(4):581-595.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y & Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663):1532-1535.

- Brison E, Jacomy H, Desforges M & Talbot PJ (2011) Glutamate excitotoxicity is involved in the induction of paralysis in mice after infection by a human coronavirus with a single point mutation in its spike protein. *Journal of virology* 85(23):12464-12473.
- Brison E, Jacomy H, Desforges M & Talbot PJ (2014) Novel treatment with neuroprotective and antiviral properties against a neuroinvasive human respiratory virus. *Journal of virology* 88(3):1548-1563.
- Brune W (2011) Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus research* 157(2):144-150.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D & van Noort JM (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61(11):1013-1021.
- Buchmeier MJ, Dalziel RG, Koolen MJ & Lampert PW (1987) Molecular determinants of CNS virulence of MHV-4. *Advances in experimental medicine and biology* 218:287-295.
- Buck D & Hemmer B (2011) Treatment of multiple sclerosis: current concepts and future perspectives. *J Neurol* 258(10):1747-1762.
- Burkard C, Verheije MH, Wicht O, van Kasteren SI, van Kuppeveld FJ, Haagmans BL, Pelkmans L, Rottier PJ, Bosch BJ & de Haan CA (2014) Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS pathogens* 10(11):e1004502.
- Butler N, Pewe L, Trandem K & Perlman S (2006) Murine encephalitis caused by HCoV-OC43, a human coronavirus with broad species specificity, is partly immune-mediated. *Virology* 347(2):410-421.
- Butterfield DA, Reed T, Newman SF & Sultana R (2007) Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* 43(5):658-677.
- Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, Ward Y, Wu LG & Liu ZG (2014) Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature cell biology* 16(1):55-65.
- Cain K, Bratton SB & Cohen GM (2002) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84(2-3):203-214.
- Cameron MJ, Bermejo-Martin JF, Danesh A, Muller MP & Kelvin DJ (2008) Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Virus research* 133(1):13-19.
- Carmen J, Rothstein JD & Kerr DA (2009) Tumor necrosis factor-alpha modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. *Brain Res* 1263:143-154.
- Carthew P & Sparrow S (1981) Murine coronaviruses: the histopathology of disease induced by intranasal inoculation. *Res Vet Sci* 30(3):270-273.

- Carty M, Reinert L, Paludan SR & Bowie AG (2014) Innate antiviral signalling in the central nervous system. *Trends in immunology* 35(2):79-87.
- Casiraghi C, Dorovini-Zis K & Horwitz MS (2011) Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 230(1-2):173-177.
- Castedo M, Ferri KF, Blanco J, Roumier T, Larochette N, Barretina J, Amendola A, Nardacci R, Metivier D, Este JA, Piacentini M & Kroemer G (2001) Human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein complex-induced apoptosis involves mammalian target of rapamycin/FKBP12-rapamycin-associated protein-mediated p53 phosphorylation. *J Exp Med* 194(8):1097-1110.
- Ch'ng TH, Spear PG, Struyf F & Enquist LW (2007) Glycoprotein D-independent spread of pseudorabies virus infection in cultured peripheral nervous system neurons in a compartmented system. *Journal of virology* 81(19):10742-10757.
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X & Shi Y (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406(6798):855-862.
- Chakraborty S, Nazmi A, Dutta K & Basu A (2010) Neurons under viral attack: victims or warriors? *Neurochem Int* 56(6-7):727-735.
- Chan CP, Siu KL, Chin KT, Yuen KY, Zheng B & Jin DY (2006) Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of virology* 80(18):9279-9287.
- Chan RW, Chan MC, Agnihothram S, Chan LL, Kuok DI, Fong JH, Guan Y, Poon LL, Baric RS, Nicholls JM & Peiris JS (2013) Tropism of and innate immune responses to the novel human betacoronavirus lineage C virus in human ex vivo respiratory organ cultures. *Journal of virology* 87(12):6604-6614.
- Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK & Perlman S (2016) Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell host & microbe* 19(2):181-193.
- Chapagain ML & Nerurkar VR (2010) Human polyomavirus JC (JCV) infection of human B lymphocytes: a possible mechanism for JCV transmigration across the blood-brain barrier. *J Infect Dis* 202(2):184-191.
- Chapagain ML, Verma S, Mercier F, Yanagihara R & Nerurkar VR (2007) Polyomavirus JC infects human brain microvascular endothelial cells independent of serotonin receptor 2A. *Virology* 364(1):55-63.
- Chatterjee D, Biswas K, Nag S, Ramachandra SG & Das Sarma J (2013) Microglia play a major role in direct viral-induced demyelination. *Clinical & developmental immunology* 2013:510396.
- Cheever FS, Daniels JB & et al. (1949) A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *J Exp Med* 90(3):181-210.

- Chen J, Lau YF, Lamirande EW, Paddock CD, Bartlett JH, Zaki SR & Subbarao K (2010) Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4⁺ T cells are important in control of SARS-CoV infection. *Journal of virology* 84(3):1289-1301.
- Chen ST, Liu RS, Wu MF, Lin YL, Chen SY, Tan DT, Chou TY, Tsai IS, Li L & Hsieh SL (2012) CLEC5A regulates Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality. *PLoS pathogens* 8(4):e1002655.
- Chen X, Li W, Ren J, Huang D, He WT, Song Y, Yang C, Li W, Zheng X, Chen P & Han J (2014) Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell research* 24(1):105-121.
- Chi X, Amet T, Byrd D, Chang KH, Shah K, Hu N, Grantham A, Hu S, Duan J, Tao F, Nicol G & Yu Q (2011) Direct effects of HIV-1 Tat on excitability and survival of primary dorsal root ganglion neurons: possible contribution to HIV-1-associated pain. *PloS one* 6(9):e24412.
- Chien H & Dix RD (2012) Evidence for multiple cell death pathways during development of experimental cytomegalovirus retinitis in mice with retrovirus-induced immunosuppression: apoptosis, necroptosis, and pyroptosis. *Journal of virology* 86(20):10961-10978.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M & Green DR (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303(5660):1010-1014.
- Cho H, Proll SC, Szretter KJ, Katze MG, Gale M, Jr. & Diamond MS (2013) Differential innate immune response programs in neuronal subtypes determine susceptibility to infection in the brain by positive-stranded RNA viruses. *Nature medicine* 19(4):458-464.
- Cho Y, McQuade T, Zhang H, Zhang J & Chan FK (2011) RIP1-dependent and independent effects of necrostatin-1 in necrosis and T cell activation. *PloS one* 6(8):e23209.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M & Chan FK (2009) Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137(6):1112-1123.
- Choi KS, Aizaki H & Lai MM (2005) Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release. *Journal of virology* 79(15):9862-9871.
- Choi WS, Lee EH, Chung CW, Jung YK, Jin BK, Kim SU, Oh TH, Saido TC & Oh YJ (2001) Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *Journal of neurochemistry* 77(6):1531-1541.
- Chong SY, Rosenberg SS, Fancy SP, Zhao C, Shen YA, Hahn AT, McGee AW, Xu X, Zheng B, Zhang LI, Rowitch DH, Franklin RJ, Lu QR & Chan JR (2012) Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(4):1299-1304.

- Christofferson DE, Li Y, Hitomi J, Zhou W, Upperman C, Zhu H, Gerber SA, Gygi S & Yuan J (2012) A novel role for RIP1 kinase in mediating TNF α production. *Cell death & disease* 3:e320.
- Chu H, Zhou J, Wong BH, Li C, Chan JF, Cheng ZS, Yang D, Wang D, Lee AC, Li C, Yeung ML, Cai JP, Chan IH, Ho WK, To KK, Zheng BJ, Yao Y, Qin C & Yuen KY (2016) Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Efficiently Infects Human Primary T Lymphocytes and Activates the Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Pathways. *J Infect Dis* 213(6):904-914.
- Chu H, Zhou J, Wong BH, Li C, Cheng ZS, Lin X, Poon VK, Sun T, Lau CC, Chan JF, To KK, Chan KH, Lu L, Zheng BJ & Yuen KY (2014) Productive replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus in monocyte-derived dendritic cells modulates innate immune response. *Virology* 454-455:197-205.
- Chung S, Gorczynski R, Cruz B, Fingerote R, Skamene E, Perlman S, Leibowitz J, Fung L, Flowers M & Levy G (1994) A Th1 cell line (3E9.1) from resistant A/J mice inhibits induction of macrophage procoagulant activity in vitro and protects against MHV-3 mortality in vivo. *Immunology* 83(3):353-361.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS & Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302(5642):113-117.
- Collins AR (2002) In vitro detection of apoptosis in monocytes/macrophages infected with human coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(6):1392-1395.
- Compton SR, Ball-Goodrich LJ, Johnson LK, Johnson EA, Paturzo FX & Macy JD (2004a) Pathogenesis of enterotropic mouse hepatitis virus in immunocompetent and immunodeficient mice. *Comp Med* 54(6):681-689.
- Compton SR, Ball-Goodrich LJ, Paturzo FX & Macy JD (2004b) Transmission of enterotropic mouse hepatitis virus from immunocompetent and immunodeficient mice. *Comp Med* 54(1):29-35.
- Compton SR, Ball-Goodrich LJ, Zeiss CJ, Johnson LK, Johnson EA & Macy JD (2003) Pathogenesis of mouse hepatitis virus infection in gamma interferon-deficient mice is modulated by co-infection with *Helicobacter hepaticus*. *Comp Med* 53(2):197-206.
- Cooray S, Bahar MW, Abrescia NG, McVey CE, Bartlett NW, Chen RA, Stuart DI, Grimes JM & Smith GL (2007) Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *The Journal of general virology* 88(Pt 6):1656-1666.
- Corman VM, Albarrak AM, Omrani AS, Albarrak MM, Farah ME, Almasri M, Muth D, Sieberg A, Meyer B, Assiri AM, Binger T, Steinhagen K, Lattwein E, Al-Tawfiq J, Muller MA, Drosten C & Memish ZA (2016) Viral Shedding and Antibody Response in 37 Patients With Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *Clin Infect Dis* 62(4):477-483.

- Coyne CB, Kim KS & Bergelson JM (2007) Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *The EMBO journal* 26(17):4016-4028.
- Cruz JL, Becares M, Sola I, Oliveros JC, Enjuanes L & Zuniga S (2013) Alphacoronavirus protein 7 modulates host innate immune response. *Journal of virology* 87(17):9754-9767.
- Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, McCandless EE, Patel JR, Luker GD, Littman DR, Russell JH & Klein RS (2011) CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J Exp Med* 208(2):327-339.
- D'Alessio M, De Nicola M, Coppola S, Gualandi G, Pugliese L, Cerella C, Cristofanon S, Civitareale P, Ciriolo MR, Bergamaschi A, Magrini A & Ghibelli L (2005) Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis. *FASEB J* 19(11):1504-1506.
- Daffis S, Samuel MA, Suthar MS, Gale M, Jr. & Diamond MS (2008) Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection. *Journal of virology* 82(21):10349-10358.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65(1):1-105.
- Danial NN & Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116(2):205-219.
- Daniels BP, Holman DW, Cruz-Orengo L, Jujjavarapu H, Durrant DM & Klein RS (2014) Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *mBio* 5(5):e01476-01414.
- Danthi P (2016) Viruses and the Diversity of Cell Death. *Annu Rev Virol* 10.1146/annurev-virology-110615-042435.
- Darman J, Backovic S, Dike S, Maragakis NJ, Krishnan C, Rothstein JD, Irani DN & Kerr DA (2004) Viral-induced spinal motor neuron death is non-cell-autonomous and involves glutamate excitotoxicity. *J Neurosci* 24(34):7566-7575.
- Das S, Ghosh D & Basu A (2009) Japanese encephalitis virus induce immuno-competency in neural stem/progenitor cells. *PloS one* 4(12):e8134.
- Das Sarma J (2014) Microglia-mediated neuroinflammation is an amplifier of virus-induced neuropathology. *Journal of neurovirology* 20(2):122-136.
- Das Sarma J, Kenyon LC, Hingley ST & Shindler KS (2009) Mechanisms of primary axonal damage in a viral model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 29(33):10272-10280.
- Davie CA (2008) A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull* 86:109-127.
- Davies HA, Dourmashkin RR & Macnaughton MR (1981) Ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus. *The Journal of general virology* 53(Pt 1):67-74.
- Davies HA & Macnaughton MR (1979) Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Archives of virology* 59(1-2):25-33.

- de Almagro MC & Vucic D (2015) Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Seminars in cell & developmental biology* 39:56-62.
- de Groot RJ (2006) Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconj J* 23(1-2):59-72.
- de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, Fouchier RA, Galiano M, Gorbalenya AE, Memish ZA, Perlman S, Poon LL, Snijder EJ, Stephens GM, Woo PC, Zaki AM, Zambon M & Ziebuhr J (2013) Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of virology* 87(14):7790-7792.
- de Haan CA, Kuo L, Masters PS, Vennema H & Rottier PJ (1998) Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein. *Journal of virology* 72(8):6838-6850.
- de Haan CA, Smeets M, Vernooij F, Vennema H & Rottier PJ (1999) Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *Journal of virology* 73(9):7441-7452.
- de Haan CA, Stadler K, Godeke GJ, Bosch BJ & Rottier PJ (2004) Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. *Journal of virology* 78(11):6048-6054.
- de Haan CA, Vennema H & Rottier PJ (2000) Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *Journal of virology* 74(11):4967-4978.
- de Weerd NA & Nguyen T (2012) The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunol Cell Biol* 90(5):483-491.
- Deane R & Zlokovic BV (2007) Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 4(2):191-197.
- Decressac M, Prestoz L, Veran J, Cantereau A, Jaber M & Gaillard A (2009) Neuropeptide Y stimulates proliferation, migration and differentiation of neural precursors from the subventricular zone in adult mice. *Neurobiology of disease* 34(3):441-449.
- Dedeurwaerder A, Desmarests LM, Olyslaegers DA, Vermeulen BL, Dewerchin HL & Nauwynck HJ (2013) The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes. *Veterinary microbiology* 162(2-4):447-455.
- Dedeurwaerder A, Olyslaegers DA, Desmarests LM, Roukaerts ID, Theuns S & Nauwynck HJ (2014) ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN-alpha-induced antiviral response. *The Journal of general virology* 95(Pt 2):393-402.
- DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Jimenez-Guardeno JM, Regla-Nava JA, Alvarez E, Oliveros JC, Zhao J, Fett C, Perlman S & Enjuanes L (2011) Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS pathogens* 7(10):e1002315.

- Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A & Yuan J (2008) Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 4(5):313-321.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA & Yuan J (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1(2):112-119.
- Degterev A, Maki JL & Yuan J (2013) Activity and specificity of necrostatin-1, small-molecule inhibitor of RIP1 kinase. *Cell death and differentiation* 20(2):366.
- Delhaye S, Paul S, Blakqori G, Minet M, Weber F, Staeheli P & Michiels T (2006) Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(20):7835-7840.
- Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I & Hotta H (2008) Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase 3-dependent pathway. *Journal of virology* 82(21):10375-10385.
- Denison MR, Spaan WJ, van der Meer Y, Gibson CA, Sims AC, Prentice E & Lu XT (1999) The putative helicase of the coronavirus mouse hepatitis virus is processed from the replicase gene polyprotein and localizes in complexes that are active in viral RNA synthesis. *Journal of virology* 73(8):6862-6871.
- Desforges M, Desjardins J, Zhang C & Talbot PJ (2013a) The acetyl-esterase activity of the hemagglutinin-esterase protein of human coronavirus OC43 strongly enhances the production of infectious virus. *Journal of virology* 87(6):3097-3107.
- Desforges M, Favreau DJ, Brison E, Desjardins J, Meessen-Pinard M, Jacomy H & Talbot PJ (2013b) Human coronaviruses. Respiratory pathogens revisited as infectious neuroinvasive, neurotropic and neurovirulent agents. *Neuroviral infections. RNA viruses and retroviruses*, Singh SK & Ruzek D (Édit.) CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton. p 93-121.
- Desforges M, Miletti TC, Gagnon M & Talbot PJ (2007) Activation of human monocytes after infection by human coronavirus 229E. *Virus research* 130(1-2):228-240.
- Desmaris N, Bosch A, Salaun C, Petit C, Prevost MC, Tordo N, Perrin P, Schwartz O, de Rocquigny H & Heard JM (2001) Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. *Mol Ther* 4(2):149-156.
- Detje CN, Meyer T, Schmidt H, Kreuz D, Rose JK, Bechmann I, Prinz M & Kalinke U (2009) Local type I IFN receptor signaling protects against virus spread within the central nervous system. *J Immunol* 182(4):2297-2304.
- Devaraj SG, Wang N, Chen Z, Chen Z, Tseng M, Barretto N, Lin R, Peters CJ, Tseng CT, Baker SC & Li K (2007) Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *The Journal of biological chemistry* 282(44):32208-32221.

- Dewson G & Kluck RM (2009) Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of cell science* 122(Pt 16):2801-2808.
- Dhib-Jalbut S & Kalvakolanu DV (2015) Microglia and necroptosis: The culprits of neuronal cell death in multiple sclerosis. *Cytokine* 10.1016/j.cyto.2015.06.004.
- Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW & Cunningham AL (2008) Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol* 18(1):35-51.
- Dietzschold B, Li J, Faber M & Schnell M (2008) Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol* 3(5):481-490.
- Dijkman R, Jebbink MF, Koekkoek SM, Deijs M, Jonsdottir HR, Molenkamp R, Ieven M, Goossens H, Thiel V & van der Hoek L (2013) Isolation and characterization of current human coronavirus strains in primary human epithelial cell cultures reveal differences in target cell tropism. *Journal of virology* 87(11):6081-6090.
- Dillon CP, Tummers B, Baran K & Green DR (2016) Developmental checkpoints guarded by regulated necrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73(11-12):2125-2136.
- Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118(2):503-508.
- Dinarello CA (2007) Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1:S34-45.
- Divito S, Cherpes TL & Hendricks RL (2006) A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunologic research* 36(1-3):119-126.
- Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, Hulpiau P, Weber K, Sehon CA, Marquis RW, Bertin J, Gough PJ, Savvides S, Martinou JC, Bertrand MJ & Vandenabeele P (2014) MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell reports* 7(4):971-981.
- Dondelinger Y, Jouan-Lanhouet S, Divert T, Theatre E, Bertin J, Gough PJ, Giansanti P, Heck AJ, Dejardin E, Vandenabeele P & Bertrand MJ (2015) NF-kappaB-Independent Role of IKKalpha/IKKbeta in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. *Molecular cell* 60(1):63-76.
- Duffy S, Shackelton LA & Holmes EC (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature reviews. Genetics* 9(4):267-276.
- Dukhovny A, Sloutskin A, Markus A, Yee MB, Kinchington PR & Goldstein RS (2012) Varicella-zoster virus infects human embryonic stem cell-derived neurons and neurospheres but not pluripotent embryonic stem cells or early progenitors. *Journal of virology* 86(6):3211-3218.
- Dunai Z, Bauer PI & Mihalik R (2011) Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Pathology oncology research : POR* 17(4):791-800.
- Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G & Chen ZJ (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular cell* 22(2):245-257.

- Enjuanes L, Almazan F, Sola I & Zuniga S (2006) Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annual review of microbiology* 60:211-230.
- Escors D, Ortego J, Laude H & Enjuanes L (2001) The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. *Journal of virology* 75(3):1312-1324.
- Ethier C, Tardif M, Arul L & Poirier GG (2012) PARP-1 modulation of mTOR signaling in response to a DNA alkylating agent. *PloS one* 7(10):e47978.
- Fan H, Tang HB, Kang J, Shan L, Song H, Zhu K, Wang J, Ju G & Wang YZ (2015) Involvement of endoplasmic reticulum stress in the necroptosis of microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neuroscience* 311:362-373.
- Fan H, Zhang K, Shan L, Kuang F, Chen K, Zhu K, Ma H, Ju G & Wang YZ (2016) Reactive astrocytes undergo M1 microglia/macrophages-induced necroptosis in spinal cord injury. *Mol Neurodegener* 11(1):14.
- Farina C, Aloisi F & Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology* 28(3):138-145.
- Favreau DJ, Desforges M, St-Jean JR & Talbot PJ (2009) A human coronavirus OC43 variant harboring persistence-associated mutations in the S glycoprotein differentially induces the unfolded protein response in human neurons as compared to wild-type virus. *Virology* 395(2):255-267.
- Favreau DJ, Meessen-Pinard M, Desforges M & Talbot PJ (2012) Human coronavirus-induced neuronal programmed cell death is cyclophilin d dependent and potentially caspase dispensable. *Journal of virology* 86(1):81-93.
- Fensterl V, Wetzel JL, Ramachandran S, Ogino T, Stohlman SA, Bergmann CC, Diamond MS, Virgin HW & Sen GC (2012) Interferon-induced Ifit2/ISG54 protects mice from lethal VSV neuropathogenesis. *PLoS pathogens* 8(5):e1002712.
- Feoktistova M, Geserick P, Panayotova-Dimitrova D & Leverkus M (2012) Pick your poison: The Ripoptosome, a cell death platform regulating apoptosis and necroptosis. *Cell Cycle* 11(3):460-467.
- Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J & Alnemri ES (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell death and differentiation* 14(9):1590-1604.
- Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J & Alnemri ES (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458(7237):509-513.
- Feuer R, Mena I, Pagarigan RR, Harkins S, Hassett DE & Whitton JL (2003) Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *Am J Pathol* 163(4):1379-1393.

- Flowerdew SE, Wick D, Himmelein S, Horn AK, Sinicina I, Strupp M, Brandt T, Theil D & Hufner K (2013) Characterization of neuronal populations in the human trigeminal ganglion and their association with latent herpes simplex virus-1 infection. *PloS one* 8(12):e83603.
- Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, Poland A & Pedersen NC (1998) Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 12(6):415-423.
- Foley JE, Rand C & Leutenegger C (2003) Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg* 5(6):313-322.
- Forgie S & Marrie TJ (2009) Healthcare-associated atypical pneumonia. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 30(1):67-85.
- Forni D, Cagliani R, Clerici M & Sironi M (2016) Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in microbiology* 10.1016/j.tim.2016.09.001.
- Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG & Gale M, Jr. (2008) Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *Journal of virology* 82(2):609-616.
- Freeman MR (2010) Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* 330(6005):774-778.
- Freeman SA & Grinstein S (2014) Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev* 262(1):193-215.
- Freistadt MS & Eberle KE (1996) Correlation between poliovirus type 1 Mahoney replication in blood cells and neurovirulence. *Journal of virology* 70(9):6486-6492.
- Frieman M, Ratia K, Johnston RE, Mesecar AD & Baric RS (2009) Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF-kappaB signaling. *Journal of virology* 83(13):6689-6705.
- Frieman M, Yount B, Heise M, Kopecky-Bromberg SA, Palese P & Baric RS (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *Journal of virology* 81(18):9812-9824.
- Frost JL & Schafer DP (2016) Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends in cell biology* 10.1016/j.tcb.2016.02.006.
- Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, Kirchhoff F, Mobius W, Goebbels S, Nave KA, Schneider A, Simons M, Klugmann M, Trotter J & Kramer-Albers EM (2013) Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS biology* 11(7):e1001604.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V & Zychlinsky A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 176(2):231-241.

- Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U & Whitton JL (2006) Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev* 19(1):80-94.
- Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Matsubara K, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Sasaki H & Hatada I (2006) Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. *J Hum Genet* 51(4):368-374.
- Fulda S (2016) Regulation of necroptosis signaling and cell death by reactive oxygen species. *Biol Chem* 10.1515/hsz-2016-0102.
- Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Mobius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S & Nave KA (2012) Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485(7399):517-521.
- Fung TS, Huang M & Liu DX (2014a) Coronavirus-induced ER stress Responses and its involvement in Regulation of Coronavirus-Host Interactions. *Virus research* 10.1016/j.virusres.2014.09.016.
- Fung TS & Liu DX (2014b) Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Frontiers in microbiology* 5:296.
- Furr SR, Chauhan VS, Sterka D, Jr., Grdzlishvili V & Marriott I (2008) Characterization of retinoic acid-inducible gene-I expression in primary murine glia following exposure to vesicular stomatitis virus. *Journal of neurovirology* 14(6):503-513.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287(5457):1433-1438.
- Gagneur A, Sizun J, Vallet S, Legr MC, Picard B & Talbot PJ (2002) Coronavirus-related nosocomial viral respiratory infections in a neonatal and paediatric intensive care unit: a prospective study. *J Hosp Infect* 51(1):59-64.
- Gallagher TM, Buchmeier MJ & Perlman S (1992) Cell receptor-independent infection by a neurotropic murine coronavirus. *Virology* 191(1):517-522.
- Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O & Kroemer G (2016) Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 10.1007/s00018-016-2209-y.
- Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH, Bazan NG, Bertrand MJ, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Campanella M, Candi E, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, Di Daniele N, Dixit VM, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Fimia GM, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Joseph B, Jost PJ, Kaufmann T, Kepp O, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, Lopez-Otin C, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Meier P, Melino S, Mizushima N, Moll U, Munoz-Pinedo C, Nunez G, Oberst A,

- Panaretakis T, Penninger JM, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Ravichandran KS, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Shi Y, Simon HU, Stockwell BR, Szabadkai G, Tait SW, Tang HL, Tavernarakis N, Tsujimoto Y, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Villunger A, Wagner EF, Walczak H, White E, Wood WG, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Melino G & Kroemer G (2015) Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation* 22(1):58-73.
- Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z & Kroemer G (2008) Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS pathogens* 4(5):e1000018.
- Galluzzi L, Kepp O, Morselli E, Vitale I, Senovilla L, Pinti M, Zitvogel L & Kroemer G (2010) Viral strategies for the evasion of immunogenic cell death. *Journal of internal medicine* 267(5):526-542.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G & Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19(1):107-120.
- Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento JM, Brindeiro R, Tanuri A & Rehen SK (2016) Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* 352(6287):816-818.
- Garcia-Saez AJ (2012) The secrets of the Bcl-2 family. *Cell death and differentiation* 19(11):1733-1740.
- Garofalo RP, Kolli D & Casola A (2013) Respiratory syncytial virus infection: mechanisms of redox control and novel therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling* 18(2):186-217.
- Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, Tu HC, Kim H, Cheng EH, Tjandra N & Walensky LD (2008) BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455(7216):1076-1081.
- Geijtenbeek TB & Gringhuis SI (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature reviews. Immunology* 9(7):465-479.
- Gerna G, Campanini G, Rovida F, Percivalle E, Sarasini A, Marchi A & Baldanti F (2006) Genetic variability of human coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. *Journal of medical virology* 78(7):938-949.
- Gerna G, Passarani N, Battaglia M & Rondanelli EG (1985) Human enteric coronaviruses: antigenic relatedness to human coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 151(5):796-803.

- Ghibelli L & Diederich M (2010) Multistep and multitask Bax activation. *Mitochondrion* 10(6):604-613.
- Gilden D, Nagel M, Cohrs R, Mahalingam R & Baird N (2015) Varicella Zoster Virus in the Nervous System. *F1000Res* 4.
- Ginhoux F & Prinz M (2015) Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7(8):a020537.
- Giraudon P & Bernard A (2009) Chronic viral infections of the central nervous system: Aspects specific to multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 165(10):789-795.
- Gluska S, Zahavi EE, Chein M, Gradus T, Bauer A, Finke S & Perlson E (2014) Rabies Virus Hijacks and accelerates the p75NTR retrograde axonal transport machinery. *PLoS pathogens* 10(8):e1004348.
- Gogate N, Swoveland P, Yamabe T, Verma L, Woyciechowska J, Tarnowska-Dziduszko E, Dymecki J & Dhib-Jalbut S (1996) Major histocompatibility complex class I expression on neurons in subacute sclerosing panencephalitis and experimental subacute measles encephalitis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55(4):435-443.
- Goncalves JT, Schafer ST & Gage FH (2016) Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167(4):897-914.
- Gonzalez ME & Carrasco L (2003) Viroporins. *FEBS letters* 552(1):28-34.
- Gosert R, Kanjanahaluethai A, Egger D, Bienz K & Baker SC (2002) RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *Journal of virology* 76(8):3697-3708.
- Graham RL, Donaldson EF & Baric RS (2013) A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology* 11(12):836-848.
- Gralinski LE, Ashley SL, Dixon SD & Spindler KR (2009) Mouse adenovirus type 1-induced breakdown of the blood-brain barrier. *Journal of virology* 83(18):9398-9410.
- Gray EE & Cyster JG (2012) Lymph node macrophages. *J Innate Immun* 4(5-6):424-436.
- Griffin DE (2011) Viral encephalomyelitis. *PLoS pathogens* 7(3):e1002004.
- Griffin DE (2016) Alphavirus Encephalomyelitis: Mechanisms and Approaches to Prevention of Neuronal Damage. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 13(3):455-460.
- Gu J, Gong E, Zhang B, Zheng J, Gao Z, Zhong Y, Zou W, Zhan J, Wang S, Xie Z, Zhuang H, Wu B, Zhong H, Shao H, Fang W, Gao D, Pei F, Li X, He Z, Xu D, Shi X, Anderson VM & Leong AS (2005) Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med* 202(3):415-424.
- Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JS & Poon LL

- (2003) Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302(5643):276-278.
- Gunther C, Martini E, Wittkopf N, Amann K, Weigmann B, Neumann H, Waldner MJ, Hedrick SM, Tenzer S, Neurath MF & Becker C (2011) Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature* 477(7364):335-339.
- Guo H, Omoto S, Harris PA, Finger JN, Bertin J, Gough PJ, Kaiser WJ & Mocarski ES (2015a) Herpes simplex virus suppresses necroptosis in human cells. *Cell host & microbe* 17(2):243-251.
- Guo S, Yang C, Diao B, Huang X, Jin M, Chen L, Yan W, Ning Q, Zheng L, Wu Y & Chen Y (2015b) The NLRP3 Inflammasome and IL-1beta Accelerate Immunologically Mediated Pathology in Experimental Viral Fulminant Hepatitis. *PLoS pathogens* 11(9):e1005155.
- Guven-Maiorov E, Tsai CJ & Nussinov R (2016) Pathogen mimicry of host protein-protein interfaces modulates immunity. *Seminars in cell & developmental biology* 10.1016/j.semcdb.2016.06.004.
- Guyton AC (1989) *Anatomie et physiologie du système nerveux*. Québec
- Haagmans BL, Kuiken T, Martina BE, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, de Jong T, Itamura S, Chan KH, Tashiro M & Osterhaus AD (2004) Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nature medicine* 10(3):290-293.
- Hacker H & Karin M (2006) Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006(357):re13.
- Hajjema BJ, Volders H & Rottier PJ (2004) Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *Journal of virology* 78(8):3863-3871.
- Hamre D & Procknow JJ (1966) A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 121(1):190-193.
- Han J, Zhong CQ & Zhang DW (2011) Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nature immunology* 12(12):1143-1149.
- Handke W, Krause E & Brune W (2012) Live or let die: manipulation of cellular suicide programs by murine cytomegalovirus. *Medical microbiology and immunology* 10.1007/s00430-012-0264-z.
- Harris KG, Morosky SA, Drummond CG, Patel M, Kim C, Stolz DB, Bergelson JM, Cherry S & Coyne CB (2015) RIP3 Regulates Autophagy and Promotes Coxsackievirus B3 Infection of Intestinal Epithelial Cells. *Cell host & microbe* 18(2):221-232.
- Harty JT, Tvinnereim AR & White DW (2000) CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18:275-308.

- Hasoksuz M, Sreevatsan S, Cho KO, Hoet AE & Saif LJ (2002) Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus research* 84(1-2):101-109.
- Hauser DN, Dukes AA, Mortimer AD & Hastings TG (2013) Dopamine quinone modifies and decreases the abundance of the mitochondrial selenoprotein glutathione peroxidase 4. *Free Radic Biol Med* 65:419-427.
- Hawkins BT & Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57(2):173-185.
- He L, Ding Y, Zhang Q, Che X, He Y, Shen H, Wang H, Li Z, Zhao L, Geng J, Deng Y, Yang L, Li J, Cai J, Qiu L, Wen K, Xu X & Jiang S (2006) Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-CoV-infected ACE2+ cells in SARS patients: relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. *J Pathol* 210(3):288-297.
- He S, Liang Y, Shao F & Wang X (2011) Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(50):20054-20059.
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L & Wang X (2009) Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 137(6):1100-1111.
- He SH, Zhang HY, Zeng XN, Chen D & Yang PC (2013) Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. *Acta pharmacologica Sinica* 34(10):1270-1283.
- He Y, Fisher R, Chowdhury S, Sultana I, Pereira CP, Bray M & Reed JL (2014) Vaccinia virus induces rapid necrosis in keratinocytes by a STAT3-dependent mechanism. *PLoS one* 9(11):e113690.
- Heald-Sargent T & Gallagher T (2012) Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses* 4(4):557-580.
- Hemmila E, Turbide C, Olson M, Jothy S, Holmes KV & Beauchemin N (2004) Ceacam1a-/- mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *Journal of virology* 78(18):10156-10165.
- Herdy B, Jaramillo M, Svitkin YV, Rosenfeld AB, Kobayashi M, Walsh D, Alain T, Sean P, Robichaud N, Topisirovic I, Furic L, Dowling RJ, Sylvestre A, Rong L, Colina R, Costa-Mattioli M, Fritz JH, Olivier M, Brown E, Mohr I & Sonenberg N (2012) Translational control of the activation of transcription factor NF-kappaB and production of type I interferon by phosphorylation of the translation factor eIF4E. *Nature immunology* 13(6):543-550.
- Hermant P & Michiels T (2014) Interferon-lambda in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *J Innate Immun* 6(5):563-574.

- Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ & de Groot RJ (1998) Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *Journal of virology* 72(5):4508-4514.
- Hill DP & Robertson KA (1998) Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain research. Brain research protocols* 2(3):183-190.
- Hirahara K, Poholek A, Vahedi G, Laurence A, Kanno Y, Milner JD & O'Shea JJ (2013) Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. *J Allergy Clin Immunol* 131(5):1276-1287.
- Hirano N, Nomura R, Tawara T & Tohyama K (2004) Neurotropism of swine haemagglutinating encephalomyelitis virus (coronavirus) in mice depending upon host age and route of infection. *J Comp Pathol* 130(1):58-65.
- Hirano T & Ruebner BH (1965) The Effect of Murine Hepatitis Virus Infection on Lymphatic Organs. *Lab Invest* 14:488-500.
- Hofmann H, Simmons G, Rennekamp AJ, Chaipan C, Gramberg T, Heck E, Geier M, Wegele A, Marzi A, Bates P & Pohlmann S (2006) Highly conserved regions within the spike proteins of human coronaviruses 229E and NL63 determine recognition of their respective cellular receptors. *Journal of virology* 80(17):8639-8652.
- Homberger FR, Zhang L & Barthold SW (1998) Prevalence of enterotropic and polytropic mouse hepatitis virus in enzootically infected mouse colonies. *Lab Anim Sci* 48(1):50-54.
- Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E & Fitzgerald KA (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458(7237):514-518.
- Hosking MP & Lane TE (2010) The Pathogenesis of Murine Coronavirus Infection of the Central Nervous System. *Critical reviews in immunology* 30(2):119-130.
- Houff SA, Major EO, Katz DA, Kufta CV, Sever JL, Pittaluga S, Roberts JR, Gitt J, Saini N & Lux W (1988) Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *The New England journal of medicine* 318(5):301-305.
- Hoving JC, Wilson GJ & Brown GD (2014) Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol* 16(2):185-194.
- Hu X, Yuan Y, Wang D & Su Z (2016) Heterogeneous astrocytes: Active players in CNS. *Brain Res Bull* 125:1-18.
- Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL & Makino S (2011a) Alphacoronavirus transmissible gastroenteritis virus nsp1 protein suppresses protein translation in mammalian cells and in cell-free HeLa cell extracts but not in rabbit reticulocyte lysate. *Journal of virology* 85(1):638-643.

- Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL & Makino S (2011b) SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS pathogens* 7(12):e1002433.
- Huang HI & Shih SR (2015a) Neurotropic Enterovirus Infections in the Central Nervous System. *Viruses* 7(11):6051-6066.
- Huang X, Dong W, Milewska A, Golda A, Qi Y, Zhu QK, Marasco WA, Baric RS, Sims AC, Pyrc K, Li W & Sui J (2015b) Human Coronavirus HKU1 Spike Protein Uses O-Acetylated Sialic Acid as an Attachment Receptor Determinant and Employs Hemagglutinin-Esterase Protein as a Receptor-Destroying Enzyme. *Journal of virology* 89(14):7202-7213.
- Huang Y, Ding L, Li Z, Dai M, Zhao X, Li W, Du Q, Xu X & Tong D (2013) Transmissible gastroenteritis virus infection induces cell apoptosis via activation of p53 signalling. *The Journal of general virology* 94(Pt 8):1807-1817.
- Huang Z, Wu SQ, Liang Y, Zhou X, Chen W, Li L, Wu J, Zhuang Q, Chen C, Li J, Zhong CQ, Xia W, Zhou R, Zheng C & Han J (2015c) RIP1/RIP3 binding to HSV-1 ICP6 initiates necroptosis to restrict virus propagation in mice. *Cell host & microbe* 17(2):229-242.
- Hulswit RJ, de Haan CA & Bosch BJ (2016) Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv Virus Res* 96:29-57.
- Huppa JB & Davis MM (2003) T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature reviews. Immunology* 3(12):973-983.
- Hurst KR, Kuo L, Koetzner CA, Ye R, Hsue B & Masters PS (2005) A major determinant for membrane protein interaction localizes to the carboxy-terminal domain of the mouse coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of virology* 79(21):13285-13297.
- Hurtado-Chong A, Yusta-Boyo MJ, Vergano-Vera E, Bulfone A, de Pablo F & Vicario-Abejon C (2009) IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur J Neurosci* 30(5):742-755.
- Iacono KT, Kazi L & Weiss SR (2006) Both spike and background genes contribute to murine coronavirus neurovirulence. *Journal of virology* 80(14):6834-6843.
- Iborra S, Izquierdo HM, Martinez-Lopez M, Blanco-Menendez N, Reis e Sousa C & Sancho D (2012) The DC receptor DNCR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J Clin Invest* 122(5):1628-1643.
- Inoue A, Koh CS, Yamazaki M, Yahikozawa H, Ichikawa M, Yagita H & Kim BS (1998) Suppressive effect on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease by the administration of anti-IL-12 antibody. *J Immunol* 161(10):5586-5593.
- Inoue Y, Tanaka N, Tanaka Y, Inoue S, Morita K, Zhuang M, Hattori T & Sugamura K (2007) Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. *Journal of virology* 81(16):8722-8729.

- Irwin DJ, Wunner WH, Ertl HC & Jackson AC (1999) Basis of rabies virus neurovirulence in mice: expression of major histocompatibility complex class I and class II mRNAs. *Journal of neurovirology* 5(5):485-494.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A & Antel JP (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175(7):4320-4330.
- Jacomy H, Fragoso G, Almazan G, Mushynski WE & Talbot PJ (2006) Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. *Virology* 349(2):335-346.
- Jacomy H, St-Jean JR, Brison E, Marceau G, Desforges M & Talbot PJ (2010) Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. *Journal of neurovirology* 16(4):279-293.
- Jacomy H & Talbot PJ (2003) Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* 315(1):20-33.
- Jan JT & Griffin DE (1999) Induction of apoptosis by Sindbis virus occurs at cell entry and does not require virus replication. *Journal of virology* 73(12):10296-10302.
- Jan YN & Jan LY (2010) Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nature reviews. Neuroscience* 11(5):316-328.
- Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, Contreras I, Luxenburg R, Rosenfeld A, Colina R, McMaster RW, Olivier M, Costa-Mattioli M & Sonenberg N (2011) Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell host & microbe* 9(4):331-341.
- Jayakar HR, Jeetendra E & Whitt MA (2004) Rhabdovirus assembly and budding. *Virus research* 106(2):117-132.
- Jego PA (1998) DNA repair: PARP - another guardian angel? *Curr Biol* 8(2):R49-51.
- Jelachich ML & Lipton HL (1996) Theiler's murine encephalomyelitis virus kills restrictive but not permissive cells by apoptosis. *Journal of virology* 70(10):6856-6861.
- Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG & Holmes EC (2002) Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol* 54(2):156-165.
- Jimenez-Guardeno JM, Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Castano-Rodriguez C & Enjuanes L (2014) The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS pathogens* 10(8):e1004320.
- Johnston SL, Pattermore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DA & et al. (1995) Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 310(6989):1225-1229.

- Jones G & Power C (2006) Regulation of neural cell survival by HIV-1 infection. *Neurobiology of disease* 21(1):1-17.
- Josset L, Menachery VD, Gralinski LE, Agnihothram S, Sova P, Carter VS, Yount BL, Graham RL, Baric RS & Katze MG (2013) Cell Host Response to Infection with Novel Human Coronavirus EMC Predicts Potential Antivirals and Important Differences with SARS Coronavirus. *mBio* 4(3).
- Jouan-Lanhouet S, Riquet F, Duprez L, Vanden Berghe T, Takahashi N & Vandenabeele P (2014) Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Seminars in cell & developmental biology* 35:2-13.
- Jung K, Hu H & Saif LJ (2016) Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis. *Virus research* 10.1016/j.virusres.2016.04.009.
- Kaczmarek A, Vandenabeele P & Krysko DV (2013) Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38(2):209-223.
- Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW & Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123(3):326-338.
- Kaiser WJ & Offermann MK (2005) Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* 174(8):4942-4952.
- Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, Sehon CA, Marquis RW, Bertin J & Mocarski ES (2013) Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *The Journal of biological chemistry* 288(43):31268-31279.
- Kaiser WJ, Upton JW & Mocarski ES (2008) Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. *J Immunol* 181(9):6427-6434.
- Kandel ER, J.H. Schwartz and T.M. Jessel (2000) *Principles of neural science*. New York. 1760 p. p
- Kanning KC, Kaplan A & Henderson CE (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33:409-440.
- Kapil P, Stohlman SA, Hinton DR & Bergmann CC (2014) PKR mediated regulation of inflammation and IL-10 during viral encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 270(1-2):1-12.
- Kar P, Samanta K, Shaikh S, Chowdhury A, Chakraborti T & Chakraborti S (2010) Mitochondrial calpain system: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics* 495(1):1-7.
- Karim S, Mirza Z, Kamal MA, Abuzenadah AM, Azhar EI, Al-Qahtani MH, Damanhour GA, Ahmad F, Gan SH & Sohrab SS (2014) The role of viruses in neurodegenerative and neurobehavioral diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13(7):1213-1223.

- Karplus PA (1997) Hydrophobicity regained. *Protein Sci* 6(6):1302-1307.
- Kavouras JH, Prandovszky E, Valyi-Nagy K, Kovacs SK, Tiwari V, Kovacs M, Shukla D & Valyi-Nagy T (2007) Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. *Journal of neurovirology* 13(5):416-425.
- Kazi L, Lissenberg A, Watson R, de Groot RJ & Weiss SR (2005) Expression of hemagglutinin esterase protein from recombinant mouse hepatitis virus enhances neurovirulence. *Journal of virology* 79(24):15064-15073.
- Keidar S, Kaplan M & Gamliel-Lazarovich A (2007) ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovascular research* 73(3):463-469.
- Kelso A (1998) Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol* 76(4):300-317.
- Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26(4):239-257.
- Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG & Keane RW (2014) Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental neurology* 258:5-16.
- Kim KD, Zhao J, Auh S, Yang X, Du P, Tang H & Fu YX (2007) Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nature medicine* 13(10):1248-1252.
- Kim SJ & Li J (2013) Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia. *Cell death & disease* 4:e716.
- Kim SY, Shim MS, Kim KY, Weinreb RN, Wheeler LA & Ju WK (2014) Inhibition of cyclophilin D by cyclosporin A promotes retinal ganglion cell survival by preventing mitochondrial alteration in ischemic injury. *Cell death & disease* 5:e1105.
- King MD, Whitaker-Lea WA, Campbell JM, Alleyne CH, Jr. & Dhandapani KM (2014) Necrostatin-1 reduces neurovascular injury after intracerebral hemorrhage. *International journal of cell biology* 2014:495817.
- Kipar A & Meli ML (2014) Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol* 51(2):505-526.
- Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, Bowker LJ & Lutz H (2010) Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *The Journal of general virology* 91(Pt 7):1698-1707.
- Klingen Y, Conzelmann KK & Finke S (2008) Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport. *Journal of virology* 82(1):237-245.
- Klumperman J, Locker JK, Meijer A, Horzinek MC, Geuze HJ & Rottier PJ (1994) Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *Journal of virology* 68(10):6523-6534.
- Knoops K, Swett-Tapia C, van den Worm SH, Te Velthuis AJ, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ & Kikkert M (2010) Integrity of the early secretory pathway promotes, but is not

- required for, severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA synthesis and virus-induced remodeling of endoplasmic reticulum membranes. *Journal of virology* 84(2):833-846.
- Koch C & Zador A (1993) The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J Neurosci* 13(2):413-422.
- Kolsch H, Ludwig M, Lutjohann D & Rao ML (2001) Neurotoxicity of 24-hydroxycholesterol, an important cholesterol elimination product of the brain, may be prevented by vitamin E and estradiol-17beta. *J Neural Transm (Vienna)* 108(4):475-488.
- Kong SL, Chui P, Lim B & Salto-Tellez M (2009) Elucidating the molecular physiopathology of acute respiratory distress syndrome in severe acute respiratory syndrome patients. *Virus research* 145(2):260-269.
- Koo GB, Morgan MJ, Lee DG, Kim WJ, Yoon JH, Koo JS, Kim SI, Kim SJ, Son MK, Hong SS, Levy JM, Pollyea DA, Jordan CT, Yan P, Frankhouser D, Nicolet D, Maharry K, Marcucci G, Choi KS, Cho H, Thorburn A & Kim YS (2015) Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell research* 25(6):707-725.
- Kopecky-Bromberg SA, Martinez-Sobrido L, Frieman M, Baric RA & Palese P (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *Journal of virology* 81(2):548-557.
- Koyuncu OO, Hogue IB & Enquist LW (2013) Virus infections in the nervous system. *Cell host & microbe* 13(4):379-393.
- Krahling V, Stein DA, Spiegel M, Weber F & Muhlberger E (2009) Severe acute respiratory syndrome coronavirus triggers apoptosis via protein kinase R but is resistant to its antiviral activity. *Journal of virology* 83(5):2298-2309.
- Krietsch J, Rouleau M, Pic E, Ethier C, Dawson TM, Dawson VL, Masson JY, Poirier GG & Gagne JP (2012) Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Molecular aspects of medicine* 10.1016/j.mam.2012.12.005.
- Krishnakumar R & Kraus WL (2010) The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Molecular cell* 39(1):8-24.
- Kroemer G, Galluzzi L & Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87(1):99-163.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G & Nomenclature Committee on Cell D (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 16(1):3-11.

- Kuhn HG, Cooper-Kuhn C, Eriksson P & Nilsson M (2005) Signals regulating neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i109-110.
- Kumar M, Verma S & Nerurkar VR (2010) Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death. *J Neuroinflammation* 7:73.
- Kumar S, Misra UK, Kalita J, Khanna VK & Khan MY (2009) Imbalance in oxidant/antioxidant system in different brain regions of rat after the infection of Japanese encephalitis virus. *Neurochem Int* 55(7):648-654.
- Kunkel F & Herrler G (1993) Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* 195(1):195-202.
- Kunz S, Rojek JM, Roberts AJ, McGavern DB, Oldstone MB & de la Torre JC (2006) Altered central nervous system gene expression caused by congenitally acquired persistent infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology* 80(18):9082-9092.
- Kuo RL, Kung SH, Hsu YY & Liu WT (2002) Infection with enterovirus 71 or expression of its 2A protease induces apoptotic cell death. *The Journal of general virology* 83(Pt 6):1367-1376.
- Kurosaki T, Kometani K & Ise W (2015) Memory B cells. *Nature reviews. Immunology* 15(3):149-159.
- Kutcher ME & Herman IM (2009) The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res* 77(3):235-246.
- Lafaille FG, Pessach IM, Zhang SY, Ciancanelli MJ, Herman M, Abhyankar A, Ying SW, Keros S, Goldstein PA, Mostoslavsky G, Ordovas-Montanes J, Jouanguy E, Plancoulaine S, Tu E, Elkabetz Y, Al-Muhsen S, Tardieu M, Schlaeger TM, Daley GQ, Abel L, Casanova JL, Studer L & Notarangelo LD (2012) Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. *Nature* 491(7426):769-773.
- Lafon M (2005) Rabies virus receptors. *Journal of neurovirology* 11(1):82-87.
- Lafon M, Megret F, Meuth SG, Simon O, Velandia Romero ML, Lafage M, Chen L, Alexopoulou L, Flavell RA, Prehaud C & Wiendl H (2008) Detrimental contribution of the immunoinhibitor B7-H1 to rabies virus encephalitis. *J Immunol* 180(11):7506-7515.
- Lai MM (1992) RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev* 56(1):61-79.
- Lalaoui N, Lindqvist LM, Sandow JJ & Ekert PG (2015) The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Seminars in cell & developmental biology* 39:63-69.
- Lambert F, Jacomy H, Marceau G & Talbot PJ (2008) Titration of human coronaviruses, HCoV-229E and HCoV-OC43, by an indirect immunoperoxidase assay. *Methods Mol Biol* 454:93-102.

- Lamontagne L, Descoteaux JP & Jolicoeur P (1989) Mouse hepatitis virus 3 replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity. *J Immunol* 142(12):4458-4465.
- Lampert PW, Sims JK & Kniazeff AJ (1973) Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies. *Acta neuropathologica* 24(1):76-85.
- Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, Hjorth P, Sondergaard L, Svejgaard A, Wucherpfennig K, Stuart DI, Bell JI, Jones EY & Fugger L (2002) A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nature immunology* 3(10):940-943.
- Langevin C & Tuffereau C (2002) Mutations conferring resistance to neutralization by a soluble form of the neurotrophin receptor (p75NTR) map outside of the known antigenic sites of the rabies virus glycoprotein. *Journal of virology* 76(21):10756-10765.
- Laukens B, Jennewein C, Schenk B, Vanlangenakker N, Schier A, Cristofanon S, Zobel K, Deshayes K, Vucic D, Jeremias I, Bertrand MJ, Vandenabeele P & Fulda S (2011) Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in FADD- or caspase-8-deficient cells by priming for tumor necrosis factor alpha-induced necroptosis. *Neoplasia* 13(10):971-979.
- Lauvau G & Soudja SM (2015) Mechanisms of Memory T Cell Activation and Effective Immunity. *Advances in experimental medicine and biology* 850:73-80.
- Lavi E, Gilden DH, Wroblewska Z, Rorke LB & Weiss SR (1984) Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus. *Neurology* 34(5):597-603.
- Lavin Y, Mortha A, Rahman A & Merad M (2015) Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature reviews. Immunology* 15(12):731-744.
- Lavrik I, Golks A & Krammer PH (2005) Death receptor signaling. *Journal of cell science* 118(Pt 2):265-267.
- Law HK, Cheung CY, Ng HY, Sia SF, Chan YO, Luk W, Nicholls JM, Peiris JS & Lau YL (2005) Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 106(7):2366-2374.
- Le Coupanec A, Desforges M, Meessen-Pinard M, Dube M, Day R, Seidah NG & Talbot PJ (2015) Cleavage of a Neuroinvasive Human Respiratory Virus Spike Glycoprotein by Proprotein Convertases Modulates Neurovirulence and Virus Spread within the Central Nervous System. *PLoS pathogens* 11(11):e1005261.
- Lee Y, Karuppagounder SS, Shin JH, Lee YI, Ko HS, Swing D, Jiang H, Kang SU, Lee BD, Kang HC, Kim D, Tessarollo L, Dawson VL & Dawson TM (2013) Parthanatos mediates AIMP2-activated age-dependent dopaminergic neuronal loss. *Nature neuroscience* 16(10):1392-1400.
- Legendre AM & Whitenack DL (1975) Feline infectious peritonitis with spinal cord involvement in two cats. *J Am Vet Med Assoc* 167(10):31-32.
- Lehnardt S (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58(3):253-263.

- Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z & Nieminen AL (2009) Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochimica et biophysica acta* 1787(11):1395-1401.
- Lepoutre V, Jain P, Quann K, Wigdahl B & Khan ZK (2009) Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:1152-1168.
- Lettau M, Paulsen M, Schmidt H & Janssen O (2011) Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology. *European journal of cell biology* 90(6-7):456-466.
- Leyssen P, Paeshuyse J, Charlier N, Van Lommel A, Drosten C, De Clercq E & Neyts J (2003) Impact of direct virus-induced neuronal dysfunction and immunological damage on the progression of flavivirus (Modoc) encephalitis in a murine model. *Journal of neurovirology* 9(1):69-78.
- Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, Zhang N, Shi L, Qin CF & Xu Z (2016a) Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 10.1016/j.stem.2016.04.017.
- Li F (2016) Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol* 10.1146/annurev-virology-110615-042301.
- Li FQ, Tam JP & Liu DX (2007) Cell cycle arrest and apoptosis induced by the coronavirus infectious bronchitis virus in the absence of p53. *Virology* 365(2):435-445.
- Li SW, Wang CY, Jou YJ, Huang SH, Hsiao LH, Wan L, Lin YJ, Kung SH & Lin CW (2016b) SARS Coronavirus Papain-Like Protease Inhibits the TLR7 Signaling Pathway through Removing Lys63-Linked Polyubiquitination of TRAF3 and TRAF6. *International journal of molecular sciences* 17(5).
- Li SW, Wang CY, Jou YJ, Yang TC, Huang SH, Wan L, Lin YJ & Lin CW (2016c) SARS coronavirus papain-like protease induces Egr-1-dependent up-regulation of TGF-beta1 via ROS/p38 MAPK/STAT3 pathway. *Sci Rep* 6:25754.
- Li T, Qiu Z, Zhang L, Han Y, He W, Liu Z, Ma X, Fan H, Lu W, Xie J, Wang H, Deng G & Wang A (2004a) Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Infect Dis* 189(4):648-651.
- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H & Farzan M (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426(6965):450-454.
- Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S & Wang LF (2005) Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310(5748):676-679.
- Li Y, Fu L, Gonzales DM & Lavi E (2004b) Coronavirus neurovirulence correlates with the ability of the virus to induce proinflammatory cytokine signals from astrocytes and microglia. *Journal of virology* 78(7):3398-3406.

- Liao Y, Fung TS, Huang M, Fang SG, Zhong Y & Liu DX (2013) Upregulation of CHOP/GADD153 during coronavirus infectious bronchitis virus infection modulates apoptosis by restricting activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Journal of virology* 87(14):8124-8134.
- Licitra BN, Duhamel GE & Whittaker GR (2014) Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. *Viruses* 6(8):3363-3376.
- Licitra BN, Millet JK, Regan AD, Hamilton BS, Rinaldi VD, Duhamel GE & Whittaker GR (2013) Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis* 19(7):1066-1073.
- Liddel SA (2011) Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids Barriers CNS* 8(1):2.
- Lin MT, Stohlman SA & Hinton DR (1997) Mouse hepatitis virus is cleared from the central nervous systems of mice lacking perforin-mediated cytolysis. *Journal of virology* 71(1):383-391.
- Lin Y, Devin A, Rodriguez Y & Liu ZG (1999) Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & development* 13(19):2514-2526.
- Lin YW, Wang SW, Tung YY & Chen SH (2009) Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 234(10):1166-1173.
- Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S & Anders HJ (2014) Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nature reviews. Immunology* 14(11):759-767.
- Lipton HL (1975) Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. *Infect Immun* 11(5):1147-1155.
- Liu DX, Fung TS, Chong KK, Shukla A & Hilgenfeld R (2014a) Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral research* 109:97-109.
- Liu S, Wang X, Li Y, Xu L, Yu X, Ge L, Li J, Zhu Y & He S (2014b) Necroptosis mediates TNF-induced toxicity of hippocampal neurons. *BioMed research international* 2014:290182.
- Liu Y, Pu Y & Zhang X (2006) Role of the mitochondrial signaling pathway in murine coronavirus-induced oligodendrocyte apoptosis. *Journal of virology* 80(1):395-403.
- Liu Y & Zhang X (2007) Murine coronavirus-induced oligodendrocyte apoptosis is mediated through the activation of the Fas signaling pathway. *Virology* 360(2):364-375.
- Lokugamage KG, Narayanan K, Huang C & Makino S (2012) Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein nsp1 is a novel eukaryotic translation inhibitor that represses multiple steps of translation initiation. *Journal of virology* 86(24):13598-13608.
- Lokugamage KG, Narayanan K, Nakagawa K, Terasaki K, Ramirez SI, Tseng CT & Makino S (2015) Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp1 Inhibits Host Gene

Expression by Selectively Targeting mRNAs Transcribed in the Nucleus while Sparing mRNAs of Cytoplasmic Origin. *Journal of virology* 89(21):10970-10981.

Long KM, Whitmore AC, Ferris MT, Sempowski GD, McGee C, Trollinger B, Gunn B & Heise MT (2013) Dendritic cell immunoreceptor regulates Chikungunya virus pathogenesis in mice. *Journal of virology* 87(10):5697-5706.

Lu H, Hu J, Li J, Pang W, Hu Y, Yang H, Li W, Huang C, Zhang M & Jiang Y (2013) Optimal dose of zinc supplementation for preventing aluminum-induced neurotoxicity in rats. *Neural Regen Res* 8(29):2754-2762.

Luan Y & Xu W (2007) The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem* 14(6):639-647.

Lundblad RL & Macdonald F (2010) *Handbook of biochemistry and molecular biology*. CRC press, Fourth edition. 1098 p

Luytjes W, Bredenbeek PJ, Noten AF, Horzinek MC & Spaan WJ (1988) Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 166(2):415-422.

Lytvyn DIB, Ya. B.; Desforges, M.; Meessen-Pinard, M.; Talbot, P.J.; Sabater, B. and Martin, M. (2016) Modulating regulated cell death: the virus way to influence cell fate, survive and persist. *Programmed cell death in plants and animals*, Rice J (Édit.) Nova science publishers, New York.

MacGibbon GA, Lawlor PA, Sirimanne ES, Walton MR, Connor B, Young D, Williams C, Gluckman P, Faull RL, Hughes P & Dragunow M (1997) Bax expression in mammalian neurons undergoing apoptosis, and in Alzheimer's disease hippocampus. *Brain Res* 750(1-2):223-234.

Mack C, Sickmann A, Lembo D & Brune W (2008) Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(8):3094-3099.

Magavi SS, Leavitt BR & Macklis JD (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405(6789):951-955.

Mahad DH, Trapp BD & Lassmann H (2015) Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet neurology* 14(2):183-193.

Maier HJ & Britton P (2012) Involvement of autophagy in coronavirus replication. *Viruses* 4(12):3440-3451.

Mandal P, Berger SB, Pillay S, Moriwaki K, Huang C, Guo H, Lich JD, Finger J, Kasparcova V, Votta B, Ouellette M, King BW, Wisnoski D, Lakdawala AS, DeMartino MP, Casillas LN, Haile PA, Sehon CA, Marquis RW, Upton J, Daley-Bauer LP, Roback L, Ramia N, Dovey CM, Carette JE, Chan FK, Bertin J, Gough PJ, Mocarski ES & Kaiser WJ (2014) RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity. *Molecular cell* 56(4):481-495.

- Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S & Marks MS (2013) Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 14(2):135-152.
- Marcenaro E, Carlomagno S, Pesce S, Della Chiesa M, Parolini S, Moretta A & Sivori S (2011) NK cells and their receptors during viral infections. *Immunotherapy* 3(9):1075-1086.
- Marshall KD & Baines CP (2014) Necroptosis: is there a role for mitochondria? *Frontiers in physiology* 5:323.
- Marshall WL, Yim C, Gustafson E, Graf T, Sage DR, Hanify K, Williams L, Fingerroth J & Finberg RW (1999) Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *Journal of virology* 73(6):5181-5185.
- Marten NW, Stohlman SA, Atkinson RD, Hinton DR, Fleming JO & Bergmann CC (2000) Contributions of CD8+ T cells and viral spread to demyelinating disease. *J Immunol* 164(8):4080-4088.
- Marten NW, Stohlman SA & Bergmann CC (2001) MHV infection of the CNS: mechanisms of immune-mediated control. *Viral Immunol* 14(1):1-18.
- Martin LJ (2001) Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). *Int J Mol Med* 7(5):455-478.
- Martinon F, Burns K & Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 10(2):417-426.
- Mattson MP (2003) Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular medicine* 3(2):65-94.
- Matute C & Perez-Cerda F (2005) Multiple sclerosis: novel perspectives on newly forming lesions. *Trends in neurosciences* 28(4):173-175.
- Mauri C & Bosma A (2012) Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* 30:221-241.
- Mazarakis ND, Azzouz M, Rohll JB, Ellard FM, Wilkes FJ, Olsen AL, Carter EE, Barber RD, Baban DF, Kingsman SM, Kingsman AJ, O'Malley K & Mitrophanous KA (2001) Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum Mol Genet* 10(19):2109-2121.
- McGavern DB & Kang SS (2011) Illuminating viral infections in the nervous system. *Nature reviews. Immunology* 11(5):318-329.
- McGoldrick A, Lowings JP & Paton DJ (1999) Characterisation of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a. *Archives of virology* 144(4):763-770.

- McIntosh K, Becker WB & Chanock RM (1967) Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58(6):2268-2273.
- Menachery VD, Eisfeld AJ, Schafer A, Josset L, Sims AC, Proll S, Fan S, Li C, Neumann G, Tilton SC, Chang J, Gralinski LE, Long C, Green R, Williams CM, Weiss J, Matzke MM, Webb-Robertson BJ, Schepmoes AA, Shukla AK, Metz TO, Smith RD, Waters KM, Katze MG, Kawaoka Y & Baric RS (2014) Pathogenic influenza viruses and coronaviruses utilize similar and contrasting approaches to control interferon-stimulated gene responses. *mBio* 5(3).
- Mesel-Lemoine M, Millet J, Vidalain PO, Law H, Vabret A, Lorin V, Escriou N, Albert ML, Nal B & Tangy F (2012) A human coronavirus responsible for the common cold massively kills dendritic cells but not monocytes. *Journal of virology* 86(14):7577-7587.
- Mestecky J & Fultz PN (1999) Mucosal immune system of the human genital tract. *J Infect Dis* 179 Suppl 3:S470-474.
- Meurs EF, Watanabe Y, Kadereit S, Barber GN, Katze MG, Chong K, Williams BR & Hovanessian AG (1992) Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *Journal of virology* 66(10):5805-5814.
- Meylan E & Tschopp J (2005) The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends in biochemical sciences* 30(3):151-159.
- Michalski JP & Kothary R (2015) Oligodendrocytes in a Nutshell. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:340.
- Micheau O & Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114(2):181-190.
- Michel PP, Hirsch EC & Hunot S (2016) Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron* 90(4):675-691.
- Mielech AM, Kilianski A, Baez-Santos YM, Mesecar AD & Baker SC (2014) MERS-CoV papain-like protease has deISGylating and deubiquitinating activities. *Virology* 450-451:64-70.
- Mildner A & Jung S (2014) Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40(5):642-656.
- Miller DC (1995) Post-polio syndrome spinal cord pathology. Case report with immunopathology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 753:186-193.
- Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, Pao W, Yauch RL, Neville KL, Katz-Levy Y, Carrizosa A & Kim BS (1997) Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nature medicine* 3(10):1133-1136.
- Millet JK & Whittaker GR (2015) Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus research* 202:120-134.

- Miner JJ & Diamond MS (2016) Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood-brain barrier. *Current opinion in immunology* 38:18-23.
- Mink JW, Blumenschine RJ & Adams DB (1981) Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *Am J Physiol* 241(3):R203-212.
- Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP & Keane RW (2013) Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* 61(7):1113-1121.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B & Reed JC (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6):1799-1805.
- Miyashita T & Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80(2):293-299.
- Mocarski ES, Upton JW & Kaiser WJ (2012) Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nature reviews. Immunology* 12(2):79-88.
- Mohr EL, McMullan LK, Lo MK, Spengler JR, Bergeron E, Albarino CG, Shrivastava-Ranjan P, Chiang CF, Nichol ST, Spiropoulou CF & Flint M (2015) Inhibitors of cellular kinases with broad-spectrum antiviral activity for hemorrhagic fever viruses. *Antiviral research* 120:40-47.
- Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ & Spear PG (1996) Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87(3):427-436.
- Mora R, Rodriguez-Boulan E, Palese P & Garcia-Sastre A (2002) Apical budding of a recombinant influenza A virus expressing a hemagglutinin protein with a basolateral localization signal. *Journal of virology* 76(7):3544-3553.
- Morfopoulou S, Brown JR, Davies EG, Anderson G, Virasami A, Qasim W, Chong WK, Hubank M, Plagnol V, Desforges M, Jacques TS, Talbot PJ & Breuer J (2016) Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal Encephalitis. *The New England journal of medicine* 375(5):497-498.
- Morgan MJ & Kim YS (2015) The serine threonine kinase RIP3: lost and found. *BMB Rep* 48(6):303-312.
- Mori I, Nishiyama Y, Yokochi T & Kimura Y (2005) Olfactory transmission of neurotropic viruses. *Journal of neurovirology* 11(2):129-137.
- Morimoto K, Foley HD, McGettigan JP, Schnell MJ & Dietzschold B (2000) Reinvestigation of the role of the rabies virus glycoprotein in viral pathogenesis using a reverse genetics approach. *Journal of neurovirology* 6(5):373-381.
- Morimoto K, Hooper DC, Spitsin S, Koprowski H & Dietzschold B (1999) Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus

- glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *Journal of virology* 73(1):510-518.
- Moriwaki K & Chan FK (2014) Necrosis-dependent and independent signaling of the RIP kinases in inflammation. *Cytokine & growth factor reviews* 25(2):167-174.
- Morrey JD, Siddharthan V, Wang H, Hall JO, Skirpstunas RT, Olsen AL, Nordstrom JL, Koenig S, Johnson S & Diamond MS (2008) West Nile virus-induced acute flaccid paralysis is prevented by monoclonal antibody treatment when administered after infection of spinal cord neurons. *Journal of neurovirology* 14(2):152-163.
- Morrison RS & Kinoshita Y (2000) The role of p53 in neuronal cell death. *Cell death and differentiation* 7(10):868-879.
- Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE & Vaux DL (2013) TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell death & disease* 4:e465.
- Mounir S & Talbot PJ (1992) Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. *The Journal of general virology* 73 (Pt 10):2731-2736.
- Mu X, He J, Anderson DW, Trojanowski JQ & Springer JE (1996) Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. *Annals of neurology* 40(3):379-386.
- Mufson EJ, Ikonomovic MD, Counts SE, Perez SE, Malek-Ahmadi M, Scheff SW & Ginsberg SD (2016) Molecular and Cellular Pathophysiology of Preclinical Alzheimer's Disease. *Behav Brain Res* 10.1016/j.bbr.2016.05.030.
- Mukherjee P, Winkler CW, Taylor KG, Woods TA, Nair V, Khan BA & Peterson KE (2015) SARM1, Not MyD88, Mediates TLR7/TLR9-Induced Apoptosis in Neurons. *J Immunol* 195(10):4913-4921.
- Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E & Prendergast GC (2005) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature medicine* 11(3):312-319.
- Nag S (2011) Morphology and properties of astrocytes. *Methods Mol Biol* 686:69-100.
- Naim HY, Ehler E & Billeter MA (2000) Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *The EMBO journal* 19(14):3576-3585.
- Nair S & Diamond MS (2015) Innate immune interactions within the central nervous system modulate pathogenesis of viral infections. *Current opinion in immunology* 36:47-53.
- Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T & Tsujimoto Y (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434(7033):652-658.

- Nakamura H, Masutani H & Yodoi J (2002) Redox imbalance and its control in HIV infection. *Antioxidants & redox signaling* 4(3):455-464.
- Nakanishi M, Niidome T, Matsuda S, Akaike A, Kihara T & Sugimoto H (2007) Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci* 25(3):649-658.
- Namy O, Moran SJ, Stuart DI, Gilbert RJ & Brierley I (2006) A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* 441(7090):244-247.
- Narayanan K, Kim KH & Makino S (2003) Characterization of N protein self-association in coronavirus ribonucleoprotein complexes. *Virus research* 98(2):131-140.
- Narayanan K, Ramirez SI, Lokugamage KG & Makino S (2015) Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus research* 202:89-100.
- Nargi-Aizenman JL & Griffin DE (2001) Sindbis virus-induced neuronal death is both necrotic and apoptotic and is ameliorated by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Journal of virology* 75(15):7114-7121.
- Nash TC & Buchmeier MJ (1997) Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways. *Virology* 233(1):1-8.
- Nava VE, Cheng EH, Veluona M, Zou S, Clem RJ, Mayer ML & Hardwick JM (1997) Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human bcl-2 oncogene. *Journal of virology* 71(5):4118-4122.
- Nave KA (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468(7321):244-252.
- Neuman BW, Adair BD, Yoshioka C, Quispe JD, Orca G, Kuhn P, Milligan RA, Yeager M & Buchmeier MJ (2006) Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy. *Journal of virology* 80(16):7918-7928.
- Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, Droese B, Klaus JP, Makino S, Sawicki SG, Siddell SG, Stamou DG, Wilson IA, Kuhn P & Buchmeier MJ (2011) A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol* 174(1):11-22.
- Neumann S, El Maadidi S, Faletti L, Haun F, Labib S, Schejtman A, Maurer U & Borner C (2015) How do viruses control mitochondria-mediated apoptosis? *Virus research* 10.1016/j.virusres.2015.02.026.
- Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, Kapoor N, de Almagro MC, Vucic D, Komuves L, Ferrando RE, French DM, Webster J, Roose-Girma M, Warming S & Dixit VM (2014) Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* 343(6177):1357-1360.
- Nguyen LT & Ohashi PS (2015) Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nature reviews. Immunology* 15(1):45-56.

- Nicholas RS, Wing MG & Compston A (2001) Nonactivated microglia promote oligodendrocyte precursor survival and maturation through the transcription factor NF-kappa B. *Eur J Neurosci* 13(5):959-967.
- Nieto-Torres JL, Verdia-Baguena C, Jimenez-Guardeno JM, Regla-Nava JA, Castano-Rodriguez C, Fernandez-Delgado R, Torres J, Aguilera VM & Enjuanes L (2015) Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* 485:330-339.
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R & Zhu X (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature reviews. Neuroscience* 10(1):9-22.
- Nogusa S, Thapa RJ, Dillon CP, Liedmann S, Oguin TH, 3rd, Ingram JP, Rodriguez DA, Kosoff R, Sharma S, Sturm O, Verbist K, Gough PJ, Bertin J, Hartmann BM, Sealson SC, Kaiser WJ, Mocarski ES, Lopez CB, Thomas PG, Oberst A, Green DR & Balachandran S (2016) RIPK3 Activates Parallel Pathways of MLKL-Driven Necroptosis and FADD-Mediated Apoptosis to Protect against Influenza A Virus. *Cell host & microbe* 20(1):13-24.
- Nomura R, Kiyota A, Suzaki E, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda T & Fujimoto T (2004) Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *Journal of virology* 78(16):8701-8708.
- Nugues AL, El Bouazzati H, Hetuin D, Berthon C, Loyens A, Bertrand E, Jouy N, Idziorek T & Quesnel B (2014) RIP3 is downregulated in human myeloid leukemia cells and modulates apoptosis and caspase-mediated p65/RelA cleavage. *Cell death & disease* 5:e1384.
- O'Brien J (2014) The ever-changing electrical synapse. *Curr Opin Neurobiol* 29:64-72.
- O'Kusky J & Ye P (2012) Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Front Neuroendocrinol* 33(3):230-251.
- Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T & Korsmeyer SJ (2005) Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(1):105-110.
- Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, Zhang Y, Shan B, DeWitt JP, Ye J, Zhang X, Chang A, Vakifahmetoglu-Norberg H, Geng J, Py B, Zhou W, Amin P, Berlink Lima J, Qi C, Yu Q, Trapp B & Yuan J (2015a) Activation of necroptosis in multiple sclerosis. *Cell reports* 10(11):1836-1849.
- Ofengeim D, Ito Y, Najafov A, Zhang YY, Shan B, DeWitt JP, Ye JY, Zhang XM, Chang AS, Vakifahmetoglu-Norberg H, Geng JF, Py B, Zhou W, Amin P, Lima JB, Qi CT, Yu Q, Trapp B & Yuan JY (2015b) Activation of Necroptosis in Multiple Sclerosis. *Cell reports* 10(11):1836-1849.
- Ohka S, Sakai M, Bohnert S, Igarashi H, Deinhardt K, Schiavo G & Nomoto A (2009) Receptor-dependent and -independent axonal retrograde transport of poliovirus in motor neurons. *Journal of virology* 83(10):4995-5004.

- Okada K, Yamashita U & Tsuji S (2005) Modulation of Na⁽⁺⁾-dependent glutamate transporter of murine astrocytes by inflammatory mediators. *J UOEH* 27(2):161-170.
- Okun E, Griffioen KJ & Mattson MP (2011) Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends in neurosciences* 34(5):269-281.
- Olson JK & Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173(6):3916-3924.
- Omoto S, Guo H, Talekar GR, Roback L, Kaiser WJ & Mocarski ES (2015) Suppression of RIP3-dependent necroptosis by human cytomegalovirus. *The Journal of biological chemistry* 290(18):11635-11648.
- Ontiveros E, Kim TS, Gallagher TM & Perlman S (2003) Enhanced virulence mediated by the murine coronavirus, mouse hepatitis virus strain JHM, is associated with a glycine at residue 310 of the spike glycoprotein. *Journal of virology* 77(19):10260-10269.
- Ortego J, Escors D, Laude H & Enjuanes L (2002) Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *Journal of virology* 76(22):11518-11529.
- Palm NW & Medzhitov R (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227(1):221-233.
- Pan T, Wu S, He X, Luo H, Zhang Y, Fan M, Geng G, Ruiz VC, Zhang J, Mills L, Bai C & Zhang H (2014) Necroptosis Takes Place in Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)-Infected CD4⁺ T Lymphocytes. *PloS one* 9(4):e93944.
- Park CH, Ishinaka M, Takada A, Kida H, Kimura T, Ochiai K & Umemura T (2002) The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. *Archives of virology* 147(7):1425-1436.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR & Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155(7):1596-1609.
- Parquet MC, Kumatori A, Hasebe F, Morita K & Igarashi A (2001) West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS letters* 500(1-2):17-24.
- Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A & Bessis A (2012) Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(4):E197-205.
- Pasparakis M & Vandenabeele P (2015) Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517(7534):311-320.
- Pasternak AO, Spaan WJ & Snijder EJ (2006) Nidovirus transcription: how to make sense...? *The Journal of general virology* 87(Pt 6):1403-1421.

- Paul WE, Milner JD & Grossman Z (2013) Pathogen-sensing, regulatory T cells, and responsiveness-tuning collectively regulate foreign- and self-antigen mediated T-cell responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 78:265-276.
- Paweletz N (2001) Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(1):72-75.
- Pearce BD, Hobbs MV, McGraw TS & Buchmeier MJ (1994) Cytokine induction during T-cell-mediated clearance of mouse hepatitis virus from neurons in vivo. *Journal of virology* 68(9):5483-5495.
- Peeters B, Pol J, Gielkens A & Moormann R (1993) Envelope glycoprotein gp50 of pseudorabies virus is essential for virus entry but is not required for viral spread in mice. *Journal of virology* 67(1):170-177.
- Peiris JS, Guan Y & Yuen KY (2004) Severe acute respiratory syndrome. *Nature medicine* 10(12 Suppl):S88-97.
- Pekny M & Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological reviews* 94(4):1077-1098.
- Peltier DC, Simms A, Farmer JR & Miller DJ (2010) Human neuronal cells possess functional cytoplasmic and TLR-mediated innate immune pathways influenced by phosphatidylinositol-3 kinase signaling. *J Immunol* 184(12):7010-7021.
- Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK & Pakkenberg B (2008) Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging* 29(11):1754-1762.
- Pender MP, Csurhes PA, Smith C, Beagley L, Hooper KD, Raj M, Coulthard A, Burrows SR & Khanna R (2014) Epstein-Barr virus-specific adoptive immunotherapy for progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 20(11):1541-1544.
- Pereda AE (2014) Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature reviews. Neuroscience* 15(4):250-263.
- Perkins D, Gyure KA, Pereira EF & Aurelian L (2003) Herpes simplex virus type 1-induced encephalitis has an apoptotic component associated with activation of c-Jun N-terminal kinase. *Journal of neurovirology* 9(1):101-111.
- Peterson KE, Hughes S, Dimcheff DE, Wehrly K & Chesebro B (2004) Separate sequences in a murine retroviral envelope protein mediate neuropathogenesis by complementary mechanisms with differing requirements for tumor necrosis factor alpha. *Journal of virology* 78(23):13104-13112.
- Petito CK, Kerza-Kwiatecki AP, Gendelman HE, McCarthy M, Nath A, Podack ER, Shapshak P & Wiley CA (1999) Review: neuronal injury in HIV infection. *Journal of neurovirology* 5(4):327-341.
- Phares TW, DiSano KD, Hinton DR, Hwang M, Zajac AJ, Stohlman SA & Bergmann CC (2013) IL-21 optimizes T cell and humoral responses in the central nervous system during viral encephalitis. *Journal of neuroimmunology* 263(1-2):43-54.

- Phares TW, Stohlman SA, Hwang M, Min B, Hinton DR & Bergmann CC (2012) CD4 T cells promote CD8 T cell immunity at the priming and effector site during viral encephalitis. *Journal of virology* 86(5):2416-2427.
- Pirooznia SK, Dawson VL & Dawson TM (2014) Motor neuron death in ALS: programmed by astrocytes? *Neuron* 81(5):961-963.
- Pogue SL, Preston BT, Stalder J, Bebbington CR & Cardarelli PM (2004) The receptor for type I IFNs is highly expressed on peripheral blood B cells and monocytes and mediates a distinct profile of differentiation and activation of these cells. *J Interferon Cytokine Res* 24(2):131-139.
- Pohlmann S, Gramberg T, Wegele A, Pyrc K, van der Hoek L, Berkhout B & Hofmann H (2006) Interaction between the spike protein of human coronavirus NL63 and its cellular receptor ACE2. *Advances in experimental medicine and biology* 581:281-284.
- Poncet D, Pauleau AL, Szabadkai G, Voza A, Scholz SR, Le Bras M, Briere JJ, Jalil A, Le Moigne R, Brenner C, Hahn G, Wittig I, Schagger H, Lemaire C, Bianchi K, Souquere S, Pierron G, Rustin P, Goldmacher VS, Rizzuto R, Palmieri F & Kroemer G (2006) Cytopathic effects of the cytomegalovirus-encoded apoptosis inhibitory protein vMIA. *The Journal of cell biology* 174(7):985-996.
- Pope M, Rotstein O, Cole E, Sinclair S, Parr R, Cruz B, Fingerote R, Chung S, Gorczynski R, Fung L & et al. (1995) Pattern of disease after murine hepatitis virus strain 3 infection correlates with macrophage activation and not viral replication. *Journal of virology* 69(9):5252-5260.
- Prentice H, Modi JP & Wu JY (2015) Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015:964518.
- Prow NA & Irani DN (2008) The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis. *Journal of neurochemistry* 105(4):1276-1286.
- Pugazhenth S, Nair S, Velmurugan K, Liang Q, Mahalingam R, Cohrs RJ, Nagel MA & Gilden D (2011) Varicella-zoster virus infection of differentiated human neural stem cells. *Journal of virology* 85(13):6678-6686.
- Qian Z, Dominguez SR & Holmes KV (2013) Role of the Spike Glycoprotein of Human Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Virus Entry and Syncytia Formation. *PloS one* 8(10):e76469.
- Qinli Z, Meiqing L, Xia J, Li X, Weili G, Xiuliang J, Junwei J, Hailan Y, Ce Z & Qiao N (2013) Necrostatin-1 inhibits the degeneration of neural cells induced by aluminum exposure. *Restor Neurol Neurosci* 31(5):543-555.
- Quaegebeur A, Lange C & Carmeliet P (2011) The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71(3):406-424.

- Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Muller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JA, Zaki A, Fouchier RA, Thiel V, Drosten C, Rottier PJ, Osterhaus AD, Bosch BJ & Haagmans BL (2013) Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495(7440):251-254.
- Ramadass M & Catz SD (2016) Molecular mechanisms regulating secretory organelles and endosomes in neutrophils and their implications for inflammation. *Immunol Rev* 273(1):249-265.
- Ramakrishna C, Stohlman SA, Atkinson RD, Shlomchik MJ & Bergmann CC (2002) Mechanisms of central nervous system viral persistence: the critical role of antibody and B cells. *J Immunol* 168(3):1204-1211.
- Randall RE & Goodbourn S (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *The Journal of general virology* 89(Pt 1):1-47.
- Randolph GJ, Angeli V & Swartz MA (2005) Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature reviews. Immunology* 5(8):617-628.
- Rangel-Gomez M & Meeter M (2016) Neurotransmitters and Novelty: A Systematic Review. *J Psychopharmacol* 30(1):3-12.
- Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S & White E (1992) The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(16):7742-7746.
- Raulet DH (2006) Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin Immunol* 18(3):145-150.
- Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, Papadimitriou D, Nagy P, Mitsumoto H, Kariya S, Wichterle H, Henderson CE & Przedborski S (2014) Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron* 81(5):1001-1008.
- Regan MR, Huang YH, Kim YS, Dykes-Hoberg MI, Jin L, Watkins AM, Bergles DE & Rothstein JD (2007) Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J Neurosci* 27(25):6607-6619.
- Reinert LS, Harder L, Holm CK, Iversen MB, Horan KA, Dagnaes-Hansen F, Ulhoi BP, Holm TH, Mogensen TH, Owens T, Nyengaard JR, Thomsen AR & Paludan SR (2012) TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. *J Clin Invest* 122(4):1368-1376.
- Rempel JD, Murray SJ, Meisner J & Buchmeier MJ (2004) Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis. *Virology* 318(1):381-392.
- Reusken CB, Raj VS, Koopmans MP & Haagmans BL (2016) Cross host transmission in the emergence of MERS coronavirus. *Current opinion in virology* 16:55-62.

- Ribeiro MP, Custodio JB & Santos AE (2016) Ionotropic glutamate receptor antagonists and cancer therapy: time to think out of the box? *Cancer Chemother Pharmacol* 10.1007/s00280-016-3129-0.
- Rimmele TS & Rosenberg PA (2016) GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem Int* 98:19-28.
- Riski H & Hovi T (1980) Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. *Journal of medical virology* 6(3):259-265.
- Robinson MB & Jackson JG (2016) Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochem Int* 10.1016/j.neuint.2016.03.014.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR & Peterson PK (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17(4):942-964, table of contents.
- Rodrigue-Gervais IG, Labbe K, Dagenais M, Dupaul-Chicoine J, Champagne C, Morizot A, Skeldon A, Brincks EL, Vidal SM, Griffith TS & Saleh M (2014) Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein cIAP2 Protects against Pulmonary Tissue Necrosis during Influenza Virus Infection to Promote Host Survival. *Cell host & microbe* 15(1):23-35.
- Rodriguez DA, Weinlich R, Brown S, Guy C, Fitzgerald P, Dillon CP, Oberst A, Quarato G, Low J, Cripps JG, Chen T & Green DR (2016) Characterization of RIPK3-mediated phosphorylation of the activation loop of MLKL during necroptosis. *Cell death and differentiation* 23(1):76-88.
- Romagnani S (2006) Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 36(11):1357-1366.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX & et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362(6415):59-62.
- Rossi D (2015) Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Prog Neurobiol* 130:86-120.
- Roth-Cross JK, Stokes H, Chang G, Chua MM, Thiel V, Weiss SR, Gorbalenya AE & Siddell SG (2009) Organ-specific attenuation of murine hepatitis virus strain A59 by replacement of catalytic residues in the putative viral cyclic phosphodiesterase ns2. *Journal of virology* 83(8):3743-3753.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP & Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16(3):675-686.
- Rottier PJ (1990) Background paper. Coronavirus M and HE: two peculiar glycoproteins. *Advances in experimental medicine and biology* 276:91-94.
- Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH & Poirier GG (2010) PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature reviews. Cancer* 10(4):293-301.

- Ruch TR & Machamer CE (2011) The hydrophobic domain of infectious bronchitis virus E protein alters the host secretory pathway and is important for release of infectious virus. *Journal of virology* 85(2):675-685.
- Russo MV & McGavern DB (2015) Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury. *Trends in immunology* 36(10):637-650.
- Ryu JR, Hong CJ, Kim JY, Kim EK, Sun W & Yu SW (2016) Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Mol Brain* 9:43.
- Saif LJ (2010) Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26(2):349-364.
- Sakahira H, Enari M & Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662):96-99.
- Salinas S, Bilsland LG, Henaff D, Weston AE, Keriell A, Schiavo G & Kremer EJ (2009) CAR-associated vesicular transport of an adenovirus in motor neuron axons. *PLoS pathogens* 5(5):e1000442.
- Salinas S, Schiavo G & Kremer EJ (2010) A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nature reviews. Microbiology* 8(9):645-655.
- Samuel MA, Wang H, Siddharthan V, Morrey JD & Diamond MS (2007) Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(43):17140-17145.
- Samuel MA, Whitby K, Keller BC, Marri A, Barchet W, Williams BR, Silverman RH, Gale M, Jr. & Diamond MS (2006) PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *Journal of virology* 80(14):7009-7019.
- Sandoval KE & Witt KA (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of disease* 32(2):200-219.
- Sansonetti PJ, Phalipon A, Arondel J, Thirumalai K, Banerjee S, Akira S, Takeda K & Zychlinsky A (2000) Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for Shigella flexneri-induced inflammation. *Immunity* 12(5):581-590.
- Sasaki Y, Kakisaka M, Chutiwitoonchai N, Tajima S, Hikono H, Saito T & Aida Y (2014) Identification of a novel multiple kinase inhibitor with potent antiviral activity against influenza virus by reducing viral polymerase activity. *Biochemical and biophysical research communications* 450(1):49-54.
- Sato S & Kiyono H (2012) The mucosal immune system of the respiratory tract. *Current opinion in virology* 2(3):225-232.
- Sato T, Takeyama N, Katsumata A, Tuchiya K, Kodama T & Kusanagi K (2011) Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo. *Virus genes* 43(1):72-78.

- Sattler R & Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl)* 78(1):3-13.
- Saveljeva S, Mc Laughlin SL, Vandenabeele P, Samali A & Bertrand MJ (2015) Endoplasmic reticulum stress induces ligand-independent TNFR1-mediated necroptosis in L929 cells. *Cell death & disease* 6:e1587.
- Sawicki SG, Sawicki DL & Siddell SG (2007) A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of virology* 81(1):20-29.
- Schneider WM, Chevillotte MD & Rice CM (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32:513-545.
- Schoenborn JR & Wilson CB (2007) Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96:41-101.
- Schonberger K, Ludwig MS, Wildner M & Weissbrich B (2013) Epidemiology of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in Germany from 2003 to 2009: a risk estimation. *PloS one* 8(7):e68909.
- Schondorf DC, Aureli M, McAllister FE, Hindley CJ, Mayer F, Schmid B, Sardi SP, Valsecchi M, Hoffmann S, Schwarz LK, Hedrich U, Berg D, Shihabuddin LS, Hu J, Pruszek J, Gygi SP, Sonnino S, Gasser T & Deleidi M (2014) iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nature communications* 5:4028.
- Schoneboom BA, Catlin KM, Marty AM & Grieder FB (2000) Inflammation is a component of neurodegeneration in response to Venezuelan equine encephalitis virus infection in mice. *Journal of neuroimmunology* 109(2):132-146.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T & Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* 75(2):163-189.
- Schwartz T, Fu L & Lavi E (2002) Differential induction of apoptosis in demyelinating and nondemyelinating infection by mouse hepatitis virus. *Journal of neurovirology* 8(5):392-399.
- Schwegmann-Wessels C & Herrler G (2006) Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconj J* 23(1-2):51-58.
- Seol DW, Li J, Seol MH, Park SY, Talanian RV & Billiar TR (2001) Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer research* 61(3):1138-1143.
- Sharif-Askari E, Nakhaei P, Olieri S, Tumilasci V, Hernandez E, Wilkinson P, Lin R, Bell J & Hiscott J (2007) Bax-dependent mitochondrial membrane permeabilization enhances IRF3-mediated innate immune response during VSV infection. *Virology* 365(1):20-33.
- Shayakhmetov DM (2010) Virus infection recognition and early innate responses to non-enveloped viral vectors. *Viruses* 2(1):244-261.

- Shieh CK, Lee HJ, Yokomori K, La Monica N, Makino S & Lai MM (1989) Identification of a new transcriptional initiation site and the corresponding functional gene 2b in the murine coronavirus RNA genome. *Journal of virology* 63(9):3729-3736.
- Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y & Sato K (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 34(6):2231-2243.
- Shrestha R, Millington O, Brewer J & Bushell T (2013) Is central nervous system an immune-privileged site? *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 11(41):102-107.
- Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD & Spear PG (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99(1):13-22.
- Silverman RH (2007) Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *Journal of virology* 81(23):12720-12729.
- Simard M & Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129(4):877-896.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP & Welsh MJ (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417(6888):552-555.
- Siu KL, Chan CP, Kok KH, Woo PC & Jin DY (2014a) Comparative analysis of the activation of unfolded protein response by spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus HKU1. *Cell Biosci* 4(1):3.
- Siu KL, Chan CP, Kok KH, Woo PCY & Jin DY (2014b) Comparative analysis of the activation of unfolded protein response by spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus HKU1. *Cell Biosci* 4.
- Siu YL, Teoh KT, Lo J, Chan CM, Kien F, Escriou N, Tsao SW, Nicholls JM, Altmeyer R, Peiris JS, Bruzzone R & Nal B (2008) The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *Journal of virology* 82(22):11318-11330.
- Slauson DO & Finn JP (1972) Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc* 160(5):729-734.
- Smith EC, Blanc H, Surdel MC, Vignuzzi M & Denison MR (2013a) Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS pathogens* 9(8):e1003565.
- Smith EC & Denison MR (2013b) Coronaviruses as DNA wannabes: a new model for the regulation of RNA virus replication fidelity. *PLoS pathogens* 9(12):e1003760.
- Smith MK, Tusell S, Travanty EA, Berkhout B, van der Hoek L & Holmes KV (2006) Human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a receptor for human respiratory coronavirus NL63. *Advances in experimental medicine and biology* 581:285-288.

- Sofroniew MV & Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119(1):7-35.
- Son KN & Lipton HL (2015) Inhibition of Theiler's virus-induced apoptosis in infected murine macrophages results in necroptosis. *Virus research* 195:177-182.
- Sorgeloos F, Kreit M, Hermant P, Lardinois C & Michiels T (2013) Antiviral type I and type III interferon responses in the central nervous system. *Viruses* 5(3):834-857.
- Soto C (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience* 4(1):49-60.
- Spencer KA, Dee M, Britton P & Hiscox JA (2008) Role of phosphorylation clusters in the biology of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. *Virology* 370(2):373-381.
- Sridharan H & Upton JW (2014) Programmed necrosis in microbial pathogenesis. *Trends in microbiology* 10.1016/j.tim.2014.01.005.
- St-Jean JR, Desforges M, Almazan F, Jacomy H, Enjuanes L & Talbot PJ (2006a) Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *Journal of virology* 80(7):3670-3674.
- St-Jean JR, Desforges M & Talbot PJ (2006b) Genetic evolution of human coronavirus OC43 in neural cell culture. *Advances in experimental medicine and biology* 581:499-502.
- St-Jean JR, Jacomy H, Desforges M, Vabret A, Freymuth F & Talbot PJ (2004) Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion. *Journal of virology* 78(16):8824-8834.
- Stanic D, Paratcha G, Ledda F, Herzog H, Kopin AS & Hokfelt T (2008) Peptidergic influences on proliferation, migration, and placement of neural progenitors in the adult mouse forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(9):3610-3615.
- Steel CD, Hahto SM & Ciavarra RP (2009) Peripheral dendritic cells are essential for both the innate and adaptive antiviral immune responses in the central nervous system. *Virology* 387(1):117-126.
- Stohlman SA & Hinton DR (2001) Viral induced demyelination. *Brain Pathol* 11(1):92-106.
- Stone KD, Prussin C & Metcalfe DD (2010) IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S73-80.
- Strazza M, Pirrone V, Wigdahl B & Nonnemacher MR (2011) Breaking down the barrier: the effects of HIV-1 on the blood-brain barrier. *Brain Res* 1399:96-115.
- Su J, Wang G, Barrett JW, Irvine TS, Gao X & McFadden G (2006) Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria. *Journal of virology* 80(3):1140-1151.

- Su JH, Deng G & Cotman CW (1997) Bax protein expression is increased in Alzheimer's brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression, and brain pathology. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56(1):86-93.
- Suh HS, Brosnan CF & Lee SC (2009) Toll-like receptors in CNS viral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 336:63-81.
- Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X & Wang X (2012a) Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 148(1-2):213-227.
- Sun L, Xing Y, Chen X, Zheng Y, Yang Y, Nichols DB, Clementz MA, Banach BS, Li K, Baker SC & Chen Z (2012b) Coronavirus papain-like proteases negatively regulate antiviral innate immune response through disruption of STING-mediated signaling. *PloS one* 7(2):e30802.
- Sun N, Grzybicki D, Castro RF, Murphy S & Perlman S (1995) Activation of astrocytes in the spinal cord of mice chronically infected with a neurotropic coronavirus. *Virology* 213(2):482-493.
- Sun X, Yin J, Starovasnik MA, Fairbrother WJ & Dixit VM (2002) Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *The Journal of biological chemistry* 277(11):9505-9511.
- Supekar VM, Bruckmann C, Ingallinella P, Bianchi E, Pessi A & Carfi A (2004) Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(52):17958-17963.
- Surjit M, Kumar R, Mishra RN, Reddy MK, Chow VT & Lal SK (2005) The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *Journal of virology* 79(17):11476-11486.
- Surya W, Li Y, Verdia-Baguena C, Aguilera VM & Torres J (2015) MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. *Virus research* 201:61-66.
- Sussman MA, Shubin RA, Kyuwa S & Stohlman SA (1989) T-cell-mediated clearance of mouse hepatitis virus strain JHM from the central nervous system. *Journal of virology* 63(7):3051-3056.
- Swanson PA, 2nd & McGavern DB (2015) Viral diseases of the central nervous system. *Current opinion in virology* 11:44-54.
- Swiss VA, Nguyen T, Dugas J, Ibrahim A, Barres B, Androulakis IP & Casaccia P (2011) Identification of a gene regulatory network necessary for the initiation of oligodendrocyte differentiation. *PloS one* 6(4):e18088.
- Szczupak L (2016) Functional contributions of electrical synapses in sensory and motor networks. *Curr Opin Neurobiol* 41:99-105.

- Tabor-Godwin JM, Ruller CM, Bagalso N, An N, Pagarigan RR, Harkins S, Gilbert PE, Kiosses WB, Gude NA, Cornell CT, Doran KS, Sussman MA, Whitton JL & Feuer R (2010) A novel population of myeloid cells responding to coxsackievirus infection assists in the dissemination of virus within the neonatal CNS. *J Neurosci* 30(25):8676-8691.
- Tahara SM, Dietlin TA, Bergmann CC, Nelson GW, Kyuwa S, Anthony RP & Stohlman SA (1994) Coronavirus translational regulation: leader affects mRNA efficiency. *Virology* 202(2):621-630.
- Tait SW, Oberst A, Quarato G, Milasta S, Haller M, Wang R, Karvela M, Ichim G, Yatim N, Albert ML, Kidd G, Wakefield R, Frase S, Krautwald S, Linkermann A & Green DR (2013) Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. *Cell reports* 5(4):878-885.
- Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, DuHadaway JB, Goossens V, Roelandt R, Van Hauwermeiren F, Libert C, Declercq W, Callewaert N, Prendergast GC, Degterev A, Yuan J & Vandenabeele P (2012) Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell death & disease* 3:e437.
- Takano T, Xu C, Funahashi Y, Namba T & Kaibuchi K (2015) Neuronal polarization. *Development* 142(12):2088-2093.
- Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C, Antel JP & Ouellet F (1996) Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 39(2):233-240.
- Templeton SP, Kim TS, O'Malley K & Perlman S (2008) Maturation and localization of macrophages and microglia during infection with a neurotropic murine coronavirus. *Brain Pathol* 18(1):40-51.
- ten Broeke T, Wubbolts R & Stoorvogel W (2013) MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(12):a016873.
- Teoh KT, Siu YL, Chan WL, Schluter MA, Liu CJ, Peiris JS, Bruzzone R, Margolis B & Nal B (2010) The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Molecular biology of the cell* 21(22):3838-3852.
- Thapa RJ, Nogusa S, Chen P, Maki JL, Lerro A, Andrade M, Rall GF, Degterev A & Balachandran S (2013) Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(33):E3109-3118.
- Thiele CJ (1998) Neuroblastoma cell lines. *Human Cell culture*, Masters J (Édit.) Kluwer Academic Publishers, Lancaster, UK Vol 1. p 21-53.
- Thornbrough JM, Jha BK, Yount B, Goldstein SA, Li Y, Elliott R, Sims AC, Baric RS, Silverman RH & Weiss SR (2016) Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus NS4b Protein Inhibits Host RNase L Activation. *mBio* 7(2):e00258.

- Totura AL & Baric RS (2012) SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Current opinion in virology* 2(3):264-275.
- Tritsch NX, Granger AJ & Sabatini BL (2016) Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nature reviews. Neuroscience* 17(3):139-145.
- Truong P, Heydari S, Garidou L & McGavern DB (2009) Persistent viral infection elevates central nervous system MHC class I through chronic production of interferons. *J Immunol* 183(6):3895-3905.
- Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 9(11):799-809.
- Tynell J, Westenius V, Ronkko E, Munster VJ, Melen K, Osterlund P & Julkunen I (2016) Middle East respiratory syndrome coronavirus shows poor replication but significant induction of antiviral responses in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *The Journal of general virology* 97(2):344-355.
- Ujike M & Taguchi F (2015) Incorporation of Spike and Membrane Glycoproteins into Coronavirus Virions. *Viruses* 7(4):1700-1725.
- Upton JW & Chan FK (2014) Staying Alive: Cell Death in Antiviral Immunity. *Molecular cell* 54(2):273-280.
- Upton JW, Kaiser WJ & Mocarski ES (2010) Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell host & microbe* 7(4):302-313.
- Upton JW, Kaiser WJ & Mocarski ES (2012) DAI/ZBP1/DLM-1 Complexes with RIP3 to Mediate Virus-Induced Programmed Necrosis that Is Targeted by Murine Cytomegalovirus vIRA. *Cell host & microbe* 11(3):290-297.
- Uze G, Schreiber G, Piehler J & Pellegrini S (2007) The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol* 316:71-95.
- Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J & Freymuth F (2009) [Human coronaviruses]. *Pathologie-biologie* 57(2):149-160.
- van den Pol AN, Ding S & Robek MD (2014) Long-distance interferon signaling within the brain blocks virus spread. *Journal of virology* 88(7):3695-3704.
- van der Meer Y, Snijder EJ, Dobbe JC, Schleich S, Denison MR, Spaan WJ & Locker JK (1999) Localization of mouse hepatitis virus nonstructural proteins and RNA synthesis indicates a role for late endosomes in viral replication. *Journal of virology* 73(9):7641-7657.
- Van Hamme E, Dewerchin HL, Cornelissen E, Verhasselt B & Nauwynck HJ (2008) Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *The Journal of general virology* 89(Pt 9):2147-2156.
- van Marle G, Antony J, Ostermann H, Dunham C, Hunt T, Halliday W, Maingat F, Urbanowski MD, Hobman T, Peeling J & Power C (2007) West Nile virus-induced neuroinflammation:

- glial infection and capsid protein-mediated neurovirulence. *Journal of virology* 81(20):10933-10949.
- van Riel D, Verdijk R & Kuiken T (2015) The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J Pathol* 235(2):277-287.
- Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N & Vandenabeele P (2013) Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* 61(2):117-129.
- Vanden Berghe T, Hassannia B & Vandenabeele P (2016) An outline of necrosome triggers. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73(11-12):2137-2152.
- Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H & Vandenabeele P (2014) Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(2):135-147.
- Vandenabeele P, Grootjans S, Callewaert N & Takahashi N (2013) Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models. *Cell death and differentiation* 20(2):185-187.
- Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Bogaert P, Laukens B, Zobel K, Deshayes K, Vucic D, Fulda S, Vandenabeele P & Bertrand MJ (2011a) cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell death and differentiation* 18(4):656-665.
- Vanlangenakker N, Vanden Berghe T & Vandenabeele P (2011b) Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell death and differentiation* 10.1038/cdd.2011.164.
- Vanlangenakker N, Vanden Berghe T & Vandenabeele P (2012) Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell death and differentiation* 19(1):75-86.
- Vaseva AV & Moll UM (2009) The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et biophysica acta* 1787(5):414-420.
- Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S & Nerurkar VR (2010) Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* 397(1):130-138.
- Versteeg GA, van de Nes PS, Bredenbeek PJ & Spaan WJ (2007) The coronavirus spike protein induces endoplasmic reticulum stress and upregulation of intracellular chemokine mRNA concentrations. *Journal of virology* 81(20):10981-10990.
- Vilcek J (2003) Novel interferons. *Nature immunology* 4(1):8-9.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T & Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nature immunology* 9(5):503-510.
- Vlasak R, Luytjes W, Spaan W & Palese P (1988) Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(12):4526-4529.

- Wajant H (2003) Death receptors. *Essays Biochem* 39:53-71.
- Wajant H, Pfizenmaier K & Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation* 10(1):45-65.
- Wake H, Lee PR & Fields RD (2011a) Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science* 333(6049):1647-1651.
- Wake H, Moorhouse AJ & Nabekura J (2011b) Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron Glia Biol* 7(1):47-53.
- Walker FO (2007) Huntington's Disease. *Semin Neurol* 27(2):143-150.
- Walls AC, Tortorici MA, Bosch BJ, Frenz B, Rottier PJ, DiMaio F, Rey FA & Velesler D (2016a) Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature* 10.1038/nature16988.
- Walls AC, Tortorici MA, Frenz B, Snijder J, Li W, Rey FA, DiMaio F, Bosch BJ & Velesler D (2016b) Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol* 23(10):899-905.
- Walther DM & Rapaport D (2009) Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1793(1):42-51.
- Wang G, Deering C, Macke M, Shao J, Burns R, Blau DM, Holmes KV, Davidson BL, Perlman S & McCray PB, Jr. (2000) Human coronavirus 229E infects polarized airway epithelia from the apical surface. *Journal of virology* 74(19):9234-9239.
- Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, Wang FS & Wang X (2014a) Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular cell* 54(1):133-146.
- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM & Lenardo MJ (2001) Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(24):13884-13888.
- Wang JX, Fukunaga-Kalabis M & Herlyn M (2016) Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *J Cell Commun Signal* 10.1007/s12079-016-0349-3.
- Wang L, Du F & Wang X (2008) TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133(4):693-703.
- Wang WL, Hong JR, Lin GH, Liu W, Gong HY, Lu MW, Lin CC & Wu JL (2011) Stage-specific expression of TNFalpha regulates bad/bid-mediated apoptosis and RIP1/ROS-mediated secondary necrosis in Birnavirus-infected fish cells. *PloS one* 6(2):e16740.
- Wang X, Li Y, Liu S, Yu X, Li L, Shi C, He W, Li J, Xu L, Hu Z, Yu L, Yang Z, Chen Q, Ge L, Zhang Z, Zhou B, Jiang X, Chen S & He S (2014b) Direct activation of RIP3/MLKL-dependent necrosis by herpes simplex virus 1 (HSV-1) protein ICP6 triggers host antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(43):15438-15443.

- Wang Y, Dawson VL & Dawson TM (2009a) Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Experimental neurology* 218(2):193-202.
- Wang Y, Kim NS, Li X, Greer PA, Koehler RC, Dawson VL & Dawson TM (2009b) Calpain activation is not required for AIF translocation in PARP-1-dependent cell death (parthanatos). *Journal of neurochemistry* 110(2):687-696.
- Wathelet MG, Orr M, Frieman MB & Baric RS (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *Journal of virology* 81(21):11620-11633.
- Weber F, Goldmann C, Kramer M, Kaup FJ, Pickhardt M, Young P, Petry H, Weber T & Luke W (2001) Cellular and humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Annals of neurology* 49(5):636-642.
- Weber F & Haller O (2007) Viral suppression of the interferon system. *Biochimie* 89(6-7):836-842.
- Wege H, Schluesener H, Meyermann R, Barac-Latas V, Suchanek G & Lassmann H (1998) Coronavirus infection and demyelination. Development of inflammatory lesions in Lewis rats. *Advances in experimental medicine and biology* 440:437-444.
- Wentworth DE & Holmes KV (2007) Coronavirus binding and entry. *Coronaviruses: Molecular and cellular biology* Thiel V (Édit.) Caister Academic Press, Norfolk, UK. p pp.3-32.
- Wentworth DE, Tresnan DB, Turner BC, Lerman IR, Bullis B, Hemmila EM, Levis R, Shapiro LH & Holmes KV (2005) Cells of human aminopeptidase N (CD13) transgenic mice are infected by human coronavirus-229E in vitro, but not in vivo. *Virology* 335(2):185-197.
- Westphal D, Ledgerwood EC, Hibma MH, Fleming SB, Whelan EM & Mercer AA (2007) A novel Bcl-2-like inhibitor of apoptosis is encoded by the parapoxvirus ORF virus. *Journal of virology* 81(13):7178-7188.
- Williams A, Peh CA & Elliott T (2002) The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* 59(1):3-17.
- Williams BL & Lipkin WI (2006) Endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration in rats neonatally infected with borna disease virus. *Journal of virology* 80(17):8613-8626.
- Williams MA & Bevan MJ (2007) Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25:171-192.
- Williams RK, Jiang GS & Holmes KV (1991) Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(13):5533-5536.
- Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS & Yuen KY (2005) Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of virology* 79(2):884-895.

- Woo PC, Lau SK, Huang Y & Yuen KY (2009) Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)* 234(10):1117-1127.
- Woo PC, Lau SK, Yip CC, Huang Y, Tsoi HW, Chan KH & Yuen KY (2006a) Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. *Journal of virology* 80(14):7136-7145.
- Woo PC, Lau SK & Yuen KY (2006b) Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: zoonotic origins of severe respiratory viral infections. *Curr Opin Infect Dis* 19(5):401-407.
- Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC & Newcomb EW (1998) Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* 17(9):1069-1078.
- Wright A, Reiley WW, Chang M, Jin W, Lee AJ, Zhang M & Sun SC (2007) Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD. *Dev Cell* 13(5):705-716.
- Wu GF & Perlman S (1999) Macrophage infiltration, but not apoptosis, is correlated with immune-mediated demyelination following murine infection with a neurotropic coronavirus. *Journal of virology* 73(10):8771-8780.
- Wu JR, Wang J, Zhou SK, Yang L, Yin JL, Cao JP & Cheng YB (2015) Necrostatin-1 protection of dopaminergic neurons. *Neural Regen Res* 10(7):1120-1124.
- Xiao H, Xu LH, Yamada Y & Liu DX (2008) Coronavirus spike protein inhibits host cell translation by interaction with eIF3f. *PloS one* 3(1):e1494.
- Xu C, Liu J, Chen L, Liang S, Fujii N, Tamamura H & Xiong H (2011) HIV-1 gp120 enhances outward potassium current via CXCR4 and cAMP-dependent protein kinase A signaling in cultured rat microglia. *Glia* 59(6):997-1007.
- Xu J & Ikezu T (2009) The comorbidity of HIV-associated neurocognitive disorders and Alzheimer's disease: a foreseeable medical challenge in post-HAART era. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 4(2):200-212.
- Xu W, Jing L, Wang Q, Lin CC, Chen X, Diao J, Liu Y & Sun X (2015) Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. *Oncotarget*.
- Xu X, Chua CC, Kong J, Kostrzewa RM, Kumaraguru U, Hamdy RC & Chua BH (2007) Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. *Journal of neurochemistry* 103(5):2004-2014.
- Xu Y, Liu Y, Lou Z, Qin L, Li X, Bai Z, Pang H, Tien P, Gao GF & Rao Z (2004) Structural basis for coronavirus-mediated membrane fusion. Crystal structure of mouse hepatitis virus spike protein fusion core. *The Journal of biological chemistry* 279(29):30514-30522.
- Yakimovich A, Gumpert H, Burckhardt CJ, Lutschg VA, Jurgeit A, Sbalzarini IF & Greber UF (2012) Cell-free transmission of human adenovirus by passive mass transfer in cell culture simulated in a computer model. *Journal of virology* 86(18):10123-10137.

- Yamada Y & Liu DX (2009a) Proteolytic activation of the spike protein at a novel RRRR/S motif is implicated in furin-dependent entry, syncytium formation, and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells. *Journal of virology* 83(17):8744-8758.
- Yamada Y, Liu XB, Fang SG, Tay FP & Liu DX (2009b) Acquisition of cell-cell fusion activity by amino acid substitutions in spike protein determines the infectivity of a coronavirus in cultured cells. *PloS one* 4(7):e6130.
- Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T, Urano Y & Noguchi N (2011) 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *The Journal of biological chemistry* 286(28):24666-24673.
- Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML & Du C (2003) Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes & development* 17(12):1487-1496.
- Ye Y, Hauns K, Langland JO, Jacobs BL & Hogue BG (2007) Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *Journal of virology* 81(6):2554-2563.
- Yeh EA, Collins A, Cohen ME, Duffner PK & Faden H (2004) Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* 113(1 Pt 1):e73-76.
- Yin B, Xu Y, Wei RL, He F, Luo BY & Wang JY (2015) Inhibition of receptor-interacting protein 3 upregulation and nuclear translocation involved in Necrostatin-1 protection against hippocampal neuronal programmed necrosis induced by ischemia/reperfusion injury. *Brain Res* 1609:63-71.
- Yin XM (2006) Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369:7-19.
- Yoo D & Deregts D (2001) A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(2):297-302.
- Yoon S, Bogdanov K, Kovalenko A & Wallach D (2015) Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell death and differentiation* 10.1038/cdd.2015.92.
- Yoshikawa T, Hill TE, Yoshikawa N, Popov VL, Galindo CL, Garner HR, Peters CJ & Tseng CT (2010) Dynamic innate immune responses of human bronchial epithelial cells to severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *PloS one* 5(1):e8729.
- Young VA & Rall GF (2009) Making it to the synapse: measles virus spread in and among neurons. *Curr Top Microbiol Immunol* 330:3-30.
- Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ & Simon HU (2008) Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature medicine* 14(9):949-953.

- Yu X & He S (2016) The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways. *Virology journal* 13(1):77.
- Yuan J & Kroemer G (2010) Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & development* 24(23):2592-2602.
- Yuan L, Chen Z, Song S, Wang S, Tian C, Xing G, Chen X, Xiao ZX, He F & Zhang L (2015) p53 degradation by a coronavirus papain-like protease suppresses type I interferon signaling. *The Journal of biological chemistry* 290(5):3172-3182.
- Yura Y, Kusaka J, Tsujimoto H, Yoshioka Y, Yoshida H & Sato M (1997) Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on the replication of herpes simplex virus and the phosphorylation of viral proteins. *Intervirology* 40(1):7-14.
- Zambrano A, Solis L, Salvadores N, Cortes M, Lerchundi R & Otth C (2008) Neuronal cytoskeletal dynamic modification and neurodegeneration induced by infection with herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis* 14(3):259-269.
- Zamorano S, Rojas-Rivera D, Lisbona F, Parra V, Court FA, Villegas R, Cheng EH, Korsmeyer SJ, Lavandero S & Hetz C (2012) A BAX/BAK and cyclophilin D-independent intrinsic apoptosis pathway. *PloS one* 7(6):e37782.
- Zelenay S, Keller AM, Whitney PG, Schraml BU, Deddouche S, Rogers NC, Schulz O, Sancho D & Reis e Sousa C (2012) The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J Clin Invest* 122(5):1615-1627.
- Zhang J, Yang Y, He W & Sun L (2016a) Necrosome core machinery: MLKL. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 10.1007/s00018-016-2190-5.
- Zhang Y, Garcia-Ibanez L & Toellner KM (2016b) Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev* 270(1):8-19.
- Zhang Y, Li J, Xiao Y, Zhang J, Wang Y, Chen L, Paranhos-Baccala G, Ren L & Wang J (2014) Genotype shift in human coronavirus OC43 and emergence of a novel genotype by natural recombination. *The Journal of infection* 10.1016/j.jinf.2014.12.005.
- Zhang Y, Wang M, Li H, Zhang H, Shi Y, Wei F, Liu D, Liu K & Chen D (2012) Accumulation of nuclear and mitochondrial DNA damage in the frontal cortex cells of patients with HIV-associated neurocognitive disorders. *Brain Res* 1458:1-11.
- Zhang YY & Liu H (2013) Connections Between Various Trigger Factors and the RIP1/ RIP3 Signaling Pathway Involved in Necroptosis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 14(12):7069-7074.
- Zhao H, Jaffer T, Eguchi S, Wang Z, Linkermann A & Ma D (2015) Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell death & disease* 6:e1975.
- Zhao L, He F, Liu H, Zhu Y, Tian W, Gao P, He H, Yue W, Lei X, Ni B, Wang X, Jin H, Hao X, Lin J & Chen Q (2012a) Natural diterpenoid compound elevates expression of Bim

- protein, which interacts with antiapoptotic protein Bcl-2, converting it to proapoptotic Bax-like molecule. *The Journal of biological chemistry* 287(2):1054-1065.
- Zhao L, Jha BK, Wu A, Elliott R, Ziebuhr J, Gorbalenya AE, Silverman RH & Weiss SR (2012b) Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell host & microbe* 11(6):607-616.
- Zhao XM, Chen Z, Zhao JB, Zhang PP, Pu YF, Jiang SH, Hou JJ, Cui YM, Jia XL & Zhang SQ (2016) Hsp90 modulates the stability of MLKL and is required for TNF-induced necroptosis. *Cell death & disease* 7:e2089.
- Zheng JH, Viacava Follis A, Kriwacki RW & Moldoveanu T (2015) Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis. *The FEBS journal* 10.1111/febs.13527.
- Zhong Y, Liao Y, Fang S, Tam JP & Liu DX (2012) Up-regulation of mcl-1 and bak by coronavirus infection of human, avian and animal cells modulates apoptosis and viral replication. *PloS one* 7(1):e30191.
- Zhou J, Chu H, Chan JF & Yuen KY (2015) Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: virus-host cell interactions and implications on pathogenesis. *Virology journal* 12(1):218.
- Zhou J, Chu H, Li C, Wong BH, Cheng ZS, Poon VK, Sun T, Lau CC, Wong KK, Chan JY, Chan JF, To KK, Chan KH, Zheng BJ & Yuen KY (2014a) Active replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines in human macrophages: implications for pathogenesis. *J Infect Dis* 209(9):1331-1342.
- Zhou W & Yuan J (2014b) Necroptosis in health and diseases. *Seminars in cell & developmental biology* 35:14-23.
- Zhou Y, Ye L, Wan Q, Zhou L, Wang X, Li J, Hu S, Zhou D & Ho W (2009) Activation of Toll-like receptors inhibits herpes simplex virus-1 infection of human neuronal cells. *J Neurosci Res* 87(13):2916-2925.
- Zhu L, Mou C, Yang X, Lin J & Yang Q (2016) Mitophagy in TGEV infection counteracts oxidative stress and apoptosis. *Oncotarget* 7(19):27122-27141.
- Zhu Q, Song X, Zhou J, Wang Y, Xia J, Qian W, Zhu J, Gao R, Wang J & Xiao H (2015) Target of HIV-1 Envelope Glycoprotein gp120-Induced Hippocampal Neuron Damage: Role of Voltage-Gated K(+) Channel Kv2.1. *Viral Immunol* 28(9):495-503.
- Zhu S, Zhang Y, Bai G & Li H (2011) Necrostatin-1 ameliorates symptoms in R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Cell death & disease* 2:e115.
- Ziebuhr J, Snijder EJ & Gorbalenya AE (2000) Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *The Journal of general virology* 81(Pt 4):853-879.

- Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J & Thompson CB (2003) Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of cell biology* 162(1):59-69.
- Zuccato C, Valenza M & Cattaneo E (2010) Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiological reviews* 90(3):905-981.
- Zuniga S, Cruz JL, Sola I, Mateos-Gomez PA, Palacio L & Enjuanes L (2010) Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *Journal of virology* 84(4):2169-2175.
- Zuo J, Stohlman SA, Hoskin JB, Hinton DR, Atkinson R & Bergmann CC (2006) Mouse hepatitis virus pathogenesis in the central nervous system is independent of IL-15 and natural killer cells. *Virology* 350(1):206-215.