

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Institut Armand Frappier

Coronavirus humain OC43, neurovirulence et neuropropagation : Importance de sa protéine d'enveloppe

Par

Guillaume Dubois

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Ian Gaël Rodrigue-Gervais INRS – Institut Armand Frappier
Examineur externe	Christophe Préhaud Unité de Neuro-immunologie virale Institut Pasteur de Paris
Directeur de recherche	Pierre Talbot INRS – Institut Armand Frappier
Co-directeur de recherche	Marc Desforges INRS – Institut Armand Frappier

"Men of science have made abundant mistakes of every kind; their knowledge has improved only because of their gradual abandonment of ancient errors, poor approximations, and premature conclusions."

George Sarton

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Pierre J. Talbot, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire en Septembre 2014 pour effectuer en premier lieu une thèse, et pour m'avoir accordé une seconde chance lorsque j'ai choisi, confronté à la réalité de cette position et de mes aspirations, de renoncer après plus d'un an à ce projet. Merci de m'avoir accueilli une seconde fois pour une maîtrise, pendant laquelle j'ai énormément appris.

Je remercie également mon co-directeur de recherche, Marc Desforges, pour son soutiens lors du passage difficile du doctorat à la maîtrise, période pendant laquelle il m'a conseillé et soutenu. Merci également pour tout le temps consacré à mon encadrement et ma formation pendant mon séjour dans ce laboratoire qui ont contribué à faire de moi un scientifique plus critique. Je ne pourrais pas oublier tout les autres membres du laboratoire qui sont depuis devenus pour certains de vrais amis : Mathieu MP, Alain LC, Mathieu D, Jenny S et Julie G pour leur aide et soutiens durant ces trois dernières années. J'ai mis un certains temps à m'adapter à l'ambiance particulière de ce laboratoire, mais je peux maintenant fièrement dire que vous êtes une belle équipe de dégénérés.

J'aimerais remercier tout les membres du Comité Socio-Culturel de l'AGEIAF avec qui j'ai partagé d'excellents moments pendant ces trois ans et à qui je fais confiance pour continuer de faire vivre cet institut, ainsi que toutes les autres personnes que j'ai pu rencontrer et qui ont fait de cette expérience au Québec une aventure extraordinaire. Pour n'en citer que quelques-uns : Alex C, Fabien J, Aude Z, Mathieu B, Cécile A, Sarah B, Vincent H, Guillaume R, Morgane P, Kevin O, Krysten LL, Karine C, et tant d'autres. Je me dois également de remercier mes trois Montpellierains que j'ai suivi ici, Aurélie L, Alain L et Sosthène U pour leur soutiens et pour tout le temps partagé avec eux ici.

Il ne fait aucun doute que je n'aurais pas entamé et encore moins fini cette aventure sans le support de mes parents et de ma famille de l'autre côté de l'océan. Enfin je ne peux oublier celle qui me supporte au quotidien depuis plus d'un an maintenant, Laurie Pinel. Merci pour tout.

RÉSUMÉ

Les coronavirus humain sont des virus respiratoires opportunistes infectant les voies respiratoires supérieures, et la souche OC43 (HCoV-OC43) est capable d'atteindre le système nerveux central (SNC), infectant préférentiellement les neurones, et provoquant des maladies neurologiques chez la souris. La protéine d'enveloppe (E) des coronavirus est reconnue comme un important facteur de virulence, assurant de multiples rôles durant l'infection, comme la morphogénèse, l'assemblage, la production de particules infectieuses ainsi que la pathogénèse. Ces rôles ont été associés à la présence d'un domaine transmembranaire formant des canaux ioniques, ainsi qu'à un motif d'interaction protéique. Cependant ces domaines n'ont jamais été étudiés en contexte d'infection du SNC, ce qui est l'objectif de cette étude. A l'aide de virus recombinants, nous avons démontré qu'une protéine E est un facteur essentiel pour une production et une propagation virale efficace en cellules épithéliales, neuronales, ainsi que dans le SNC de souris, et qu'elle est essentielle pour la neuropathologie. En modifiant des acides aminés aux positions importantes du domaine transmembranaire et du motif d'interaction protéique nous avons démontré que ces domaines modulent la production virale lors de l'infection, ainsi que le développement de la neuropathologie, représentant donc une cible thérapeutique d'intérêt pour la prévention de maladies neurologiques.

Mots-clés : HCoV-OC43, Coronavirus, Protéine d'enveloppe, Domaine transmembranaire, PBM, Production virale, Pathogénèse

ABSTRACT

Human coronaviruses are opportunistic respiratory viruses infecting the upper respiratory tract, and the OC43 strain (HCoV-OC43) is capable of invading the central nervous system (CNS), preferentially infecting neurons, and causing neurological diseases in mice. Coronavirus envelope protein (E) is recognized as an important virulence factor, ensuring multiple roles during infection, such as morphogenesis, assembly, infectious particle production and pathogenesis. These roles have been associated to the presence of a transmembrane domain that can form ion channels, as well as a protein-protein interaction motif. However, these domains have never been studied in the context of CNS infection, which is this study objective. Using recombinant viruses, we have demonstrated that the E protein is an essential factor for efficient viral production and propagation in epithelial cells, neurons, as well as in the mouse CNS, and that it is essential for development of neurological disease. By modifying amino acids at key positions of the transmembrane domain and the protein interaction motif, we have demonstrated that these domains modulate virus production during infection, as well as the development of neuropathology, thus representing a therapeutic target of interest for the prevention of neurological diseases.

Keywords : HCoV-OC43, Coronavirus, E protein, Transmembrane domain, PDZ binding motif, Virus production, Pathogenesis

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	V
RESUME.....	VII
ABSTRACT.....	IX
TABLE DES MATIERES	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES ABREVIATIONS	XVII
1 LES CORONAVIRUS, DES VIRUS RESPIRATOIRES PRESENTS AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	1
1.1 LE SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE	1
1.2 LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	2
1.2.1 Structure et organisation	2
1.2.2 Immunité du SNC	11
1.3 VIRUS NEUROTROPES	13
1.4 PATHOLOGIES ASSOCIEES AUX CORONAVIRUS.....	14
1.4.1 Coronavirus infectant les animaux	15
1.4.2 Coronavirus infectant l'humain	16
1.5 LES CORONAVIRUS : DES VIRUS RESPIRATOIRES NEUROINVASIFS, NEUROTROPES ET NEUROVIRULENTS.....	17
2 ORGANISATION DU GENOME DES CORONAVIRUS, CYCLE REPLICATIF ET FACTEUR DE VIRULENCE	19
2.1 ORGANISATION DU GENOME ET CYCLE DE REPLICATION.....	19
2.2 LES PROTEINES DU CORONAVIRUS.....	22
2.2.1 Protéines structurales.....	22
2.2.2 Protéines non structurales.....	25
2.2.3 Protéines accessoires	26

2.3	LA GLYCOPROTEINE DE SURFACE S : UN FACTEUR DE VIRULENCE MAJEUR.....	27
3	LA PROTEINE D'ENVELOPPE DU CORONAVIRUS.....	29
3.1	CARACTERISTIQUES	29
3.1.1	Structure	29
3.1.2	Localisation.....	29
3.1.3	Topologie.....	32
3.1.4	Transformations post-traductionnelles	33
3.2	IMPORTANCE DE LA PROTEINE E DANS L'INFECTION PAR LES CORONAVIRUS.....	34
3.2.1	Rôle dans le cycle de réplication.....	35
3.2.2	Domaine transmembranaire.....	36
3.2.3	Motif PBM	45
4	IMPORTANCE DE LA PROTEINE E DE HCOV-OC43 ET DE SES DOMAINES POUR SA NEUROVIRULENCE	51
5	THE OC43 HUMAN CORONAVIRUS ENVELOPE PROTEIN IS CRITICAL FOR INFECTIOUS VIRUS PRODUCTION AND PROPAGATION IN NEURONAL CELLS AND IS A DETERMINANT OF NEUROVIRULENCE AND CNS PATHOLOGY.....	53
5.1	ABSTRACT.....	57
5.2	INTRODUCTION	58
5.3	RESULTS.....	61
5.4	DISCUSSION.....	79
5.5	MATERIALS AND METHODS.....	85
5.6	ACKNOWLEDGEMENTS	93
6	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	95
7	REFERENCES.....	105

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 3-1	LISTE DES VIROPORINES IDENTIFIÉES ET LEURS PROPRIÉTÉS.....	38
TABLEAU 3-2	LISTE DE PROTÉINES VIRALES POSSÉDANT UN PBM ET LES PROTÉINES CELLULAIRES POSSÉDANT UN PDZ AVEC LESQUELS ILS INTERAGISSENT.....	48
TABLEAU 5-1	PRIMERS USED TO INTRODUCE NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS IN THE E GENE OF PBAC- OC43 ^{FL}	86

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-1	SECTION TRANSVERSALE DE LA MOELLE ÉPINIÈRE.....	3
FIGURE 1-2	STRUCTURE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL HUMAIN.....	4
FIGURE 1-3	SCHÉMA D'UN NEURONE MYÉLINISÉ DE VERTÉBRÉ TYPIQUE.....	6
FIGURE 1-4	CLASSIFICATION DES QUATRE TYPES DE NEURONES SELON RAMÒN Y CAJAL.....	8
FIGURE 1-5	SYNAPSE TRIPARTIE ET RÉSEAU NEUROGLIAL : IMPACT SUR LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE.....	10
FIGURE 1-6	RÉGULATION D'UNE INFECTION VIRALE DU SNC.....	12
FIGURE 2-1	ORGANISATION GÉNOMIQUE DES CORONAVIRUS BASÉE SUR LA SOUCHE OC43.....	19
FIGURE 2-2	SCHÉMA DU CYCLE DE RÉPLICATION DES CORONAVIRUS.....	21
FIGURE 2-3	STRUCTURE DE LA PROTEINE D'ENVELOPPE DES CORONAVIRUS BASEE SUR LA SOUCHE OC43.....	25
FIGURE 3-1	TOPOLOGIE TRANSMEMBRANAIRE ET EN ÉPINGLE DE LA PROTÉINE E D'IBV.....	33
FIGURE 3-2	CLASSIFICATION DES VIROPORINES DÉPENDAMMENT DE LEUR NOMBRE DE DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE AINSI QUE DE LEUR TOPOLOGIE.....	40
FIGURE 3-3	MODÈLE PENTAMÉRIQUE DE LA PROTÉINE E DU SARS-CoV.....	44
FIGURE 3-4	STRUCTURE D'UN DOMAINE PDZ.....	46
FIGURE 3-5	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE PROTÉINES CONTENANT UN OU PLUSIEURS DOMAINES PDZ.....	47
FIGURE 5-1	THE HCoV-OC43 E PROTEIN IS CRITICAL FOR INFECTIOUS PARTICLE PRODUCTION.....	62
FIGURE 5-2	HCoV-OC43 LACKING E PROTEIN CAN INFECT NEURONAL CELLS BUT REPLICATION IS SEVERELY IMPAIRED.....	64
FIGURE 5-3	THE PUTATIVE HCoV-OC43 TRANSMEMBRANE DOMAIN PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN INFECTIOUS VIRION PRODUCTION, RELEASE, REPLICATION AND PROPAGATION IN NEURONAL CELLS.....	67
FIGURE S5-1	HCoV-OC43 E PROTEIN TRANSMEMBRANE (TM) DOMAIN IS IMPORTANT FOR ITS EFFICIENT PROPAGATION IN HUMAN NEURONAL CELLS.....	67
FIGURE 5-4	A FUNCTIONAL PDZ-DOMAIN BINDING MOTIF AT THE C-TERMINAL END OF THE HCoV- OC43 E PROTEIN IS CRITICAL FOR EFFICIENT VIRUS PRODUCTION AND SPREAD IN NEURONAL CELLS.....	69

FIGURE S5-2	HCoV-OC43 E PROTEIN PBM MOTIF GREATLY IMPROVES ITS PROPAGATION IN HUMAN NEURONAL CELLS.....	70
FIGURE 5-5	HCoV-OC43 E PROTEIN AND ITS PUTATIVE TMD AND PBM MODULATE RELATIVE VIRUS INFECTIVITY.....	71
FIGURE 5-6	A FULLY FUNCTIONAL HCoV-OC43 E PROTEIN IS ASSOCIATED WITH OPTIMAL NEUROINVASION AND INCREASES NEUROVIRULENCE.....	73
FIGURE S5-3	HCoV-OC43 E PROTEIN IS REQUIRED FOR PATHOGENESIS IN THE CNS.....	74
FIGURE 5-7	THE E PROTEIN TM AND PBM DOMAIN ARE ESSENTIAL FOR OPTIMAL REPLICATION IN THE MURINE BRAIN AND SPINAL CORD.....	76
FIGURE S5-4	ROC/E-PBM _{D82A-V84A} IS ABLE TO PRODUCE INFECTIOUS VIRIONS IN THE BRAIN AND TO PROPAGATE TO THE SPINAL CORD AFTER AN INFECTION AT A HIGHER DOSE.....	77
FIGURE 5-8	HCoV-OC43 E PROTEIN PUTATIVE TM DOMAIN IS REQUIRED FOR EFFICIENT SPREADING IN MOUSE CNS.....	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS

HCoV	Coronavirus humain
SNC	Système nerveux central
CNS	<i>Central Nervous System</i>
E	Protéine d'enveloppe
SNP	Système nerveux périphérique
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
LCR	Liquide céphalo-rachidien
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
RLR	<i>Rig-like receptor</i>
PD-L1	<i>Programmed death ligand-1</i>
HSV	Virus de l'herpes simplex
WNV	Virus du nil occidental
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
HTLV-1	Virus T-lymphotrope humain de type 1
PEDV	<i>Porcine epidemic diarrhea virus</i>
TGEV	<i>Transmissible gastroenteritis coronavirus</i>
FCoV	<i>Feline coronavirus</i>
CCoV	<i>Canine Coronavirus</i>
BCoV	<i>Bovine coronavirus</i>
IBV	<i>Infectious bronchitis virus</i>

PHEV	<i>Porcine hemagglutinating encephalitis virus</i>
MuCoV	<i>Murine coronavirus</i>
MHV	<i>Murine hepatitis virus</i>
MERS	<i>Middle-east respiratory syndrome</i>
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>
ARN	Acide ribonucléique
S	Glycoprotéine de surface
ORF	<i>Open reading frame</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
ARNm	ARN messenger
Nsp	Protéine non structural
M	Protéine de membrane
N	Nucléocapside
HE	Hémagglutinine-estérase
ERGIC	Compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi
TMD	Domaine transmembranaire
PBM	<i>PDZ binding motif</i>
PLP	<i>Papain-like protéase</i>
UPR	Réponse aux protéines mal repliées
RE	Réticulum endoplasmique
VLP	Virus-like particle
VIA	Virus de l'influenza A
VHC	Virus de l'hépatite C
PSD-95	<i>Postsynaptic density 95</i>
Dlg	<i>Discs Large</i>

ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>
CRB3	<i>Crumbs protein homolog 3</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

1 LES CORONAVIRUS, DES VIRUS RESPIRATOIRES PRÉSENTS AU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Afin d'assurer un bon fonctionnement de l'organisme, une boucle de détection-évaluation-réaction aux stimuli internes et externes est nécessaire, et, chez les vertébrés, cette boucle de régulation est assurée par le système nerveux et le système endocrinien (Farley et al. 2014). Alors que la réponse par le système endocrinien est lente du fait qu'elle consiste en la sécrétion d'hormones dans la circulation, la réponse par le système nerveux est presque instantanée et est relayée par un échange local de neurotransmetteurs (Uchino et al. 2015). Le système nerveux, qui est constitué de tous les tissus nerveux de l'organisme, est chargé de recevoir les influx sensoriels relatant les changements dans l'environnement interne et externe, et après avoir analysé les informations, va envoyer des signaux réponses vers les organes effecteurs. Il est entre autres responsable de la perception, du comportement, de la mémoire et de l'initiation de tous les mouvements volontaires (Farley et al. 2014). Le système nerveux est constitué de deux grandes parties permettant la transmission d'informations d'une région à une autre de l'organisme : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC est constitué de l'encéphale et de la moelle épinière et le SNP comprend tous les tissus nerveux hors du SNC.

1.1 Le système nerveux périphérique

Le SNP comporte les ganglions et l'ensemble des nerfs à l'extérieur du SNC, incluant une partie des nerfs crâniens et l'entièreté des nerfs spinaux qui permettent au SNP de communiquer directement avec l'encéphale et la moelle épinière respectivement (Farley et al. 2014). Il peut être divisé en plusieurs sous-systèmes régulant différents processus. Le système nerveux somatique est constitué des nerfs sensoriels et moteurs transmettant respectivement les informations des récepteurs somatiques jusqu'au SNC, ou du SNC aux muscles effecteurs. Le système nerveux autonome régule la température de l'organisme, le rythme cardiaque, la pression sanguine et la glycémie. Le système nerveux entérique est le système nerveux du système digestif contrôlant localement les fonctions gastro-intestinales (Farley et al. 2014).

1.2 Le Système nerveux central

1.2.1 Structure et organisation

Chez les mammifères, le SNC est constitué de deux principales structures, l'encéphale et la moelle épinière. Ces deux organes aux structures très différentes sont responsables du fonctionnement de tout l'organisme par la transition d'informations entre l'encéphale et les différents sites effecteurs (muscles, organes, tissus...) (Uchino et al. 2015).

1.2.1.1 La moelle épinière

La moelle épinière est protégée par les vertèbres formant la colonne vertébrale et commence à la base de l'encéphale, allant jusqu'aux vertèbres lombaires, parcourant ainsi toute la colonne vertébrale. La moelle épinière est responsable de la transmission d'informations entre l'encéphale et le système nerveux périphérique (SNP) par le biais de nerfs spinaux situés au niveau de chaque vertèbre. Ces nerfs spinaux sont issus de prolongement de la moelle épinière formant quatre racines rachidiennes au niveau de chaque vertèbre : deux racines dorsales constituées de fibres sensorielles permettant le transfert de signaux depuis la périphérie jusqu'au SNC, et deux racines ventrales constituées de fibres motrices, permettant le transfert de signaux moteurs vers le SNP (Richard et al. 2013; Uchino et al. 2015).

La moelle épinière peut être divisée en deux parties : la substance grise et la substance blanche. La substance grise située dans la région centrale comporte principalement des corps cellulaires, alors que la substance blanche située en périphérie est constituée de fibres nerveuses myélinisées permettant la communication (Figure 1-1). Ces fibres forment plusieurs faisceaux sensoriels ascendants et moteurs descendants permettant le cheminement de l'information entre l'encéphale et les organes effecteurs (Uchino et al. 2015; Kandel et al. 2013).

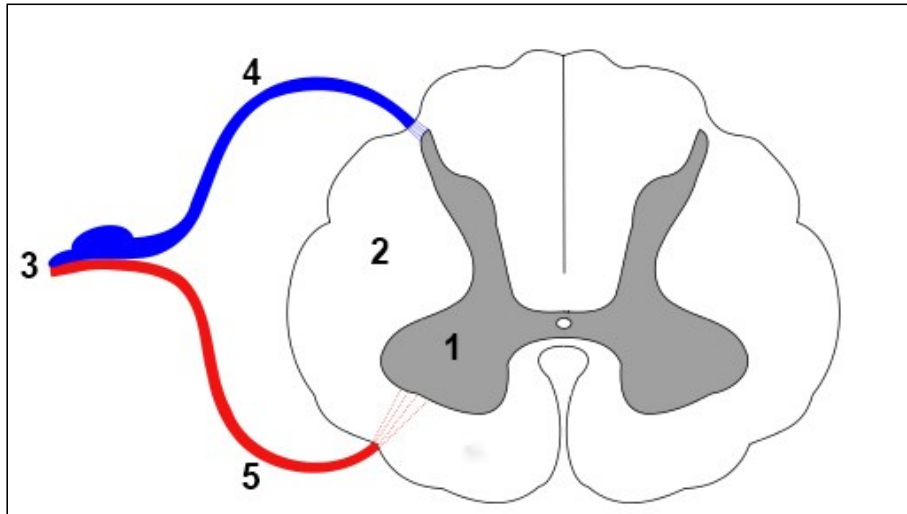


Figure 1-1 Section transversale de la moelle épinière. La moelle épinière est divisée en deux parties : (1) la substance grise contenant les corps cellulaires et (2) la substance blanche formée principalement de fibres nerveuses. Les nerfs spinaux (3) sont formés par la réunion d'une racine rachidienne dorsale (4) et d'une ventrale (5). Adaptée de https://fr.wikipedia.org/wiki/Moelle_épineire.

1.2.1.2 L'encéphale

L'encéphale est protégé par le crâne et représente l'unité décisionnelle du système nerveux. En effet, là où la moelle épinière est capable de traiter les réflexes, la majorité des informations sont traitées au sein de l'encéphale, et la réponse est ensuite propagée par la moelle épinière jusqu'aux sites effecteurs (Farley et al. 2014).

L'encéphale est divisé en quatre parties : le tronc cérébral, le cervelet, le diencephale et le télencéphale, plus communément appelé le cerveau (Figure 1-2 A) (Hendry et al. 2014). Ces quatre éléments jouent chacun des rôles différents dans le traitement des informations, et sont associés à différentes tâches. Le tronc cérébral est constitué du bulbe rachidien, du pont et du mésencéphale. Le bulbe rachidien est le prolongement de la moelle épinière et agit comme intermédiaire entre le reste de l'encéphale et la moelle épinière. Il régule plusieurs fonctions vitales telles que le rythme cardiaque, la respiration et la digestion. Le pont transfère les informations de mouvements entre le télencéphale et le cervelet. Le cervelet est impliqué dans la coordination motrice et l'équilibre, sans être pour autant à l'origine des mouvements. Le mésencéphale est principalement le site de coordination sensorielle et du contrôle des mouvements oculaires. Le diencephale est constitué de deux structures spécialisées traitant la majorité des informations allant vers le télencéphale depuis le reste de l'encéphale : (1) le thalamus qui est impliqué dans

la gestion de la conscience, de la vigilance, et du sommeil et (2) l'hypothalamus qui fait le lien entre l'encéphale et le système endocrinien et qui joue un rôle dans la régulation de certains processus métaboliques et d'autres fonctions du système nerveux autonome appartenant au SNP (Kandel et al. 2013; Uchino et al. 2015; Hendry et al. 2014).

Enfin, le télencéphale (cerveau), est constitué des hémisphères cérébraux, eux-mêmes constitués d'une couche externe ridée appelée cortex cérébral, et de trois autres structures : les noyaux gris de la base, l'hippocampe et les amygdales. Ces quatre structures participent respectivement à la sélection de l'action à effectuer, au stockage de la mémoire et à la modulation de la sécrétion d'hormones par les glandes endocriniennes en réponse aux émotions. De plus, le cortex cérébral peut être séparé en quatre lobes aux fonctions distinctes (Figure 1-2 B). Le lobe frontal gère la mémoire à court terme, la planification d'actions futures et du contrôle des mouvements ; le lobe pariétal est impliqué dans la perception de l'espace découlant de la vision, du toucher et de l'audition ; le lobe occipital régule la vision ; et le lobe temporal module l'ouïe (Kandel et al. 2013; Uchino et al. 2015). Ces fonctions ne représentent qu'une partie des actions plus ou moins complexes gérées par ces quatre lobes.

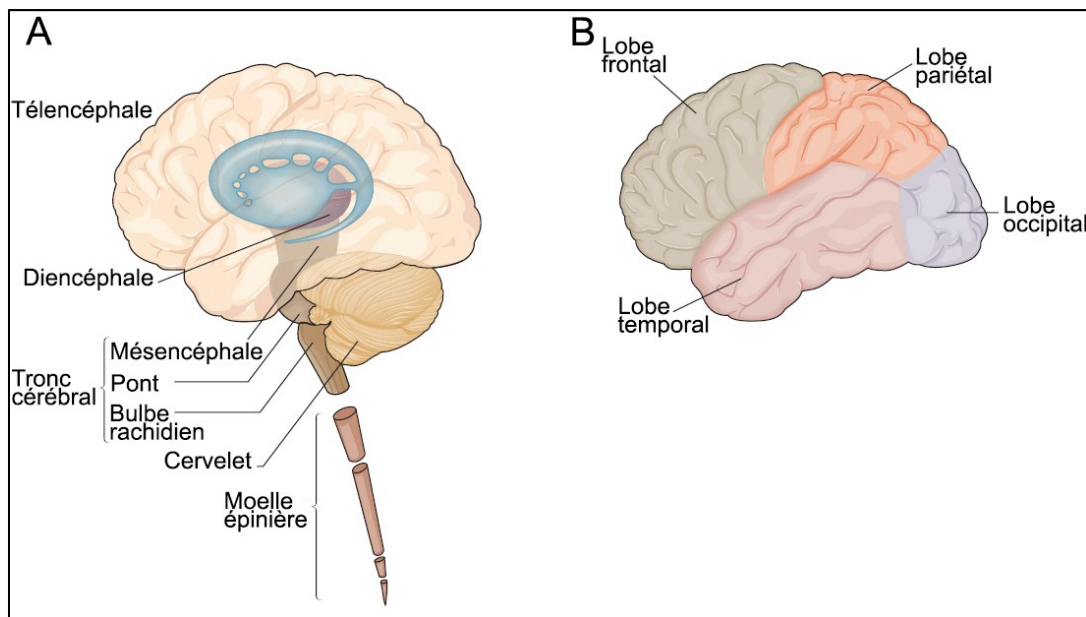


Figure 1-2 Structure du système nerveux central humain. (A) Le système nerveux central est divisé en sept unités fonctionnelles : La moelle épinière et l'encéphale regroupant le télencéphale (cerveau), le diencéphale, le cervelet et le tronc cérébral constitué du mésencéphale, du pont et du bulbe rachidien. (B) Les 4 lobes du cortex cérébral. Adapté de Kandel et al, 2013.

Afin de traiter toutes les informations sensorielles arrivant jusqu'à l'encéphale, et d'envoyer les bons signaux moteurs en réponse, le SNC est constitué de différents types cellulaires assurant toutes ces fonctions et qui sont regroupées en deux groupes de cellules : les cellules gliales et les neurones.

1.2.1.3 Les neurones

Les neurones sont l'unité de traitement et de transfert des informations du SNC, transmettant des signaux électriques et chimiques. Ils sont constitués d'un corps cellulaire, ou soma, contenant le noyau et toute la machinerie cellulaire du cytoplasme environnant, et de deux types de prolongements : les dendrites et l'axone. Les dendrites sont de courts prolongements partant du soma et assurant le transfert du signal depuis une cellule avoisinante ou depuis un stimulus du milieu extérieur, alors que l'axone est un long prolongement tubulaire allant du soma vers une autre cellule, propageant ainsi le signal (l'influx nerveux) vers un autre neurone ou une cellule effectrice telle que les cellules glandulaires ou musculaires (Uchino et al. 2015; Richard et al. 2013). À l'extrémité de l'axone se trouve une excroissance appelée terminaison présynaptique où le signal, propagé depuis le soma le long de l'axone, sera transmis à une nouvelle cellule par le biais de structures formant la synapse (Figure 1-3).

Au sein du neurone, le signal est transmis sous forme électrique en tant que différence de potentiel transmembranaire, et est ensuite transmis chimiquement entre les cellules à l'aide de composés appelés neurotransmetteurs au niveau des synapses (Kandel et al. 2013; Uchino et al. 2015). Toutes ces connexions entre neurones forment ainsi un réseau complexe où chaque neurone est connecté à plusieurs autres permettant ainsi le transfert et le traitement des informations dans le système nerveux.

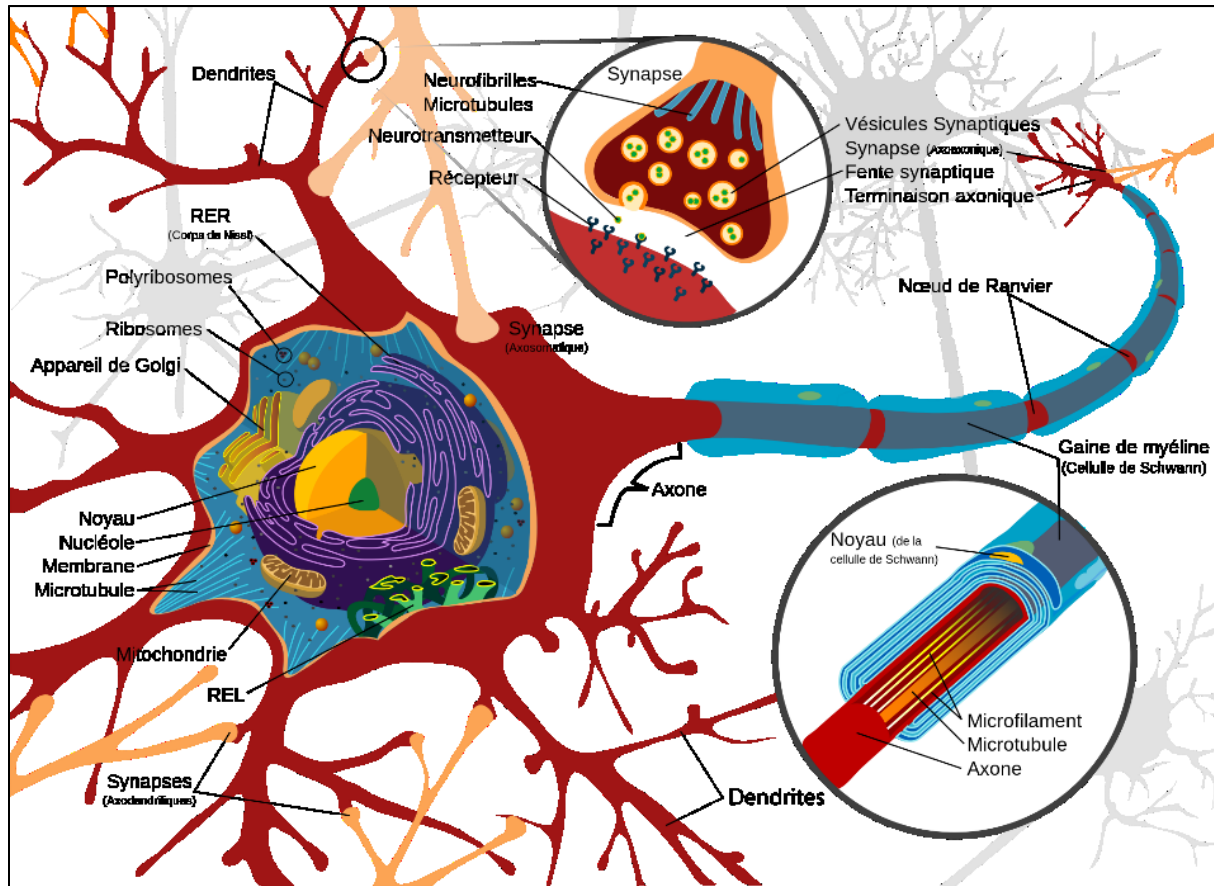


Figure 1-3 Schéma d'un neurone myélinisé de vertébré typique. Le neurone est composé d'un corps cellulaire appelé soma, et de deux types de prolongements : l'axone, unique, qui conduit le potentiel d'action vers une autre cellule, et les dendrites, qui conduisent les potentiels gradués vers le soma. La morphologie, la localisation et le nombre de ces prolongements, ainsi que la forme du soma, varient et contribuent à définir différentes familles morphologiques de neurones. Le corps des neurones contient le noyau, bloqué en interphase et donc incapable de se diviser, et le cytoplasme contenant le réticulum endoplasmique rugueux, les appareils de Golgi, des mitochondries et des neurofilaments. Chaque ramification se termine par une synapse où s'accumulent des vésicules synaptiques contenant un neurotransmetteur. Certains axones sont recouverts d'une gaine de myéline, formée par les oligodendrocytes dans le système nerveux central et par les neurolemmocytes ou cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. Ce recouvrement est en fait discontinu, séparé par les nœuds de Ranvier, et permet une plus grande vitesse de passage de l'information nerveuse. Les dendrites sont nombreuses, courtes et très ramifiées dès leur origine. Source : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Neurone>.

Contrairement aux autres cellules, les neurones matures ne se répliquent plus par division limitant le renouvellement des cellules du SNC, bien qu'il ait été démontré que de nouveaux neurones sont formés à partir de cellules souches neurales dans le bulbe olfactif et l'hippocampe, formant principalement des interneurons régulant les interactions entre les neurones sensoriels et moteurs (Purves et al. 2001).

Il existe plusieurs types de neurones identifiables par le nombre et la longueur des prolongements issus du soma. À la fin du XIX^e siècle, Ramòn y Cajal fut l'un des premiers à distinguer ces différents types de neurones en les classifiant en trois catégories : les neurones unipolaires possédant un seul grand prolongement se divisant ensuite pour former d'un côté l'axone et de l'autre les dendrites, et se retrouvant majoritairement dans le SNC des invertébrés et dans le système nerveux autonome chez les vertébrés ; les neurones bipolaires dont le soma forme deux prolongements, l'axone d'une part, et les dendrites de l'autre ; et les neurones multipolaires possédant un axone et plusieurs prolongements partant du soma et formant des dendrites, et qui se retrouvent en grande majorité dans le SNC des vertébrés (Figure 1-4). Les neurones bipolaires sont en grande partie des neurones sensoriels tels que ceux de la rétine ou de l'épithélium olfactif du nez, ainsi que les neurones transmettant les signaux du toucher, de la pression et de la douleur à la moelle épinière qui sont des types de neurones bipolaires appelés pseudo-unipolaires, car ces cellules se développent initialement comme des neurones bipolaires avant que ses deux prolongations ne fusionnent pour ne donner qu'une seule prolongation se divisant ensuite en deux (Figure 1-4) (Kandel et al. 2013; Uchino et al. 2015).

Afin de protéger l'axone du neurone et d'améliorer le transfert d'information le long de ce dernier, la plupart des axones sont entourés d'une gaine de myéline isolante formée par les oligodendrocytes. Ces derniers enroulent des portions d'axones de leurs prolongements permettant une meilleure transmission du signal électrique le long de l'axone.

En plus du transfert de signaux électriques, les neurones transmettent l'information chimiquement aux autres cellules au niveau des synapses par le biais de neurotransmetteurs tels que le glutamate, l'acétylcholine ou la dopamine. Ces composés sont synthétisés par le neurone au sein du soma et sont ensuite acheminés jusqu'aux synapses le long des axones par le biais d'enzymes motrices transportant des vésicules contenant ces substances le long de microtubules. Ces transports peuvent se faire dans le sens antérograde allant du soma vers la synapse par l'ATPase kinésine, ou dans le sens rétrograde allant de la synapse jusqu'au soma par l'intermédiaire de l'ATPase dinéine.

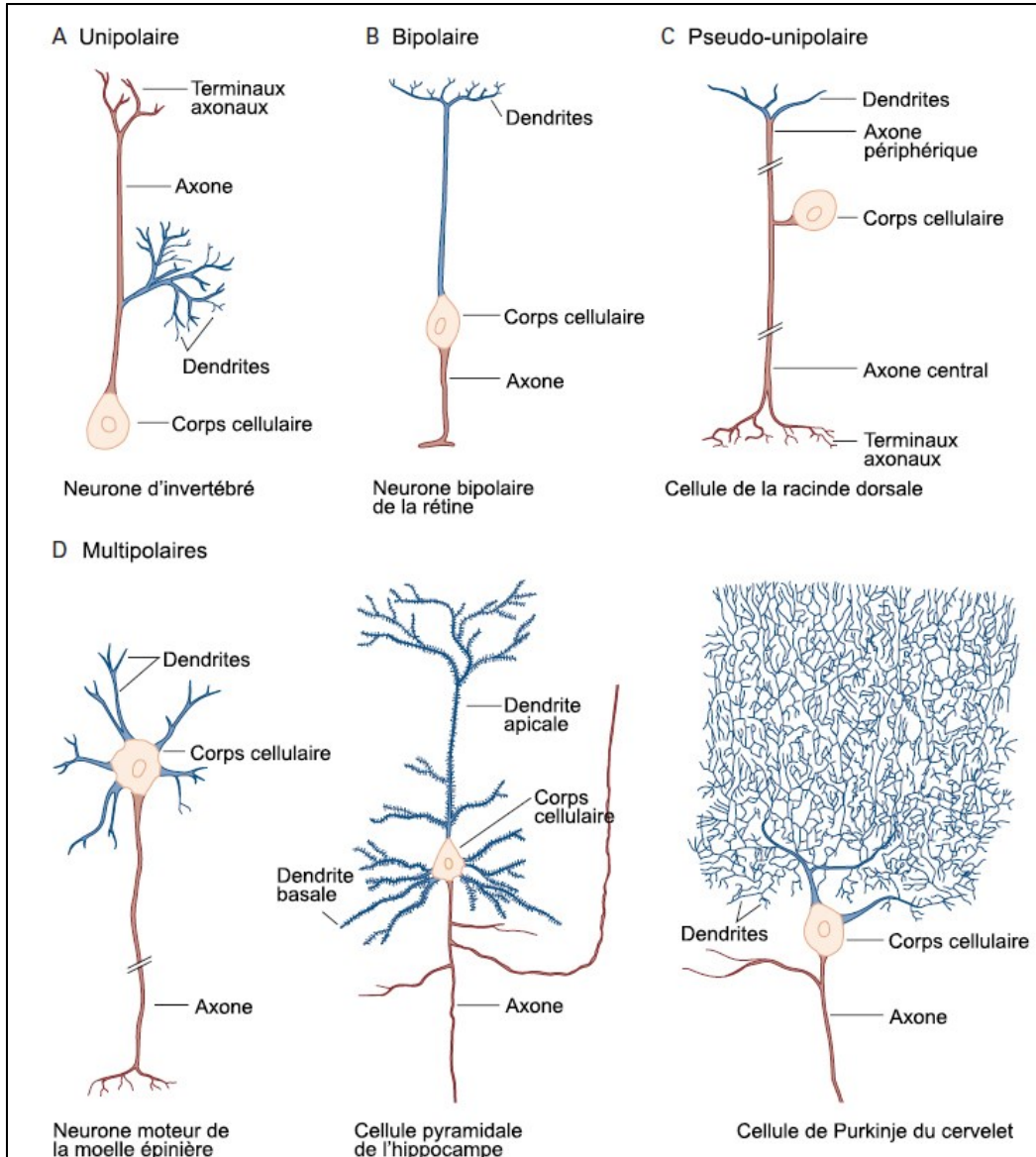


Figure 1-4 Classification des quatre types de neurones selon Ramon y Cajal. (A) Neurones unipolaires caractéristiques des systèmes nerveux invertébrés. (B) Neurones bipolaires présentant deux types de prolongements, les dendrites et l'axone, permettant le transfert d'informations de cellule à cellule. (C) Neurones pseudo-unipolaires. (D) Neurones multipolaires retrouvés en grande majorité dans le SNC des vertébrés. Adaptée de Kendal et al, 2013.

1.2.1.4 Les cellules gliales

Afin d'assurer un bon fonctionnement du SNC et des neurones, ces derniers sont supportés par plusieurs types cellulaires regroupés sous le nom de cellules gliales. Cette catégorie de cellules regroupe les astrocytes et les oligodendrocytes, communément appelées macroglies, ainsi qu'un troisième type, les microglies (Jessen 2004).

Les astrocytes, qui composent environ 30% des cellules dans le SNC (Liddelow et al. 2017), jouent un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie des synapses. En effet, en étant présents autour de ces sites, les astrocytes peuvent capter l'excès de certains neurotransmetteurs tels que le glutamate et les cations potassium qui, sinon, seraient toxiques pour les cellules (Danbolt 2001; Auld et al. 2003; Walz 2000). De plus, les astrocytes modulent également la transmission d'informations au sein de l'encéphale. En effet, les astrocytes forment un réseau cellulaire du même type que les neurones, et sont également présents au niveau des synapses, modulant l'échange d'information y ayant lieu. Suite à la relâche de neurotransmetteurs dans la synapse, une partie de ces composés va être captée par les astrocytes présents, qui vont ensuite relâcher des gliotransmetteurs influençant l'excitabilité neuronale, l'activité synaptique et la plasticité synaptique (Figure 1-5 A). De plus, cet effet de l'intégration des neurotransmetteurs par les astrocytes peut se transmettre à d'autres astrocytes par les jonctions entre astrocytes, permettant que cette modulation locale soit transmise à un autre site synaptique (Figure 1-5 B) (Haydon 2001; Rochon et al. 2001; Giaume et al. 2010; Saito et al. 2015). Les astrocytes sont également impliqués dans le maintien et le renforcement de la barrière hématoencéphalique en renforçant les jonctions serrées des cellules composant cette barrière ou en induisant l'expression polarisée de transporteurs et de certains systèmes enzymatiques qui permettent le transport sélectif de composés au travers de la barrière hématoencéphalique, et plus généralement, permettant à la barrière d'atteindre son efficacité optimale (Abbott et al. 2006; Abbott 2002).

Les oligodendrocytes sont les cellules responsables de la myélinisation des axones dans le SNC. Les prolongements de ces cellules vont s'enrouler autour d'une portion d'axone afin de former une gaine de myéline. Cette gaine permet d'augmenter entre 20 et 100 fois la vitesse de transfert du signal électrique le long de l'axone en formant des espaces étroits non myélinisés appelés nœud de Ranvier entre chaque gaine (Nave et al. 2014). De plus, la présence de cette gaine de myéline apporte un soutien métabolique aux axones aidant à leur maintien (Fünfschilling et al. 2012). Ces cellules sont également impliquées dans le développement des neurones par la production de facteurs neurotrophes tels que le facteur neurotrophe dérivé des cellules gliales (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*, GDNF), le facteur neurotrophe dérivé du cerveau (*Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF) ou le facteur de croissance similaire à l'insuline 1 (*Insulin-like Growth Factor*, IGF-1) (Du et al. 2002; Dougherty et al. 2000; Wilkins et al. 2003).

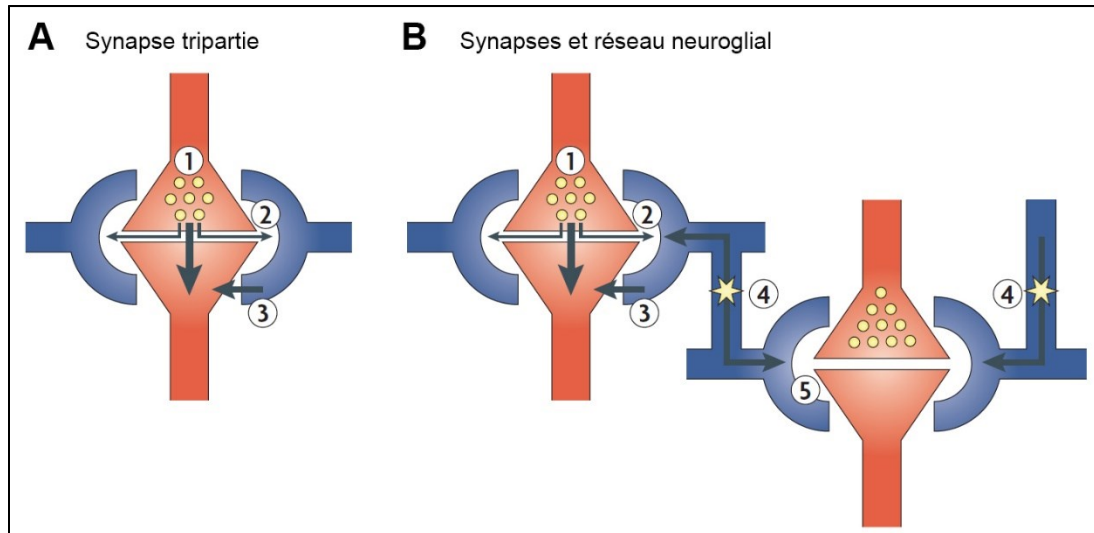


Figure 1-5 Synapse tripartite et réseau neuroglial : impact sur la transmission synaptique. Rôle des astrocytes (bleu) autour d'une synapse (rouge). (A) Les différentes étapes ayant lieu lors de l'interaction entre les membres de la synapse tripartite sont : (1) Relargage de neurotransmetteurs, (2) Action des neurotransmetteurs sur les récepteurs et transporteurs des astrocytes, (3) Relargage des gliotransmetteurs influençant l'activité neuronale. (B) Les neurotransmetteurs captés par les astrocytes peuvent (4) migrer vers d'autres astrocytes par leurs jonctions (étoile jaune), pouvant résulter au (5) relargage de gliotransmetteurs près d'une synapse éloignée. Adaptée de Giaume et al, 2010.

Les microglies, qui représentent 10% des cellules de l'encéphale (Colonna et al. 2017), sont les macrophages du SNC et sont chargées de l'élimination des cellules mortes ou endommagées et des corps étrangers par phagocytose (Aloisi 2001). Les microglies se retrouvent sous deux formes dans le SNC : une forme « au repos », présentant de nombreuses ramifications formant des contacts avec des neurones, des astrocytes et avec les vaisseaux sanguins irriguant le SNC, et une seconde forme qui s'active suite à la détection d'un signal de dommage dans l'encéphale. Ces microglies activées subissent une panoplie de changements morphologiques et fonctionnels et sont dites amiboïdes (Nimmerjahn et al. 2005). De même que les oligodendrocytes, les microglies sont impliquées dans le développement du SNC en modelant les synapses neuronales durant l'embryogenèse (Kettenmann et al. 2013) et sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires (Vezzani et al. 2015). De plus, les microglies ont la capacité d'exprimer les composants du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et donc de devenir des cellules présentatrices d'antigènes (Ransohoff et al. 2010). Cependant, leur capacité à activer des lymphocytes T reste encore à établir clairement (Donnou 2007).

1.2.2 Immunité du SNC

Le système immunitaire fonctionne différemment dans le SNC par rapport au reste de l'organisme. Pendant longtemps, pour la communauté scientifique, le SNC représenta un espace immunologiquement isolé et protégé par la barrière hématoencéphalique (Klein et al. 2017). Cependant, de récentes études ont montré que ce modèle est incorrect. En effet, bien que peu de cellules du système immunitaire se retrouvent au sein du SNC en conditions normales, ces dernières aident au bon fonctionnement du SNC (Kipnis et al. 2012; Schwartz et al. 2011), et des cellules inflammatoires sont recrutées suite à une infection ou une blessure du SNC (Klein et al. 2017).

La première ligne de défense du SNC contre les pathogènes est la barrière hématoencéphalique constituée de cellules endothéliales polarisées liées par des jonctions serrées et adhérentes formant une membrane semi-perméable extrêmement sélective, permettant le passage de composés essentiels au maintien de l'homéostasie du SNC, et empêchant divers pathogènes de pénétrer le SNC (Stamatovic et al. 2008). Cette barrière permet également de filtrer les cellules pouvant pénétrer le SNC afin de limiter l'effet néfaste d'une inflammation prolongée dans le SNC (Klein et al. 2017). En plus de cette barrière, le SNC est surveillé par des cellules immunitaires spécialisées pouvant pénétrer le SNC par différents chemins les menant au liquide céphalo-rachidien (LCR), aux méninges et aux espaces périvasculaires (Ransohoff et al. 2012). Ces cellules sont essentiellement des macrophages, incluant les microglies, et sont les premières cellules à détecter la présence de pathogènes étrangers (Nayak et al. 2012).

Lorsqu'un pathogène se rend jusqu'au SNC, ces macrophages de surveillance ainsi que les neurones (Lafon et al. 2006) et les astrocytes (A. Nair et al. 2008) peuvent détecter différents motifs moléculaires associés à des pathogènes grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs (*pattern recognition receptors*, PRR) tels que les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor*, TLR) ou de type RIG (*RIG-like receptor*, RLR) qui reconnaissent l'ARN simple brin de certains virus (Moynagh 2005; Kell et al. 2015), et déclenchent ainsi une réponse immunitaire innée (S. Nair et al. 2015).

Suite à la détection de ces pathogènes, ces cellules vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron de type I et les chimiokines CCL2, CCL5 et CXCL9-11 (Drokhlyansky et al. 2016). La sécrétion d'interféron de type I induit, par liaison à son récepteur,

l'expression de gènes permettant l'élimination des cellules infectées ou aidant à la suppression du pathogène, en plus de protéger les cellules non infectées avoisinantes (Miller et al. 2016). La production rapide d'interféron de type I suite à la détection de ces motifs est cruciale pour contrôler la propagation du pathogène dans le SNC et peut également promouvoir la survie de l'hôte (Paul et al. 2007). Suite à la sécrétion des chimiokines, des lymphocytes T et B sont recrutés au SNC où elles sont activées par des cellules gliales présentatrices d'antigènes. Ne produisant pas ou peu de molécules du CMH de classe I en condition physiologique, les neurones sont généralement invisibles aux lymphocytes T. Cependant, l'infection des neurones peut induire la production de molécules du CMH-I afin d'initier la réponse inflammatoire des lymphocytes T (Chevalier et al. 2011). Ces derniers jouent leur rôle en induisant la mort cellulaire des cellules infectées par l'usage de perforines et de granzymes, ou en produisant de l'interféron γ (Figure 1-6) qui aura des effets similaires aux interférons de type I sur les cellules permettant ainsi d'éliminer l'infection sans tuer la cellule infectée (Goodbourn et al. 2000). De plus, les lymphocytes T peuvent induire la différenciation et prolifération de lymphocytes B mémoires ayant infiltrés le SNC afin de produire des anticorps spécifiques au pathogène, aidant à la suppression de l'infection (Meinl et al. 2006).

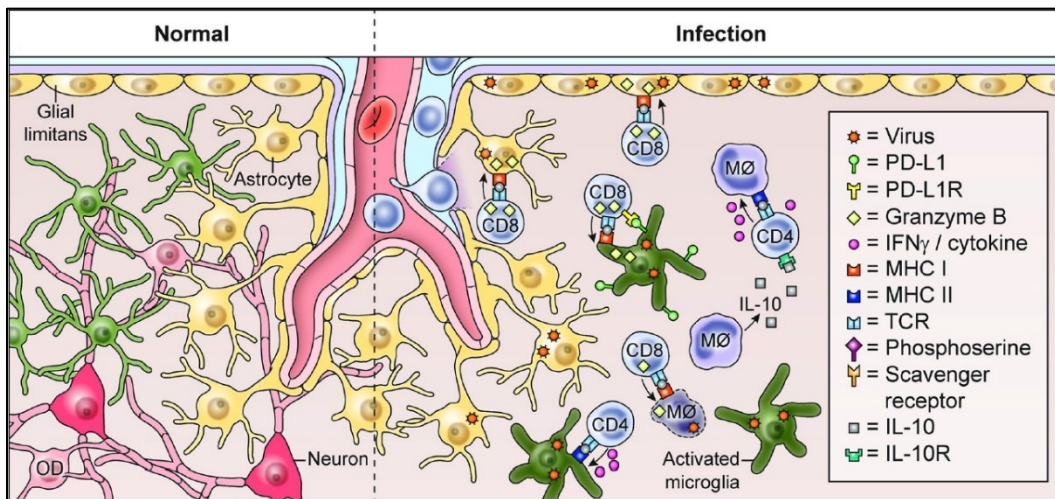


Figure 1-6 Régulation d'une infection virale du SNC. L'infection virale du SNC est principalement contrôlée par les lymphocytes T CD8+ reconnaissant les peptides viraux présentés par les CMH-I des cellules infectées et sécrétant des molécules effectrices afin d'induire l'apoptose des cellules infectées. De même, les lymphocytes T CD4+ reconnaissent les peptides viraux présentés par le CMH-II des microglies/macrophages et sécrètent des cytokines antivirales. Adapté de Russo et McGavern, 2016.

Après avoir supprimé l'infection, l'inflammation dans le SNC doit être régulée afin d'éviter le développement d'immunopathologies. À cette fin, les lymphocytes T régulateurs ainsi que les cellules gliales du SNC produisent différents facteurs immunosuppresseurs tels que le ligand de mort programmée 1 (*programmed death ligand-1*, PD-L1) qui permet d'aider à supprimer les lymphocytes T effecteurs (Latchman et al. 2004), ou la cytokine immunosuppressive IL-10 qui permet de réduire l'activation des cellules du système immunitaire (Trandem et al. 2011). De plus, afin de pouvoir répondre plus rapidement en cas de réinfection, une partie de la population de lymphocyte T effecteur va s'établir dans le SNC et devenir des lymphocytes T mémoires résidants, représentant une première ligne de défense en cas de réinfection (Park et al. 2015).

1.3 Virus neurotropes

Malgré la présence de la barrière hématoencéphalique limitant l'accès au SNC, une multitude de virus ont su trouver des parades leur permettant de traverser cette barrière et d'infecter les cellules présentes. Certains virus tels que le virus du Nil occidental (*West Nile Virus*, WNV), de l'immunodéficience humaine, le poliovirus et le virus de la rougeole sont capables de traverser la barrière hématoencéphalique en infectant des cellules du système immunitaire qui sont recrutées au SNC, d'induire une perte d'intégrité de cette barrière, ou d'infecter les cellules de cette barrière afin de produire et de relâcher des particules infectieuses vers le SNC (Verma et al. 2010; S. Nair et al. 2015; Atluri et al. 2015; Young et al. 2009; Racaniello 2006). D'autres virus comme le virus de la rage, le virus de l'herpès simplex 1 et l'influenza H5N1 infectent des neurones du SNP ou des neurones olfactifs leur permettant d'infiltrer le SNC par transport rétrograde le long des axones (Lafon 2011; Jang et al. 2009; Diefenbach et al. 2008). Ces virus sont qualifiés de neuroinvasifs, neurotropes et potentiellement neurovirulents, c'est-à-dire qu'ils peuvent infiltrer le SNC depuis un site d'infection extérieur, qu'ils peuvent infecter les neurones et cellules gliales du SNC, et qu'ils peuvent potentiellement induire le développement d'une maladie neurologique suite à l'infection du SNC (Desforges et al. 2014).

Une grande majorité des symptômes induits par une infection du SNC se traduisent par une encéphalite dont la sévérité peut varier, allant de bénigne à mortelle, et dont les symptômes vont des maux de tête, fièvre, confusion, aux convulsions, hallucinations ou à des accidents vasculaires cérébraux (National Institute of Neurological Disorders and Stroke 2017). Parmi les virus capables de provoquer une encéphalite se trouve le virus de l'herpès simplex (HSV) (Whitley

2006), des entérovirus tels que le poliovirus ou le coxsakievirus (Rhoades et al. 2011), WNV (Tyler et al. 2006), le virus de la rougeole (Buchanan et al. 2012), le virus de la grippe (G. F. Wang et al. 2010) et le virus de la rage (Hemachudha et al. 2013).

De plus, bien que les mécanismes ne soient pas encore bien compris, certaines infections virales du SNC ont été associées au développement de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la Sclérose en plaques (Alshaikh 2011). Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est également capable d'infecter le SNC et d'y induire des troubles neurocognitifs caractérisés par une neurodégénérescence (Eggers et al. 2017). D'autres rétrovirus causent le développement de maladies neurologiques. Le virus T-lymphotrope humain de type I (*Human T-lymphotropic virus type I*, HTLV-1) conduit au développement de la myélopathie associée à HTLV-I / paraparésie spastique tropicale chez une faible proportion des individus infectés (Matsuura et al. 2010). De même, des rétrovirus endogènes humains ont été associés au développement de la sclérose en plaques, de schizophrénie et de troubles bipolaires (Christensen 2010). Plus récemment, après l'épidémie au Brésil, l'infection par le virus Zika a été associée au développement du syndrome congénital Zika, du syndrome de Guillain-Barré, et au développement de microcéphalies chez les nouveaux nés bien que les mécanismes impliqués restent inconnus (Russo et al. 2017).

Une très grande variété de virus est donc capable d'infiltrer le SNC et d'y provoquer des dommages ayant différentes répercussions sur la santé de l'individu infecté, impliquant des mécanismes encore méconnus ou incomplètement compris. Parmi ces virus, de nombreuses études se sont attardées aux coronavirus représentants des virus neuroinvasifs d'intérêts.

1.4 Pathologies associées aux coronavirus

Les coronavirus, membre de la sous-famille des *Coronavirinae*, de la famille des *Coronaviridae*, et de l'ordre des *Nidovirales*, font partie des plus grands virus à ARN monocaténaire à polarité positive identifiés à ce jour. Ces virus possèdent un génome d'environ 30kb enveloppé dans une membrane pléomorphe (de Groot et al. 2012) et peuvent aussi bien infecter l'humain que les animaux; mammifères ou oiseaux. Les coronavirus sont généralement des virus respiratoires infectant les voies respiratoires supérieures, et pouvant, en tant que virus

opportunistes, infecter les voies respiratoires inférieures, le système gastro-entérique et le SNC provoquant des pathologies plus sévères (Desforges et al. 2014).

1.4.1 Coronavirus infectant les animaux

Les coronavirus sont capables d'induire le développement de plusieurs pathologies chez les animaux menant à de graves conséquences pour l'industrie de l'élevage. Ces virus sont capables d'infecter une grande variété d'hôtes allant des porcins (*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV, et *Transmissible gastroenteritis coronavirus*, TGEV) aux chats et chiens (*Feline coronavirus*, FCoV et *Canine coronavirus*, CCoV) en incluant les bovins (*Bovine coronavirus*, BCoV) et les oiseaux (*Infectious bronchitis virus*, IBV), provoquant une panoplie de symptômes plus ou moins graves tels que des vomissements, diarrhées, troubles respiratoires ou dysfonctionnements rénaux pouvant mener à la mort de l'hôte (Lin et al. 2016; Tekes et al. 2016; Licitra et al. 2014; Saif 2010; Bande et al. 2016). Certains coronavirus sont également capables d'infecter le SNC. C'est le cas du virus de l'encéphalite hémagglutinante porcine (*porcine hemagglutinating encephalitis virus*, PHEV) pouvant causer des encéphalomyélites chez les porcelets infectés (Andries et al. 1980). De même un variant très virulent de FCoV est capable d'induire des méningites lorsque l'infection se rend au cerveau des chats (Slauson et al. 1972). Dépendamment de la souche, le coronavirus murin (*Murine coronavirus*, MuCoV) est capable d'infecter le système entérique, le foie, le système pulmonaire et le SNC. De par la grande variété de tropismes et de symptômes induits par l'infection, les différentes souches de ce coronavirus murin (regroupées sous le terme MHV) sont actuellement utilisées en tant que modèles murins de développements de maladies humaines telles que la sclérose en plaques, l'hépatite virale ou la pneumonie (S. R. Weiss et al. 2011). Plusieurs études sur ces différentes espèces coronavirales ont pu déterminer qu'ils sont neuroinvasifs et neurotropes (Yagami et al. 1986; Hirano et al. 2004; Bender et al. 2010; Cowley et al. 2010) bien que MHV reste le plus étudié. En effet, il a été démontré que MHV atteint le SNC par le nerf olfactif, qu'il peut causer une encéphalite aiguë lors de l'atteinte du cerveau ou une maladie démyélinisante chronique lorsqu'il est capable d'y persister et qu'il est capable de rapidement se propager jusqu'à la moelle épinière (Bender et al. 2010; Lane et al. 2010).

1.4.2 Coronavirus infectant l'humain

La première souche identifiée de coronavirus infectant l'humain a été la souche B814, initialement isolée et cultivée par Tyrrell et Bynoe dans les années 1960, alors que des sujets volontaires furent inoculés et ont, par la suite, développés des symptômes du rhume (Tyrrell et al. 1965). Peu de temps après, Hamre et Procknow isolèrent la souche HCoV-229E de patients présentant des maladies respiratoires mineures (Hamre et al. 1966). Suivant l'isolation de ces deux souches, l'équipe de Chanock réussit à isoler une troisième souche appelée HCoV-OC43 en utilisant la même technique de culture d'organe à partir d'échantillons de patients montrant les symptômes du rhume. Ils montrèrent également par microscopie électronique que les souches B814, HCoV-229E et HCoV-OC43 ressemblaient au coronavirus aviaire IBV faisant un lien entre ces virus différents des virus respiratoires connus à cette période (McIntosh et al. 1967).

Suite à ces importantes études, il fallut attendre l'épidémie du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (*Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS), causé par le coronavirus SARS-CoV, survenue en 2002-2003 pour que les études sur les coronavirus prennent de l'ampleur. Depuis le premier cas de SRAS en novembre 2002 en Chine (Drosten et al. 2003; Ksiazek et al. 2003; Peiris et al. 2003), jusqu'à ce que l'épidémie soit déclarée finie en juillet 2003, 8096 cas furent recensés dont 774 décès dans 27 pays, faisant du SARS-CoV le premier coronavirus capable d'induire une maladie mortelle chez l'homme (World Health Organization 2004). Dix ans plus tard, une seconde épidémie, dont l'agent étiologique se révéla aussi être un coronavirus, eu lieu. En juin 2012, le premier cas de Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient (*Middle-East Respiratory Syndrome*, MERS) fut identifié, et l'agent pathogène responsable fut appelé MERS-CoV (Zaki et al. 2012). De nouveaux cas sont encore identifiés et au 12 août 2017, 2066 cas ont été référencés dont 720 décès dans 27 pays (World Health Organization 2017). Le réservoir naturel de ces deux virus est la chauve-souris, et ils furent d'abord transmis à des civettes pour le SARS-CoV, et à des dromadaires pour le MERS-CoV avant d'être transmis à l'homme (W. Li et al. 2005; Zumla et al. 2015) dont l'infection va principalement se traduire (pour les deux virus) par une fièvre, une toux, des maux de tête et plus rarement par une diarrhée, des vomissements et une nausée. Dans de rares cas, les voies respiratoires inférieures peuvent être infectées et induire des syndromes respiratoires pouvant mener au décès (de Wit et al. 2016).

L'intérêt renouvelé pour les coronavirus suite à l'émergence du SARS-CoV permit l'identification de deux autres coronavirus humains : HCoV-NL63 fût isolé d'un enfant souffrant

d'une bronchite et d'une pneumonie en Hollande en 2004 (Fouchier et al. 2004; van der Hoek et al. 2004), et HCoV-HKU1 d'un adulte présentant une maladie pulmonaire chronique à Hong-Kong en 2005 (Woo et al. 2005).

Les quatre coronavirus humains (HCoV-229E, -OC43, -HKU1 et -NL63) représentent tous des virus circulants partout dans le monde avec des pics saisonniers pendant l'année et existant sous différents génotypes (Vabret et al. 2009; Dominguez et al. 2012; Gerna et al. 2006; Lau et al. 2006; Gaunt et al. 2010). Ces coronavirus infectent principalement les voies respiratoires supérieures y provoquant des rhinites, laryngites ou otites, mais peuvent également infecter les voies respiratoires inférieures chez certaines populations vulnérables (nouveau-nés, personnes âgées et patients immunodéprimés) menant à des bronchites, pneumonies ou au syndrome de détresse respiratoire (Vabret et al. 2009). Une partie des patients infectés montrent une co-infection avec d'autres virus respiratoires tels que le virus respiratoire syncytial humain et le rhinovirus/entérovirus (Gaunt et al. 2010; Lepiller et al. 2013), bien que cette co-infection ne semble pas avoir d'effet sur l'état clinique des patients en comparaison à des patients infectés uniquement par les coronavirus ou par d'autres virus respiratoires (Gaunt et al. 2010). De plus, historiquement, ces coronavirus furent associés à des maladies autres que respiratoires telles que des myocardites, méningites (Riski et al. 1980) et des diarrhées sévères (Gerna et al. 1985; Resta et al. 1985).

1.5 Les coronavirus : des virus respiratoires neuroinvasifs, neurotropes et neurovirulents

Comme précédemment mentionné, les coronavirus sont des virus opportunistes, et sont capables de se disséminer hors des voies respiratoires pour aller vers le système digestif, le foie, le rein et le SNC (Gu et al. 2005; Riski et al. 1980; Arbour et al. 2000; Yuanyuan Li et al. 2017). En effet, la détection d'ARN viral dans des échantillons de cerveaux de patients sains ou atteints de maladies neurologiques a montré que les coronavirus -OC43 et -229E sont naturellement neuroinvasifs et qu'ils peuvent potentiellement établir une infection persistante dans le SNC des patients infectés (Arbour et al. 2000). Le neurotropisme (capacité à infecter les cellules résidentes du SNC) a été validé à l'aide de lignées cellulaires neuronales humaines, de cellules primaires humaines et de modèles murins susceptibles à l'infection par les HCoV-OC43 et -229E (Bonavia et al. 1997; Arbour, Côté et al. 1999; Arbour, Ekandé et al. 1999; Jacomy et al. 2006).

Malgré la détection de matériel viral dans le SNC humain, l'association entre l'infection du SNC et le développement de maladies neurologiques reste circonstancielle. À ce jour, HCoV-OC43 fut détecté dans le LCR d'un enfant souffrant d'une encéphalomyélite disséminée aiguë (Yeh et al. 2004), et a été très fortement associé à un cas d'encéphalite fatale chez un nouveau-né où du matériel génétique et des protéines de HCoV-OC43 furent détectés dans le cerveau du patient (Morfopoulou et al. 2016). De plus le virus du SRAS a été détecté dans le cerveau de patients décédés montrant des signes de dégénérescence (Gu et al. 2005; Xu et al. 2005), et trois patients dont les voies respiratoires étaient infectées par le virus du MERS présentaient des symptômes neurologiques sévères, voire fatals, suggérant ainsi une possible implication du MERS-CoV dans le développement de neuropathologies (Arabi et al. 2015).

Des études en modèle murin ont permis d'établir que HCoV-OC43 peut induire le développement de maladies neurologiques, c'est-à-dire qu'il est neurovirulent (Brison et al. 2014; Brison et al. 2011; Jacomy et al. 2010; Jacomy et al. 2006; Jacomy et al. 2003). De l'ARN viral fut détecté dans le cerveau des souris ayant survécu à l'encéphalite induite par la phase aiguë de l'infection pendant au moins un an et 30% de ces souris présentaient des réflexes anormaux et une réduction de la taille de leur hippocampe associée à une perte neuronale (Jacomy et al. 2006). De plus, l'insertion de mutations identifiées dans la glycoprotéine de surface virale S de virus ayant établis une infection persistante en culture de cellules neurales, menât au développement d'une paralysie des membres postérieurs des souris infectées en plus de l'encéphalite. Cette paralysie fut associée à une excitotoxicité glutamatergique et à une démyélinisation des neurones (Brison et al. 2011; Jacomy et al. 2010). Il fut récemment démontré que certaines de ces mutations présentes dans la protéine S modulent la neurovirulence de HCoV-OC43 en le rendant plus ou moins agressif (Le Coupanec et al. 2015; Meessen-Pinard et al. 2017). Compte tenu de l'aspect neuroinvasif et neurotrope de HCoV-OC43 démontré chez l'homme, de l'aspect neurovirulent chez la souris, et de sa prévalence dans le monde, aussi bien chez des patients sains que chez des patients atteints de maladies neurologiques, il est possible que l'infection du SNC par HCoV-OC43 puisse mener ou participer au développement de maladies neurologiques chez des individus prédisposés (Arbour et al. 2000).

2 ORGANISATION DU GÉNOME DES CORONAVIRUS, CYCLE RÉPLICATIF ET FACTEUR DE VIRULENCE

2.1 Organisation du génome et cycle de réplication

Avec son génome de 27-32 kb, la famille des coronavirus représente les plus gros virus à ARN monocaténaire à polarité positive (de Groot et al. 2012). Ce dernier est polycistronique et comporte au moins 6 cadres de lecture ouverts (*Open Reading Frame*, ORF) encadrés de régions non traduites (*Untranslated Regions*, UTRs) en 5' et 3' (Figure 2-1) produisant un ensemble d'ARNs messagers (ARNm) sous-génomiques. Les deux tiers du génome à l'extrémité 5' encode les gènes du complexe de réplicase incluant les ORF1a et ORF1b. Ces deux ORFs mènent à la production de deux polyprotéines : pp1a à partir de l'ORF1a, et pp1a/b à partir des ORF1a et ORF1b par changement ribosomique de cadre de lecture (Sola et al. 2015). Ces deux polyprotéines sont coupées par autoprotéolyse afin de former 15-16 protéines non structurales (*Non Structural Protein*, nsp) impliquées dans la réplication du génome viral et dans la production d'ARNm sous-génomiques. Le tiers restant du génome en 3' encode les protéines structurales et accessoires telles que la glycoprotéine de surface S, la protéine de membrane M, la nucléocapside N, la protéine d'enveloppe E, l'hémagglutinine-estérase HE, et un nombre variable de protéines accessoires. Les gènes de ces protéines accessoires sont intercalés entre les gènes des protéines structurales, leurs nombre et disposition sont dépendants de la souche de coronavirus, et elles ne sont généralement pas requises pour la réplication en culture cellulaire, mais joue un ou des rôles dans le processus de pathogenèse et la virulence des virus (Ding Xiang Liu et al. 2014).

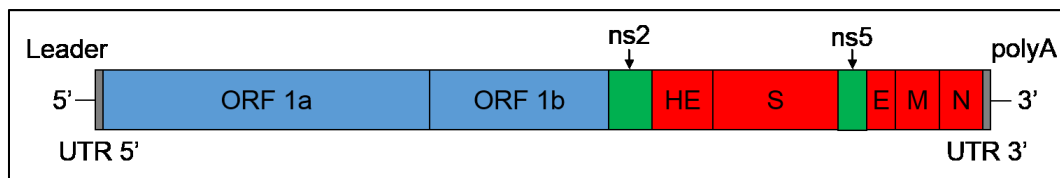


Figure 2-1 Organisation génomique des coronavirus basée sur la souche OC43. Les gènes non structuraux des ORF1a/1b (complexe réplicase) sont représentés en bleu, les gènes structuraux en rouge, et les gènes accessoires en vert. UTR, *untranslated region*, région non traduite; ORF, *open reading frame*, cadre de lecture ouverte; ns, non structural; HE, hémagglutinine-estérase (uniquement chez certains β -coronavirus de la lignée A); S, *spike*, surface; E, enveloppe; M, membrane; N, nucléocapside. Adapté de St-Jean et al, 2006.

La première étape du cycle de réplication virale est l'entrée de la particule virale dans la cellule. Cette étape cruciale implique la liaison de la protéine S en surface du virion avec un récepteur cellulaire (F. Li 2016). La protéine S est sous forme de trimère dans le virion et est composée de deux domaines S1 et S2 impliqués à différents niveaux dans l'entrée dans la cellule. Le domaine S1 est responsable de la liaison au récepteur et du tropisme cellulaire du virus, et le domaine S2 a pour rôle d'enclencher la fusion de l'enveloppe du virion avec la membrane cellulaire (F. Li 2016). De plus, certains β -coronavirus de la lignée A possèdent une protéine HE contenant un domaine de liaison aux lectines permettant aux virions de se fixer sur des acides sialiques O-acétylés (Langereis et al. 2010). Dépendamment des coronavirus, l'entrée peut se faire soit par fusion directe à la surface, soit par endocytose suite à quoi le matériel génétique du virus sera relâché dans le cytoplasme de la cellule infectée (F. Li 2016).

Suivant l'entrée de la particule virale dans la cellule, l'ARN viral monocaténaire de polarité positive est relâché dans le cytoplasme de la cellule où la réplication va avoir lieu (Figure 2-2). Comme tous les virus, les coronavirus dépendent de la machinerie de la cellule hôte afin de produire les protéines virales et les nouveaux virions. Suite à la traduction des ORF1a et ORF1b en deux polyprotéines pp1a et pp1a/b, des protéases virales coupent ces deux polyprotéines afin d'obtenir l'ensemble des composants nécessaires à l'assemblage du complexe de réplication viral qui va ainsi produire un brin de sens négatif qui servira de modèle pour la synthèse de l'ARN génomique viral (Sawicki et al. 2007; Sola et al. 2015). De plus, une série d'ARNm sous-génomiques sont synthétisés par transcription discontinue à partir du brin d'ARN viral de sens positif, et serviront à la synthèse d'ARNm sous-génomiques qui seront par la suite traduits en protéines virales. Lorsqu'assez d'ARN génomique et de protéines virales ont été synthétisés, l'assemblage des particules virales s'enclenche.

La protéine de membrane M est le principal facteur contrôlant l'assemblage des virions qui se forment dans la lumière du compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (*endoplasmic reticulum-Golgi intermediary compartment*, ERGIC) (Siu et al. 2008). La nucléocapside N et l'ARN génomique vont s'assembler dans le cytoplasme et vont se relocaliser au lumen de l'ERGIC sous la forme d'une nucléocapside hélicoïdale. Le complexe protéine N-ARN génomique va s'associer à l'enveloppe virale formée des protéines M, S, E et HE (si présente) par l'intermédiaire d'une interaction avec la protéine M formant ainsi un virion (Siu et al. 2008; Masters 2006). Ces virions vont ensuite être redirigés vers la membrane plasmique de la cellule par exocytose des vésicules les contenant, et seront relâchés dans le milieu

extracellulaire par fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique (Siu et al. 2008; Masters 2006).

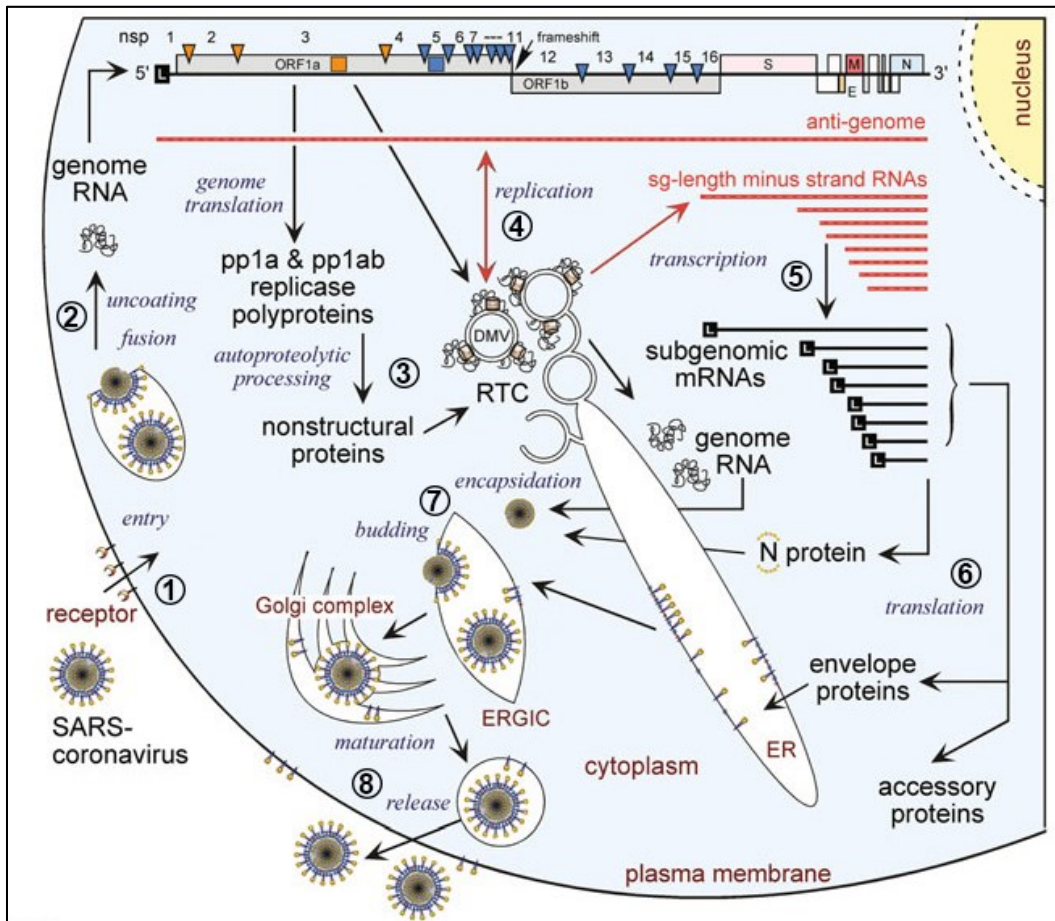


Figure 2-2 Schéma du cycle de réplication des coronavirus. Suite à l'entrée d'une particule virale dans une cellule après liaison à son récepteur (1), le génome viral est décapsidé dans le cytoplasme (2), et est initialement traduit pour produire les protéines non-structurales afin de former le complexe répliqueuse (3). Ce complexe génère un brin de sens négatif servant à répliquer le génome viral (4), ainsi qu'une série de copies sous-génomiques permettant la synthèse d'ARNm (5), et donc des protéines virales (6). Lorsqu'assez de copie du génome viral et des protéines structurales ont été produites, le processus d'assemblage s'initie afin de former de nouvelles particules virales infectieuses. Contrairement à la majorité des virus à ARN bourgeonnant à la membrane plasmique des cellules infectées, les particules virales des coronavirus sont assemblées dans le compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (ERGIC) (7) avant d'être relâchées par exocytose (8). Image adaptée de De Wilde et al, 2017.

2.2 Les protéines du coronavirus

L'ensemble des protéines encodées par le génome des coronavirus jouent des rôles différents menant à la production de particules pléiomorphes infectieuses mesurant entre 120 et 160 nm, ou au développement de pathologies chez les différents hôtes infectés. Ces protéines sont classifiées en 3 groupes en fonction de leurs rôle : les protéines formant les virions sont dites protéines structurales, les protéines qui ne sont pas incorporées aux virions, mais qui jouent un rôle direct ou indirect lors de la réplication ou l'assemblage du virus sont appelées protéines non structurales, et les protéines non nécessaires à la réplication en culture cellulaire mais jouant un rôle *in vivo* notamment sur le développement de pathologies sont qualifiées de protéines accessoires.

2.2.1 Protéines structurales

L'ensemble des coronavirus ont conservés les quatre mêmes protéines structurales, c'est-à-dire la protéine S, M, E et N. Seuls quelques β -coronavirus de la lignée A, tel que HCoV-OC43, possèdent une cinquième protéine structurale : la protéine HE.

2.2.1.1 La glycoprotéine de surface S

La glycoprotéine de surface S est une grande protéine d'environ 1100 à 1500 acides aminés présente sous forme d'homotrimères dans l'enveloppe des virions ce qui leur procure leur forme caractéristique de « couronne » (Belouzard et al. 2012). La protéine S des coronavirus est une protéine N-exo, C-endo transmembranaire de type 1 dont la principale fonction est de permettre l'entrée du virus dans la cellule cible par attachement et fusion à la membrane plasmique (Masters 2006). Cette protéine est hautement glycosylée et est coupée en deux domaines S1 et S2, où S1 contient le domaine de liaison au récepteur cellulaire et S2 est responsable de la fusion à la membrane cellulaire (Ujike et al. 2015; Masters 2006). La région S1 varie grandement entre les différentes souches de coronavirus apportant ainsi la grande variété de tropisme d'organes des coronavirus alors que la région S2 semble plus conservée (Masters 2006). Cette protéine a été identifiée comme un facteur de virulence majeur des coronavirus (discuté à la section 2.3)

2.2.1.2 *La protéine de membrane M*

La protéine M est la protéine structurale la plus abondante dans l'enveloppe des coronavirus et est responsable de la formation de l'enveloppe des virions. Cette protéine d'environ 220-260 acides aminés possède un court ectodomaine suivi de trois domaines transmembranaires et d'un long domaine C-terminal partiellement associé à la membrane (Jimenez-Guardeño et al. 2015; Masters 2006; Ujike et al. 2015). Malgré la faible homologie de séquence entre les protéines M des différents coronavirus, leurs structures et fonctions restent conservées, et dépendamment de la souche de coronavirus, l'ectodomaine de la protéine M est N- ou O-glycosylée. La fonction de cette glycosylation reste à déterminer. La protéine M joue un rôle important dans la morphogénèse du virus et joue un rôle important dans l'assemblage et la maturation des particules virales en interagissant avec différents facteurs viraux tels que la protéine N, S et E (Masters 2006; Siu et al. 2008; S. C. Chen et al. 2009; Ujike et al. 2015).

2.2.1.3 *La nucléocapside N*

Le principal rôle de la protéine N consiste à emballer l'ARN génomique viral afin de former un long et flexible complexe protégeant le génome du coronavirus et lui permettant d'être inclus dans les virions par interaction entre les protéines M et N (McBride et al. 2014). Cependant, l'encapsulation du génome viral n'est pas le seul rôle de cette protéine multifonctionnelle. En effet, cette protéine de 349 à 470 acides aminés est également impliquée dans la régulation de la synthèse d'ARN génomique ainsi que de la transcription et traduction en interagissant avec les ARN génomique et sous-génomiques. La protéine N est également une chaperonne d'ARN aidant au repliement des acides nucléiques, elle est capable de déréguler la réponse cellulaire de l'hôte en stoppant le système de traduction de la cellule à l'avantage du virus, en inhibant la production d'interféron de type I impliqué dans la réponse immunitaire et en interférant dans différentes voies de signalisation cellulaire (McBride et al. 2014).

2.2.1.4 *La protéine Hémagglutinine-Estérase HE*

Certains β -coronavirus tels que les coronavirus humains HCoV-OC43, HCoV-HKU1, le coronavirus bovin BCoV et certaines souches du coronavirus murin MHV possèdent un gène supplémentaire permettant l'expression d'une protéine Hémagglutinine-Estérase, HE. Cette protéine d'environ 400 acides aminés est une autre glycoprotéine de surface plus petite que la protéine S menant à la formation d'une seconde couche de la « couronne » caractéristique des coronavirus (De Groot 2006). Cette protéine transmembranaire de type I contient un domaine

transmembranaire à son extrémité C-terminale et un ectodomaine N-terminal étant glycosylé, et menant à la dimérisation de cette protéine avant d'être incorporée dans l'enveloppe des virions (de Haan et al. 2005). Agissant comme une sialate-O-acetyl-esterase, la protéine HE permet aux virions de certaines souches de s'attacher réversiblement aux acides sialiques O-acétylés augmentant le tropisme cellulaire de certains coronavirus possédant cette protéine (de Haan et al. 2005; Huang et al. 2015; Bakkers et al. 2017). De plus il a été récemment démontré que la protéine HE de HCoV-OC43 ne se lie pas aux acides sialiques O-acétylés, mais est un facteur viral critique pour la réplication du virus en culture cellulaire permettant également une meilleure dissémination du virus (Desforges et al. 2013; Bakkers et al. 2017), et que la protéine HE de la souche MHV-JHM renforce la neurovirulence de ce dernier (Kazi et al. 2005), bien que l'expression de la protéine HE pour la souche MHV-A59 ne lui soit pas bénéfique et qu'elle soit éliminée lors de passages successifs (Lissenberg et al. 2005) montrant que la fonction de la protéine HE reste à déterminer avec plus de précision.

2.2.1.5 La protéine d'enveloppe E

La protéine d'enveloppe E est une petite protéine transmembranaire de type I de 76-106 acides aminés présente chez tous les coronavirus. Bien que les protéines E ne présentent pas une grande homologie de séquence, plusieurs études suggèrent que la structure secondaire de la protéine est conservée et est plus importante pour les fonctions de la protéine E que la séquence en acides aminés à proprement parlé (Cohen et al. 2011; Kuo et al. 2007). Ainsi une structure unique a été identifiée pour la protéine E : un court domaine hydrophobe à l'extrémité N-terminale suivi d'un domaine transmembranaire (TMD) et d'un large domaine hydrophile à son extrémité C-terminale représentant une grande partie de la protéine et se terminant sur une séquence consensus d'un motif de liaison aux domaines PDZ (*PDZ Binding Motif*, PBM) (Jimenez-Guardeño et al. 2014; Ruch et al. 2012a). Bien que la protéine E soit exprimée en grande quantité dans les cellules infectées, seulement une très petite quantité de protéine est incorporée dans les particules virales (Maeda et al. 2001). En effet, chaque virion possède environ 20 copies de la protéine E contre environ 400 et 6000 copies pour les protéines S et M respectivement (Godet et al. 1992). Cependant la protéine E s'est vu attribuée des fonctions variées allant d'un rôle dans la formation et la maturation des virions (de Groot et al. 2012) à un rôle de facteur de virulence lors de l'infection notamment pour le SARS-CoV (DeDiego et al. 2014). En effet, de par ses deux domaines fonctionnels TMD et PBM (Figure 2-3), la protéine E pourrait agir comme une viroporine (protéine virale formant des canaux ioniques) ou détourner des fonctions cellulaires en interagissant avec des protéines cellulaires possédant un PDZ (DeDiego

et al. 2014). Les différentes fonctions de la protéine E des coronavirus seront approfondies dans le chapitre 3.

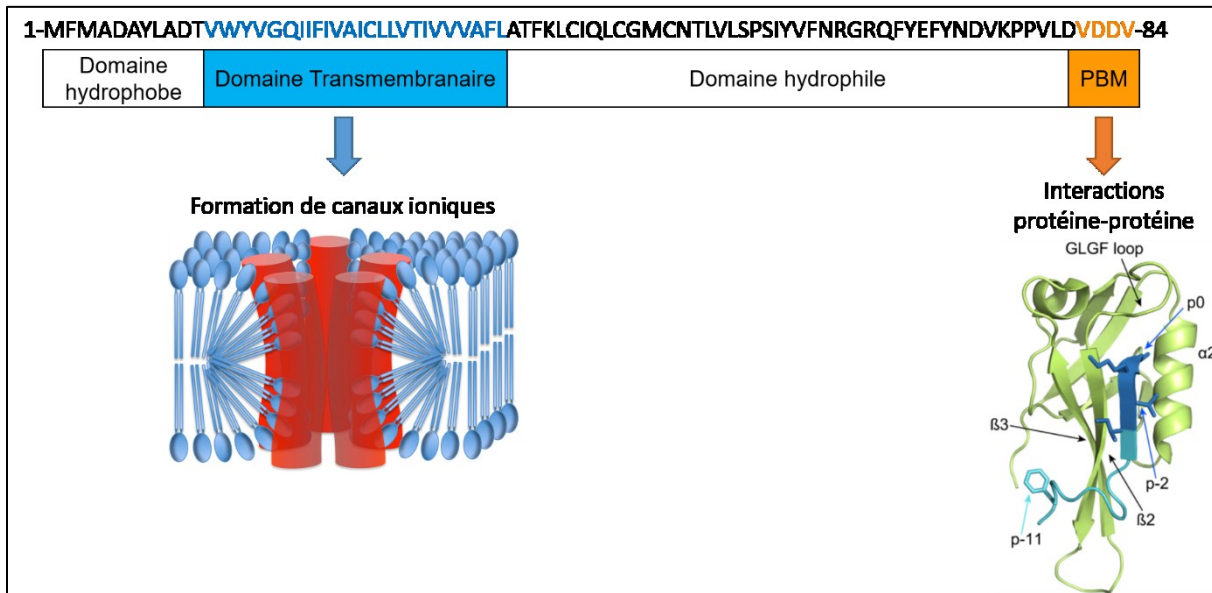


Figure 2-3 Structure de la protéine d’enveloppe des coronavirus basée sur la souche OC43. La séquence d’acide aminé de la protéine E de la souche OC43 est indiquée au dessus du schéma représentant la structure commune de la protéine E des coronavirus. Cette protéine possède deux domaines structuraux : un domaine transmembranaire (bleu), et un motif d’interaction protéine-protéine de type PBM (orange). La protéine E est capable de former des canaux ioniques par homo-pentamérisation autour du domaine transmembranaire (en rouge dans le schéma) et insertion dans une membrane lipidique, permettant le transfert d’ions entre deux compartiments cellulaires. Schéma tiré de DeDiego et al, 2014. Le motif PBM (en bleu dans le schéma) permet à la protéine E d’interagir des domaines PDZ d’autres protéines (en vert dans le schéma) permettant d’interférer avec différents processus cellulaires. Schéma tiré de Caillet-Saguy et al, 2015.

2.2.2 Protéines non structurales

Suite au clivage de leurs polyprotéines pp1a et pp1a/b, les coronavirus expriment 15 ou 16 protéines non structurales (Sawicki et al. 2007) ayant des fonctions variées telles que l’ARN polymérase, la méthyltransférase qui ajoute la coiffe méthylée à l’extrémité 5’ du génome ou encore quelques protéases qui clivent plusieurs protéines précurseurs. Les fonctions de quelques-unes de ces protéines non structurales sont détaillées ci-dessous.

La protéine nsp12 comporte le cœur de l’ARN polymérase ARN-dépendante qui est responsable de la répllication du génome viral et de la synthèse des ARN sous-génomiques à partir d’un brin de polarité négative intermédiaire. Cette synthèse d’ARN viral par nsp12 est

dépendante de la présence d'amorces qui sont générées par la protéine nsp8 qui elle aussi possède une fonction d'ARN polymérase ARN-dépendante. De plus, nsp12 forme un complexe avec l'hélicase nsp13 afin de dérouler les acides nucléiques et permettre la synthèse de nouveaux brins d'ARN. De par ses propriétés de NTPase, dNTPase et 5' triphosphatase, il a été suggéré que nsp8 participe également au coiffage du génome et des ARNm. La protéine nsp1 peut se lier à l'ARN et semble jouer un rôle dans la régulation de la traduction ou de la réplication du génome viral. De plus, les protéines nsp1 de différents coronavirus peuvent interférer avec le cycle cellulaire, menant à un arrêt du cycle dans la phase G0/G1 et à une baisse de la prolifération cellulaire. La protéine nsp3 est une protéine multifonctionnelle de par les nombreux domaines qu'elle possède. Nsp3 possède un ou deux domaines de protéase de papaine (*papain-like protéase*, PLP) dépendamment de la souche de coronavirus permettant le clivage des polyprotéines pp1a et pp1a/b, ainsi qu'un macro-domaine ADP-ribose 1'-phosphatase qui est impliqué dans la résistance à l'interféron de type 1. La protéine nsp14 possède un domaine d'exonucléase jouant un rôle important dans la transcription et la réplication de l'ARN viral en contribuant à la grande fidélité de la synthèse d'ARN viral comparé à la majorité des virus à ARN. De même, la protéine nsp15 possède un domaine d'endonucléase facilitant la synthèse optimale d'ARN viral, mais n'y étant pas essentielle. Enfin la protéine nsp16 joue un rôle important avec l'aide de nsp14 dans la formation de la coiffe des ARNs, permettant aux ARNs coiffés d'échapper à leur détection par les PRRs, aidant par le fait la propagation de l'infection. Plusieurs de ces protéines non structurales sont également impliquées dans différentes voies d'inhibition de la réponse à l'interféron de type 1. En effet, les protéines nsp1 du SARS-CoV et nsp3 du SARS-CoV et du MHV sont capables de bloquer à différents niveaux la voie de réponse à l'interféron de type 1 (S. R. Weiss et al. 2011).

2.2.3 Protéines accessoires

Tous les coronavirus possèdent en plus de leurs protéines structurales et non structurales une combinaison de protéines accessoires ne jouant pas de rôle dans la réplication en culture cellulaire, mais ayant des impacts *in vivo* sur le développement de pathologies. Dépendamment des coronavirus, ces derniers peuvent avoir de une (PEDV et HCoV-NL63) à huit (SARS-CoV) protéines accessoires dont les gènes sont intercalés entre ceux des protéines structurales (Masters 2006). La majorité de ces protéines accessoires sont connues pour interférer avec la réponse de l'hôte à l'interféron de type 1. En effet les protéines ns2 du coronavirus murin MHV et du coronavirus humain OC43 possèdent un domaine phosphodiesterase et bloque l'activation du

système 2',5'-oligoadenylate synthétase (OAS)/RNase L lié à la voie de réponse à l'interféron de type 1, empêchant ainsi la dégradation de l'ARN viral (Zhao et al. 2012; Goldstein et al. 2017). De même, la protéine ns5 de MHV apporte une protection contre la réponse antivirale induite par l'interféron de type 1, bien que le mécanisme d'action ne soit pas encore connu (Koetzner et al. 2010). De plus, les protéines ns2 et ns5 de HCoV-OC43 sont capables de moduler la neurovirulence de ce dernier chez la souris comme l'a montré l'utilisation de virus *knock-out* pour ces protéines (Desforges et al. 2014) en partie dû à la nature possible de viroporine de ns5 (Zhang et al. 2015). La protéine encodée par l'orf6 du SARS-CoV inhibe la voie de réponse à l'interféron en inhibant le transport de certains facteurs tels que STAT1 au noyau, empêchant l'expression des gènes stimulés par l'interféron (Frieman et al. 2007). La protéine encodée par l'orf3b est également impliquée l'inhibition de l'expression de l'interféron (Kopecky-Bromberg et al. 2007), ainsi que dans l'induction d'apoptose et de nécrose dans les cellules infectées (Khan et al. 2006). Cependant il est important de noter que ces études sur le virus SARS-CoV ont été réalisées en surexprimant les protéines et non en contexte d'infection. Les protéines accessoires 4a et 4b du MERS-CoV peuvent également interférer avec la voie de réponse de l'interféron en se liant à l'ARN viral empêchant leur reconnaissance par des PRRs (Niemeyer et al. 2013), ou en inhibant la production d'interféron de type 1 ou sa réponse (Matthews et al. 2014; Thornbrough et al. 2013).

En plus des protéines accessoires, la glycoprotéine de surface S des coronavirus représente un facteur de virulence majeur. Le rôle de la protéine S a été étudié en profondeur, et bien que tous les mécanismes impliqués ne soient pas encore établis, plusieurs de ses fonctions sont déjà bien documentées.

2.3 La glycoprotéine de surface S : un facteur de virulence majeur

La protéine S de MHV est déterminante pour le tropisme du virus et pour le développement de la pathologie dans le foie et le cerveau (Navas et al. 2001; Navas et al. 2003; Iacono et al. 2006). Il a été montré qu'une simple mutation à la position 310 est responsable d'une différence importante de neurovirulence entre les souches JHM.SD (souche agressive) et JHM.IA (souche atténuée) de MHV (Ontiveros et al. 2003), et qu'une autre mutation à la position 159 réduit la capacité de la souche A59 à infecter le foie et à induire une démyélinisation dans le cerveau (Leparc-Goffart et al. 1997; Leparc-Goffart et al. 1998), indiquant que la protéine S est responsable du tropisme hépatique et neural ainsi que de la virulence spécifique de certaines

souches de MHV. De même, la protéine S de la souche MHV-1 est responsable de la pneumovirulence bien qu'elle ne soit pas suffisante pour induire la totalité des symptômes (Leibowitz et al. 2010). De plus, la protéine S du coronavirus aviaire joue également un rôle important dans le tropisme et la pathogenèse de ce dernier. En effet, la délétion d'une partie du gène S ou l'incorporation du gène S d'une souche dans le génome d'une autre mène souvent à la génération de virus non pathogène (Armesto et al. 2011; Hodgson et al. 2004; Wei et al. 2014). La protéine S du coronavirus humain OC43 représente également un facteur de virulence important lors de l'infection du SNC. En effet, l'insertion de mutations identifiées dans le gène S, suite à une infection persistante de cellules neurales humaines, mène à la génération de différents virus mutants de virulence variée. Dépendamment des mutations insérées, l'infection du SNC murin par ces virus mène au développement de pathologies neurologiques de sévérité variable et associées pour certains à une paralysie des membres postérieurs (Brison et al. 2011; Jacomy et al. 2010; Meessen-Pinard et al. 2017; Le Coupanec et al. 2015). De plus ces mutations ont été associées au développement d'une excitotoxicité glutamatergique (Brison et al. 2011), d'une réponse aux protéines mal repliées (*unfolded protein response*, UPR) (Favreau et al. 2009), d'une augmentation de la mort cellulaire suite à l'infection de cellules neurales murines et humaines (Meessen-Pinard et al. 2017) et d'une démyélinisation des neurones du SNC murin (Jacomy et al. 2010).

Toutes ces études démontrent l'importance de la protéine S pour la virulence des coronavirus en faisant un déterminant majeur dans la pathogenèse et une cible d'intérêt pour le développement de thérapies. Cependant, depuis quelques années, une autre protéine structurale des coronavirus est mise de l'avant comme étant un facteur de virulence important. Ce facteur est la protéine d'enveloppe (E) du coronavirus et sera discuté plus en détail dans le chapitre suivant.

3 LA PROTÉINE D'ENVELOPPE DU CORONAVIRUS

3.1 Caractéristiques

L'essentiel des connaissances concernant la protéine E des coronavirus a été obtenu suite à l'étude des coronavirus MHV, IBV, TGEV et SARS-CoV. À ce jour, aucune donnée concernant les coronavirus humains circulants n'est disponible. L'objectif de cette revue de littérature est d'établir un contexte introduisant et guidant le projet de cette maîtrise concernant la caractérisation de l'importance de la protéine E de HCoV-OC43 lors de l'infection du SNC et son potentiel lien avec le développement de maladies neurologiques.

3.1.1 Structure

La protéine E des coronavirus est une petite protéine structurale de 76 à 106 acides aminés (84 pour HCoV-OC43) présente chez tous les coronavirus (de Groot et al. 2012), mais qui fut identifiée tardivement comme protéine structurale d'abord chez IBV (D. X. Liu et al. 1991), puis chez TGEV (Godet et al. 1992) et MHV (Yu et al. 1994). Bien que la protéine E présente moins de 30% d'homologie de séquence entre les différents coronavirus (Ruch et al. 2012a), il a été suggéré que toutes les protéines E présentent la même structure secondaire, et que cette dernière est importante pour les différentes fonctions de cette protéine (Cohen et al. 2011; Kuo et al. 2007). La protéine E est constituée d'une courte région N-terminale hydrophile de 8 à 12 acides aminés, suivi d'une région hydrophobe de 21 à 29 acides aminés qui a été identifiée comme un domaine transmembranaire (Torres et al. 2005), et se termine par une grande région hydrophile de 39 à 76 acides aminés comportant un motif d'interaction protéine-protéine appelé PBM (*PDZ Binding Motif*) (Jimenez-Guardeño et al. 2014; Teoh et al. 2010).

3.1.2 Localisation

Contrairement aux autres virus enveloppés dont les virions se forment à la membrane plasmique de la cellule infectée, les virions des coronavirus se forment dans la zone ERGIC des cellules, et les vésicules les contenant sont ensuite transportées jusqu'à la membrane plasmique de la cellule hôte où la cellule va libérer les nouveaux virions formés par exocytose (Klumperman

et al. 1994; Krijnse-Locker et al. 1994). Une des particularités de la protéine E est qu'elle est très peu présente dans les virions formés, même si elle est exprimée en grande quantité dans les cellules infectées où elle se localise au sein du Réticulum Endoplasmique (RE), dans la zone ERGIC et dans l'appareil de Golgi. En effet l'étude de la localisation cellulaire de la protéine E de la souche A59 de MHV a montré que durant l'infection, la protéine E co-localise avec des marqueurs de la zone ERGIC et de l'appareil de Golgi (Venkatagopalan et al. 2015). De plus, cette étude a démontré par immunofluorescence que la protéine E reste au sein de la zone ERGIC et de l'appareil de Golgi durant toute l'infection, et qu'elle ne migre pas à la membrane plasmique contrairement aux autres protéines virales M et S. Une précédente étude utilisant la même souche a également pu mettre de l'avant que la protéine E est localisée dans la région pré-Golgi en montrant une co-localisation entre la protéine E et Rab-1 (un marqueur du RE et de la zone ERGIC) (Raamsman et al. 2000). De même, plusieurs études ont démontré que la protéine E d'IBV est localisée dans la région pré-Golgi et dans l'appareil de Golgi par immunofluorescence (Corse et al. 2000; Lim et al. 2001).

La localisation cellulaire de la protéine E du SARS-CoV a principalement été étudiée à l'aide de systèmes d'expression de la protéine E couplée à différentes étiquettes. Ces études ont ainsi pu montrer que la protéine E est localisée dans le RE, la zone ERGIC et l'appareil de Golgi (Álvarez et al. 2010; Liao et al. 2006; L. A. Lopez et al. 2006; Nieto-Torres et al. 2011; Teoh et al. 2010). Cependant, ces études présentent de légères variations de localisation qui pourraient être causées par une interférence des étiquettes ajoutées à la protéine E empêchant son transport efficace dans le RE ou en bloquant des interactions avec des protéines cellulaires essentielles à sa relocalisation (Cohen et al. 2011). L'équipe de Machamer a pu montrer, en exprimant la protéine E sans étiquette, que cette dernière est localisée dans la zone cis- de l'appareil de Golgi (Cohen et al. 2011). Toutes ces données indiquent que la protéine E est localisée dans l'ER, la zone ERGIC et l'appareil de Golgi en montrant des différences en fonction de l'espèce virale et des cellules utilisées.

Afin d'identifier les régions de la protéine E responsables de cette localisation, l'équipe de Machamer a utilisé un système permettant l'expression de diverses protéines chimériques comportant une partie de la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) et une autre partie de la protéine E d'IBV. Ainsi cette équipe a pu mettre en évidence une région dans la partie cytoplasmique de la protéine située entre les acides aminés 13 et 63, responsable de la localisation de la protéine E dans l'appareil de Golgi (Corse et al. 2002). De plus, cette équipe a

montré que le domaine transmembranaire de la protéine E d'IBV n'est pas requis pour la localisation de cette protéine au sein de l'appareil de Golgi. Cependant, il est intéressant de noter que l'importance du domaine transmembranaire et de la partie cytoplasmique de la protéine E pour sa localisation intracellulaire n'ont pas été étudiés dans le même environnement. En effet, là où l'importance de la partie cytoplasmique a été étudiée en exprimant que cette portion de la protéine E, l'importance du domaine transmembranaire a été étudiée en remplaçant ce domaine par le domaine transmembranaire de VSV-G dans la protéine E entière. Cette façon de faire pour étudier le domaine cytoplasmique pourrait introduire un biais ne permettant donc pas de conclure formellement sur le rôle joué par ce domaine dans la localisation de la protéine E au sein de l'appareil de Golgi. De plus, dans une étude portant sur la localisation intracellulaire de la protéine E du SARS-CoV, l'équipe de Machamer a démontré en utilisant le même système d'expression de protéines chimériques, que non seulement la partie cytoplasmique comporte une région responsable de la localisation de la protéine E dans l'appareil de Golgi, mais que sa portion N-terminale, incluant le domaine transmembranaire, est également capable de localiser la protéine E dans cet organite (Cohen et al. 2011). Lorsque la protéine E entière est exprimée dans des cellules Hela et que des mutations sont introduites dans sa partie cytoplasmique elle reste localisée dans l'appareil de Golgi, indiquant qu'une autre région (hors de la portion cytoplasmique) est capable d'induire cette localisation. De plus, dans cette étude, la structure secondaire de la région responsable de la localisation de la protéine E dans sa partie cytoplasmique a été prédite par bio-informatique comme étant une épingle β formée autour d'une proline conservée au sein des coronavirus (Cohen et al. 2011). Cette structure a également été prédite pour plusieurs β - et γ -coronavirus mais pas pour les α -coronavirus tels que HCoV-229E et TGEV. En effet, les parties cytoplasmiques des protéines E de MHV et de IBV pourraient former cette structure secondaire, et sont suffisantes pour induire la localisation de la protéine E dans l'appareil de Golgi (Cohen et al. 2011).

L'équipe de Machamer suggère que cette multiplicité de régions responsables de la localisation de la protéine E dans l'appareil de Golgi pourrait être un mécanisme évolutif assurant que la protéine γ soit bien localisée ou pourrait être utilisée par différentes populations de la protéine E qui auraient des rôles distincts (Cohen et al. 2011). De plus, une récente étude confirme que la protéine E du SARS-CoV possède au moins une deuxième région de localisation en dehors de l'épingle β dans sa partie cytoplasmique. En effet, suite à la délétion de différentes portions de la partie cytoplasmique, les protéines recombinantes étaient encore toutes localisées dans l'appareil de Golgi (Regla-Nava et al. 2015). Une récente étude structurale de la protéine E a mis

en évidence que, bien que la portion C-terminale de cette protéine soit capable de former d'elle-même l'épingle β préalablement prédite, lorsque la protéine entière est exprimée, cette portion forme en très grande partie une hélice α (Yan Li et al. 2014). Dans cette condition, la structure secondaire d'épingle β ne serait présente qu'en faible proportion, et existerait en équilibre dynamique avec la structure d'hélice α (Yan Li et al. 2014), ce qui appuie l'hypothèse de la présence de deux populations distinctes de protéine E en cellule.

3.1.3 Topologie

La protéine E des coronavirus est une protéine transmembranaire dont la topologie exacte reste encore à déterminer. En effet, de nombreuses études sur les protéines E de différents coronavirus semblent indiquer que la topologie de la protéine E est dépendante de l'espèce coronavirale. Lorsque la protéine E fut initialement identifiée, elle fut associée à une orientation $C_{\text{exo}}-N_{\text{endo}}$ (l'extrémité N-terminale est orientée vers le lumen des membranes intracellulaires, et l'extrémité C-terminale est orientée vers le cytoplasme de la cellule, Figure 3-1) en faisant une protéine transmembranaire de type I (Godet et al. 1992). De même, des études portant sur les protéines E de MHV et IBV ont conclu que ces deux protéines montrent la même orientation (Corse et al. 2000; Raamsman et al. 2000), orientation qui fut plus récemment confirmée pour la souche A59 de MHV et pour le SARS-CoV (Venkatagopalan et al. 2015; Nieto-Torres et al. 2011). Cependant, une précédente étude a démontré, en utilisant une étiquette FLAG ajoutée à l'extrémité N-terminale de la protéine E de MHV, que cette extrémité est en fait orientée elle aussi vers le cytoplasme (Maeda et al. 2001) suggérant que la protéine E traverse deux fois la membrane, ou qu'elle forme une épingle ancrée dans la membrane (Figure 3-1). Une topologie identique a également été proposée pour la protéine E du SARS-CoV (Yuan et al. 2006). Cette incohérence apparente pourrait être expliquée par l'hypothèse déjà avancée par l'équipe de Machamer selon laquelle la protéine E formerait deux populations distinctes au sein des cellules infectées (Cohen et al. 2011). Cette équipe a d'abord suggéré que la protéine E d'IBV peut adopter différentes topologies lors de l'infection de la cellule, et a montré que la forme transmembranaire permet d'interférer avec la voie de sécrétion, mais est moins efficace pour former des particules virales, alors que la forme en épingle n'interfère pas avec la voie de sécrétion, ni n'induit la formation de particules virales (Ruch et al. 2012b). Une plus récente étude a mis en évidence la présence de ces deux populations dans les cellules infectées, où la protéine E existerait sous la forme d'homopentamères ou de monomères (Westerbeck et al. 2015). Cette observation corrèle avec une étude structurale de la protéine E du SARS-CoV où l'expression d'un peptide comportant

le domaine transmembranaire ainsi que la portion C-terminale de la protéine montre l'existence d'un équilibre dynamique entre une structure secondaire d'hélice α ou d'épingle β , ayant potentiellement des rôles distincts lors de l'infection des cellules (Yan Li et al. 2014).

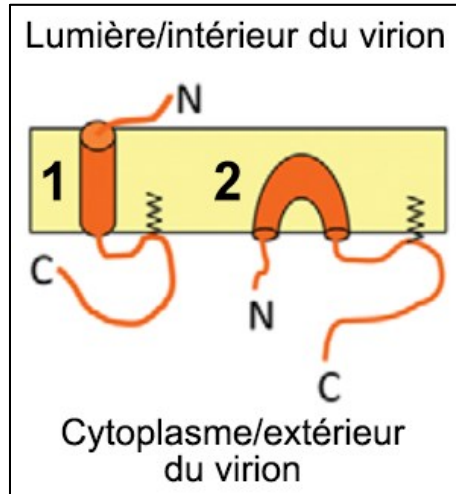


Figure 3-1 Topologie transmembranaire et en épingle de la protéine E d'IBV. La protéine E pourrait adopter deux topologies différentes : (1) Une protéine transmembranaire de type II ayant son extrémité N-terminale vers la lumière de l'appareil de Golgi et son extrémité C-terminale dans le cytoplasme dans la cellule, ou vers l'intérieur et l'extérieur respectivement lorsque la protéine est dans l'enveloppe d'une particule virale. (2) Une protéine membranaire en épingle à cheveux possédant ses deux extrémités orientées vers le cytoplasme de la cellule, ou vers l'extérieur du virion lorsque la protéine est insérée dans la membrane d'une particule virale. Adapté de Ruch et Machamer, 2012b.

3.1.4 Transformations post-traductionnelles

La principale transformation post-traductionnelle de la protéine E étudiée à ce jour est sa palmylation, c'est-à-dire l'ajout d'un acide gras (l'acide palmitique) à une cystéine de la protéine. Selon l'espèce coronavirale, la protéine E comporte entre 2 et 4 cystéines situées juste après le domaine transmembranaire. La protéine E d'IBV est palmylée sur une ou sur ses deux cystéines, cependant l'équipe de Machamer a démontré que cette palmylation n'influe pas sur sa localisation au sein de l'appareil de Golgi (Corse et al. 2002). De même, la protéine E de MHV est palmylée sur ces trois cystéines (Boscarino et al. 2008; L. A. Lopez et al. 2008) bien que l'on ne sache pas si ces cystéines sont toutes palmylées en même temps ou si elles suivent un cycle dynamique de palmylation/dépalmylation durant l'infection (Venkatagopalan et al. 2015). Le remplacement de ces cystéines par des alanines a conduit à la génération de virus défectueux lorsque les trois cystéines sont mutées (Boscarino et al. 2008; L. A. Lopez et al. 2008), indiquant

que la palmylation de la protéine E joue un rôle important dans la production de particules virales. La protéine E du SARS-CoV est également palmylée sur ses trois cystéines, cependant cette modification ne semble pas influencer la production de particules virales (Tseng et al. 2014), bien qu'elle reste importante pour l'association à la membrane cellulaire (Liao et al. 2006).

Plusieurs études suggèrent que la palmylation de la protéine E permettrait de la concentrer sur son principal site de localisation en augmentant son association à la membrane cellulaire afin de faciliter son rôle dans l'assemblage des virions (Liao et al. 2006; L. A. Lopez et al. 2008; Venkatagopalan et al. 2015). En effet, pour le SARS-CoV les cystéines palmylées sont en amont de l'épingle β responsable de la localisation de la protéine E dans l'appareil de Golgi, et pourrait faciliter les interactions entre la partie cytoplasmique de la protéine E et les complexes protéiques présents à la membrane de l'appareil de Golgi (Cohen et al. 2011). Il a également été suggéré que la palmylation affecte l'interaction entre les protéines E et M au site d'assemblage empêchant que la protéine M ne forme des agrégats insolubles, et donc aidant lors de la morphogénèse et la relâche des virions (Boscarino et al. 2008).

D'autres transformations post-traductionnelles ont pu être observées pour la protéine E bien que ces dernières n'aient pas été étudiées en détail. Une étude sur le SARS-CoV a montré qu'en exprimant la protéine E portant une étiquette FLAG, l'asparagine à la position 66 est N-glycosylée et influence la topologie de la protéine (Yuan et al. 2006). Cette asparagine n'étant pas conservée chez les autres coronavirus, cette N-glycosylation pourrait être spécifique au SARS-CoV. Il est intéressant de noter qu'une précédente étude n'a pu montrer cette glycosylation (Nal et al. 2005), bien que ces deux études aient utilisé un système d'expression transitoire de la protéine E fusionnée à une étiquette FLAG. Hormis le SARS-CoV, la protéine E des coronavirus est considérée comme n'étant pas glycosylée (de Groot et al. 2012). Il a également été démontré que la protéine E peut être ubiquitinée sur sa lysine à la position 64 (Álvarez et al. 2010; Keng et al. 2011), ce qui expliquerait qu'elle soit rapidement dégradée (Nal et al. 2005), bien que le mécanisme complet doive encore être élucidé.

3.2 Importance de la protéine E dans l'infection par les coronavirus

Suite à l'émergence du SARS-CoV et du MERS-CoV, beaucoup d'études ont cherché à comprendre quelles protéines sont importantes pour l'établissement des différentes pathologies

induites par l'infection, et par quels mécanismes ces protéines les induisent. Ces études ont permis de mettre en évidence l'importance de la protéine E des coronavirus, ainsi que la grande variété de fonctions qui lui est attribuée, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore bien connus. Les prochaines sections de ce chapitre ont pour objectif de faire un état des lieux des connaissances sur les fonctions de la protéine E lors de l'infection par les coronavirus.

3.2.1 Rôle dans le cycle de réplication

Afin d'étudier l'importance de la protéine E pour la réplication des coronavirus, de nombreuses études ont générés des virus n'exprimant pas la protéine E par délétion du gène E. En absence de la protéine E, deux phénotypes ont été identifiés. La protéine E est soit essentielle à la production de particules virales détectables, soient importante mais non indispensable (une production de particules virales infectieuses est détectable, mais le titre infectieux est grandement réduit). En effet, suite à la délétion du gène E de TGEV (Curtis et al. 2002; Ortego et al. 2007; Ortego et al. 2002) et du MERS-CoV (Almazán et al. 2013), aucune production ni propagation de virus n'a pu être détectée bien que la réplication virale ait pu être observée dans les cellules transfectées. Au contraire, la délétion du gène E de MHV a mené à une production de virus infectieux 1000 fois plus faible (Kuo et al. 2007; Kuo et al. 2003), et entre 20 et 200 fois plus faible pour le SARS-CoV (DeDiego et al. 2007). De plus, le SARS-CoV n'exprimant pas la protéine E est également atténué *in vivo* (DeDiego et al. 2007; DeDiego et al. 2008). L'importance relative de la protéine E pour la réplication du virus semble donc dépendre de l'espèce virale.

Cependant, la substitution du gène E de MHV (β -coronavirus) avec le gène d'autres β - et γ -coronavirus a mené à une production de particules virales infectieuses identique à la souche de référence (Kuo et al. 2007). Néanmoins, suite à la substitution avec le gène E d' α -coronavirus, une production de virus infectieux a été détectée uniquement après que des mutations compensatrices aient été insérées dans le gène E d' α -coronavirus préalablement introduit (Kuo et al. 2007), indiquant que l'importance de la protéine E dans la réplication des coronavirus tolère une certaine flexibilité, renforçant l'idée que la structure secondaire de la protéine est plus importante pour le maintien de ses fonctions que sa séquence en acides aminés. De plus, suite à des amplifications successives de virus mutants MHV n'exprimant pas la protéine E en culture cellulaire, l'équipe de Masters a pu démontrer qu'une duplication partielle du gène M est capable de rétablir en partie la production virale de ces virus (Kuo et al. 2010). Ce phénomène a également été observé pour le SARS-CoV où cette duplication partielle a pu rétablir la cinétique de production

virale des virus mutants (Jimenez-Guardeño et al. 2015). Ces différents mécanismes de réversion renforcent l'importance de la protéine E pour la production de virus infectieux chez les coronavirus.

Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas tous bien caractérisés, il a été démontré pour plusieurs coronavirus que la protéine E joue un rôle lors de l'assemblage des particules virales. En effet, plusieurs études ont suggéré que la protéine E interagit avec les protéines M et N afin de former les particules virales (Corse et al. 2003; Lim et al. 2001; S. C. Chen et al. 2009; Hsieh et al. 2008). Cependant, la méthode utilisée, (surexpression de protéines virales), pour mesurer la production de VLP (*Virus-like particle*) pourrait mener à la détection de microvésicules qui compliquerait l'interprétation des résultats (Ruch et al. 2012a). Il a également été suggéré que la protéine E faciliterait l'assemblage de VLP non pas en interagissant avec la protéine M, mais en empêchant la protéine M de former des agrégats non solubles, et donc en permettant de former des virions (Kuo et al. 2007). Enfin, la protéine E pourrait être impliquée lors du bourgeonnement des nouveaux virions dans l'induction de la séparation de l'enveloppe des virions de la membrane cytoplasmique lors de leur formation au sein de l'ERGIC. En effet, en mutant la portion C-terminale de la protéine E de MHV, les virions formés sont allongés et instables, possiblement à cause d'une séparation de la membrane inefficace (Fischer et al. 1998).

3.2.2 Domaine transmembranaire

3.2.2.1 Protéines virales transmembranaires

De nombreux virus à ARN possèdent des protéines transmembranaires pouvant former des canaux ioniques et ainsi permettre le transit d'ions au travers de membranes cellulaires. Ces protéines sont appelées viroporines et ont commencé à être étudiées il y a 20 ans après observation que certaines protéines virales sont capables d'induire une augmentation de la perméabilité membranaire dans les cellules infectées (Carrasco 1995). Considérant les possibilités thérapeutiques ouvertes par cette catégorie de protéine virale, de nombreuses viroporines ont depuis été identifiées et en partie caractérisées (tableau 3-1). La protéine M2 du virus de l'influenza A (VIA) (Pinto et al. 2006; Pinto et al. 1992; Sakaguchi et al. 1996), la protéine Vpu du VIH-1 (Ewart et al. 1996), la protéine p7 du virus de l'hépatite C (VHC) (Carrere-Kremer et al. 2002; Griffin et al. 2003; Pavlovic et al. 2003), la protéine SH du virus respiratoire syncytial humain (Perez et al. 1997) et la protéine 2B du coxsackievirus (De Jong et al. 2006) sont toutes des exemples de viroporines des virus à ARN. Quelques virus à ADN possèdent également des viroporines telles que l'agnoprotéine du polyomavirus JC et la protéine VP4 du virus simien 40

(Suzuki et al. 2010; Raghava et al. 2013). Parmi les protéines des coronavirus, les protéines 3a et 8a du SARS-CoV (W. Lu et al. 2006; C.-C. Chen et al. 2010), la protéine 4a de HCoV-229E (Zhang et al. 2013), la protéine ns5 de HCoV-OC43 (Zhang et al. 2015) et la protéine E de plusieurs coronavirus ont été identifiées comme des viroporines (Y. Ye et al. 2007; Surya et al. 2015; DeDiego et al. 2014). Ces viroporines sont de petites protéines transmembranaires ne montrant généralement qu'une faible spécificité ionique, et impliquées dans une variété de fonctions telles que l'entrée dans la cellule, l'assemblage et la relâche de particules virales lors de l'infection (tableau 3-1).

Les connaissances actuelles sur la structure des viroporines suggèrent que celles-ci s'oligomérisent et forment des canaux ioniques après insertion dans les membranes. Nieva et ses collègues ont proposé de classer les viroporines dans deux grandes catégories en fonction du nombre de domaines TM qu'elles possèdent (Nieva et al. 2012). Les viroporines de classe I possèdent un domaine TM alors que celles de classe II en possèdent deux (Figure 3-2). Ces groupes sont ensuite subdivisés en fonction de leur topologie. La classe IA contient un petit domaine (9 à 25 acides aminés) près de leur extrémité N-terminale qui est exposé dans la lumière des organites, et l'extrémité C-terminale plus longue (environ 50 acides aminés) est exposée au cytosol, à l'inverse des classes IB. La classe II contient des protéines ayant deux domaines TM connectés par une boucle d'acides aminés basiques. Les extrémités N- et C-terminales des protéines IIA sont exposées à la lumière, alors que celles des IIB sont orientées vers le cytosol.

Tableau 3-1 Liste des viroporines identifiées et leurs propriétés. Données de la littérature concernant les fonctions, tailles, spécificités ioniques et nombre de domaines transmembranaires des viroporines. * : Un tiret signifie inconnu ou incertain; † : Test indirect; ‡ : prédit par simulation bioinformatique. HCV, virus de l'hépatite C; BVDV, virus de la diarrhée virale bovine; CSFV, virus de la peste porcine classique; SARS-CoV, coronavirus associé au syndrome de détresse respiratoire aigu sévère; MHV, virus de l'hépatite murine; hRSV, virus syncytial respiratoire humain; HIV-1, virus de l'immunodéficience humaine de type 1; HTLV-1, virus T lymphotrope humain de type 1; SV40, virus simien 40; JC, JC polyomavirus; HPV-16, papillomavirus humain de type 16. Adapté de Scott et Griffin, 2015.

Classification	Famille	Virus	Protéine	Taille (acides aminés)	TMD	Spécificité ionique	Rôle de l'activité de canal ionique	
Virus à ARN simple brin de polarité positive	Picornaviridae	Poliovirus	2B	97	2	Ca ²⁺	Production de particules virales infectieuses, Induction de la lyse cellulaire	
			VP4	68	1	- *	Entrée du virus	
		Coxsackievirus B3	2B	99	2	Ca ²⁺	Production de particules virales infectieuses, Induction de la lyse cellulaire	
		Enterovirus 71	2B	99	2	Cl ⁻	Propagation virale	
	Flaviviridae	Hepatitis C virus	VP4	68	1	-	Entrée du virus	
			p7	63	2	H ⁺	Production de particules virales infectieuses	
			BVDV	p7	63	2	H ⁺ †	Production de particules virales infectieuses
			CSFV	p7	63	2	Ca ²⁺	Production de particules virales infectieuses
		Dengue virus	M	75	2	K ⁺ /Na ⁺	Production de particules virales infectieuses	
		Togaviridae	Semliki Forest virus	6K	60	2	K ⁺ /Na ⁺	Production de particules virales infectieuses
Sindbis virus	6K		55	1 ‡	K ⁺ /Na ⁺	Production de particules virales infectieuses		
Ross River virus	6K		62	1 ‡	K ⁺ /Na ⁺	Production de particules virales infectieuses		
Coronaviridae	SARS-CoV	E	76	1	K ⁺ /Na ⁺	Production de particules virales infectieuses		
		3a	274	3	K ⁺	Propagation virale		
		8a	39	1	K ⁺ /Na ⁺	-		
	MHV	E	83	1	K ⁺ /Na ⁺	Production de particules virales infectieuses		
	HCoV-229E	4a	133	3	-	Production de particules virales infectieuses		

Classification	Famille	Virus	Protéine	Taille (acides aminés)	TMD	Spécificité ionique	Rôle de l'activité de canal ionique
		HCoV-OC43	ns5	109	1	–	Production de particules virales infectieuses
Virus à ARN simple brin de polarité négative	Paramyxoviridae	hRSV	SH	64	1	K ⁺ /Na ⁺	Antagoniste du TNF, pathogénèse
	Orthomyxoviridae	Influenza A virus	M2	97	1	H ⁺	Entrée du virus, Production de particules virales infectieuses
		Influenza B virus	BM2	115	1	H ⁺	Entrée du virus
			NB	100	1	H ⁺	–
Influenza C virus	CM2	115	1	H ⁺	Entrée du virus		
Virus à ARN double brin	Reoviridae	Rotavirus	NSP4	175	1/3	Ca ²⁺	Production de particules virales infectieuses, entérotoxine
Virus à ARN à transcription inversée	Retroviridae	HIV-1	Vpu	81	1	K ⁺ /Na ⁺	Production de particules virales infectieuses
		HTLV-1	P13ii	87	2	K ⁺ †	Perméabilisation de la mitochondrie
Virus à ADN double brin	Polyomaviridae	SV40	VP4	125	1	Ca ²⁺	Production de particules virales infectieuses
		JC	Agno	71	1	Ca ²⁺	Production de particules virales infectieuses
	Papillomaviridae	HPV-16	E5	83	3	H ⁺ †	Oncogène, signalling/trafficking

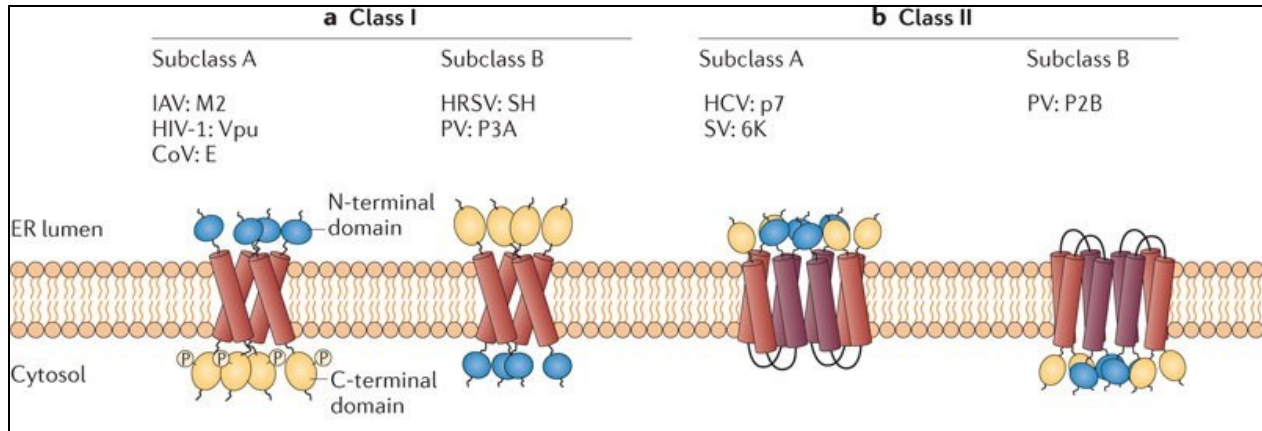


Figure 3-2 Classification des viroporines en fonction de leur nombre de domaines transmembranaires ainsi que de leur topologie. (a) Les viroporines de la classe I possèdent un seul domaine TM. Les sous-classes A et B contiennent des protéines qui sont insérées dans la membrane à l'aide d'une extrémité N-terminale luminale et d'une extrémité C-terminale cytosolique (classe IA) ou d'une extrémité N-terminale cytosolique et d'une extrémité C-terminale luminale (classe IB). Les membres de la classe IA sont généralement phosphorylés à l'extrémité C-terminale. (b) Les viroporines de classe II possèdent deux domaines transmembranaires reliés par une boucle d'acides aminés. Les membres de la sous-classe A ont des extrémités N- et C-terminales luminales, alors que les membres de la sous-classe B ont des terminaisons N- et C-terminales cytosoliques. Les viroporines connues de chaque sous-classe sont indiquées. CoV, coronavirus; E, enveloppe; HCV, virus de l'hépatite C; HRSV, virus respiratoire syncytial humain; IAV, virus de la grippe A; M2, protéine de matrice 2; PV, poliovirus; SH, petite protéine hydrophobe; SV, virus Sindbis; Vpu, protéine virale U. Tiré de Nieva, Madan et Carrasco, 2012.

Les structures de quelques viroporines ont pu être déterminées par cristallographie aux rayons X, par spectroscopie RMN, et par microscopie électronique. La protéine M2 du VIA (Influenza A) se tétramérise afin de former un canal ionique, dont l'histidine et le tryptophane aux positions respectives 37 et 41 sont cruciaux pour le transfert d'ions (Acharya et al. 2010). Il a été suggéré que les résidus aromatiques bloquant le canal, changent de conformation à bas pH ouvrant ainsi le canal, et permettant le transfert d'ions (Acharya et al. 2010; Schnell et al. 2008; Hong et al. 2012). La structure du canal ionique formé par la protéine Vpu du VIH-1 n'a pas encore pu être déterminée à partir de protéines fonctionnelles, cependant plusieurs études ont montré qu'elle est présente sous la forme d'oligomères de différents niveaux, allant de tétramères à des hexamères (J. X. Lu et al. 2010), et des modélisations informatiques prédisent que les canaux ioniques sont formés par des pentamères, ou par des oligomères plus larges (C. F. Lopez et al. 2002; Cordes et al. 2002). La structure de la protéine p7 du VHC a pu être déterminée par microscopie électronique, démontrant que cette protéine forme un hexamère en forme de fleur où chaque « pétale » est composé d'un monomère (Luik et al. 2009).

3.2.2.2 Fonctions des domaines transmembranaires viraux

De par leur capacité à s'oligomériser et à s'intégrer aux membranes d'organites cellulaires, les viroporines peuvent perméabiliser ces dernières et participer à la régulation d'une grande variété d'étapes du cycle viral (Nieva et al. 2012). Parmi elles, les viroporines régulent la production virale. En effet, la délétion totale ou partielle des viroporines mène souvent à une diminution significative de la production de particules virales infectieuses, comme cela a été montré pour la protéine p7 du VHC (Steinmann et al. 2007). De plus suite à une transcomplémentation, la capacité du virus à produire des particules infectieuses a pu être rétablie, confirmant l'importance de la viroporine p7 (Brohm et al. 2009). Pour d'autres virus, leur viroporine semble moins importante. En effet, les délétions des protéines Vpu du VIH-1 et M2 du VIA mènent à une production de particules virales infectieuses détectable, bien que réduite de 10 à 100 fois (Strebel et al. 1988; Cheung et al. 2005). De même, en absence des protéines 3a du SARS-CoV, ns4a de 229E et ns5 de HCoV-OC43, la production de particules infectieuses de ces virus est réduite (W. Lu et al. 2006; Åkerström et al. 2007; Zhang et al. 2013; Zhang et al. 2015) indiquant que l'importance des viroporines pour la production virale est dépendante de l'espèce virale. Afin de mieux caractériser le rôle des domaines transmembranaires de ces protéines, des mutations uniques bloquant l'activité de canal ionique ont été insérées dans quelques viroporines. Dépendamment des souches de VHC utilisées, les mutations insérées dans la protéine p7 ont soit totalement inhibé, soit réduite de 100 fois la production de particules infectieuses (Wozniak et al. 2010; Steinmann et al. 2007). De même, l'inhibition de la protéine M2 du virus du VIA induit soit, une réduction de 15 fois de la production de particules infectieuses en culture cellulaire (Takeda et al. 2002), ou une production classique en culture cellulaire mais réduite *in vivo* (T. Watanabe et al. 2001). Des résultats similaires ont été obtenus suite à l'inhibition chimique des viroporines du VIA et du VHC (Grambas et al. 1992; C. Wang et al. 1994; Steinmann et al. 2007). Ces études confirment que l'activité de canal ionique est importante pour la production de particules infectieuses de ces virus.

Ces protéines virales sont également capables de modifier le transport cellulaire, remodelant certains organites. Les protéines M2 du VIA et p7 de VHC peuvent retarder le transport de protéines au travers de l'appareil de Golgi, induisant une dilatation de ce dernier, bloquant son acidification, et jouant un rôle dans la production de particules infectieuses (Sakaguchi et al. 1996; Wozniak et al. 2010). La protéine 2B du rhinovirus est également capable d'inhiber le transport de protéines à travers le RE et l'appareil de Golgi (de Jong et al. 2008). De

plus, la protéine précurseure 2B2C du poliovirus induit le remodelage du RE suite à son expression, afin de former des vésicules à doubles membranes requises pour la réplication de l'ARN viral (Suhy et al. 2000). De même, la protéine 3a du SARS-CoV induit la fragmentation de l'appareil de Golgi, permettant l'accumulation de vésicules intracellulaires (Freundt et al. 2010). Il a été suggéré que cette accumulation permet l'assemblage des virions ou leur relargage non lytique (Freundt et al. 2010). De plus, l'inhibition de l'acidification des vésicules de la voie de sécrétion empruntée par les virus permettrait de protéger les virions. En effet, cette acidification pourrait altérer les virions, les rendant non infectieux. À cette fin, la protéine M2 inhibe l'acidification de l'appareil de Golgi, empêchant une activation précoce de la protéine Hémagglutinine-Estérase, permettant la production de particules infectieuses (Takeuchi et al. 1994). De même, la protéine p7 induit une relâche de protons depuis différents organites cellulaires équilibrant ainsi leur pH avec celui du cytoplasme, et permettant une production virale efficace (Wozniak et al. 2010).

En plus de leur importance dans la réplication virale, les viroporines ont également été associées à la pathogenèse découlant de l'infection. En effet, des souris infectées par le VIA n'exprimant pas la protéine M2 ne montrent ni perte de poids ni pathologie et sont protégées contre le virus de type sauvage (S. Watanabe et al. 2009). De même, l'infection de souris et chimpanzés par le virus respiratoire syncytial n'exprimant pas sa protéine SH, induit une pathologie atténuée dans les voies respiratoires (Bukreyev et al. 1997; Whitehead et al. 1999). La délétion de la protéine p7 du virus de la fièvre porcine classique (similaire à la protéine p7 du VHC) mène elle aussi à une atténuation de la virulence (Gladue et al. 2012). La protéine 3a du SARS-CoV régule l'activation de gènes pro-inflammatoires tels que C-Jun et NF- κ B (Obitsu et al. 2009; Kanzawa et al. 2006), et la production de cytokines pro-inflammatoires qui participent à l'exacerbation du système immunitaire caractéristique de l'infection par le SARS-CoV. D'autres viroporines ont été impliquées dans le développement de l'inflammation. C'est le cas de la protéine M2 du VIA, la protéine SH du virus respiratoire syncytial, la protéine 2B du rhinovirus ou la protéine p7 du VHC qui induise une inflammation par activation de l'inflammasome (Shrivastava et al. 2013; Ichinohe et al. 2010; Triantafilou, Kar, Vakakis et al. 2013; Triantafilou, Kar, van Kuppeveld et al. 2013; Triantafilou et al. 2014). Toutes ces observations indiquent que les viroporines sont des éléments importants pour les virus, agissant à différents niveaux lors du cycle de réplication.

3.2.2.3 Importance du domaine TM de la protéine E des coronavirus

Outre les protéines 3a du SARS-CoV, ns4a du HCoV-229E et ns5 de HCoV-OC43, la protéine E des coronavirus représente également une potentielle viroporine grâce à son domaine transmembranaire. En effet, les protéines E du SARS-CoV et de MHV sont capables de perméabiliser des cellules *E. coli* et des cellules de mammifères lorsqu'exprimées transitoirement (Liao et al. 2004; Liao et al. 2006; Madan et al. 2005). Une étude bio-informatique complétée par une analyse d'oligomérisation de peptides synthétiques en solution a permis de prédire l'homo-oligomérisation de la protéine E des différents coronavirus, et que ces homo-oligomères seraient présents sous la forme de dimères, trimères ou pentamères (Torres et al. 2005). Cette configuration pentamérique (Figure 3-3) fut confirmée pour la protéine E du SARS-CoV (Parthasarathy et al. 2008; Pervushin et al. 2009; Torres et al. 2006; Yan Li et al. 2014), la protéine E d'IBV (Parthasarathy et al. 2012; Westerbeck et al. 2015), et pour la protéine E du MERS-CoV (Surya et al. 2015) en utilisant différents systèmes de membranes artificielles ou d'expression transitoire de la protéine E en cellule. Dans ce modèle, l'asparagine à la position 15 est orientée vers l'intérieur du canal, et pourrait jouer un rôle de filtre, apportant la spécificité ionique à ce canal (Torres et al. 2006; Pervushin et al. 2009). La valine à la position 25 est présente dans la portion la plus étroite du canal, et est impliquée dans les interactions entre les hélices α formant ce canal ionique (Verdiá-Báguena et al. 2012; Torres et al. 2007). L'utilisation de membranes lipidiques synthétiques et d'inhibiteurs chimiques a pu démontrer que les protéines E du HCoV-229E, du MHV, du SARS-CoV et d'IBV possèdent une activité de canal ionique, où HCoV-229E (α -coronavirus) montre une préférence pour les cations K^+ par rapport aux cations Na^+ , alors que MHV, SARS-CoV et IBV (β - et γ -coronavirus) montrent une préférence pour les cations Na^+ (Wilson et al. 2006; Wilson et al. 2004). Cette préférence cationique semble donc dépendante du genre coronaviral, cependant l'utilisation de modèles de membrane lipidique imitant la membrane de l'ERGIC a permis de montrer que la composition lipidique de la membrane ainsi que sa charge influe la sélectivité du canal (Verdiá-Báguena et al. 2013; Verdiá-Báguena et al. 2012; Nieto-Torres et al. 2015).

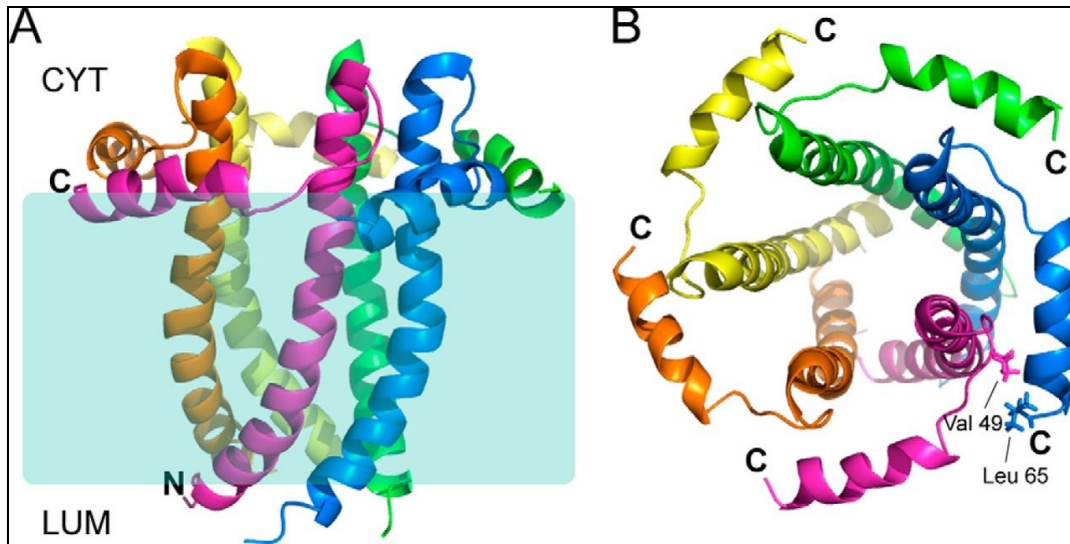


Figure 3-3 **Modèle pentamérique de la protéine E du SARS-CoV.** Vue de côté (A) et du dessus (B) de la structure pentamérique proposée pour la protéine E du SARS-CoV. Chaque monomère est représenté sous forme de ruban d'une couleur différente. Tiré de Li et al, 2014.

Afin de déterminer l'importance de ce TMD pour les coronavirus, plusieurs groupes ont inséré des mutations aux positions d'intérêt 15 et 25 préalablement identifiées pour le SARS-CoV, ou à des positions équivalentes pour d'autres coronavirus, afin d'entraver la sélectivité ionique du canal (position 15) ou d'interférer avec le passage des ions (position 25). Ainsi, suite à l'insertion de ces mutations dans la protéine E du SARS-CoV, les virus recombinants ne montrent plus d'activité de canal ionique, bien que cette activité soit restaurée par réversion après plusieurs amplifications sur cellules (Nieto-Torres et al. 2014). De plus, en absence de cette propriété, l'infection de souris mène à une réponse inflammatoire réduite, et à un taux de survie plus élevé (Nieto-Torres et al. 2014), indiquant que le TMD de la protéine E du SARS-CoV est un facteur de virulence. L'importance du TMD de la protéine E du SARS-CoV découlerait de sa capacité à transporter des cations Ca^{2+} au travers des membranes de l'ERGIC induisant l'activation de l'inflammasome (Nieto-Torres et al. 2015). De plus, la position 16 de la protéine E d'IBV (position équivalente à la position 15 pour le SARS-CoV) a été associée à la modification de la voie de sécrétion utilisée par le virus (Ruch et al. 2011; Ruch et al. 2012b; Westerbeck et al. 2015) suggérant que le TMD d'IBV est impliqué dans le réarrangement des organites de la voie de sécrétion, et dans la modification de leur milieu luminal afin de permettre un meilleur transit des virions (Ruch et al. 2012a).

Le domaine TM de la protéine E a également été associé à la réplication des coronavirus. En effet, l'insertion de mutations dans ce domaine de la protéine E du MHV conduit à la génération de virus recombinants défectueux produisant moins de particules infectieuses, et présentant un défaut de relâche (Y. Ye et al. 2007), suggérant que le domaine est important pour la réplication du virus. Ce défaut de relâche a également pu être montré pour IBV, bien que la production de particules virales ne semble pas affectée en culture cellulaire (Ruch et al. 2011; Ruch et al. 2012b). La mutation des positions 15 et 25 du SARS-CoV induit un faible défaut de production de particules infectieuses (moins de 5 fois) en culture cellulaire (Verdiá-Báguena et al. 2012), et une faible différence chez les souris infectées par voie intranasale (Nieto-Torres et al. 2014). Ces observations indiquent que le domaine TM de la protéine E des coronavirus représente un facteur de virulence important, possiblement en jouant un rôle dans le détournement de la voie de sécrétion, mais ne semble pas requis pour la production virale. Il a été suggéré que ce domaine serait plus important pour médier les interactions virus-virus ou virus-hôte que directement pour la production virale, bien que ces interactions pourraient affecter directement ou indirectement l'assemblage des particules virales ou leur relâche (Y. Ye et al. 2007). Cependant, le domaine TM de la protéine E n'est pas son seul domaine fonctionnel. En effet, la protéine E des coronavirus possède également un motif d'interaction protéique à son extrémité C-terminale.

3.2.3 Motif PBM

3.2.3.1 Domaines PDZ et motifs PBM viraux

Les domaines PDZ sont des domaines d'interaction protéine-protéine présents dans de nombreuses protéines chez les procaryotes et les eucaryotes. Plus de 270 domaines PDZ ont été identifiés dans plus de 150 protéines du protéome humain (Caillet-Saguy et al. 2015). Ces domaines furent découverts chez les protéines PSD-95 (*Postsynaptic Density 95*), Dlg (*Discs Large*) et ZO-1 (*Zonula Occludens-1*) qui lui donnèrent son nom au début des années 1990 (Cho et al. 1992; Kennedy 1995; Willott et al. 1993; Woods et al. 1993). Ces domaines font généralement entre 80 et 90 acides aminés, forment 5 ou 6 feuillets β et une ou deux hélices α (Doyle et al. 1996), et reconnaissent spécifiquement des motifs PBM (*PDZ-Binding Motif*) composés de 4 acides aminés généralement localisés à l'extrémité C-terminale des protéines. Ces motifs forment un feuillet s'insérant dans un espace délimité par le feuillet β_2 et l'hélice α_2 du PDZ (Figure 3-4), et la spécificité de cette interaction est déterminée par les acides aminés aux positions p0 (résidu C-terminal) et p-2 (résidu antépénultième). Cependant, les résidus

jusqu'à la position p-11 peuvent moduler la formation du complexe protéine-protéine (Terrien et al. 2012).

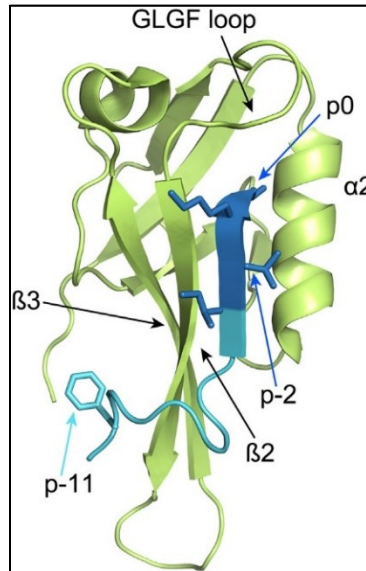


Figure 3-4 Structure d'un domaine PDZ. Schéma en ruban du domaine PDZ de la protéine MAST2 (vert) formant un complexe avec le motif PBM C-terminal de la protéine PTEN (bleu). Tiré de Caillet-Saguy et al, 2015.

Ces domaines PDZ sont associés à une grande variété de fonctions telles que la modulation de la polarité et de la migration cellulaire, le maintien des jonctions cellulaires et de l'homéostasie cellulaire, ou dans la transmission de signaux neuronaux (Nourry et al. 2003). Les protéines possédant de tels domaines sont en grande partie des protéines d'échafaudages qui vont réunir différentes protéines en unités fonctionnelles et orienter ces complexes supramoléculaires vers des compartiments cellulaires spécifiques, contribuant à la spécificité du signal transmis (Nourry et al. 2003). De plus, ces protéines possèdent souvent d'autres domaines d'interaction facilitant la formation de ces complexes supramoléculaires, tels que le domaine SH3, L27 ou le domaine de type guanylate kinase (Figure 3-5) (H.-J. Lee et al. 2010; Feng et al. 2009)

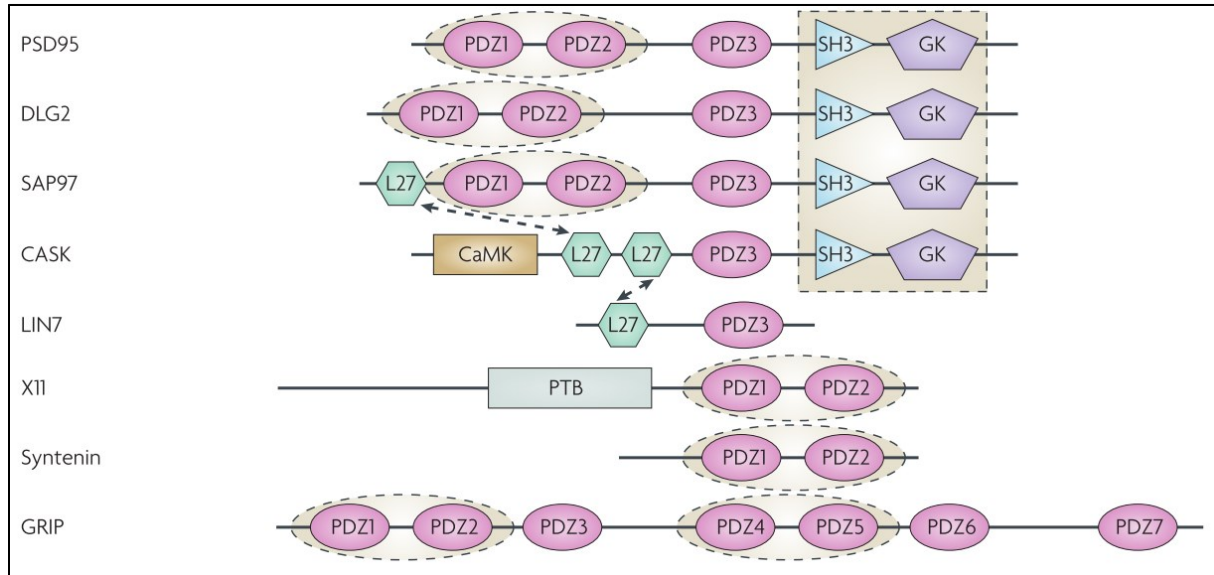


Figure 3-5 Représentation schématique de protéines contenant un ou plusieurs domaines PDZ. Les protéines contenant un domaine PDZ contiennent souvent d'autres domaines d'interaction protéique. Diverses protéines sont représentées par une ligne noire, et les domaines fonctionnels sont schématisés par des blocs. Les flèches indiquent que les deux domaines reliés peuvent interagir pour former des complexes protéiques. Protéines : PSD95, post-synaptic density 95; DLG2, Discs Large; SAP97, synapse-associated protein 97; CASK, calmodulin-associated serine/threonine kinase; GRIP, glutamate receptor interacting protein. Domaines : PDZ, domaine PSD95-Dlg-ZO-1; SH3, Src homology 3 domain; GK, guanylate kinase; CaMK, calmodulin-dependent kinase; PTB, phosphotyrosine binding domain; Tiré de Feng et Zhang, 2009

Ces domaines PDZ reconnaissent et lient généralement des motifs PBM qui furent regroupés en trois classes selon la séquence des quatre derniers acides aminés des protéines : les PBMs de type I dont la séquence est $-X-S/T-X-\Phi_{COOH}$ (X représente n'importe quel acide aminé, et Φ est un acide aminé hydrophobe), les PBMs de type II de séquence $-X-\Phi-X-\Phi_{COOH}$, et les PBMs de type III de séquence $-X-D/E-X-\Phi_{COOH}$ (Songyang et al. 1997; Stricker et al. 1997). Cependant, une plus récente étude a déterminé que les domaines PDZ reconnaissent jusqu'aux sept derniers résidus, formant ainsi 16 classes de PBM (Tonikian et al. 2008). Ces PBMs sont utilisés par les cellules pour induire une grande variété de fonctions que les virus ont appris à détourner à leur avantage. En effet, de plus en plus de protéines virales contenant des motifs PBM sont identifiées. Les premières furent identifiées à la fin des années 1990, alors qu'un tel motif a été identifié chez à l'extrémité C-terminale des protéines E4-ORF1 de l'adénovirus humain, Tax du virus humain T-lymphotropique de type 1 (HTLV-1), et E6 du papillomavirus humain (Rousset et al. 1998; S. S. Lee et al. 1997; Kiyono et al. 1997). Depuis, de nombreuses autres protéines virales contenant un PBM ont été identifiées ainsi que les domaines PDZ avec

lesquels ils interagissent (tableau 3-2), telles que la protéine NS1 du VIA (Obenauer et al. 2006), la glycoprotéine d'enveloppe G du virus de la rage (Préhaud et al. 2010) et la protéine ns5 du virus de la dengue (Ellencrona et al. 2009).

Tableau 3-2 Liste de protéines virales possédant un PBM et les protéines cellulaires possédant un PDZ avec lesquels ils interagissent. Human Ad, adénovirus humain; HBV, virus de l'hépatite B; TBEV, virus de la méningo-encéphalite à tiques; DV, virus de la dengue; SARS, syndrome respiratoire aigu sévère; HPV, papillomavirus humain; RhPV, papillomavirus rhésus; CRPV, papillomavirus du lapin à queue de coton; HTLV-1, virus humain T-lymphotropique de type 1; HIV, virus de l'immunodéficience humaine. Tiré de Javier et al, 2011, et complété à partir de Jimenez-Guardeno et al, 2014.

Adenoviridae	Hepadnaviridae	Orthomyxoviridae	Papillomaviridae	Retroviridae
<p>Human Ad E4-ORF1 proteins PBM: ASLI, ATMI, ASNV, ATLV</p> <p><u>PDZ targets</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dlg1 • MAGI-1 • MUPP1 • PATJ • ZO-2 (Ad9 only) 	<p>HBV Core protein PBM: SQAR</p> <p><u>PDZ target</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • TIP-2/GIPC 	<p>Influenza A NS1 proteins Avian PBM: ESEV</p> <p><u>PDZ targets</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dlg1 • MAGI-1 • MAGI-2 • MAGI-3 • Scribble • PDLIM2 	<p>HPV E6 proteins HPV-16 PBM: ETQL HPV-18 PBM: ETQV</p> <p><u>PDZ targets</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • CAL/GOPC • Dlg1 • Dlg4 • MAGI-1 • MAGI-2 • MAGI-3 • MUPP1 • PATJ • PTPN3 • PTPN13 • Scribble • TIP-1 • TIP-2/GIPC 	<p>HTLV I Tax protein PBM: ETEV</p> <p><u>PDZ targets</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • β1-syntrophin • Dlg1 • Dlg4 • Erbin • MAGI-3 • pro-IL-16 • Scribble • TIP-1 • TIP-2/GIPC • PDLIM2*
Flaviviridae	Rhabdoviridae	Coronaviridae		
<p>TBEV NS5 protein PBM: internal</p> <p><u>PDZ targets</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • RIMS2 • Scribble • ZO-1 <p>DV NS5 protein PBM: internal</p> <p><u>PDZ target</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • ZO-1 	<p>Rabies G proteins PBM: ETRL</p> <p><u>PDZ targets</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dlg1 • MAST2 • MUPP1 • PTPN4 	<p>SARS E protein PBM: DLLV</p> <p><u>PDZ target</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • PALS1 • Syntenin 	<p>RhPV E7 protein PBM: ASRV</p> <p><u>PDZ target</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Par3 <p>CRPV LE6 and SE6 proteins PBM: Not identified</p> <p><u>PDZ target</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dlg1 	<p><u>Env protein</u> PBM: ESSL</p> <p><u>PDZ target</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dlg1 <p>HIV Gag protein PBM: None</p> <p><u>PDZ target</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dlg1* • PDZD8*

3.2.3.2 Fonctions associées aux motifs PBM viraux

Ces interactions peuvent mener à l'interférence ou au détournement de fonctions cellulaires à l'avantage de la réplication et de la propagation du virus ou pour moduler la pathogenèse (Javier et al. 2011). Le motif PBM de la protéine ns1 du VIA représente un facteur de virulence important. En effet, des virus recombinants H7N1 et H1N1 comportant le PBM du VIA aviaire mènent à une pathologie plus sévère chez la souris que les virus recombinants ayant

le PBM du VIA humain (Soubies et al. 2010; Jackson et al. 2008). Cette augmentation de virulence a ensuite été attribuée à l'interaction de ns1 avec les domaines PDZ de la protéine Scribble, où cette interaction relocalise Scribble de la membrane cytoplasmique dans des vésicules cytoplasmiques, inhibant ainsi son activité pro-apoptotique, et permettant une meilleure réplication virale (H. Liu et al. 2010). De même, la protéine E4-ORF1 de l'adénovirus de type 9 est un facteur déterminant dans le développement de tumeurs suite à l'infection et son motif PBM C-terminal a été identifié comme étant essentiel pour ce développement (R. S. Weiss et al. 1997). Cette protéine, dans sa forme monomérique, peut interagir avec les domaines PDZ des protéines MUPP1, MAGI-1 et ZO-2 induisant une séquestration de ces protéines, détruisant par ce fait les jonctions serrées et causant une perte de la polarité des cellules infectées (Latorre et al. 2005). Dans sa forme trimérique, E4-ORF1 interagit avec Dlg1 et active la voie de signalisation de la Phosphatidylinositol 3-kinase, activation qui est essentielle pour le développement de tumeurs suite à l'infection (Frese et al. 2003). La protéine E6 des papillomavirus humains de type 16 et 18 agit de façon similaire, où l'interaction avec MAGI-1 mène à la destruction des jonctions serrées suite à sa dégradation (Kranjec et al. 2011). La glycoprotéine G du virus de la rage représente un parfait exemple de la spécificité de l'interaction PBM-PDZ. En effet, une mutation d'un seul acide aminé dans le PBM de la protéine G change un virus très virulent avantageant la survie des cellules infectées, en un virus atténué induisant la mort des cellules, ralentissant ainsi sa réplication et sa propagation (Préhaud et al. 2010). Cette différence de phénotype a été attribuée à une différence de spécificité d'interaction avec des protéines possédant un domaine PDZ. En effet, la souche virulente de PBM -QTRL interagit avec le domaine PDZ de la sérine/thréonine kinase MAST2 promouvant la survie cellulaire, alors que la souche atténuée de PBM -ETRL interagit en plus avec Dlg2, MUPP1 et PTPN4, ce dernier induisant la mort cellulaire suite à son interaction avec la protéine G (Préhaud et al. 2010). Ces exemples démontrent que de nombreux virus ont su s'adapter et incorporer un motif PBM au sein de leurs protéines afin d'inhiber, de détourner ou d'induire des fonctions cellulaires à leur avantage. Parmi ces virus, de récentes études ont pu montrer que la protéine E du SARS-CoV possède un PBM fonctionnel, impliqué dans le développement de la pathologie suite à l'infection.

3.2.3.3 Importance du motif PBM de la protéine E des coronavirus

L'infection des voies respiratoires par le SARS-CoV se traduit par des dommages alvéolaires diffus, occasionnellement par des dommages plus sévères de l'épithélium des poumons, et par une exacerbation de l'inflammation dans les voies respiratoires (Teoh et al. 2010). En 2010, l'équipe de Nal a démontré par criblage par double-hybride et par co-

immunoprécipitation que la protéine E du SARS-CoV interagit avec la protéine cellulaire PALS1, et que cette interaction se fait entre le motif PBM-DLLV de la protéine E et le domaine PDZ de PALS1 (Teoh et al. 2010). La protéine PALS1 est impliquée dans la formation et le maintien des jonctions serrées, et suite à son interaction avec la protéine E, PALS1 est relocalisée dans l'ERGIC et dans l'appareil de Golgi. Cette relocalisation empêche PALS1 d'interagir avec le motif PBM de CRB3 (*Crumbs protein homolog 3*) et induit une destruction des jonctions serrées et un retard dans l'établissement de la polarité dans les cellules épithéliales infectées suggérant un rôle important dans la destruction de l'épithélium des poumons et dans la propagation de l'infection (Teoh et al. 2010).

De même, l'équipe d'Enjuanes a cherché à caractériser le rôle de la protéine E du SARS-CoV en utilisant des modèles murins et des virus recombinants exprimant une protéine E sans son PBM (Jimenez-Guardeño et al. 2014). L'infection de souris par voie intranasale avec ce virus recombinant n'induit aucune pathologie, aucune lésion ni inflammation dans les poumons, bien que le titre infectieux du virus recombinant ne soit pas affecté dans les poumons par rapport au virus sauvage, indiquant que le PBM de la protéine E du SARS-CoV n'est pas requis pour la production de particules infectieuses *in vivo*, mais représente un facteur de virulence très important. Après un criblage par double-hybride et une confirmation par co-immunoprécipitation, les auteurs ont identifié la Synténine comme partenaire d'interaction du PBM de la protéine E (Jimenez-Guardeño et al. 2014). Cette interaction entraîne également la relocalisation de la Synténine depuis le noyau des cellules vers le cytoplasme, ainsi que l'activation subséquente de la MAP kinase p38 (*Mitogen-activated protein kinase*) qui mène à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires. L'interaction E-Synténine serait donc en partie responsable de l'exacerbation de l'inflammation caractéristique de l'infection des poumons par le SARS-CoV. Une étude plus récente a montré que suite à la délétion des 11 derniers acides aminés de la protéine E, et donc du PBM, l'infection de souris par ce virus recombinant n'a pas montré de différences dans la pathologie induite par rapport au virus sauvage (Regla-Nava et al. 2015). Les auteurs émettent l'hypothèse que cette délétion a mis en avant un potentiel motif PBM alternatif à l'extrémité C-terminale, et que ce motif PBM pourrait remplacer le motif PBM « de type sauvage » et assurer les mêmes fonctions (Regla-Nava et al. 2015). L'équipe d'Enjuanes a également identifié par analyse bio-informatique des séquences consensus de PBM chez une grande partie des protéine E des coronavirus tels que MHV, TGEV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 et HCoV-OC43 suggérant que la présence d'un motif PBM C-terminal est une caractéristique commune à l'ensemble des coronavirus (Jimenez-Guardeño et al. 2014).

4 IMPORTANCE DE LA PROTÉINE E DE HCOV-OC43 ET DE SES DOMAINES POUR SA NEUROVIRULENCE

Depuis les épidémies du SARS-CoV en 2002 et du MERS-CoV en 2012, les études cherchant à mieux caractériser le processus d'infection par les coronavirus se sont multipliées apportant toujours plus d'informations sur les mécanismes sous-jacents déployés par cette famille de virus et sur les facteurs viraux impliqués. Comme préalablement mentionné, parmi ces facteurs, la glycoprotéine de surface S représente un déterminant majeur de la pathogenèse des coronavirus notamment chez HCoV-OC43 (Brison et al. 2011; Jacomy et al. 2010; Le Coupanec et al. 2015; Meessen-Pinard et al. 2017). En plus de la protéine S, la protéine d'enveloppe E est maintenant reconnue comme un autre facteur de virulence important étant impliqué dans la formation et la maturation des virions, dans la modification de la voie de sécrétion ainsi que dans la modulation de la pathologie induite (DeDiego et al. 2014). Cette grande variété de fonctions s'expliquerait par la présence de deux domaines fonctionnels dans la protéine E ayant des rôles distincts : un domaine transmembranaire et un motif PBM d'interaction protéine-protéine. De plus, une récente étude sur la protéine E d'IBV a pu démontrer que cette protéine existe en deux populations distinctes dans les cellules infectées (Westerbeck et al. 2015). En effet, la protéine E d'IBV est présente sous forme monomérique modulant la voie de sécrétion, ou sous forme d'homo-oligomères étant essentiels pour la production de particules virales. La formation de ces deux populations pourrait permettre à la protéine E d'utiliser distinctement ces deux domaines fonctionnels de façon optimale pour aider à l'assemblage des particules virales infectieuses par l'action du domaine transmembranaire, et détourner la voie de sécrétion à l'avantage du virus par le biais d'interactions avec son motif PBM.

Bien que de plus en plus d'études s'intéressent à ces domaines particuliers de la protéine E, leur importance pour la virulence des coronavirus n'est pas encore totalement comprise. De plus, le rôle de la protéine E des coronavirus et de ses domaines dans l'atteinte du SNC et le développement de maladies neurologiques n'a que peu été étudié. En effet, une seule étude a démontré par délétion de l'entièreté de la protéine E du SARS-CoV, que cette dernière est importante pour l'atteinte et la réplication dans le CNS murin, et que ce tropisme pourrait être liée à la virulence du SARS-CoV (DeDiego et al. 2008). Étant donné que HCoV-OC43 est naturellement neuroinvasif et neurotrope chez l'homme, et neurovirulent chez la souris, nous avons émis l'hypothèse que la protéine E de HCoV-OC43 et ses domaines fonctionnels (TM et

PBM) sont des facteurs de neurovirulence importants chez la souris, notamment en influençant la réplication et la propagation du virus dans le SNC.

Ce mémoire va présenter pour la première fois l'étude de la protéine E de HCoV-OC43 dans un contexte d'infection du SNC murin. À l'aide de virus recombinants n'exprimant pas la protéine E ou comportant des mutations inhibant l'activité des potentiels domaines TM et PBM, nous déterminerons si la protéine E de HCoV-OC43 joue un rôle dans la capacité du virus à atteindre le SNC depuis un site d'infection extérieur et à s'y répliquer et se propager ainsi que sur le développement d'une pathologie neurologique associée.

5 THE OC43 HUMAN CORONAVIRUS ENVELOPE PROTEIN IS CRITICAL FOR INFECTIOUS VIRUS PRODUCTION AND PROPAGATION IN NEURONAL CELLS AND IS A DETERMINANT OF NEUROVIRULENCE AND CNS PATHOLOGY

Auteurs : Jenny K. Stodola, Guillaume Dubois, Alain Le Coupanec, Marc Desforges, Pierre J. Talbot

Affiliation des auteurs : Laboratory of Neuroimmunovirology, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Contribution des auteurs: Jenny K. Stodola et Guillaume Dubois ont tout deux participé à la production des résultats présentés dans cet article sous les conseils et la direction de Marc Desforges et Pierre J. Talbot. Ce projet fût initié par JKS et terminé par GD. JKS a produit les différents clones infectieux permettant de produire les différents virus recombinants utilisés dans ce projet, et a réalisé une grande partie de l'étude *in vitro* concernant la production de particules virales infectieuses lors de l'infection ainsi que la propagation de l'infection dans les cellules épithéliales, neuronales humaines et dans des cultures primaires mixtes du SNC de souris. GD a reproduit les expériences précédemment effectuées par JKS concernant la cinétique de réplication des virus rOC/ATCC, rOC/E-TM_{Q17A} et rOC/E-PBM_{D82A-V84A} en culture de cellules neuronales humaines, ainsi que la propagation de ces virus et la quantification de cette propagation afin de générer une quantité de données permettant une meilleure analyse statistique. GD a également réalisé le test de relâche comparant les virus rOC/ATCC et rOC/E-TM_{Q17A}, ainsi que la détermination de l'infectivité relative des différents stocks viraux de rOC/ATCC, rOC/E_{Stop}, rOC/E-TM_{Q17A} et rOC/E-PBM_{D82A-V84A}. L'intégralité de l'étude *in vivo* présenté dans cet article a été conduite par GD. Alain Le Coupanec a apporté l'expertise nécessaire pour la préparation des cultures primaires mixtes du SNC de souris, ainsi que toutes les connaissances théoriques et pratiques *in vivo*.

En terme de figure, JKS a réalisé en intégralité les figures 1, 2, S1 et S2, ainsi que les panneaux 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C. GD a réalisé les figures 3D, 3E, 4D, et l'intégralité des figures 5, 6, 7 et 8, ainsi que les figures supplémentaires S3 et S4. JKS a écrit une première version de cet article, qui fût ensuite complétée et remodelée par GD, avec l'aide de MD et de PJT.

Article soumis dans : Virology (Le 15 Novembre 2017), accepté le 20 Décembre 2017

Titre français : La protéine d'enveloppe du coronavirus humain OC43 est essentielle pour la production de virus infectieux et la propagation en cellules neuronales, et est un déterminant critique de la neurovirulence.

Résumé français : La souche OC43 du coronavirus humain (HCoV-OC43) est un pathogène respiratoires ubiquitaire possédant des capacités neurotropes. La protéine d'enveloppe structurale (E) du coronavirus possède des motifs spécifiques impliqués dans des interactions protéine-protéine ou dans la formation des canaux ioniques homo-oligomériques, et qui jouent divers rôles dans la morphologie/l'assemblage des virions et dans la réponse cellulaire à l'infection et/ou la virulence. En utilisant des virus recombinants dépourvus de la protéine E ou ayant les potentiels domaine transmembranaire ou motif de liaison PDZ mutés, nous avons démontré qu'une protéine HCoV-OC43 E entière et fonctionnelle est nécessaire pour la production optimale de virus infectieux recombinants. De plus, l'infection par HCoV-OC43 de lignées cellulaires épithéliales et neuronales humaines, de cultures primaires murines provenant du cerveau, de même que l'infection par les voies intranasale et intracérébrale du système nerveux central de la souris a montré que la protéine E joue un rôle important dans la neuroinvasion, la réplication et la propagation efficace du virus, ainsi que pour sa neurovirulence.

Confirmation de soumission :

From: eesserver@eesmail.elsevier.com [<mailto:eesserver@eesmail.elsevier.com>]

Sent: 15 novembre 2017 15:44

To: Desforges, Marc

Subject: Virology: Submission Confirmation

Title: The neuroinvasive OC43 human coronavirus envelope protein is a critical determinant of neurovirulence and CNS pathology Corresponding Author: Dr. Marc Desforges

Authors: Jenny K Stodola, MSc; Guillaume Dubois, MSc; Alain Le Coupanec, MSc; Pierre J Talbot, PhD Regular Article

Dear Dr. Desforges,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Virology.

You will be able to check the status of your manuscript by logging onto the Elsevier Editorial System as an author:

<https://ees.elsevier.com/viro/>

Your paper will now be assigned a manuscript number, and you will receive an e-mail containing this number shortly.

Thank you for submitting your manuscript to Virology.

Kind regards,

Virology

5.1 Abstract

The OC43 strain of human coronavirus (HCoV-OC43) is an ubiquitous respiratory tract pathogen possessing neurotropic capacities. Coronavirus structural envelope (E) protein possesses specific motifs involved in protein-protein interaction or in homo-oligomeric ion channel formation, which are known to play various roles including in virion morphology/assembly and in cell response to infection and/or virulence. Making use of recombinant viruses either devoid of the E protein or harboring mutations either in putative transmembrane domain or PDZ-binding motif, we demonstrated that a fully functional HCoV-OC43 E protein is needed for optimal production of recombinant infectious viruses. Furthermore, HCoV-OC43 infection of human epithelial and neuronal cell lines, of mixed murine primary cultures from the central nervous system and of mouse central nervous system itself showed that the E protein is critical for efficient and optimal virus neuroinvasion, replication and propagation, and thereby for neurovirulence.

140 words.

Keywords (max 10): HCoV-OC43, Coronavirus, E protein, Transmembrane domain, PDZ binding motif, Virus production, Pathogenesis

5.2 Introduction

Coronaviruses are widespread RNA viruses of the Nidovirales order, Coronaviridae family, most often associated with human and veterinary respiratory infections (de Groot et al. 2012). Of the six human-infecting coronavirus strains, four (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 and HCoV-OC43) are currently co-circulating and elicit respiratory illnesses (Vabret et al. 2009). Coronaviruses also represent a significant public health concern due to the recent zoonotically emerged, highly pathogenic species, SARS coronavirus (SARS-CoV) (Drosten et al. 2003; Ksiazek et al. 2003) in 2002-2003 and, since 2012, Middle-East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) (Zaki et al. 2012), localized to the Arabian Peninsula, but with sporadic travel-related outbreaks worldwide. In addition to their respiratory tropism, human coronaviruses have been detected concurrently with severe and acute neurological symptoms (Arabi et al. 2015; Morfopoulou et al. 2016; Yeh et al. 2004) and shown to naturally infect the central nervous system (CNS) (Arbour et al. 2000; Gu et al. 2005; Xu et al. 2005) with neurons demonstrated as the main target of infection in HCoV-OC43 (Bonavia et al. 1997; Favreau et al. 2012; Jacomy et al. 2006; Jacomy et al. 2003) and SARS-CoV (Gu et al. 2005; Xu et al. 2005).

Coronaviruses represent the largest known enveloped RNA (single-stranded positive sense) viruses with a genome of approximately 30 kb (de Groot et al. 2012). The viral envelope is composed of four or five proteins, the spike (S), membrane (M), envelope (E) and hemagglutinin-esterase protein (HE), the latter in some β coronaviruses genus, such as HCoV-OC43. Coronavirus E proteins are 74-109 amino acids in length, 84 amino acids for HCoV-OC43, and share only a small amount of sequence identity between coronavirus species. However, its secondary structure, composed of a short N-terminal domain followed by a single hydrophobic transmembrane domain (TMD) and hydrophilic cytoplasmic tail, remains overall conserved and is suggested to be more important than sequence for function (Kuo et al. 2007; Torres et al. 2005). The importance of the presence of the E protein in the viral envelope is emphasized by the fact that there are only about twenty E molecules incorporated within the virion structure (Godet et al. 1992; D. X. Liu et al. 1991; Yu et al. 1994) and deletion of the protein can either completely prevent the production of detectable infectious virions (Almazán et al. 2013; Curtis et al. 2002; Ortego et al. 2007; Ortego et al. 2002) or significantly reduce infectious virus titers (DeDiego et al. 2007; DeDiego et al. 2008; Kuo et al. 2007; Kuo et al. 2003).

The majority of the coronavirus E protein in the infected cell is localized within the secretory pathway between the membranes of the endoplasmic reticulum (ER), Golgi and intermediate compartment between them (ERGIC) (Cohen et al. 2011; Nieto-Torres et al. 2011;

Venkatagopalan et al. 2015). It is in this intracellular region that additional functions mediated by various domains of the coronavirus E proteins are proposed to occur. Homo-pentameric oligomerization of the E protein TMD in membranes to form ion channels, called viroporins, has been predicted for several coronaviruses (Torres et al. 2005) and extensively studied for species such as SARS-CoV (Nieto-Torres et al. 2014; Pervushin et al. 2009) or avian infectious bronchitis virus (IBV) (Ruch et al. 2012b; Westerbeck et al. 2015). Another domain found at the extreme C-terminal end of the E protein, a PDZ-domain binding motif (PBM), has also been predicted for several coronavirus species (Jimenez-Guardeño et al. 2014). This protein-protein interaction motif capable of interrupting normal cellular functions, has been demonstrated in other viruses to play important roles in replication, dissemination in the host and pathogenesis (Javier et al. 2011). The multiple properties of coronavirus E proteins have not yet been fully investigated or explained, and can at times differ between coronavirus species. The multifunctionality of the E protein could be explained by the presence of two distinct pools (monomeric versus homo-oligomeric states) present in the infected cell (Westerbeck et al. 2015). Furthermore, the different motifs found within the protein (Jimenez-Guardeño et al. 2015) could mediate different specific functions. The coronavirus E protein was also recently recognized as an important virulence factor for the SARS-CoV (Jimenez-Guardeño et al. 2014), where deletion of the whole or part of the protein led to an attenuated pathology in mouse lungs (DeDiego et al. 2008; DeDiego et al. 2007), attenuation which was later linked to the E protein TMD and PBM (Nieto-Torres et al. 2014; Jimenez-Guardeño et al. 2014).

HCoV-OC43 represents a circulating strain of human coronavirus causing respiratory illness, which is naturally capable of invading the CNS where neurons are preferentially targeted for infection. In this study, we demonstrate that the fully functional HCoV-OC43 E protein (harboring specific TMD and PBM) is critical in infectious virus production and dissemination in epithelial and neuronal cell cultures and in the murine CNS and that it represents a virulence factor, a first demonstration for this coronavirus species.

5.3 Results

Deletion of HCoV-OC43 E protein abrogates infectious virion production, introduces a strong selection pressure for reversion in progeny.

In order to evaluate the importance of the HCoV-OC43 E protein in infectious virion production, a stop codon was introduced at the beginning of the E gene of our cDNA infectious clone, pBAC-OC43^{FL} (St-Jean et al. 2006), preventing corresponding full-length E protein production in the resultant recombinant virus (Figure 5-1A). Transfection of BHK-21 cells with the pBAC-OC43^{FL} led to the detection of reference HCoV-OC43 recombinant infectious virus (rOC/ATCC) whereas transfection with the pBAC-OC43-E-Stop mutant did not lead to any detectable infectious virus (rOC/E-Stop) (Figure 5-1B).

To confirm that the inability to detect infectious viral particles was due to the lack of E protein expression, we wished to verify whether viral production could be rescued with wild-type E protein. Transfection of a plasmid containing the reference HCoV-OC43 E gene, pcDNA(OC-E), in BHK-21 cells clearly showed via Western blot assay (WB) that the E protein was produced compared to an empty plasmid condition (Figure 5-1C). Subsequently, a transient co-transfection was conducted in the same cells with pBAC-E-Stop and pcDNA(OC-E) and, by making use of a monoclonal antibody against the S protein of HCoV-OC43, we confirmed that the co-transfection did not affect transfection efficiency, and that the viral S protein was produced at equivalent levels in cells transfected with pBAC-OC43^{FL} alone or pBAC-E-Stop with pcDNA(OC-E) or empty plasmid (Figure 5-1D). Following the co-transfection, infectious particles production was rescued to detectable levels in a dose-dependent manner (Figure 5-1E). Viral RNA was harvested and cDNA sequenced to confirm that the infectious particles detected after transfection corresponded to rOC/ATCC and rOC/E-Stop mutant (data not shown).

As we were able to rescue infectious particles production through transient complementation, we wondered whether this resultant virus, still lacking the E gene, could be amplified further in subsequent passages. To this end, we amplified the viral stocks of all transfected plasmids three times without trans-complementation on HRT-18 epithelial cells, each time normalizing viral titers to the lowest detectable titer to infect cells at an identical MOI for all recombinant viruses (Figure 5-1F). Throughout the amplification process we were consistently unable to detect infectious viral particles issuing from viral stocks of rOC/E-Stop. Amplifications of initially complemented viral stocks of rOC/E-Stop led to detectable titers which decreased over

the course of each subsequent amplification compared to rOC/ATCC. Sequencing of viral RNA confirmed that the E gene in the viral rOC/E-Stop stocks contained the introduced stop codon at each amplification step (data not shown). These results demonstrate that production of progeny infectious HCoV-OC43 virions is still possible in the absence E protein, however the efficiency of the process is dramatically diminished.

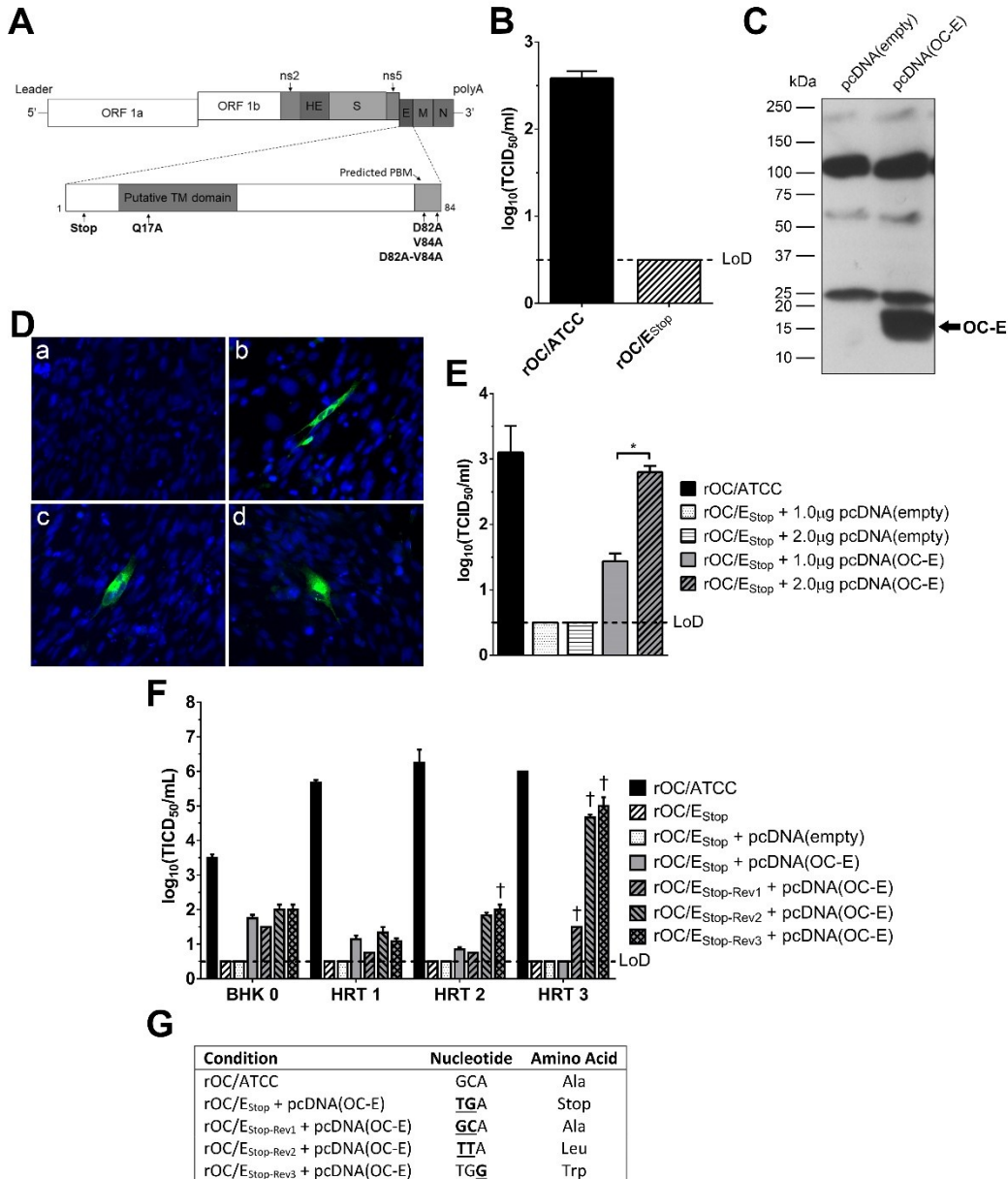


Figure 5-1 The HCoV-OC43 E protein is critical for infectious particle production. (A) Representation of the full-length HCoV-OC43 genome found within the pBAC-OC43_{FL} infectious clone (top) with a schematic representation of the HCoV-OC43 E gene to be modified at various amino acid positions indicated at their relative positions within the

protein (bottom). TM, transmembrane; PBM, PDZ-binding motif. (B) Evaluation of infectious virus production corresponding to pBAC-E-Stop transfection of BHK-21 cells compared to pBAC-OC43FL. (C) Insertion of wild-type E gene into pcDNA3.1(+) expression vector, pcDNA(OC-E), yielded corresponding HCoV-OC43 E protein expression compared to empty vector. (D) Visualization of transfection efficiency on BHK-21 cells of various conditions by immunofluorescence detection of HCoV-OC43 S protein (green), nucleus staining with DAPI (blue). Subpanels: (a) mock, (b) pBAC-OC43FL (rOC/ATCC), (c) pBAC-E-Stop (rOC/E-Stop + 2 μ g pcDNA(OC-E)), (d) pBAC-E-Stop (rOC/E-Stop + 2 μ g pcDNA(empty)). (E) Transient co-transfection of pBAC-E-Stop and 1 or 2 μ g pcDNA(OC-E) in BHK-21 cells rescued detectable infectious virus in a dose-dependent manner. (* P<0.05) (F) Evaluation of infectious recombinant virus production after transient co-transfection of pBAC-E-Stop and pcDNA(OC-E) in BHK-21 cells (BHK 0). The supernatants (P0) were amplified three times by inoculation of HRT-18 cells (HRT 1-3). Infectious viral titer differences observed between experiments, revealed, by sequencing (G), the appearance of reversions at the position in the E gene where a stop codon was introduced are indicated by bold and underline. LOD, limit of detection. † (cross) indicates appearance of reversion(s) in the HCoV-OC43 E gene in viral stocks as detected by sequencing.

Interestingly, when conducting independent experiments following the same experimental approach, the titers of initially complemented rOC/E-Stop sometimes increased substantially after two or three amplifications, approaching reference virus titer levels after three rounds of amplification on HRT-18 cells (Figure 5-1F). Sequence analysis of the E gene of the corresponding viral stocks revealed that a reversion of sequence appeared at the position where the stop codon had been initially introduced; representing reversion to wild-type or new amino acids (Figure 5-1G). Taken together, these data demonstrate that the HCoV-OC43 E protein is critical for efficient infectious virion production in epithelial cells.

Neuronal cells are susceptible to infection with HCoV-OC43 lacking E protein but progeny virus production is severely inhibited.

HCoV-OC43 is neuroinvasive (Arbour et al. 2000) and neurotropic, with the neuron being the main target of infection in the CNS (Jacomy et al. 2006; Jacomy et al. 2003). Therefore, we sought to investigate whether the absence of the E protein would modify these neurotropic capacities by infecting a susceptible differentiated human neuronal cell line (LA-N-5) or mixed primary cultures of murine CNS cells. Initially complemented rOC/E-Stop, previously recovered from transfection on BHK-21 cells (P0), was used for infection and infectious viral titers determined over a period of 72 hours post-infection (hpi). This revealed an important decrease of infectious virus production for human cells (Figure 5-2A), which was exacerbated in primary murine cells, where virus titers were under the limit of detection (Figure 5-2B). However, in these primary cultures, low levels of infected cells were visualized by immunofluorescence (IFA), suggesting that

infection was possible even for the complemented rOC/E-Stop virus but that propagation was severely inhibited (Figure 5-2C).

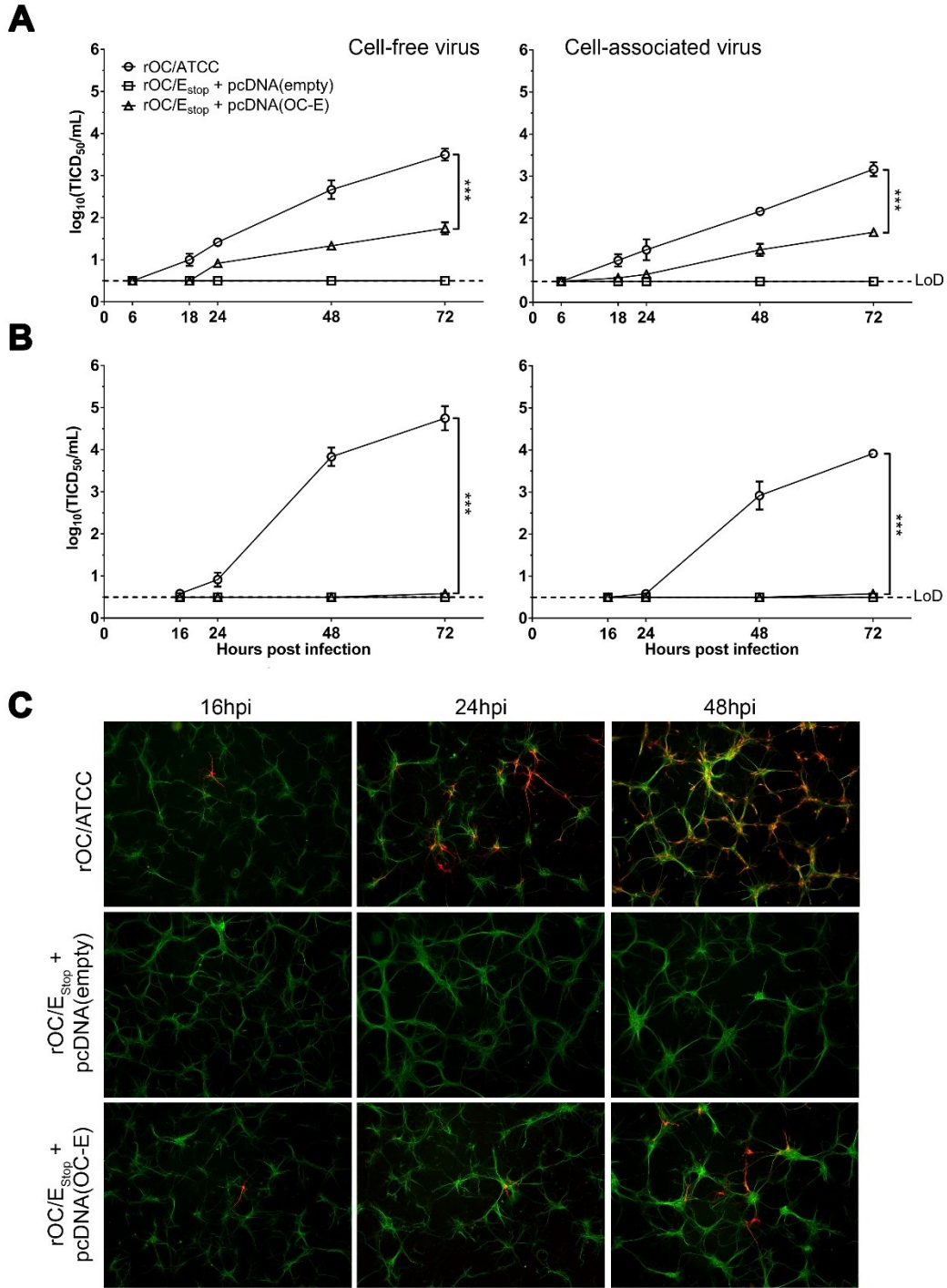


Figure 5-2 HCoV-OC43 lacking E protein can infect neuronal cells but replication is severely impaired. LA-N-5 (A) and mixed primary mouse CNS cells (B) were infected with infectious

supernatant (P0) lacking E protein, rOC/E-Stop + pcDNA(empty), or initially complemented virus, rOC/E-Stop + pcDNA(OC-E). Cell-free and cell-associated virus infectious titers were determined over 72 hours post-infection. Representative of three different experiments. Statistical significance was tested at 72hpi (***) $P < 0.001$). (C) IFA on infected mixed primary murine CNS cells over 48h. Green represents the microtubule associated protein 2 (MAP2) staining in neurons; red represents viral antigens.

HCoV-OC43 E protein putative transmembrane domain integrity is important for efficient infectious virion production and efficient infection of neuronal cells.

The transmembrane domain (TMD) of some coronavirus E protein is known to homo-oligomerize in membranes and appears to modulate infectious virus production (Nieto-Torres et al. 2014). In order to determine the effect of HCoV-OC43 E protein TMD on virus production in cell culture, pBAC-OC43FL was modified at a key amino acid position previously identified in other coronaviruses to be critical for the stability of this specific domain (Nieto-Torres et al. 2014; Ruch et al. 2012b) and compared against wild-type virus during infection of cells. The large, polar glutamine at position 17 of the HCoV-OC43 E protein putative TMD was modified into a smaller, non-polar alanine (pBAC-E-TM-Q17A) in order to diminish any possible ion channel selectivity conveyed by this amino acid (Pervushin et al. 2009) at the opening of the putative ion channel.

Transfection of transmembrane mutant in BHK-21 cells yielded detectable virus titers of rOC/E-TM_{Q17A}, which was further amplified on HRT-18 cells (P1) to significantly lower titers compared to reference virus (Figure 5-3A). Infection of human LA-N-5 cells and mixed primary cultures of mouse CNS cells showed a similar virus production kinetic with an initial delay over the first 24hpi in the cell-free fraction (Figure 5-3B and C, left panels). However, in the cell-associated fractions, the amount of recovered infectious virus particles was almost identical to those of the reference virus (Figure 5-3B and C, right panels), suggesting a possible defect in virus release. In order to ascertain this potential defect, human LA-N-5 cells were infected with either rOC/ATCC or rOC/E-TM_{Q17A}, and both infectious titer and viral RNA copies (associated to total viral particles) in the cell-free fraction were quantified at 16 hours post-infection (Figure 5-3D). Only the infectious titer was quantified in the cell-associated fraction as we are not able to differentiate between viral genomic and subgenomic RNA and between viral RNA that would be inserted in virion or free in the infected cell. Similar levels of viral infectious particles were measured in the cell-associated fractions for both viruses at 16hpi indicating that the cells have been infected with the same efficiency and that the viral replication early steps are not affected by the alteration of the TMD. However infectious viral titer in the supernatant (cell-free fraction) of cells infected with rOC/E-

TM_{Q17A} was significantly reduced compared to cells infected with rOC/ATCC, although both viruses produced similar amount of total viral particles. These findings are supported by immunofluorescence assay showing a delay in propagation of rOC/E-TM_{Q17A} over 72 hpi compared to reference virus (Figure 5-3E, Figure S5-1).

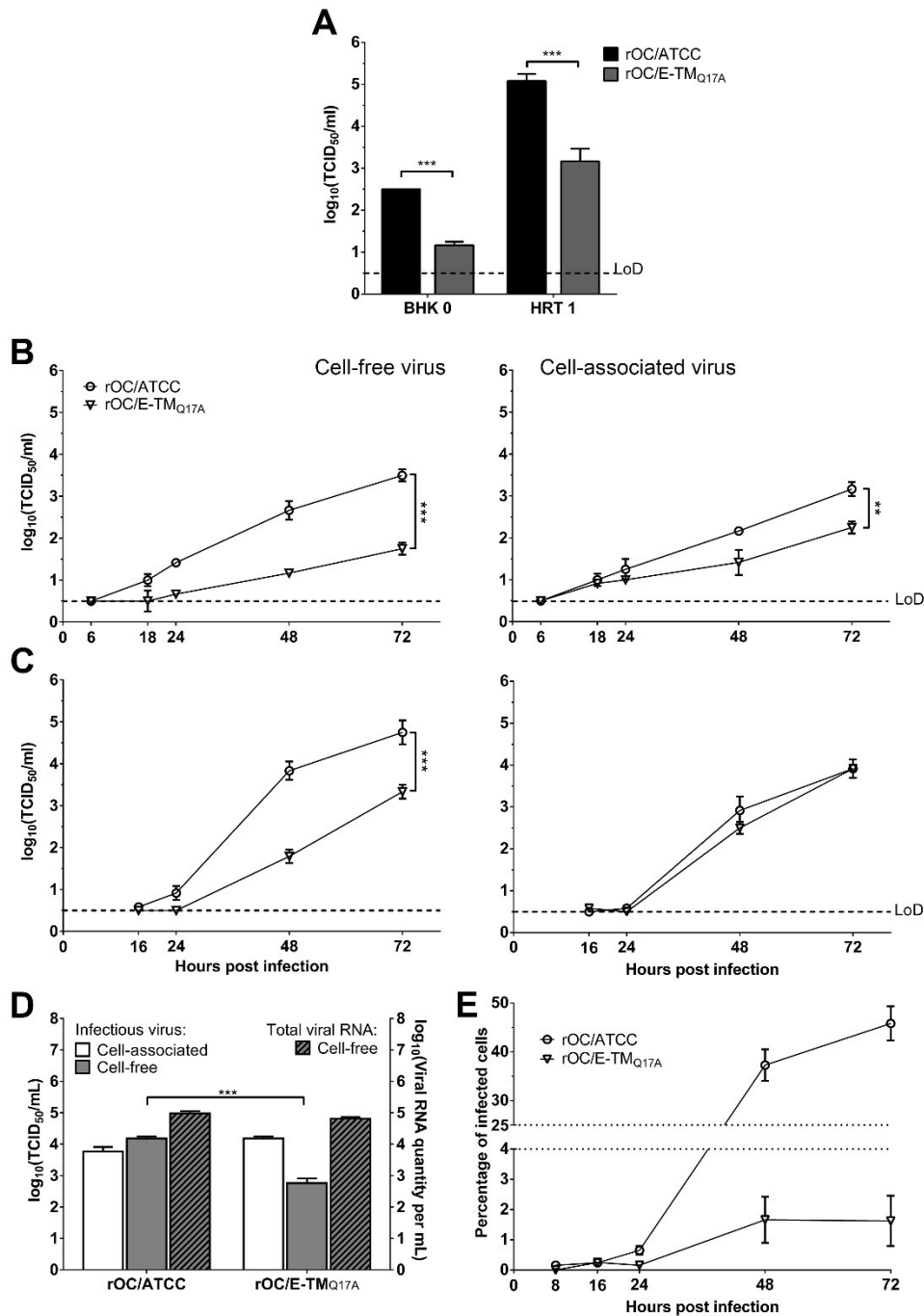


Figure 5-3 The putative HCoV-OC43 transmembrane domain plays an important role in infectious virion production, release, replication and propagation in neuronal cells. (A) Production of infectious virus after transfection of E protein transmembrane mutant in BHK-21 cells (BHK 0) and amplification on HRT-18 cells (HRT 1). (B) LA-N-5 human neuronal cells and (C) mixed primary mouse CNS cells were infected with rOC/E-TM_{Q17A}. Cell-free and cell-associated virus fractions were recovered and titrated over 72 hours. The results show a representative experiment. Statistical significance was tested at 72hpi (** P<0.01; *** P<0.001). (D) Infectious virus production was evaluated in the cell-associated or cell-free fraction, and total viral RNA (representative of total viral particles production) was quantified by RT-qPCR in the cell-free fraction of rOC/ATCC or rOC/E-TM_{Q17A} infected cells following 16 hours of incubation with 200nM chloroquine to prevent re-infection. (E) The percentage of LA-N-5 cells infected by the transmembrane mutant (representative of viral propagation) was quantified by immunofluorescence and cell profiler software and compared to the reference virus over 72 hours post-infection. LOD, limit of detection.

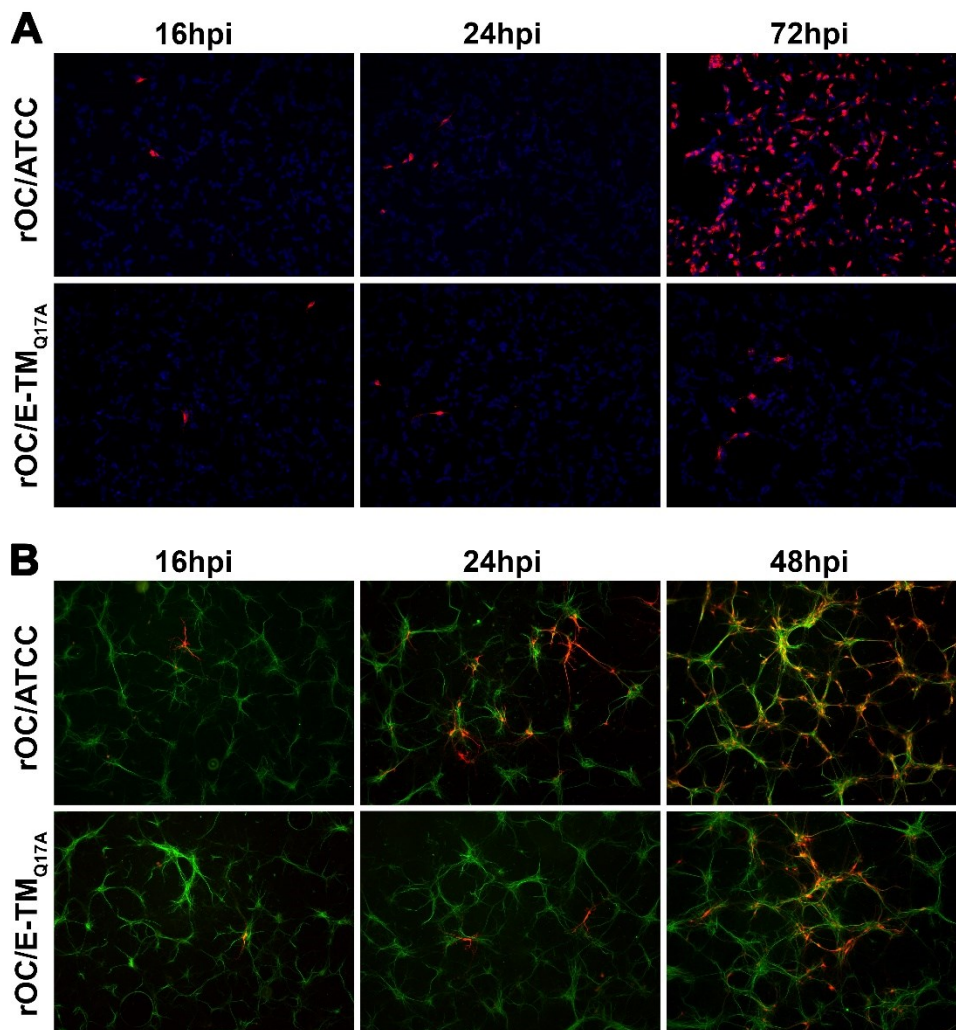


Figure S5-1 HCoV-OC43 E protein transmembrane (TM) domain is important for its efficient propagation in human and murine neuronal cells. (A) Differentiated LA-N-5 and (B) mixed primary murine CNS cells were infected with either rOC/ATCC or rOC/E-TM_{Q17A} at the same MOI and cells were fixed at several time points and HCoV-OC43 S protein (red)

was revealed by immunofluorescence staining to follow viral propagation. Green represents the microtubule associated protein 2 (MAP2) staining in neurons of the mixed primary murine CNS cells. Nucleus were stained with DAPI (blue).

HCoV-OC43 E protein putative C-terminal protein-protein interaction motif is critical for efficient infectious virion production and dissemination.

Bioinformatics analysis and modeling suggest that several coronavirus species possess a PDZ-domain binding motif (PBM) at the extreme C-terminus of their E protein that could interact with cellular and viral proteins (Jimenez-Guardeño et al. 2014). We sought to investigate whether the putative four-amino acid E protein PBM of HCoV-OC43 modulates production of infectious particles and infection of susceptible cells. To this end, we modified our cDNA infectious clone to change the two key amino acids of the putative PBM motif, at the -0 and -2 positions from the C-terminal end respectively, into inert alanines, and thereby abrogated putative motif recognition by potential interaction partner(s). Single amino acid mutants (pBAC-OC-E-PBM-D82A and pBAC-OC-E-PBM-V84A) or double mutant (pBAC-OC-E-PBM-D82A-V84A) (Figure 5-1A), were transfected in BHK-21 cells and amplified on HRT-18 cells at the same multiplicity of infection and compared to reference virus (Figure 5-4A). Amplification on HRT-18 cells demonstrated that viral titers of the double mutant were significantly decreased compared to other viruses.

To investigate whether the ability to infect susceptible cells, replicate and disseminate is affected by the putative C-terminal PBM in the context of the CNS, LA-N-5 or mixed primary cultures of murine CNS cells were infected with single or double mutant PBM viruses and viral titers and propagation were analyzed. In LA-N-5 cells, after 18 hpi, the titers of rOC/E-PBM_{D82A-V84A} were significantly decreased in the cell-free and cell-associated virus fraction compared to single PBM mutants or reference viruses and total infectious virus titers of the double mutant was severely altered over 72 hours (Figure 5-4B). This trend was exacerbated in primary mixed murine CNS cultures, which showed no detection of infectious rOC/E-PBM_{D82A-V84A} compared to single mutant PBM and reference viruses (Figure 5-4C). As no differences were observed between both single PBM mutant (rOC/E-PBM_{D82A} and rOC/E-PBM_{V84A}) and reference virus, we continued the characterization of the potential PBM only with the double mutant virus (rOC/E-PBM_{D82A-V84A}). Immunofluorescence analysis indicated that cells could be infected by all viruses but we detected a significant difference in propagation for both LA-N-5 cells (Figure 5-4D, Figure S5-2A) and primary mixed murine CNS cultures (Figure S5-2B), showing a significantly reduced propagation for the double PBM mutant rOC/E-PBM_{D82A-V84A}.

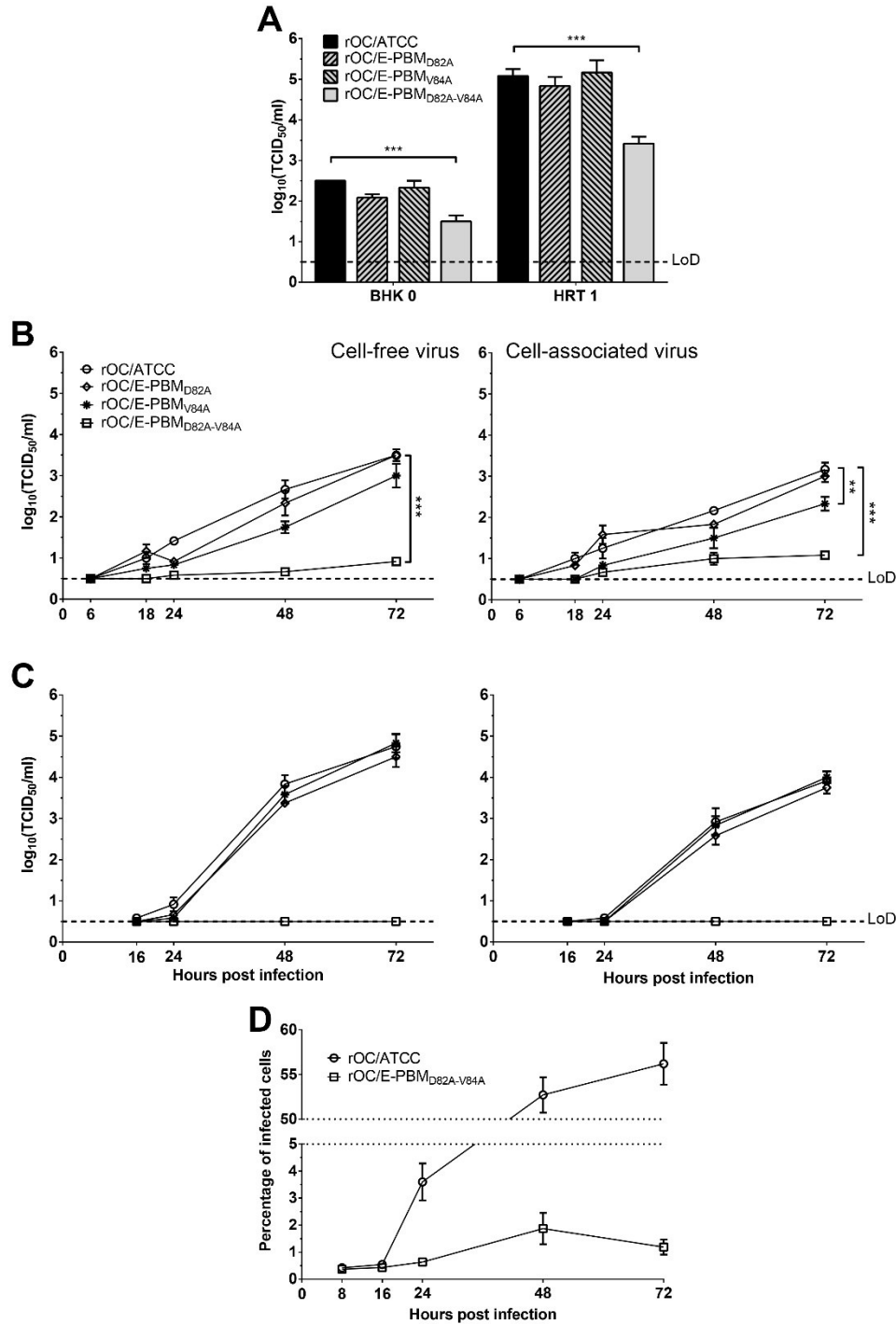


Figure 5-4 A functional PDZ-domain binding motif at the C-terminal end of the HCoV-OC43 E protein is critical for efficient virus production and spread in neuronal cells. (A) Production of infectious virus after transfection of various E protein mutants with fully or partially abrogated predicted PBM after transfection in BHK-21 cells (BHK 0) and amplification on HRT-18 cells (HRT 1). The results show a representative experiment. Cell-free and cell-associated infectious virus production were determined at indicated timepoints after infection at an MOI of 0.05 on (B) LA-N-5 cells and (C) mixed primary cultures of mouse CNS cells. The results show a representative experiment. Statistical significance

was tested at 72hpi (** P<0.01; *** P<0.001). (D) The percentage of LA-N-5 cells infected by the transmembrane mutant (representative of viral propagation) was quantified by immunofluorescence and cell profiler software and compared to the reference virus over 72 hours post-infection. LOD, limit of detection.

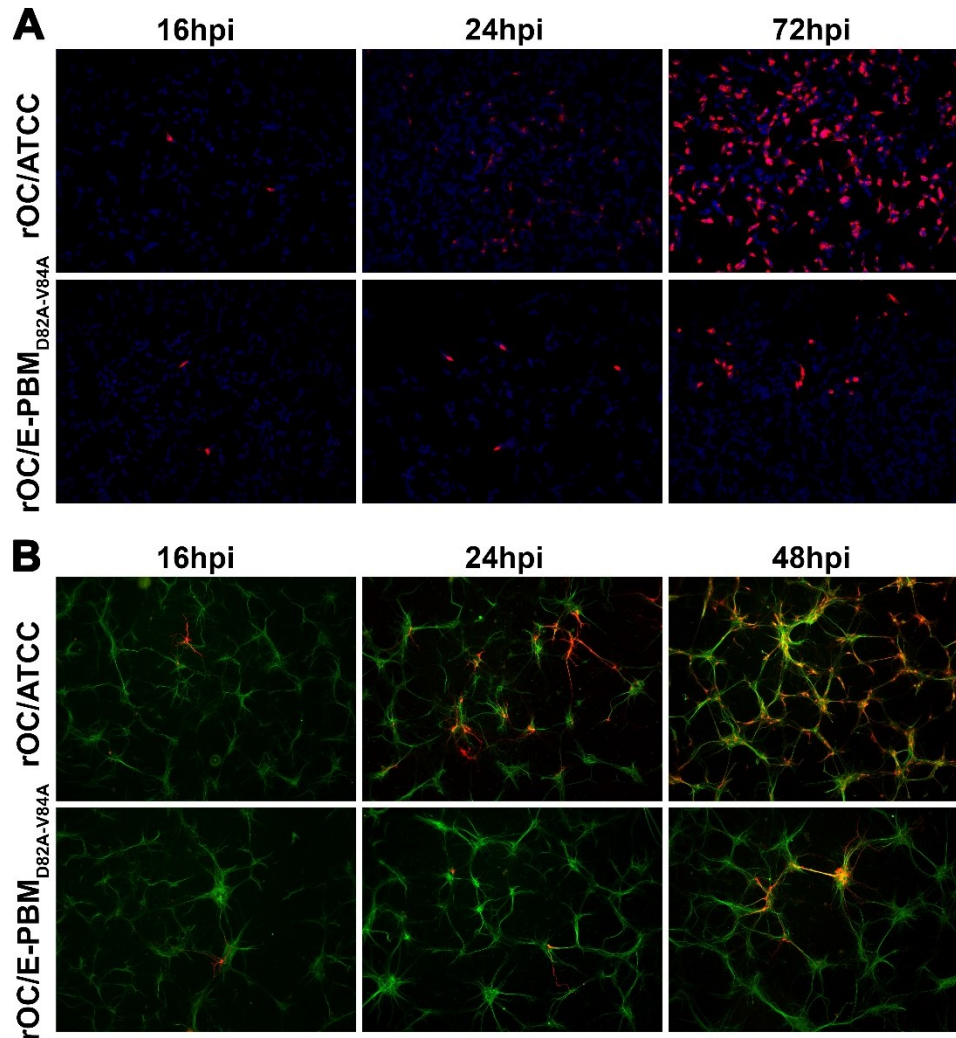


Figure S5-2 HCoV-OC43 E protein PBM motif greatly improves its propagation in human and murine neuronal cells. (A) Differentiated LA-N-5 and (B) mixed primary murine CNS cells were infected with either rOC/ATCC or rOC/E-TM_{D82A-V84A} at the same MOI and cells were fixed at several time points and HCoV-OC43 S protein (red) was revealed by immunofluorescence staining to follow viral propagation. Green represents the microtubule associated protein 2 (MAP2) staining in neurons of the mixed primary murine CNS cells. Nucleus were stained with DAPI (blue).

Deletion of HCoV-OC43 E protein or alteration of its putative TMD and PBM alter its relative infectivity.

Given that the coronavirus E protein is known to play an important role in infectious virion formation and maturation (de Groot et al. 2012), we then looked if its deletion or the alteration of its putative functional domains could also alter the total virion production. Using a RT-qPCR approach, the quantity of total viral particles in stocks of rOC/ATCC, rOC/E_{stop}, rOC/E-TM_{Q17A} or rOC/E-PBM_{D82A-V84A} were evaluated and compared to the infectious titer of the corresponding viruses (Figure 5-5A). Whereas the reference virus possesses a ratio of infectious virion to total viral particles of approximately 1:100, the rOC/E_{stop} mutant has a ratio of 1:56 000 correlating with the defect in infectious virion production previously observed. Surprisingly, the quantity of total viral particles (evaluated as total RNA copy number by RT-qPCR) was close to the reference virus. The same defect was observed for rOC/E-TM_{Q17A} but to a lesser extent with a ratio of 1:1065, but it was absent for the rOC/E-PBM_{D82A-V84A} mutant. Indeed, even though this latter mutant produces less virions compared to the reference virus, a very high proportion of them are infectious, as the ratio of infectious over total particles is about 1:2 (Figure 5-5A). These observations of modified ratio were confirmed by immunofluorescence comparing the percentage of infected cells when the quantity of virus used for the infection of LA-N-5 cells was normalized either to the number of infectious virions or to the number of total viral particles (Figure 5-5B). All these findings demonstrate that the HCoV-OC43 E protein is critical for efficient replication in epithelial and neuronal cells, and that its functional domains play important and potentially distinct roles during the production of new infectious virions.

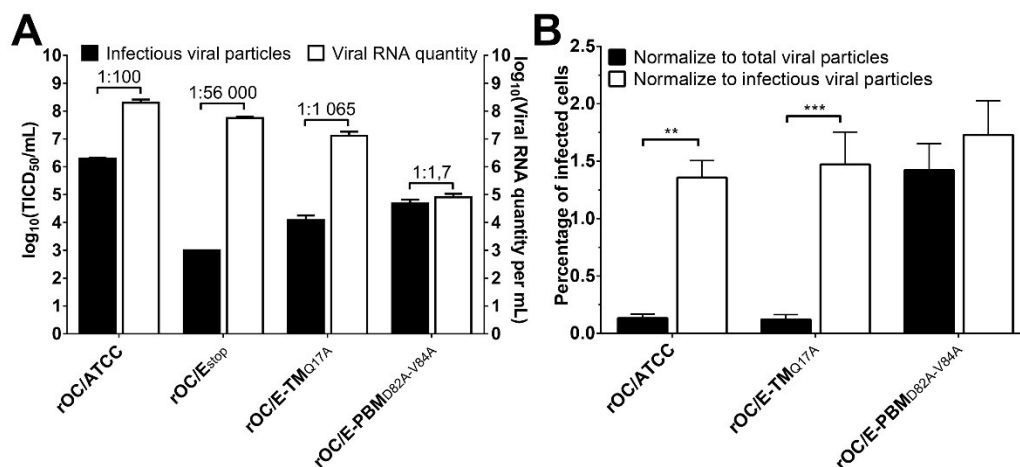


Figure 5-5 HCoV-OC43 E protein and its putative TMD and PBM modulate relative virus infectivity. (A) Infectivity assay between viruses: quantification of viral RNA in viral stocks (absolute quantity in RNA copy representative of total viral particles) and of the number of

infectious particles in viral stocks. Ratio of infectious to total viral particles are indicated over each virus. (B) The percentage of LA-N-5 cells infected by the different viruses was quantified by immunofluorescence and cell profiler software at 16hpi in the presence of 200µM Chloroquine (reinfection inhibitor). Infection were performed with amount of viruses normalized either on the quantity of viral RNA (total particles) or on the number of infectious viral particles. (** P<0.01; *** P<0.001)

Fully competent HCoV-OC43 E protein is required for optimal neuroinvasion and is a determinant factor of neurovirulence.

As HCoV-OC43 is naturally neuroinvasive and neurovirulent in mice (Brison et al. 2011; Desforges et al. 2014; Le Coupanec et al. 2015) and that the E protein is important for efficient propagation in neuronal cells (Figure 5-3 and 5-4), we wished to investigate the importance of the two functional domains of E in the process of neuroinvasion. Seven-day-old C57Bl/6 mice were infected and RT-qPCR performed at 5 days post-infection on complete brain revealed that mutant viruses were still neuroinvasive compared to reference virus, however the copy number of viral RNA was significantly lower for both mutants (Figure 5-6A). This indicates that the TMD and PBM are not essential for HCoV-OC43 neuroinvasion. Moreover, it is interesting to note that the 4 mice (3 infected with the reference virus, and one with the TMD mutant) with a high number of viral RNA copy ($>10^{13}$) were the only ones to show signs of illness at 5 dpi.

To investigate the role of the E protein in the induction of HCoV-OC43-induced neurological pathology, 22-day-old C57Bl/6 mice were intracerebrally infected with either rOC/ATCC, rOC/E-TM_{Q17A} or rOC/E-PBM_{D82A-V84A}, and the development of illness was monitored for 21 days after infection. During this period, only mice infected with the reference virus died, all other mice survived the infection (Figure 5-6B). Moreover, mice infected with rOC/E-PBM_{D82A-V84A} did not show any significant differences of weight gain compared to sham infected mice (Figure 5-6C), nor did they show any sign of neurological disease compared to mice infected with the reference virus (Figure 5-6D). However, mice infected with rOC/E-TM_{Q17A} showed an intermediate weight gain profile between mice infected with the reference virus and the sham infected mice (Figure 5-6C), suggesting that these mice were developing a disease, which was confirmed by the neurological symptoms developed by several mice, although to a lesser extent than mice infected with the reference virus (Figure 5-6D). Mice infected with initially complemented rOC/E_{stop} did not show any signs of illness whether in terms of weight gain, or neurological symptoms (Figure S5-3A-C).

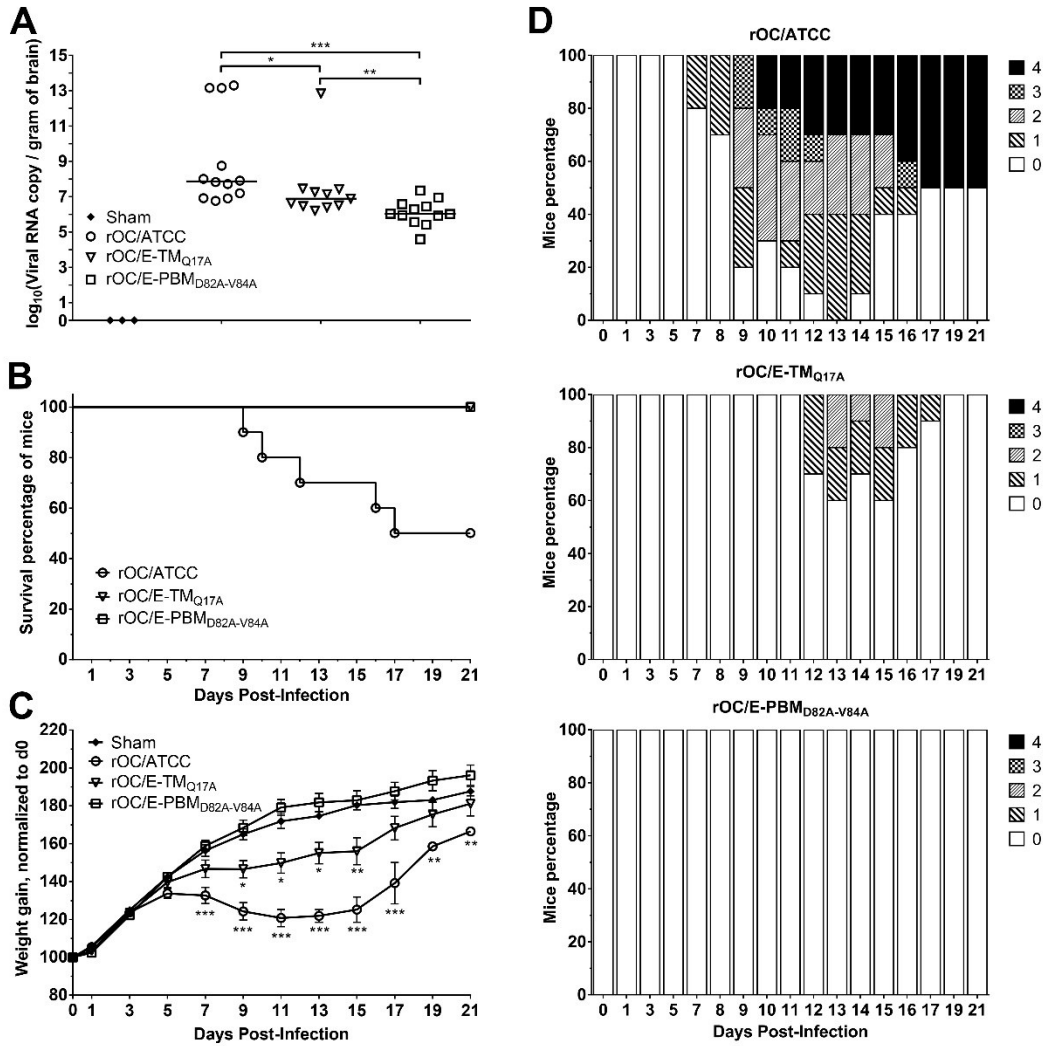


Figure 5-6 A fully functional HCoV-OC43 E protein is associated with optimal neuroinvasion and increases neurovirulence. (A) 7-day-old C57Bl/6 mice received 10^3 TCID₅₀/20 μ L of rOC/ATCC, rOC/E-TM_{Q17A} or rOC/E-PBM_{D82A-V84A} by the IN route. Neuroinvasion was detected and quantified by RT-qPCR on brain RNA at 5 days post-infection, each point represents a single mouse. (B) Twenty-two-day-old C57Bl/6 mice received $10^{2.5}$ TCID₅₀/10 μ L of rOC/ATCC, rOC/E-TM_{Q17A} or rOC/E-PBM_{D82A-V84A} by the IC route and were observed for survival over 21 days following the injection. (C) Infected mice were weighted every 2 days for a period of 21 days following infection. The weight gain is shown as percentage of d0 set at 100%. (D) Evaluation of the clinical scores (percentage of mice at each level of the scale) of mice infected by rOC/ATCC, rOC/E-TM_{Q17A} or rOC/E-PBM_{D82A-V84A} based on neurological symptoms described in clinical score scale between level 0 and 4 over a period of 21 days (see Materials and methods). Representative of three different experiments. (* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001)

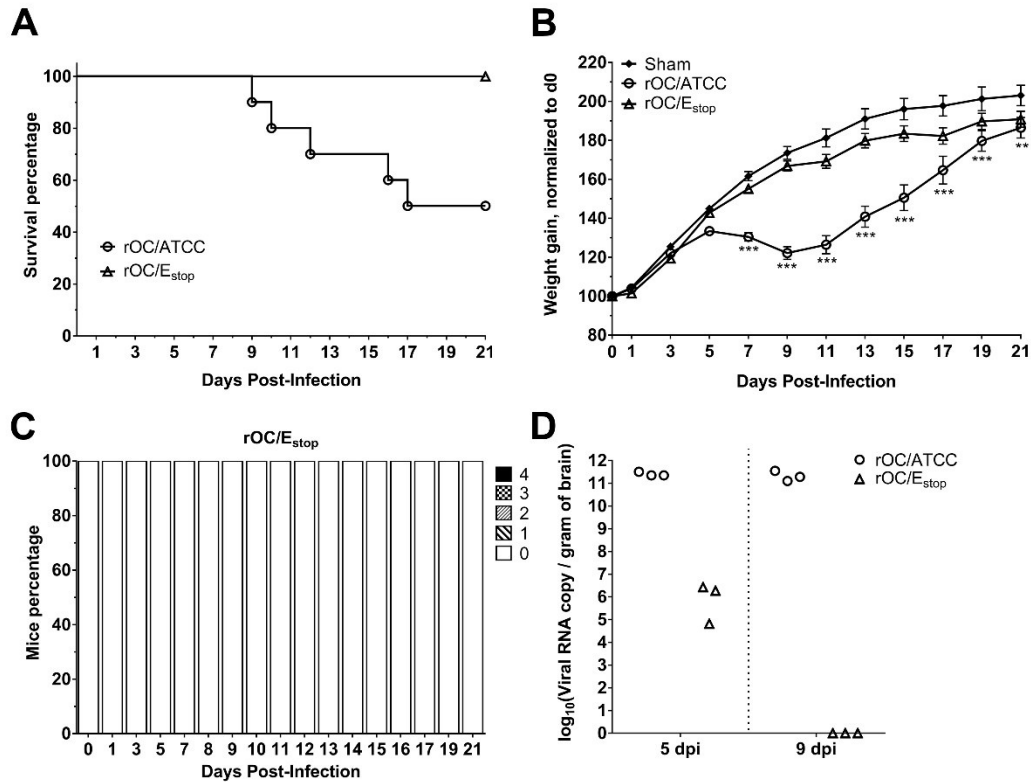


Figure S5-3 HCoV-OC43 E protein is required for pathogenesis in the CNS. (A) Survival curves of mice in percentage over 21 days following the injection. (B) Infected mice were weighted every 2 days for a period of 21 days following infection. The weight gain is shown as percentage of j_0 set at 100%. (C) Evaluation of the clinical scores (percentage of mice at each level of the scale) of mice infected by rOC/E_{stop} based on neurological symptoms described in clinical score scale between level 0 and 4 (see Materials and methods). (D) Viral RNA was detected and quantified by RT-qPCR in the brain of infected mice at 5 and 9 days post-infection. Representative of three different experiments. (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

HCoV-OC43 E protein and its TMD and PBM are essential for efficient replication in the murine CNS.

As HCoV-OC43 E protein and its functional domains modulate viral replication and propagation in human and murine neuronal cultures (Figure 5-3, and 5-4), we examined if the differences in neurovirulence observed (Figure 5-6) were associated with defective infectious virus productions and propagation in the CNS. Infection of 22-day-old C57Bl/6 mice with reference and E protein mutants revealed that the infectious titer in the brain (Figure 5-7A) and the spinal cord (Figure 5-7B) was significantly reduced for the TMD mutant. This altered replication in the brain correlates with an extremely weak production in the spinal cord, where infectious virions were detected in only one mouse at 5 dpi. Production of infectious particles was under the limit of

detection in mice infected with the PBM mutant, correlating with the total absence of neurovirulence (Figure 5-6). However, the PBM mutant RNA was detected in the brain at 5 and 9 dpi, although at a lower level than the reference virus or the TMD mutant (Figure 5-7C), indicating that this virus was capable of replicating at a low level in the brain. Similar observations were obtained following mouse infection with rOC/E_{stop} (Figure S5-3D). Viral RNA of each mutant was extracted at 5 and 9 dpi and sequenced for the E and M gene. No reversion in the targeted genes were observed (data not shown), indicating that the inserted mutations are stable during replication in the murine brain for at least 9 days. It is interesting to note that when infected with a higher viral dose ($10^{2.5}$ TCID₅₀/10 μ L vs $10^{1.5}$ TCID₅₀/10 μ L), infectious virions of the PBM mutant could be detected in low amount in the brain of mice (Figure S5-4A). Moreover, the apparent increase of infectious virus production at days 10-11 post-infection suggest that this mutant could be able to replicate at a low level, avoiding detection by the immune system at first. Viral RNA was also detected in both the brain and spinal cord (Figure S5-4B and C). Sequencing of the E and M genes again revealed the absence of reversion, again suggesting that the absence of detectable infectious virion production previously observed (Figure 5-7) was probably due to the low infectious dose. Taken together, these data demonstrate that a fully competent E protein (with both functional TMD and PBM) is essential for HCoV-OC43 neurovirulence in association with efficient replication in the CNS, correlating with the early observations in neuronal cells (Figures 2-4).

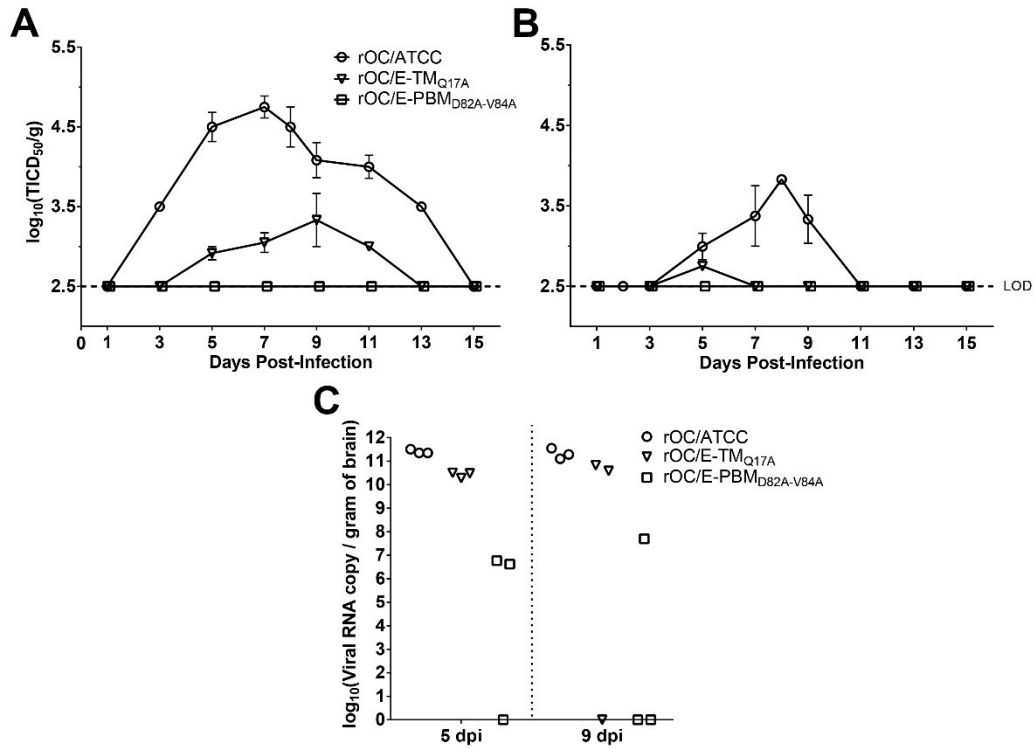


Figure 5-7 The E protein TM and PBM domain are essential for optimal replication in the murine brain and spinal cord. Infectious viral particles were quantified in (A) the brains and (B) the spinal cord of 22-day-old C57Bl/6 mice infected by the IC route with $10^{1.5}$ TCID₅₀/10 μ L rOC/ATCC, rOC/E-TM-Q17A or rOC/E-PBM-82-84 over a period of 15 days. (C) Viral RNA was detected and quantified by RT-qPCR in the brain of infected mice at 5 and 9 days post-infection. LOD, limit of detection. Representative of three different experiments.

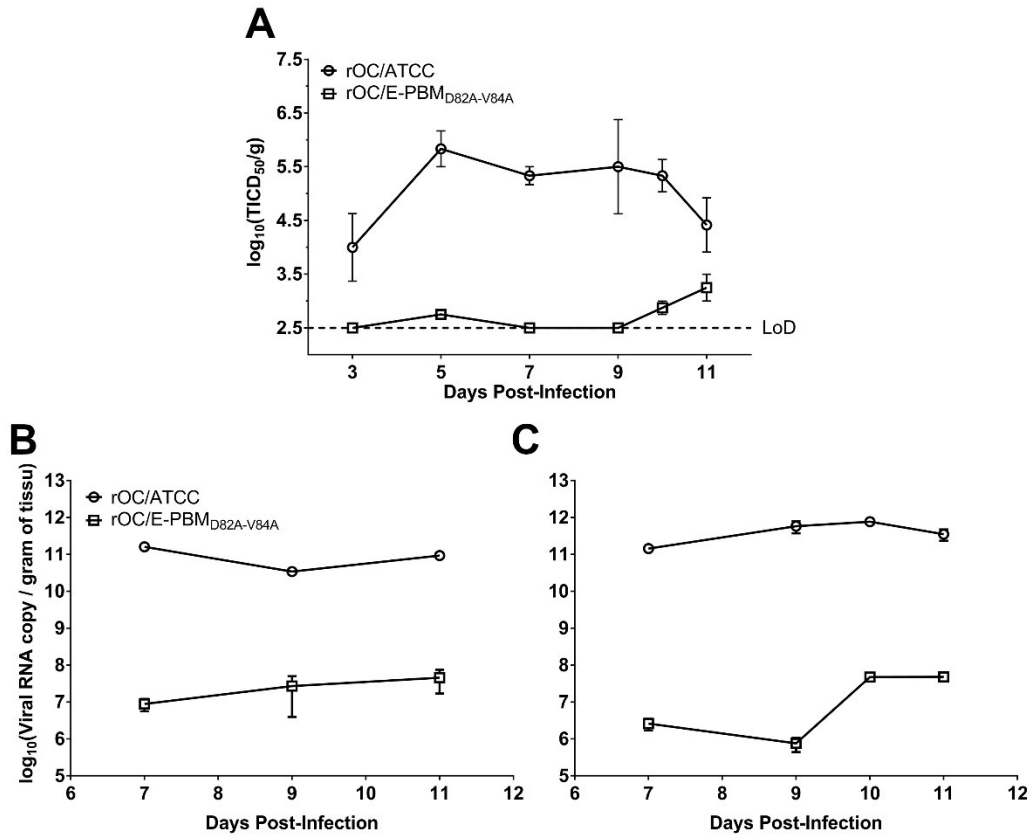


Figure S 5-4 rOC/E-PBM_{D82A-V84A} is able to produce infectious virions in the brain and to propagate to the spinal cord after an infection at a higher dose. (A) Infectious viral particles were quantified in the brains of 22-day-old C57Bl/6 mice infected by the IC route by $10^{2.5}$ TCID₅₀/10 μ L rOC/ATCC, or rOC/E-PBM_{D82A-V84A} over 11 days post-infection. Viral RNA was detected and quantified by RT-qPCR in the (B) brain and (C) spinal cord of infected mice over 11 days post-infection. LOD, limit of detection.

The putative TMD decreases HCoV-OC43 propagation in the murine brain.

When infection was performed at a $10^{1.5}$ TCID₅₀/10 μ L dose, only the E protein TMD mutant produced detectable virions in the brain (infectious virus is under the limit of detection for PBM mutant). However, this production was significantly lowered compared to reference virus. Therefore, based on data obtained in neuronal cultures (Figures 2-4), we investigated if the TMD mutation also induced a defect in propagation within the brain. Brains of mice infected intracerebrally with rOC/ATCC or rOC/E-TM_{Q17A} were harvested at 3 and 7 dpi, and viral spreading was observed by immunofluorescence. Whereas the reference virus had already infected the hippocampus at 3 days post-infection (with positive cells around the lateral ventricle and in the hypothalamus), and then continued to spread until the rest of the brain was infected at 7 dpi (Figure 5-8 left panels), the rOC/E-TM_{Q17A} presented an important delay in spreading as only a few number

of infected cells were visible at 3 dpi except for a small focus of infection around the hippocampus and the lateral ventricle. Spreading then occurred to the same brain regions compared to reference virus but to a much lower extent (Figure 5-8 right panels). This suggests that although the TMD mutant seems to follow the same spreading path in the murine brain, its spreading is greatly delayed and underlines the fact that HCoV-OC43 E protein TMD is important for efficient propagation in the murine brain.

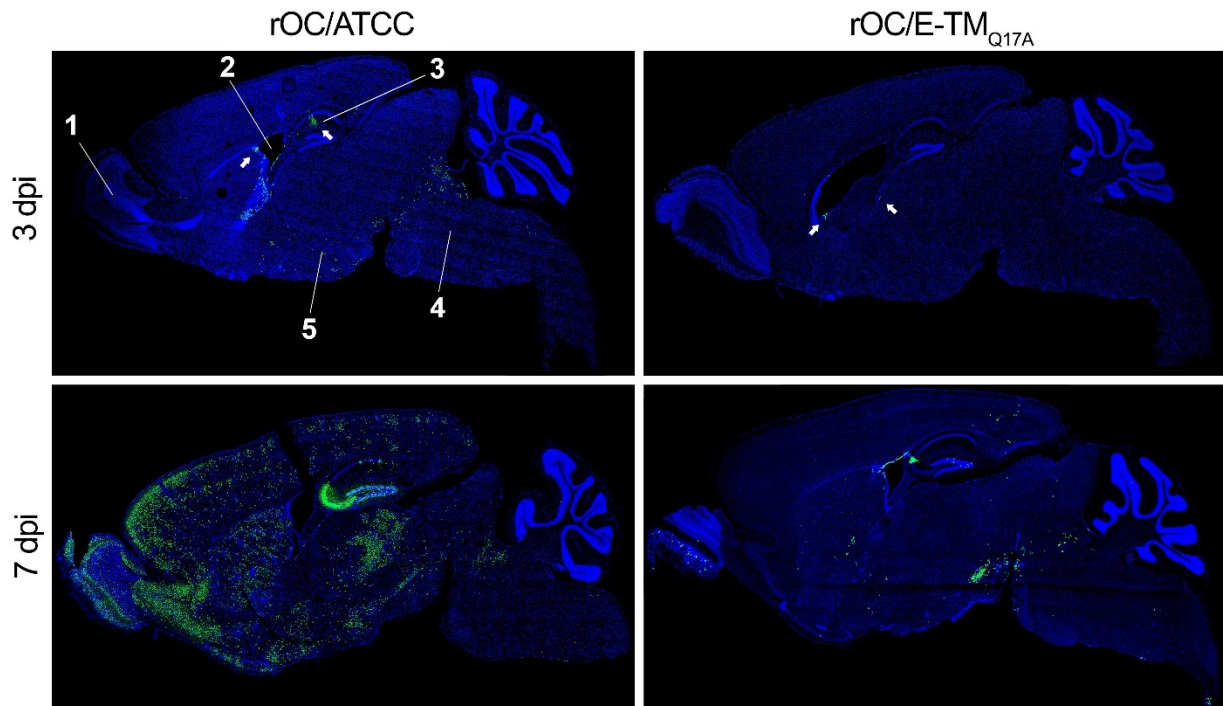


Figure 5-8 HCoV-OC43 E protein putative TM domain is required for efficient spreading in mouse CNS. Viral spreading in mice brain was examined by immunofluorescence at 3 and 7 days post-infection. The virus was detected using an antibody against the HCoV-OC43 S protein (green) and nuclei were detected using DAPI (blue). Small white arrows point to isolated infected cells. Brain regions: 1, Olfactory Bulb; 2, Lateral Ventricle; 3, Hippocampus; 4, Brainstem; 5, Hypothalamus.

5.4 Discussion

In this study, by modifying a full-length cDNA infectious clone of the human HCoV-OC43 virus, we demonstrate that E protein is critical for the production of infectious virions, as transient complementation with wild type E protein rescued infectious viral production and a strong selection pressure to revert to a functional E protein was observed. Moreover, mutations of specific domains revealed that a fully functional protein participate in the efficient viral spreading, associated with neuropathogenesis.

Deletion of the E protein leads to varying degrees of defects for coronaviruses. Indeed, whereas murine hepatitis virus (MHV) and SARS-CoV are attenuated, showing a reduced ability to produce infectious virus without E protein, in a cell-type specific manner (DeDiego et al. 2008; DeDiego et al. 2007; Jimenez-Guardeño et al. 2015; Kuo et al. 2003), transmissible gastroenteritis virus (TGEV) (Ortego et al. 2002) and MERS-CoV (Almazán et al. 2013) are replication competent, but completely propagation defective, with no detectable infectious virus production when the E protein is deleted. Similarly, we were able to rescue infectious rOC/E_{stop} production by providing wild-type E protein in trans, as the recovery of initially complemented rOC/E_{stop} through complementation, and amplification on epithelial cells yielded detectable infectious virus (Figure 5-1). As suggested for MERS-CoV (Almazán et al. 2013), the apparent low titer detected after the first passage on HRT-18 cells (especially at P1), could be due to a transfer of detached cells transfected with the initially complemented pBAC-OC43-E-Stop. Furthermore, the production of infectious particles (for initially complemented mutant lacking the E protein) was low and decreased with subsequent amplification attempts. On the other hand, these results also suggest that production of infectious virions without E protein is possible but with severely affected efficiency, underlining the requirement of a fully functional E protein. Coronavirus E protein has been suggested to allow correct virion formation in part by inhibiting M protein aggregation (Kuo et al. 2007), or by inducing scission events at the ERGIC (Fischer et al. 1998). Our data indicate that while reducing dramatically the quantity of infectious viral particles formed, the complete abrogation of HCoV-OC43 E protein did not significantly alter the quantity of total viral particles produced compared to the reference virus (Figure 5-5), suggesting that the protein is important for efficient virion maturation that lead to good infectivity.

This concept is emphasized by the appearance of recombinant HCoV-OC43 E protein revertants at a very low passage number (P2 or P3) on HRT-18 cells. Indeed, the appearance of revertants with different E sequences after only a few rounds of amplification on HRT-18 cells indicates that low level of viral particles must have been produced earlier during the process as we already observed previously for HE-deleted recombinant HCoV-OC43 (Desforges et al. 2013). We observed strong selective pressure at the position where we introduced a stop codon where nucleotide changes led to reversion to reference E sequence or to another amino acid residue (tryptophan or leucine). It was previously described that SARS-CoV (Jimenez-Guardeño et al. 2015) and MHV (Kuo et al. 2010) E protein deletion mutants underwent compensatory mutations after a few passages in culture to utilize a partially duplicated version of the adjacent M protein to recover partial virus production. A second type of reversion was observed for SARS-CoV E protein deletion mutant after an intranasal infection of susceptible mice as the small transmembrane ion channel forming 8a was modified to incorporate a potential PBM associated with increased infectious virus production compared to E protein deletion mutant (Jimenez-Guardeño et al. 2015). Our results support the hypothesis that there is selective pressure to specifically restore the E protein functionality itself without partial duplication of the M gene (data not shown), however, it is important to note that we only introduced a stop codon at the beginning of the E gene instead of deleting part or all of the gene, as it was done for SARS-CoV and MHV (Jimenez-Guardeño et al. 2015; Kuo et al. 2010). A recombinant HCoV-OC43 in which the E gene would have been deleted could have used the same reversion process in other viral gene.

Production of infectious virus was reduced after infection of neuronal cell cultures with initially complemented rOC/E_{stop} compared to reference virus. Immunofluorescence assay for viral proteins confirmed these latter results showing no defect in entry for the initially complemented rOC/E_{stop} virus compared to reference virus at 16 hpi, while observations at 48 hours indicated an important defect of viral propagation (Figure6). A decrease in virus spread was also reported for MHV (Kuo et al. 2007; Kuo et al. 2003) and SARS-CoV (DeDiego et al. 2007) ΔE mutants which formed smaller and less numerous plaques.

The coronavirus E protein is now considered as a virulence factor (reviewed extensively in (DeDiego et al. 2014)) and there have been extensive efforts to characterize the different domains of this relatively small transmembrane protein and the possibility that it acts as a viroporin, with ion channel activity. The TMD of several coronavirus E proteins (including HCoV-OC43) was

predicted (Torres et al. 2005) and shown to form ion channels permeable to small cations in artificial membranes for species such as IBV, MHV, HCoV-229E (Wilson et al. 2006), MERS-CoV (Surya et al. 2015) and SARS-CoV (Wilson et al. 2004). Furthermore, it was demonstrated that the IBV E protein can exist in a penta-oligomeric state (Westerbeck et al. 2015), and that for MERS-CoV (Surya et al. 2015) and SARS-CoV (Pervushin et al. 2009; Torres et al. 2006; Verdiá-Báguena et al. 2013; Verdiá-Báguena et al. 2012), it forms pentameric channels in lipid membranes. Chemical inhibition of ion channel activity (Wilson et al. 2006), destruction of the integrity of (Almazán et al. 2014; Regla-Nava et al. 2015; Y. Ye et al. 2007) or replacement of the TMD with those of other viral species (Ruch et al. 2011) all led to reduced viral titers for other coronaviruses species. The E protein of coronaviruses is largely localized within the secretory pathway (Cohen et al. 2011; Nieto-Torres et al. 2011; Venkatagopalan et al. 2015) where it has recently been described for IBV to exist in two different pools; one of monomeric E proteins that disrupt the secretory pathway and a second pool in an oligomeric state, likely serving to facilitate the assembly of progeny virions (Westerbeck et al. 2015). The transient delay in infectious virus release observed for the TMD mutant compared to the reference virus (Figure 5-3) suggests a defect in virus release that could be the result of damaged infectious particles as it was observed for IBV, for which a TMD mutant of the E protein induces a similar defect associated with increased quantity of non-infectious viral particles released possessing a cleaved S protein near the virion surface (Ruch et al. 2011). Considering the higher proportion of non-infectious virions released by cells infected with the TMD mutant compared to cells infected with the reference virus (Figure 5-3D and 5-5A), a similar process consisting in an alteration of infectious virions in the secretory pathway may also be involved here, suggesting an important role for TMD within the cellular secretory pathway. Furthermore, mutation at homologous position T16 of IBV did not have an effect on VLP formation but rather was required for secretory pathway disruption (Ruch et al. 2012b; Westerbeck et al. 2015). These results suggest that mutation Q17A (homologous to IBV T16A) in the HCoV-OC43 E protein putative TMD plays a role in modulating infectious virus release from infected cells.

A four-amino acid C-terminal PBM protein-protein interaction motif has been predicted for HCoV-OC43 (Jimenez-Guardeño et al. 2014). Through the replacement of the key amino acids of this motif by alanines, we demonstrated its importance in infectious virion production in the epithelial and neuronal cells tested (Figure 5-4). Defective propagation without an effect on the ability to infect cells was observed with the recombinant virus with an abrogated putative PBM.

Deletion of the PBM in SARS-CoV E protein led to slight decreases in viral titers in some cell types (Jimenez-Guardeño et al. 2014) while in others viral titers remained unaffected (Regla-Nava et al. 2015). Our data on HCoV-OC43 reveal significant infectious virus production defects in an epithelial cell line which was further accentuated in neurons, but only after infection by the double mutant rOC/E-PBM_{D82A-V84A}, suggesting that HCoV-OC43 replication in cultured cells can tolerate a slight flexibility in the putative PBM sequence. Among coronavirus E proteins, only the SARS-CoV E protein has been shown to per se possess such a functional motif, which interacts with PALS1 to disturb secretory pathway membranes to alter tight junction formation (Teoh et al. 2010) and syntenin to play a role in the exacerbated inflammatory response typical of infection via p38 MAPK activation (Jimenez-Guardeño et al. 2014). For SARS-CoV E protein, the PBM is suggested to be important in two independent functions: virus stability and virulence/pathogenesis rather than virus production (Jimenez-Guardeño et al. 2015; Jimenez-Guardeño et al. 2014; Regla-Nava et al. 2015). Given that the functions of PBM is dependent on their sequence and surrounding sequence context (F. Ye et al. 2013), further study of the HCoV-OC43 E protein neuronal interactome is warranted and could provide new insights on the precise function of the protein in infected cells. Prevention of a functional interaction between HCoV-OC43 E protein PBM and its PDZ domain-containing ligand could conceivably function in the same vein as seen in case of neurotropic encephalitic rabies virus, for which differences in disease phenotype, rapid versus attenuated spread of virus infection, was attributed to differences in PBM sequences on the C-terminal of the rabies envelope glycoprotein G leading to different cellular interaction partners to mediate either neuronal cell survival or death (Préhaud et al. 2010). Surprisingly, the PBM mutant forms less total viral particles but almost all of them are infectious. As protein-protein interaction motifs, viral PBM are involved in a variety of processes, including viral particle assembly and maturation (Javier et al. 2011). Abrogation of the E PBM, could prevent critical cellular and/or viral interaction necessary for the rapid and efficient formation and maturation of viral particles, making propagation highly inefficient.

The SARS-CoV E protein is critical for neuroinvasiveness in susceptible mice (DeDiego et al. 2008). HCoV-OC43 E protein seems to differ from its SARS-CoV homolog as viral RNA is present in the brain of all mice intranasally infected with either the reference virus, the TMD mutant or the PBM mutant (Figure 5-7-A), indicating that the fully functional protein is not essential for neuroinvasion. On the other hand, the amount of viral RNA was significantly lower in the brain of E mutant-infected mice. Although we cannot rule out that these data represent a difference in

replication and propagation once the virus is already in the brain, optimal HCoV-OC43 neuroinvasion may necessitate a fully functional E protein. The SARS-CoV E protein was recently described as an important virulence factor during infection of the lungs, being in part responsible for the immune response exacerbation (Jimenez-Guardeño et al. 2014), the lung epithelium destruction (Teoh et al. 2010), and edema accumulation in the lungs (Nieto-Torres et al. 2014). We demonstrate here that HCoV-OC43 E protein deletion as well as abrogation of the putative PBM prevented neurological symptoms following CNS infection, correlating with replication and propagation observations in epithelial and neuronal cells (Figure 5-7). Disappearance of respiratory tract disease was observed for SARS-CoV in which E PBM was abrogated, preventing interaction of the viral protein with the PDZ-containing protein syntenin (Jimenez-Guardeño et al. 2014; Regla-Nava et al. 2015). The absence of neurological symptoms following infection by either rOC/E_{stop} or rOC/E-PBM_{D82A-V84A} could potentially be linked to glutamate excitotoxicity that we have previously observed in mice (Brison et al. 2011), possibly by interfering with PDZ-domain containing proteins found in neuronal cells (Feng et al. 2009). We also demonstrate that HCoV-OC43 putative TMD plays a role in the neuropathogenesis following the CNS infection, albeit to a lesser extent than its PBM. Indeed, infected mice showed some neurological symptoms, even if their severity and frequency were lower than for the reference virus. This attenuated phenotype was also associated with reduced viral particles production and propagation in the CNS. Homologous mutation at the position 15 of SARS-CoV E protein also led to an attenuated pathology, although infectious viral particle production was not significantly affected compared to wild-type virus (Nieto-Torres et al. 2014). Taken together, these results demonstrate that HCoV-OC43 E protein is a virulence factor, with TMD and PBM being important determinants in that matter.

In summary, the current study demonstrates the critical importance of a fully functional HCoV-OC43 E protein in infectious virus production and efficient spread in both epithelial and neuronal cells. Modifications to key amino acids in putative functionally important domains modulated infectious virion production and delayed virus spread in human and murine neuronal cells and within mouse CNS. This points towards the presence of a true TMD, which has a role in the secretory pathway, as seen for other coronaviruses and that the HCoV-OC43 E protein putative C-terminal PBM plays a significant role in infectious virion production as well as efficient virus spread. In addition, this study establishes a clear link between both putative functional domains of HCoV-OC43 E protein and CNS pathogenesis. Functional viroporins and viral PBM

are associated with viral pathogenesis for a growing number of viruses and their studies to better understand virus-host interaction represent an emerging field (Javier et al. 2011; Nieva et al. 2012; Scott et al. 2015). Considering that the HCoV-OC43 E protein seems to possess both functions and that they seem to be important for the induction of disease, future studies regarding their functionality and underlying mechanisms resulting in HCoV-OC43 neuropathogenesis previously described (Brison et al. 2011; Jacomy et al. 2006; Le Coupanec et al. 2015) are warranted and necessary as they will help to identify virus-host interfaces which could represent therapeutic target.

5.5 Materials and Methods

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

Cell lines and mixed primary murine CNS cells. The BHK-21 cell line (ATCC-CCL10) was cultured in minimal essential medium alpha (MEM- α ; Life Technologies) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; PAA GE Healthcare) and used for transfection. The HRT-18 cell line (a gift from the late David Brian, University of Tennessee) was cultured in the same medium and used for virus infections/amplifications. The LA-N-5 cell line (a kind gift of Stephan Ladisch, George Washington University School of Medicine) was cultured in RPMI medium supplemented with 15% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 100 μ M non-essential amino acids (Gibco - Invitrogen). The LA-N-5 cells were differentiated into human neurons as previously described (Hill et al. 1998). Briefly, cells were seeded in 24-well plates pre-coated with 0.1% gelatin (1.25×10^3 cells/well) in RPMI medium supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 100 μ M non-essential amino acids. The next day and every 2 days for 6 days, the medium was replaced with the same medium supplemented with 10% (vol/vol) FBS and 10 μ M all-trans retinoic acid (Sigma-Aldrich).

Mixed primary cultures of mouse CNS cells were prepared as previously described (Le Coupanec et al. 2015). Briefly, embryos at 14 to 16 days of gestation were removed from pregnant anesthetized CD1 mice and their cortex and hippocampus were harvested and placed in Hanks balanced salt solution (HBSS) medium, without Ca^{2+} and Mg^{2+} , supplemented with 1 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES buffer. Tissues were gently pipetted up and down with a Pasteur pipette to dissociate the cells. After a decantation step of 5 min at room temperature, supernatants were transferred into a 50-mL tube with 36 mL of Neurobasal Medium (Invitrogen) supplemented with 0.5 mM GlutaMAX-I (Life Technologies), 10 mM HEPES buffer, B27 supplement (Life Technologies), gentamycin and 10% (vol/vol) of horse serum (Life Technologies). Cells were then seeded at 1×10^5 cells/cm² and grown on collagen+poly-D-lysine (3:1 for a final concentration at

50 µg/mL for both)-treated 12-well plates containing glass coverslips (for immunofluorescence) or not (for evaluation of infectious virus production) 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.

Site-directed mutagenesis. Using our full-length, cDNA infectious clone pBAC-OC43^{FL} (St-Jean et al. 2006) the recombinant HCoV-OC43 virus (rOC/ATCC) was generated. In parallel, a series of recombinant mutant viruses were produced by site-directed mutagenesis using the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and a variety of primers (Table 1, Section A) to introduce nucleotide substitutions in the E gene. These substitutions in the cDNA clone introduced were: nucleotide mutations at positions 24 and 25, corresponding to a change of amino acid position 9 into a stop codon (pBAC-OC43-E-Stop, plasmid; rOC/E_{stop}, recombinant virus) or mutations at nucleotide positions 49 and 50 corresponding to amino acid 17 (pBAC-OC43-E-TM-Q17A; rOC/E-TM_{Q17A}), nucleotide position 245 and 246; amino acid 82 (pBAC-OC43-E-PBM-D82A; rOC/E-PBM_{D82A}) or nucleotide position 251; amino acid 84 (pBAC-OC43-E-PBM-V84A; rOC/E-PBM_{V84A}). A double mutant cDNA clone pBAC-OC43-E-PBM-D82A-V84A (rOC/E-PBM_{D82A-V84A}) was also produced using the pBAC-OC43-E-PBM-D82A as a DNA template for a second-round of mutagenesis reaction with OC-E-PBM-D82A-V84A primer to introduce a second mutation at nucleotide position 251; amino acid 84. Prior to transfection of BHK-21 cells, all samples were sequenced to make sure that only the introduced mutations were present and that no other mutations appeared.

Table 5-1 Primers used to introduce nucleotide substitutions in the E gene of pBAC-OC43^{FL} (St-Jean et al. 2006) for recombinant HCoV-OC43 virus production with amino acid modifications within the E protein (Section A). Primers used to verify sequences of the full HCoV-OC43 E and M gene of recombinant viruses (Section B). Bold and underlined sections represent newly introduced nucleotide substitutions. Underlined section in mutant E-PBM 82-84 represents previously introduced nucleotide substitutions.

A – Primers for site-directed mutagenesis		
Recombinant Virus	Primer Name	Primer Sequence
rOC/E _{stop}	OC-E-stop	5'-CT GAT GCT TAT CTT TGA GAC ACT GTG TGG-3'
rOC/E-TM _{Q17A}	OC-E-TM-Q17A	5'-GTG TGG TAT GTG GGG GCA ATA ATT TTT ATA GTT GCC-3'
rOC/E-PBM _{D82A}	OC-E-PBM-D82A	5'-CA GTC CTT GAT GTG GCC GAC GTT TAG GTA ATC-3'
rOC/E-PBM _{V84A}	OC-E-PBM-V84A	3'-GT TTG GAT TAC CTA AGC GTC ATC CAC ATC AAG-5'
rOC/E-PBM _{D82A-V84A}	OC-E-PBM-D82V-V84A	5'-CTT GAT GTG <u>GCC</u> GAC <u>GCT</u> TAG GTA ATC CAA AC-3'

B – Primer for sequence verification

Primer Name	Primer Sequence
OC-ns5-116-E-For	5'-GTA GAG TTC CTA GTC ATG CTT G-3'
OC-E-222-For	5'-GAT GTA AAA CCA CCA GTC CT-3'
OC-M-127-E-Rev	5'-ACA TAC TGC GAC TTG TAT AGC C-3'
OC-M-172-For	5'-ATT TTG TGG CTT ATG TGG CCC-3'
OC-M-241-E-Rev	5'-CTA TAG AAA GGC CAA GAT ACA C-3'
OC-M-439-For	5'-GTC ACA ATA ATA CGC GGC CA-3'
OC-M-514-Rev	5'-CCT TAG CAA CAG TCA TAT AAG C-3'
OC-N-60-Rev	5'-CAT TAC CAG AAC GAT TTC C-3'
GAPDH-For	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
GAPDH-Rev	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'

Plasmid for transient co-transfection rescue. In order to insert the HCoV-OC43 E gene into the pcDNA3.1(+) expression vector (pcDNA; Invitrogen) and allow for E protein expression upon transient co-transfection with pBAC-OC43 infectious clones in BHK-21 cells, restriction enzymes *NheI* and *BamHI* were added to the 5' (primer: 5'-GCTAGC ATG TTT ATG GCT GAT GCT TA-3') and 3' (primer: 5'-GGATCC CTA AAC GTC ATC CAC AT-5') ends of the E gene respectively. The E gene with added restriction enzyme sites was PCR-amplified from cDNA originating from a HCoV-OC43 reference strain (ATCC) infection on HRT-18 cells using Accuprime *Pfx* Supermix (Life Technologies) with 1 cycle at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 15 s, 48°C for 30 s and 68°C for 1 min and 1 cycle at 68°C for 4 min and then introduced into the pcDNA plasmid.

Recombinant virus production, transient co-transfection and virus amplification. The BHK-21 cells were cultured in MEM- α supplemented with 10% (vol/vol) FBS and used for transfection of pBAC-OC43 cDNA infectious clones with Lipofectamine 3000 Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Briefly, for production of recombinant viruses, BHK-21 cells were seeded in 6-well cell culture plates at 6×10^5 cells/well. The next day, when cells were 70-90% confluent, the medium was replaced and cells were transfected with 7.5 μ l Lipofectamine 3000 Transfection Reagent, 10 μ l P3000 Reagent, 5 μ g of pBAC-OC43^{FL} or other modified pBAC DNA, and 2 μ g of pcDNA(OC-E) or empty pcDNA plasmid per well. For semi-quantitative determination of transfection efficiency by immunofluorescence assay (IFA), BHK-21 cells were seeded at 5×10^4 cells/well onto glass coverslips in 24-well plates and transfected with 1.5 μ l Lipofectamine 3000 Transfection Reagent, 6 μ l P3000 Reagent, 1.5 μ g of pBAC-OC43^{FL} or other modified pBAC DNA, and 500 ng of pcDNA(OC-E) or empty pcDNA plasmid per well. The

plates were incubated at 37°C for 8 hours and then medium replaced with MEM- α supplemented with 10% (vol/vol) FBS and 0.01% (vol/vol) gentamycin and incubated for 3 days.

The cells from 6-well culture plates were harvested either to recover total RNA or total protein while the supernatant (P0) was recovered by aspiration after centrifugation at 500 \times g for 7 min and then clarified at 1000 \times g for 10 min. The supernatant (P0) served to inoculate HRT-18 cells in order to amplify the viral stocks. The supernatant from this first-round amplification (P1) served for a second round of viral amplification on HRT-18 cells from which supernatant was recovered (P2) and in some cases, was repeated again for a third round of amplification (P3). The production of infectious viral particles corresponding to the different pBAC-OC43 cDNA clones was titrated by an immunoperoxidase assay (IPA) prior to each amplification step in order that titers could be normalized to the lowest detectable titer and replication rates be compared.

Infection of human cell lines and of primary mouse CNS cultures. The HRT-18 and LA-N-5 cells as well as mixed primary cultures of mouse CNS cells were infected at a MOI equivalent to the lowest detectable titer of the series of recombinant virus stock used during each experiment or mock-infected and then incubated at 33°C (HRT-18) or 37°C (LA-N-5 cell line and primary CNS cultures), for 2 h (for virus adsorption), and incubated at 33°C with fresh MEM- α supplemented with 1% (vol/vol) FBS (for HRT-18 cells), at 37°C with fresh RPMI medium supplemented with 2.5% (vol/vol) FBS (for LA-N-5 cells) or at 37°C with fresh Neurobasal Medium with B27-GlutaMAX-I (for primary murine CNS cell cultures) for different periods of time before fixing cells for immunofluorescence detection or harvesting the cell-associated and/or cell-free medium fractions for infectious virus titer determination by IPA. For relative infectivity and release assay, LA-N-5 cells were infected at a MOI equivalent to the lowest titer of the compared recombinant viruses and incubated at 37°C for 16 hours with fresh RPMI medium supplemented with 2.5% (vol/vol) FBS and 200 nM chloroquine (N⁴-(7-Chloro-4-quinolinyl)-N¹,N¹-dimethyl-1,4-pentanediamine diphosphate salt, Sigma, CAS number 50-63-5) in order to prevent re-infection.

Mice, survival curves, body weight variations and evaluation of clinical scores. Infection of 22-day- or 7-day-old female C57Bl/6 mice (Charles River) were performed as previously described (Le Coupanec et al. 2015). Briefly, mice were inoculated respectively by the IC route with 10^{1.5} or the intranasal route with 10³ of 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) recombinant virus. Groups of 10 mice infected by each recombinant virus were observed on a daily basis over a period of 21 dpi, and survival and weight variations were evaluated. Clinical

scores were evaluated using a scale with 5 distinctive levels (0 to 4); where 0 was equivalent to the asymptomatic mouse; 1 for mice with early hunched backs; 2 for mice presenting slight social isolation, weight loss, and abnormal gait; 3 for mice presenting total social isolation, ruffled fur, hunched backs, weight loss and almost no movement; and number 4 was attributed to mice that were in moribund state or dead.

Titration of infectious virus using an immunoperoxidase assay (IPA). The IPA was performed on HRT-18 cells, as previously described (Lambert et al. 2008). Briefly, the primary antibody used was mAb 4.3E4 (hybridoma supernatant; ½ dilution) directed against the S protein of HCoV-OC43. The secondary antibody was horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (KPL; 1/500). Immune complexes were detected by incubation with 0.025% (w/v) 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Bio-Rad) and 0.01% (vol/vol) hydrogen peroxide in PBS and infectious virus titers were calculated by the Karber method, as previously described (Lambert et al. 2008).

Immunofluorescence for semi-quantification of transfection efficiency or virus propagation. BHK-21 and LAN-5 cells as well as mixed primary cultures of mouse CNS were fixed onto glass coverslips with 4% (wt/vol) paraformaldehyde for 30 min at room temperature and permeabilized for 5 minutes with 100% methanol at -20°C. For LA-N-5 and BHK-21 cells, to detect HCoV-OC43 spike (S) protein, one-hour incubations of primary 4.3.E.4 (hybridoma supernatant; ½ dilution;) followed by secondary antibody AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG (H + L) (1/1000; Life Technologies-Molecular probes) were conducted with three PBS washes between steps. For primary mouse CNS cultures, after blocking with a PBS-BSA 2% (wt/vol) solution for one hour at room temperature, primary antibody polyclonal rabbit anti-S protein (dilution 1/1000) and mouse monoclonal antibody against the neuron-specific MAP2 protein (1/1000; BD Pharmagen, catalog no. 556320) were diluted in PBS + 0.1% Triton X-100 and incubated on cells for one hour at room temperature followed by three PBS washes. Cells were then incubated one hour at room temperature with anti-rabbit Alexa Fluor 568- and anti-mouse Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies (1/1000; Life Technologies-Molecular probes) in PBS. For all cell types, nucleus detection was accomplished by a 5-min incubation with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1 µg/ml; Life Technologies). Triplicate samples were mounted on glass slides with Immuno-Mount medium (Fisher Scientific). Immunofluorescent staining was observed under a Nikon Eclipse E800 microscope with a QImaging Retiga-EXi Fast 1394 digital camera using

Procapture system software. Percentage of infected cells was quantified from immunofluorescence pictures with the CellProfiler software (Carpenter et al. 2006).

For immunofluorescence on brain section, perfusion with 4% (wt/vol) paraformaldehyde (PFA) was performed on infected C57Bl/6 mice for each virus, at 3 and 7 dpi. Murine brains were carefully harvested and conserved in 30% (wt/vol) sucrose at 4°C. Prior to section, harvested brains were embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek, WWR) at -20°C. Sagittal brain sections were prepared at a thickness of 60 µm with a microtome cryostat HM 525; Microm. Serial sections were collected and 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. For detection of viral antigens, sections were incubated overnight at 4°C in a 1/1000 dilutions of ascites fluid from the 4.E.11.3 hybridoma secreting a murine monoclonal antibody against the viral N protein (Bonavia et al. 1997). After three washes with PBS, sections were incubated in the dark for 1 h at room temperature with the secondary fluorescent antibodies Alexa Fluor 488 anti-mouse (1/500; Life Technologies). After three PBS washes, sections were incubated for 5 min at room temperature with 4',6-diamidino-2 phenylindole (DAPI; 1 µg/ml; Life Technologies), washed once with PBS and water and then mounted with Immuno-Mount mounting medium (Fisher Scientific). Immunofluorescent staining was observed under a Zeiss LSM780 confocal microscope.

RNA extraction, cDNA synthesis and gene amplification. After transfection of BHK-21 cells or infection of HRT-18 cells, cells were scraped from wells or plates, centrifuged at 500 × *g* for 7 min at 4°C, medium was removed and cell pellet resuspended with 1.5ml ice-cold PBS and centrifuged at 1000 × *g* for 10 min at 4°C. PBS was aspirated and the dry pellet stored at -80°C until use. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) with QIAshredder spin columns (QIAGEN) to lyse cells according to manufacturer's instructions. RNA quality was verified using the Agilent 2100 Bioanalyzer using the Agilent RNA 6000 Nano Assay protocol according to manufacturer's instructions and concentration measured using a ND1000 spectrophotometer (Nanodrop). To produce cDNA, 5µg of total extracted RNA was reverse transcribed using the SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix Kit using oligo(dT) primer (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

PCR was conducted using Accuprime *Pfx* Supermix (Life Technologies) with one cycle at 95°C for 1 min, followed by 40 cycles at 95°C for 35 sec, 50°C for 45 sec and 68°C for 2 min,

followed by one cycle at 68°C for 7 min using several sets of primers to amplify the E gene (forward primer, OC-ns5-116-E-For, OC-E-222-For, OC-M-172-For or OC-M-439-For; reverse primers, OC-M127-E-Rev, OC-M-514-Rev, OC-M241-E-Rev or OC-N-60-Rev) and GAPDH gene as control (forward primer, GAPDH-For; reverse primer, GAPDH-Rev). A complete list and description of all primers is presented in Table 1, section B.

RNA extraction for infectivity assay and quantification of viral RNA in mouse tissue.

Real time RT-PCR for the absolute quantification of viral RNA in viral stocks and during infection of murine CNS, was modified from Vijgen and collaborators (Vijgen et al. 2005) using the Taqman technology and the use of cRNA standards for the generation of a standard curve and to evaluate the copy number of viral RNA in samples with the MEGAscript kit (Ambion/Life Technologies) (Vijgen et al. 2005; Fronhoffs et al. 2002). Briefly, total RNA was extracted with the Qiazol reagent (Qiagen) for HRT-18 cell culture supernatant and mouse tissue to evaluate the amount of viral RNA in virus stock and in mouse tissue respectively. cRNA standards were constructed exactly as described elsewhere made as previously described (Vijgen et al. 2005). RNA concentrations were evaluated in all samples and quantified using a ND1000 spectrophotometer (Nanodrop). Real-time quantitative RT-PCR was performed with the TaqMan-RNA-to-CT 1-Step kit (Applied Biosystems/Life Technologies) in a 20 µL reaction mixture with 10 µL of 2x TaqMan RT-PCR Mix (containing ROX as a passive reference dye), 900 nM of forward and reverse primers, and 200 nM of FAM BHQ1-TP probe. Four µL of RNA for supernatant samples and cRNA standards (serial dilutions), were used for the reaction. Amplification and detection were performed in a StepOnePlus Realtime PCR system apparatus and analysis were performed with the StepOne software version 2.3 (Applied Biosystems).

Protein extraction and Western blot analysis. To confirm E protein production after transfection of pcDNA(OC-E) in BHK-21 cells, proteins from whole cell lysates were extracted. Harvested cells were pipetted up and down into RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, 1% (v/v) NP-40, 0.25% (wt/vol) sodium deoxycholate, 1 mM EDTA) supplemented with protease cocktail inhibitor (Sigma). Lysates were incubated on ice for 20 min and centrifuged at 17,000 × g for 10 min at 4°C. Supernatants were harvested, aliquoted and stored at -80°C until further analyzed.

Protein concentrations were determined using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Novagen) according to the manufacturer's instructions. Ten µg of protein was loaded on a Tris-

Glycine 4–15% gradient gel, transferred to PVDF membrane with a semi-dry trans-blot apparatus (Bio-Rad). Membranes were blocked overnight at 4 °C with TBS buffer containing 1% (vol/vol) Tween (TBS-T) and 5% (wt/vol) non-fat milk. The following day all steps were conducted at room temperature, with, or solutions diluted in, TBS-T and milk. A primary rabbit polyclonal antibody was used to detect either the HCoV-OC43 E protein (1/5000) or GAPDH (1/10 000) for 1 hour, followed by three 10 min washes. Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (from donkey) (GE Healthcare) was the secondary antibody used, followed by three 10 min washes. Detection was performed using 1/1 solution of Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) for one minute followed by membrane exposure on CL-X-Posure Film (Thermo Scientific).

Statistical tests. For cell experiments (percentage of infection), statistical analysis were conducted by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test, or a t-test. For mice experiments, results were compared using two non-parametric statistical tests: Kruskal-Wallis and Mann-Whitney. Survival rates were plotted as Kaplan–Meier survival curves and were compared using the log rank (Mantel–Cox) test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ and is indicated with * (Student's t-test p value < 0.05), ** (Student's t-test p value < 0.01) or *** (Student's t-test p value < 0.001).

5.6 Acknowledgements

We thank Jessie Tremblay for excellent technical assistance with confocal microscopy. J.K.S. and G.D. wishes to thank Mathieu Meessen-Pinard, Mathieu Dubé, and especially Marc Desforges and Pierre J. Talbot for their advice and support throughout the project. Additionally, J.K.S. and G.D. wishes to thank M.D. and P.J.T. for guidance in the preparation of this manuscript. This study was supported by Discovery grant 42619-2009 from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada and operating grant MT-9203 from the Institute of Infection and Immunity of the Canadian Institutes for Health Research to P.J.T. who is the holder of the Tier-1 (Senior) Canada Research Chair in Neuroimmunovirology award. J.K.S. gratefully acknowledges a masters studentship from the *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.

6 DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce mémoire présente pour la première fois l'étude de l'importance de la protéine E du coronavirus humain OC43 dans un contexte d'infection du SNC, présentée dans le chapitre 5. À l'aide de virus recombinant exprimant une protéine E tronquée ou ayant ses potentiels domaines fonctionnels altérés, nous avons démontré qu'en plus d'être importante pour une production de particules virales infectieuses et une propagation de l'infection efficace en culture de cellules épithéliales et neuronales ainsi que dans le SNC de souris, cette protéine représente un important facteur de virulence pour le développement de maladies neurologiques suite à l'infection du SNC murin. Bien qu'il soit déjà connu que quelques coronavirus comme le MHV, le PHEV, le FCoV et le HCoV-OC43 soient clairement neuroinvasifs et neurovirulents (Andries et al. 1980; Jacomy et al. 2006; Morfopoulou et al. 2016; Slauson et al. 1972; S. R. Weiss et al. 2011), et que d'autres tels que le SARS-CoV et MERS-CoV (Arabi et al. 2015; Gu et al. 2005; Xu et al. 2005) sont associés au développement de symptômes neurologiques, l'importance connue de la protéine E dans ce contexte se limite à son effet sur le tropisme tissulaire du virus, ainsi que sur la sévérité de l'infection (DeDiego et al. 2008). En effet, l'infection intranasale de souris susceptibles par le SARS-CoV recombinant n'exprimant plus la protéine E mène à une mortalité réduite et une atteinte non détectable du SNC, même après une injection par la voie intracérébrale (DeDiego et al. 2008).

Suite à l'infection du SNC de souris C57Bl/6 par le virus mutant n'exprimant pas la protéine E (rOC/E_{Stop}), aucune mortalité ni aucun symptômes neurologiques ne sont observés (Figure 5-S3), bien que le virus soit capable de se répliquer très faiblement dans le cerveau des souris plusieurs jours après l'injection (Figure S5-4). De même, la délétion du gène de la protéine E de HCoV-OC43 mène à une production de particules virales infectieuses en culture de cellules épithéliales et neuronales détectable uniquement lorsque le gène E est ajouté par transcomplémentation (Figure 5-1), indiquant que la protéine E de HCoV-OC43 est essentielle pour la réplication virale. De plus, lors d'amplifications subséquentes en absence de transcomplémentation, la capacité de production de particules infectieuses du virus rOC/E_{Stop} décroît jusqu'à ce qu'aucune particules infectieuses ne soient détectables dès la troisième amplification (Figure 5-1), indiquant que bien que la protéine E ne soit pas essentielle à la production de particules infectieuses, elle est nécessaire pour une production efficace et durable. Comme suggéré par l'équipe d'Enjuanes lors de l'étude de MERS-CoV n'exprimant pas la

protéine E (Almazán et al. 2013), la faible production de particules virales infectieuses pourrait être due à un transfert de cellules épithéliales transfectées avec le clone pBAC-OC43-E-Stop initialement complémenté (P0). Cependant, étant donné que le surnageant prélevé du P0 est clarifié par centrifugation et est conservé à -80°C sans ajout de composés protégeant les cellules, il paraît peu probable que cela soit le cas. Une PCR ciblant des régions du pBAC hors génome viral ou du pcDNA de transcomplémentation sur de l'ARN issu des cellules infectées pour produire le P1 permettrait de répondre à cette hypothèse, et préciserait l'importance de la protéine E pour la réplication de HCoV-OC43. De même, l'équipe d'Enjuanes a démontré que la protéine E du SARS-CoV joue un rôle anti-apoptotique dans les cellules infectées en réduisant la réponse au stress cellulaire, notamment en inhibant la réponse aux protéines mal repliées (UPR), ainsi que la réponse inflammatoire innée en réduisant la production des cytokines pro-inflammatoires CCL2 et CXCL2 (DeDiego et al. 2011). Cet effet anti-apoptotique permettrait au virus de mieux échapper au système immunitaire et de produire des particules virales infectieuses plus efficacement, permettant le développement de la pathologie associée au SARS-CoV. Étant donné que l'infection de cellules neuronales humaines par HCoV-OC43 induit la réponse aux protéines mal repliées (UPR; *Unfolded protein response*) qui est exacerbée suite à l'introduction de mutations dans la protéine S (Favreau et al. 2009), la délétion de la protéine E pourrait induire une augmentation de cette UPR, et donc de la mort cellulaire et de la réponse immunitaire, menant à une suppression de l'infection plus rapide. Il serait intéressant d'étudier le rôle de la protéine E de HCoV-OC43 dans ce contexte, en comparant l'induction de l'UPR et de l'apoptose dans les cellules neuronales infectées par le virus de référence ou par les virus mutants n'exprimant pas la protéine E entière et fonctionnelle, ainsi que la réponse inflammatoire induite chez la souris après l'infection du SNC, notamment la production de cytokine pro-inflammatoire.

Surprenamment, nous n'avons pu montrer de différence d'atteinte du SNC entre les souris infectées par voie intranasale par le virus de référence ou par les virus recombinants ayant de potentiels domaine transmembranaire et motif d'interaction protéine-protéine de type PBM altérés. En effet, ces trois virus montrent un pourcentage de souris infectées identique (Figure 5-6) suggérant que les potentiels domaines fonctionnels de la protéine E ne sont pas requis pour la neuroinvasion de HCoV-OC43. Cependant, le niveau d'ARN viral quantifié dans les cerveaux n'est pas identique, alors qu'une plus grande quantité de copies d'ARN viral est détectée pour le virus de référence que pour le mutant TMD, et encore plus que pour le mutant PBM. Cette différence pourrait être due à une modulation de la vitesse d'atteinte du SNC par les deux

domaines fonctionnels. Le virus de référence pourrait atteindre plus rapidement le SNC que le mutant TMD, qui serait lui-même plus rapide que le mutant PBM. Cette différence pourrait également résulter du défaut de réplication et de propagation dans le cerveau des souris observé suite à l'infection par voie intracérébrale (Figure 5-7 et 5-8), et interviendrait donc après l'atteinte du SNC. Il serait donc intéressant de répéter cette expérience en faisant varier la dose injectée ou la durée d'incubation avant la récolte du cerveau (ici 5 jours) afin de déterminer si l'altération du TMD et du PBM module l'efficacité de neuroinvasion de HCoV-OC43 comme le fait l'absence de la protéine E du SARS-CoV (DeDiego et al. 2008). Cependant, l'altération de ces domaines pourrait avoir l'effet opposé. En effet, suite à l'altération du potentiel PBM de HCoV-OC43, l'infection de cellules épithéliales HRT-18 mène à une production totale de particules virales réduite, mais dont la proportion de particules infectieuses par rapport à la production de particule totale est grandement augmenté (50% pour le mutant PBM contre moins de 1% pour le virus de référence) (Figure 5-5). Lors de l'infection de souris avec une même quantité de particules virales infectieuses, les souris infectées avec le mutant PBM seront donc en présence de beaucoup moins de particules défectives par rapport au virus de référence, ce qui pourrait compenser le défaut de production et de propagation du mutant en étant potentiellement moins détectable par le système immunitaire, ou en améliorant les chances d'une particule infectieuse d'infecter une cellule.

Suite à des infections persistantes de cellules neurales, le gène de la protéine S de HCoV-OC43 a acquis plusieurs mutations d'adaptation modulant à la hausse ou à la baisse la neurovirulence du virus et ayant différentes conséquences sur les mécanismes induits par l'infection, tels que l'augmentation de l'UPR, de l'excitotoxicité glutamatergique, de la mort cellulaire régulée, la modification du clivage de cette protéine et la neurovirulence associée (Brison et al. 2011; Favreau et al. 2009; Jacomy et al. 2010; Le Coupanec et al. 2015; Meessen-Pinard et al. 2017). L'étude de la stabilité du gène de la protéine E, et de ses domaines fonctionnels pourrait mettre en évidence de nouvelles mutations d'adaptation, et ainsi permettrait d'obtenir plus d'informations sur le rôle de cette protéine durant l'infection. Une telle étude a été conduite très récemment sur le coronavirus porcine PEDV, où après 40 amplifications successives en culture cellulaire, une délétion de 5 acides aminés accompagnée d'une mutation d'un autre acide aminé dans le domaine transmembranaire de la protéine E ont été observée (Sun et al. 2017). Cette adaptation est responsable d'une augmentation de la réponse au stress du RE, de la réponse inflammatoire, et de l'apoptose des cellules infectées pouvant jouer sur la pathologie.

De même, il a été montré suite à la délétion du gène E du MHV et du SARS-CoV, que ces coronavirus peuvent rétablir leur phénotype en dupliquant une portion du gène M, ou en modifiant l'extrémité C-terminale du gène de la protéine 8a du SARS-CoV afin de rétablir un PBM fonctionnel (Jimenez-Guardeño et al. 2015; Kuo et al. 2010). Ces réversions furent observées suite à des amplifications successives sur cultures de cellules et non pas *in vivo*. Nous avons également démontré que suite à l'introduction d'un codon-stop dans le gène de la protéine E de HCoV-OC43, le virus mutant initialement complété montrait des signes de réversions dès le deuxième cycle d'amplification (Figure 5-1). L'analyse du génome de ces stocks révertants a montré que le gène E muté avait subi une réversion afin de revenir à l'acide aminé d'origine, ou à un autre acide aminé permettant la synthèse d'une protéine E entière et fonctionnelle. Nous n'avons cependant pas observé de telles réversions dans le contexte de l'infection du SNC de souris. Nous supposons que la suppression de l'infection par l'hôte, en partie par l'entremise de la réponse immunitaire ne permet pas aux populations de virus révertants de s'amplifier suffisamment pour être observable, bien que ce processus soit très rapide en culture de cellules épithéliales (réversion observable dès la deuxième amplification) (Figure 5-1). De plus, nous n'avons pas non plus observé de duplication du gène M lors d'infections du SNC de souris ou de cultures de cellules. L'approche que nous avons prise a été d'introduire un codon-stop dans le gène E plutôt que de supprimer une partie du gène. On peut donc logiquement penser qu'une simple réversion d'un ou deux nucléotides paraît plus simple et plus rapide à faire afin de retrouver une protéine E fonctionnelle plutôt qu'une duplication partielle d'un autre gène qui pourrait engendrer une protéine permettant de palier les problèmes liés à l'absence de la protéine E. Néanmoins, cette pression de sélection sur la protéine E de HCoV-OC43 que nous avons observé, souligne de façon très nette l'importance d'avoir une protéine E entière et fonctionnelle pour une infection efficace par le virus.

Bien que les expériences présentées dans ce travail de maîtrise n'aient pas été conçues pour étudier la fonctionnalité des potentiels domaines fonctionnels de la protéine E, les résultats obtenus suggèrent que ces domaines sont impliqués à différents niveaux durant l'infection de cellules et la pathogenèse. En effet, la mutation de la glutamine à la position 17 (Q17A) mène à un important défaut de production de particules virales infectieuses et de propagation en culture de cellules épithéliales et neuronales, et dans le SNC de souris. Cette mutation induit également un phénotype atténué chez les souris infectées. La mutation équivalente à la position 15 (N15A)

dans la protéine E du SARS-CoV induit aussi un phénotype atténué avec une mortalité grandement réduite, ce qui a été associé à la perte de l'activité de canal ionique de cette protéine (Niето-Torres et al. 2014). Cette activité de canal ionique a aussi été associée à la modulation de la production de particules virales infectieuses, notamment en facilitant la relâche de nouvelles particules. En effet, l'insertion de mutations dans le TMD des protéines E de MHV et d'IBV conduit à l'apparition d'un défaut de relâche de particules infectieuses nouvellement formées (Ruch et al. 2011; Y. Ye et al. 2007). La quantification des titres infectieux du surnageant et des cellules infectées par le virus de référence ou par le mutant rOC/E-TM_{Q17A}, et la quantification des particules infectieuses et totales relâchées à 16 heures suivant l'infection par les deux virus (Figure 5-3B, C et D) suggèrent que le potentiel TMD de la protéine E de HCoV-OC43 joue un rôle important dans la relâche de virions nouvellement formés en protégeant ces virions d'une potentielle dégradation. En effet, en absence du domaine TMD d'IBV, une grande partie des virions formés présente des protéines S clivées à la surface des virions les rendant non infectieux (Ruch et al. 2011). Un rôle similaire a été attribué à la viroporine M2 du VIA qui inhibe l'acidification des vésicules transportant les virions, empêchant ainsi l'inactivation de sa protéine Hemagglutinine, et assurant l'infectivité des virions (Takeuchi et al. 1994). De tels mécanismes pourraient expliquer l'apparente dégradation de l'infectivité des particules virales produites par le mutant rOC/E-TM_{Q17A} suite à l'infection. De plus, plusieurs viroporines sont capables d'induire un remodelage des organites cellulaires permettant l'assemblage ou le relargage des virions. En effet, la protéine M2 du VIA, p7 du VHC, 2B du rhinovirus et 3a du SARS-CoV peuvent moduler le transport de protéines au travers du RE et de l'appareil de Golgi créant ainsi des sites favorables à la production de particules virales infectieuses (Sakaguchi et al. 1996; Wozniak et al. 2010; de Jong et al. 2008; Freundt et al. 2010). Il a été suggéré que le TMD de la protéine E des coronavirus permet au virus d'interférer avec la voie de sécrétion des cellules infectées, la détournant afin de relâcher les virions nouvellement formés dans le milieu extracellulaire (Ruch et al. 2012b). En effet, l'altération de ce domaine mène à une séquestration des particules virales nouvellement formées pour le SARS-CoV, TGEV et IBV (DeDiego et al. 2007; Ortego et al. 2007; Ruch et al. 2011). L'absence d'un mécanisme similaire pourrait également être à l'origine de la dégradation des particules virales infectieuses du mutant TMD observé en culture cellulaire (Figure 5-3C et D). L'observation par microscopie électronique de cellules neuronales infectées par le virus de référence ou le mutant TMD apporterait plus de précisions sur la nature du défaut de production observé suite à l'altération du domaine TMD de HCoV-OC43, et sur un potentiel réarrangement des organites cellulaires de la voie de sécrétion. Ces résultats renforcent l'hypothèse que la protéine E de HCoV-OC43 possède un domaine transmembranaire formant

un canal ionique, et que cette activité est liée au développement de neuropathologies suite à l'infection du SNC. Cependant, l'étude de sa capacité à s'homo-oligomériser en cellule et/ou en membrane artificielle, et de la perméabilité ionique induite par ces homo-oligomères est requise pour démontrer la nature de viroporine de cette protéine.

L'utilisation d'inhibiteurs de canaux ioniques pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer l'importance de ce domaine transmembranaire. En effet, plusieurs inhibiteurs ont déjà été utilisés pour étudier la fonction de canal ionique des protéines E de différents coronavirus et d'autres viroporines. Le HMA (5-N,N Hexamethylene amiloride) est capable de bloquer l'activité de canal ionique de HCoV-229E, de MHV et du SARS-CoV, et ayant également un impact sur la production de particules virales infectieuses (Wilson et al. 2006). De même, l'amantadine (tricyclo(3.3.1.1^{3,7})décan-1-amine hydrochloride) est capable d'inhiber le canal ionique formé par la protéine E du SARS-CoV, par la protéine p7 du VHC, et par la protéine M2 du VIA (Griffin et al. 2003; Pinto et al. 2006; Torres et al. 2007). L'utilisation de ces inhibiteurs chimiques, en combinaison avec des modèles de membranes artificielles permettrait d'établir si la protéine E de HCoV-OC43 possède une fonction de canal ionique, et l'utilisation de ces inhibiteurs en culture cellulaire apporterait plus de détails sur l'importance de cette fonction dans le cycle de réplication viral. Il serait également intéressant de déterminer si l'administration de ces inhibiteurs aux souris infectées apporterait un effet protecteur contre l'infection, et si cet effet serait spécifique au TMD de la protéine E à l'aide du mutant transmembranaire. Il est à noter que l'utilisation de la mémantine (3,5-diméthyl-tricyclo-(3.3.1.1^{3,7})décan-1-amine hydrochloride), un composé apparenté à l'amantadine, protège les souris contre l'infection par HCoV-OC43 et diminue la réplication virale dans le SNC lorsqu'il est administré pendant ou avant l'infection (Brison et al. 2014). Étant donné que les dérivés de l'amantadine sont connus pour inhiber des viroporines (Tanner et al. 2005; Ickes et al. 1990; Cady et al. 2011), l'hypothèse que l'effet protecteur de la mémantine est lié à l'inhibition de l'activité de canal ionique de la protéine E est à envisager. La comparaison des neuropathologies induites par l'infection par le virus de référence ou par le mutant TMD avec ou sans traitement à la mémantine permettrait de préciser l'importance du domaine transmembranaire de la protéine E de HCoV-OC43 pour sa neurovirulence.

De plus, le domaine transmembranaire de la protéine E pourrait également jouer un rôle lors de l'entrée du virus, jouant ainsi un rôle important pour l'infectivité des virions produits. Le seul exemple connu de viroporine agissant lors de l'entrée du virus dans la cellule est celui du

VIA. En effet, suite à l'endocytose du virus, les endosomes qui les contiennent vont s'acidifier progressivement lors de la formation des endolysosomes. Cette acidification va entraîner plusieurs changements conformationnels sur les protéines virales et va également activer les quelques copies de la protéine M2 présentes dans les virions, permettant l'acidification des particules virales et leur décapsidation. En présence d'inhibiteur chimique de M2, certaines souches du VIA ne sont pas complètement décapsidées modulant la suite de l'infection (Grambas et al. 1992; C. Wang et al. 1994). HCoV-OC43 étant capable d'entrer dans les cellules par endocytose (Le Coupanec, résultats non publiés) (Keyaerts et al. 2009; Shen et al. 2016), il serait intéressant de déterminer si sa protéine E a un rôle similaire. Bien qu'elle ne soit qu'un composant mineur du virion (environ 20 copies par virion), cette faible quantité pourrait être suffisante pour faciliter la décapsidation des virions. En effet, la protéine M2 du VIA est également très peu présente dans le virion (entre 14 et 68 copies par virion) (Zebedee et al. 1988). Cependant, l'importance des viroporines lors de l'entrée du virus dans la cellule reste mal connue et ce rôle est possiblement moins fréquent, étant donné la rareté de la présence de viroporines dans les enveloppes virales.

La protéine E des coronavirus est connue pour avoir de multiples fonctions en plus de celles associées à son domaine transmembranaire. En effet, la protéine E du SARS-CoV a été associée au tropisme neural alors que son absence empêche la réplication du virus dans le SNC de souris (DeDiego et al. 2008), à la morphogénèse avec un degré d'importance variable en fonction des systèmes utilisés et de l'espèce coronavirale (DeDiego et al. 2014), et à la pathogénèse où la délétion de la protéine E induit un phénotype atténué chez les souris infectées (DeDiego et al. 2007). De plus, la protéine E est fortement liée à la réponse du système immunitaire (DeDiego et al. 2011; Jimenez-Guardeño et al. 2014). Cet ensemble de rôles, qui reste à bien définir, montre que la protéine E des coronavirus est une protéine multifonctionnelle dont les rôles découlent en partie de son TMD, mais également d'autres domaines fonctionnels tels que le motif d'interaction protéine-protéine de type PBM présent à l'extrémité C-terminale de la protéine (Jimenez-Guardeño et al. 2014; Teoh et al. 2010).

Dans cette étude, nous avons caractérisé l'importance du potentiel motif PBM de la protéine E de HCoV-OC43 pour la réplication et propagation virale, ainsi que pour sa neurovirulence. Nous avons démontré qu'une altération partielle du PBM (rOC/E-PBM_{D82A} et rOC/E-PBM_{V84A}) n'induit pas de défaut de production de particules virales infectieuses visible,

indiquant que HCoV-OC43 tolère une certaine flexibilité dans la séquence du motif PBM, alors que l'altération complète du PBM (rOC/E-PBM_{D82A-V84A}) mène à une production de particules virales infectieuses grandement réduite en culture de cellules épithéliales (Figure 5-4). Il est à noter que ce défaut de production est exacerbé en culture de cellules neuronales humaines et neurales murines, suggérant que l'importance du motif PBM de la protéine E dépend du type cellulaire infecté, ce qui pouvait être attendu compte tenu du fait que le rôle du PBM dépend de ses partenaires cellulaires qui peuvent changer en fonction des types cellulaires (Javier et al. 2011). De plus, nous avons démontré que ce domaine est essentiel pour une production efficace de particules virales infectieuses dans le SNC de souris, modulant ainsi la neurovirulence de HCoV-OC43 (Figure 5-6 et 5-7). Cependant, le motif PBM de la protéine E du SARS-CoV (-DLLV) semble être aussi important pour la production de virus infectieux dans les cellules épithéliales que dans les cellules astrocytaires (Jimenez-Guardeño et al. 2014), et étant donné que l'abrogation de ce motif PBM mène à une production légèrement réduite ou non affectée en cellules et dans les poumons (Jimenez-Guardeño et al. 2014; Regla-Nava et al. 2015), nos résultats confirment que l'importance de la protéine E dépend également de l'espèce coronavirale.

Bien que notre étude suggère que la protéine E de HCoV-OC43 possède un motif PBM fonctionnel, l'unique façon de le déterminer est d'identifier un partenaire d'interaction protéique possédant un domaine PDZ, et de montrer que cette interaction est spécifique au motif PBM. En plus de confirmer la fonctionnalité du motif PBM, l'identification de partenaires cellulaires permettrait de mieux comprendre les mécanismes induits par la protéine E durant l'infection et donc, apporterait des informations supplémentaires sur le rôle de cette protéine. L'utilisation de co-immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps spécifique à la protéine E couplé à de la spectroscopie de masse, ou l'utilisation de double-hybride à l'aide d'une banque de protéines représentatives du protéome des neurones permettrait d'identifier l'interactome neuronal de la protéine E de HCoV-OC43. À ce jour, la seule protéine E de coronavirus étudiée dans ce contexte est celle du SARS-CoV où son interaction avec les domaines PDZ des protéines PALS1 et Synténine modulent sa virulence en induisant respectivement la destruction des jonctions serrées de l'épithélium des poumons (Teoh et al. 2010), et l'exacerbation de la réponse immunitaire dans les poumons (Jimenez-Guardeño et al. 2014). L'étude de l'interférence des PBM viraux dans les interactions entre PBM et PDZ cellulaires représente un domaine d'étude très récent et concerne surtout la capacité oncogénique de ces virus (James et al. 2016; Javier et al. 2011). Cependant,

la grande diversité de protéines cellulaires possédant un ou plusieurs domaines PDZ dans les neurones (Feng et al. 2009) en fait un domaine très prometteur pour l'étude des virus neurovirulents, notamment pour trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Le virus de la rage représente l'un des seuls exemples très concrets de PBM viral détournant des interactions PDZ-PBM neuronales (Caillet-Saguy et al. 2015).

L'étude du motif PBM situé à l'extrémité C-terminale de la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la rage a montré que la mutation d'un acide aminé de ce PBM de type I peut induire deux phénotypes totalement différents : le motif -QTRL est associé à une virulence accrue, et le motif -ETRL est associé à une virulence atténuée (Préhaud et al. 2010). Cette différence de phénotype est associée à une modification de partenaires d'interaction cellulaire où la souche atténuée interagit en plus avec le domaine PDZ de la tyrosine phosphatase PTPN4, induisant l'apoptose des cellules infectées, contrairement à la souche virulente qui interagit avec le domaine PDZ de la sérine-thréonine kinase MAST2, promouvant la survie cellulaire, et donc une réplication et propagation virale plus efficace (Préhaud et al. 2010; Terrien et al. 2012). Étant donné que la protéine E du SARS-CoV joue un rôle anti-apoptotique (DeDiego et al. 2011), il serait intéressant de déterminer si la protéine E de HCoV-OC43 peut interagir avec le domaine PDZ de MAST2 afin de promouvoir la survie cellulaire des neurones infectés et si cette interaction est spécifique au motif PBM en déterminant si elle est modifiée par l'altération du motif PBM de la protéine E à l'aide du virus mutant associé, ce qui expliquerait le défaut de réplication et propagation virale observé en culture neuronale suite à l'infection par le virus ayant un motif PBM altéré (Figure 5-4). De plus, le motif PBM de la protéine E du SARS-CoV est lié à une exacerbation de la réponse immunitaire dans les poumons. En effet, suite à la liaison de ce motif PBM avec le domaine PDZ de la synténine, cette dernière est relocalisée au noyau de la cellule infectée, activant la MAP Kinase p38, et menant à une augmentation de l'expression de gènes associés à la réponse inflammatoire à l'infection (gènes des cytokines proinflammatoires CCL2, CXCL10 et IL6) (Jimenez-Guardeño et al. 2014). Étant donné que l'infection du SNC de souris par le virus de référence induit une infiltration de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, ainsi qu'une augmentation de la production des cytokines CCL2, CXCL10, IL-1, IL-6 et INF- γ (Jacomy et al. 2010), une implication de la protéine E dans la régulation de cette réponse inflammatoire est à envisager, et l'étude de la réponse immunitaire dans le SNC de souris suivant l'infection par le mutant rOC/E-PBM_{D82A-V84A} en comparaison au virus de référence pourrait apporter de nouvelles perspectives quant à ce rôle lors de l'infection du SNC.

En conclusion, dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois que la protéine E du coronavirus humain OC43 est un facteur déterminant pour la production de particules virales infectieuses et pour la propagation du virus en culture de cellules épithéliales et neuronales, ainsi que dans un contexte d'infection du SNC de souris. De même, telle que la protéine E du SARS-CoV, de MHV et d'IBV, la protéine E de HCoV-OC43 représente un facteur de virulence important influençant le développement de la maladie neurologique suivant l'infection du SNC. Nous avons également montré que ce rôle important semble relié aux deux domaines fonctionnels potentiellement présents dans la protéine. Le potentiel domaine transmembranaire joue un rôle important dans la modulation de la production de particules virales infectieuses ainsi que dans la propagation de l'infection, notamment dans le cerveau des souris infectées en facilitant la relâche de particules nouvellement formées. Nos résultats semblent appuyer l'hypothèse déjà envisagée pour une grande partie des coronavirus catégorisant la protéine E des coronavirus dans la classe des viroporines. Cette hypothèse nécessite toutefois une étude plus approfondie afin d'être confirmée. La démonstration de sa capacité à s'homo-oligomériser et à former des canaux ioniques fonctionnels en membrane artificielle, complété par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques spécifiques à l'activité de canal ionique pendant l'infection apporterait plus d'information sur la nature de viroporine de la protéine E de HCoV-OC43. De plus, le potentiel motif d'interaction protéine-protéine spécifique aux PDZ (PBM) préalablement identifié à l'extrémité C-terminale de la protéine E de HCoV-OC43 est très important pour une réplication efficace en cellules neuronales ainsi que pour la propagation de l'infection. De même, l'altération de ce domaine abolit la neurovirulence en empêchant le développement de symptômes suivant l'infection du SNC de souris. L'identification des protéines cellulaires possédant un domaine PDZ et interagissant spécifiquement avec la protéine E de HCoV-OC43 (interactome neuronale) durant l'infection apporterait de précieuses informations sur les mécanismes déployés par ce virus afin de se propager à l'intérieur du SNC et d'induire des pathologies neurologiques, et sur la fonctionnalité de ce potentiel motif PBM. Ces études plus approfondies permettraient d'approfondir la compréhension de tels mécanismes et d'envisager l'élaboration d'approches thérapeutiques permettant de limiter l'impact de ce virus respiratoire neuroinvasif circulant sur le développement de pathologies neurologiques chez certaines populations à risque.

7 REFERENCES

- Abbott, N. Joan. 2002. « Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. » *Journal of anatomy* 200 (6). Wiley-Blackwell: 629-38. doi:10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x.
- Abbott, N. Joan, Lars Rönnbäck et Elisabeth Hansson. 2006. « Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. » *Nature Reviews Neuroscience* 7 (1): 41-53. doi:10.1038/nrn1824.
- Acharya, Rudresh, Vincenzo Carnevale, Giacomo Fiorin, Benjamin G. Levine, Alexei L. Polishchuk, V. Balannik, I. Samish, Robert A. Lamb, L. H. Pinto, W. F. DeGrado et M. L. Klein. 2010. « Structure and mechanism of proton transport through the transmembrane tetrameric M2 protein bundle of the influenza A virus. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (34): 15075-15080. doi:10.1073/pnas.1007071107.
- Åkerström, Sara, Ali Mirazimi et Yee Joo Tan. 2007. « Inhibition of SARS-CoV replication cycle by small interference RNAs silencing specific SARS proteins, 7a/7b, 3a/3b and S. » *Antiviral Research* 73 (3): 219-227. doi:10.1016/j.antiviral.2006.10.008.
- Almazán, Fernando, Marta L Dediego, Isabel Sola, Sonia Zuñiga, Jose L Nieto-torres, Silvia Marquez-jurado et German Andrés. 2013. « a Vaccine Candidate East Respiratory Syndrome Coronavirus as a Vaccine Candidate. » *mBIO* 4 (5): 1-11. doi:10.1128/mBio.00650-13.Editor.
- Almazán, Fernando, Isabel Sola, Sonia Zuñiga, Silvia Marquez-Jurado, Lucia Morales, Martina Becares et Luis Enjuanes. 2014. « Coronavirus reverse genetic systems: Infectious clones and replicons. » *Virus Research* 189 (10): 262-270. doi:10.1016/j.virusres.2014.05.026.
- Aloisi, Francesca. 2001. « Immune function of microglia. » *Glia* 36 (2). John Wiley & Sons, Inc.: 165-179. doi:10.1002/glia.1106.
- Alshaikh, Sana Ali T. 2011. « A Novel and Sensitive Molecular Method for Nucleic Acid Discovery in CSF Samples. » University of Manchester.
- Álvarez, Enrique, Marta L. DeDiego, Jose L. Nieto-Torres, Jose M. Jiménez-Guardeño, Laura Marcos-Villar et Luis Enjuanes. 2010. « The envelope protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus interacts with the non-structural protein 3 and is ubiquitinated. » *Virology* 402 (2). Elsevier Inc.: 281-291. doi:10.1016/j.virol.2010.03.015.

- Andries, K et M B Pensaert. 1980. « Virus isolated and immunofluorescence in different organs of pigs infected with hemagglutinating encephalomyelitis virus. » *American journal of veterinary research* 41 (2): 215-8.
- Arabi, Y. M., A. Harthi, J. Hussein, A. Bouchama, S. Johani, A. H. Hajeer, B. T. Saeed, A. Wahbi, A. Saedy, T. AlDabbagh, R. Okaili, M. Sadat et H. Balkhy. 2015. « Severe neurologic syndrome associated with Middle East respiratory syndrome corona virus (MERS-CoV). » *Infection* 43 (4). Springer Berlin Heidelberg: 495-501. doi:10.1007/s15010-015-0720-y.
- Arbour, N, G Côté, C Lachance, M Tardieu, N R Cashman et P J Talbot. 1999. « Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. » *Journal of virology* 73 (4): 3338-50.
- Arbour, N, R Day, J Newcombe et P J Talbot. 2000. « Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. » *Journal of virology* 74 (19): 8913-8921. doi:10.1128/JVI.74.19.8913-8921.2000.
- Arbour, N, S EkanDé, G Côté, C Lachance, F Chagnon, M Tardieu, N R Cashman et P J Talbot. 1999. « Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. » *Journal of virology* 73 (4): 3326-37.
- Armesto, Maria, Sharon Evans, David Cavanagh, Abu Bakr Abu-Median, Sarah Keep et Paul Britton. 2011. « A recombinant Avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene belonging to the 4/91 serotype. » *PLoS ONE* 6 (8). doi:10.1371/journal.pone.0024352.
- Atluri, Venkata Subba Rao, Melissa Hidalgo, Thangavel Samikkannu, Kesava Rao Venkata Kurapati, Rahul Dev Jayant, Vidya Sagar et Madhavan P. N. Nair. 2015. « Effect of human immunodeficiency virus on blood-brain barrier integrity and function: an update. » *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (June): 1-10. doi:10.3389/fncel.2015.00212.
- Auld, Daniel S et Richard Robitaille. 2003. « Glial Cells and Neurotransmission: An Inclusive View of Synaptic Function. » *Neuron* 40: 389-400.
- Bakkers, Mark J.G., Yifei Lang, Louris J. Feitsma, Ruben J.G. Hulswit, Stefanie A.H. de Poot, Arno L.W. van Vliet, Irina Margine, Jolanda D.F. de Groot-Mijnes, Frank J.M. van Kuppeveld, Martijn A. Langereis, Eric G. Huizinga et Raoul J. de Groot. 2017. « Betacoronavirus Adaptation to Humans Involved Progressive Loss of Hemagglutinin-Esterase Lectin Activity. » *Cell Host & Microbe* 21 (3). Elsevier Inc.: 356-366.

doi:10.1016/j.chom.2017.02.008.

- Bande, Faruku, Siti Suri Arshad, Abdul Rahman Omar, Mohd Hair Bejo, Muhammad Salisu Abubakar et Yusuf Abba. 2016. « Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. » *Advance in Virology* 2016 (ID 4621659). doi:10.1155/2016/4621659.
- Belouzard, Sandrine, Jean K. Millet, Beth N. Licitra et Gary R. Whittaker. 2012. « Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. » *Viruses* 4 (6): 1011-1033. doi:10.3390/v4061011.
- Bender, Susan J. et Susan R. Weiss. 2010. « Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. » *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 5 (3). Springer US: 336-54. doi:10.1007/s11481-010-9202-2.
- Bonavia, A, N Arbour, V W Yong et P J Talbot. 1997. « Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. » *Journal of virology* 71 (1): 800-6.
- Boscarino, Joseph a, Hillary L Logan, Jason J Lacny et Thomas M Gallagher. 2008. « Envelope protein palmitoylations are crucial for murine coronavirus assembly. » *Journal of virology* 82 (6): 2989-99. doi:10.1128/JVI.01906-07.
- Brison, Elodie, H el ene Jacomy, Marc Desforages et Pierre J Talbot. 2014. « Novel treatment with neuroprotective and antiviral properties against a neuroinvasive human respiratory virus. » *Journal of virology* 88 (3): 1548-63. doi:10.1128/JVI.02972-13.
- Brison, Elodie, H el ene Jacomy, Marc Desforages et Pierre J. Talbot. 2011. « Glutamate excitotoxicity is involved in the induction of paralysis in mice after infection by a human coronavirus with a single point mutation in its spike protein. » *Journal of virology* 85 (23): 12464-12473. doi:10.1128/JVI.05576-11.
- Brohm, C, E Steinmann, M Friesland, I C Lorenz, A Patel, F Penin, R Bartenschlager et T Pietschmann. 2009. « Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation. » *Journal of virology* 83 (22): 11682-11693. doi:10.1128/JVI.00691-09.
- Buchanan, Renee et Daniel J. Bonthius. 2012. « Measles Virus and Associated Central Nervous System Sequelae. » *Seminars in Pediatric Neurology* 19 (3). Elsevier Inc.: 107-114. doi:10.1016/j.spen.2012.02.003.
- Bukreyev, a, S S Whitehead, B R Murphy et P L Collins. 1997. « Recombinant respiratory

- syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. » *Journal of virology* 71 (12): 8973-8982.
- Cady, Sarah D., Jun Wang, Yibing Wu, William F. DeGrado et Mei Hong. 2011. « Specific Binding of Adamantane Drugs and Direction of Their Polar Amines in the Pore of the Influenza M2 Transmembrane Domain in Lipid Bilayers and Dodecylphosphocholine Micelles Determined by NMR Spectroscopy. » *Journal of the American Chemical Society* 133 (12): 4274-4284. doi:10.1021/ja102581n.
- Caillet-Saguy, Célia, Pierre Maisonneuve, Florent Delhommel, Elouan Terrien, Nicolas Babault, Monique Lafon, Florence Cordier et Nicolas Wolff. 2015. « Strategies to interfere with PDZ-mediated interactions in neurons: What we can learn from the rabies virus. » *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 33 (1): 1-7. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.007.
- Carpenter, Anne E., Thouis R. Jones, Michael R. Lamprecht, Colin Clarke, In Han Kang, Ola Friman, David A. Guertin, Joo Han Chang, Robert A. Lindquist, Jason Moffat, Polina Golland et David M. Sabatini. 2006. « CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. » *Genome biology* 7 (10): R100. doi:10.1186/gb-2006-7-10-r100.
- Carrasco, Luis. 1995. « Modification of membrane permeability by animal viruses. » *Advances in virus research* 45 (C): 61-112. doi:10.1016/S0065-3527(08)60058-5.
- Carrere-Kremer, S, C Montpellier-Pala, L Cocquerel, C Wychowski, F Penin et J Dubuisson. 2002. « Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. » *J Virol* 76 (8): 3720-3730. doi:10.1128/JVI.76.8.3720.
- Chen, Cheng-Chang, Jens Krüger, Issara Sramala, Hao-Jen Hsu, Peter Henklein, Yi-Ming Arthur Chen et Wolfgang B. Fischer. 2010. « ORF8a of SARS-CoV forms an ion channel: Experiments and molecular dynamics simulations. » *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808 (2). Elsevier B.V.: 572-579. doi:10.1016/j.bbamem.2010.08.004.
- Chen, Shih Chi, Shih Yen Lo, Hsin Chieh Ma et Hui Chun Li. 2009. « Expression and membrane integration of SARS-CoV e protein and its interaction with M protein. » *Virus Genes* 38 (3): 365-371. doi:10.1007/s11262-009-0341-6.
- Cheung, T. K.W., Y. Guan, S. S.F. Ng, H. Chen, C. H.K. Wong, J. S.M. Peiris et L. L.M. Poon. 2005. « Generation of recombinant influenza A virus without M2 ion-channel protein by

- introduction of a point mutation at the 5' end of the viral intron. » *Journal of General Virology* 86 (5): 1447-1454. doi:10.1099/vir.0.80727-0.
- Chevalier, Grégoire, Elsa Suberbielle, Céline Monnet, Valérie Duplan, Guillaume Martin-Blondel, Fanny Farrugia, Gwendal Le Masson, Roland Liblau et Daniel Gonzalez-Dunia. 2011. « Neurons are MHC class I-dependent targets for CD8 T cells upon neurotropic viral infection. » *PLoS pathogens* 7 (11). doi:10.1371/journal.ppat.1002393.
- Cho, Kyung Ok, Carol A. Hunt et Mary B. Kennedy. 1992. « The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the drosophila discs-large tumor suppressor protein. » *Neuron* 9 (5): 929-942. doi:10.1016/0896-6273(92)90245-9.
- Christensen, Tove. 2010. « HERVs in neuropathogenesis. » *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 5 (3): 326-335. doi:10.1007/s11481-010-9214-y.
- Cohen, Jennifer R, Lisa D Lin et Carolyn E Machamer. 2011. « Identification of a Golgi complex-targeting signal in the cytoplasmic tail of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. » *Journal of virology* 85 (12): 5794-803. doi:10.1128/JVI.00060-11.
- Colonna, Marco et Oleg Butovsky. 2017. « Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. » *Annual Review of Immunology* 35 (1): annurev-immunol-051116-052358. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358.
- Cordes, F. S., A. D. Tustian, M. S P Sansom, A. Watts et W. B. Fischer. 2002. « Bundles consisting of extended transmembrane segments of Vpu from HIV-1: Computer simulations and conductance measurements. » *Biochemistry* 41 (23): 7359-7365. doi:10.1021/bi025518p.
- Corse, E et C E Machamer. 2000. « Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles. » *Journal of virology* 74 (9): 4319-26.
- Corse, E et C E Machamer. 2002. « The cytoplasmic tail of infectious bronchitis virus E protein directs Golgi targeting. » *Journal of virology* 76 (3): 1273-84. doi:10.1128/JVI.76.3.1273-1284.2002.
- Corse, E et C E Machamer. 2003. « The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction. » *Virology* 312 (1): 25-34. doi:10.1016/S0042-6822(03)00175-2.
- Le Coupanec, Alain, Marc Desforges, Mathieu Meessen-Pinard, Mathieu Dubé, Robert Day, Nabil G Seidah et Pierre J Talbot. 2015. « Cleavage of a Neuroinvasive Human Respiratory Virus

- Spike Glycoprotein by Proprotein Convertases Modulates Neurovirulence and Virus Spread within the Central Nervous System. » *PLoS pathogens* 11 (11). Public Library of Science: e1005261. doi:10.1371/journal.ppat.1005261.
- Cowley, Timothy J et Susan R Weiss. 2010. « Murine coronavirus neuropathogenesis: determinants of virulence. » *Journal of Neurovirology* 16 (6): 427-34. doi:10.3109/13550284.2010.529238.
- Curtis, KM, Boyd Yount et RS Baric. 2002. « Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles. » *Journal of virology* 76 (3): 1422-1434. doi:10.1128/JVI.76.3.1422.
- Danbolt, Niels C. 2001. « Glutamate uptake. » *Progress in Neurobiology* 65: 1-105.
- DeDiego, Marta L., E. Alvarez, Fernando Almazan, M. T. Rejas, E. Lamirande, A. Roberts, W. J. Shieh, S. R. Zaki, K. Subbarao et Luis Enjuanes. 2007. « A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. » *J Virol* 81 (4): 1701-1713. doi:10.1128/JVI.01467-06.
- DeDiego, Marta L., Jose L. Nieto-Torres, Jose M. Jiménez-Guardeño, Jose a. Regla-Nava, Enrique Álvarez, Juan Carlos Oliveros, Jincun Zhao, Craig Fett, Stanley Perlman, Luis Enjuanes, Enrique Alvarez, Juan Carlos Oliveros, Jincun Zhao, Craig Fett, Stanley Perlman et Luis Enjuanes. 2011. « Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. » *PLoS pathogens* 7 (10). Public Library of Science: e1002315. doi:10.1371/journal.ppat.1002315.
- DeDiego, Marta L., Jose L. Nieto-Torres, Jose M. Jimenez-Guardeño, Jose a. Regla-Nava, Carlos Castaño-Rodríguez, Raul Fernandez-Delgado, Fernando Usera et Luis Enjuanes. 2014. « Coronavirus virulence genes with main focus on SARS-CoV envelope gene. » *Virus research* 194: 124-37. doi:10.1016/j.virusres.2014.07.024.
- DeDiego, Marta L., Lecia Pewe, Enrique Alvarez, Maria Teresa Rejas, Stanley Perlman et Luis Enjuanes. 2008. « Pathogenicity of severe acute respiratory coronavirus deletion mutants in hACE-2 transgenic mice. » *Virology* 376 (2): 379-389. doi:10.1016/j.virol.2008.03.005.
- Desforges, Marc, Alain Le Coupanec, Jenny K Stodola, Mathieu Meessen-Pinard et Pierre J Talbot. 2014. « Human coronaviruses: viral and cellular factors involved in neuroinvasiveness and neuropathogenesis. » *Virus research* 194: 145-58. doi:10.1016/j.virusres.2014.09.011.

- Desforges, Marc, Jessica Desjardins, Chengsheng Zhang et Pierre J Talbot. 2013. « 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): 3097-107. doi:10.1128/JVI.02699-12.
- Diefenbach, Russell J., Monica Miranda-Saksena, Mark W. Douglas et Anthony L. Cunningham. 2008. « Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. » *Reviews in Medical Virology* 18 (1): 35-51. doi:10.1002/rmv.560.
- Dominguez, Samuel R., Gregory E. Sims, David E. Wentworth, Rebecca A. Halpin, Christine C. Robinson, Christopher D. Town et Kathryn V. Holmes. 2012. « Genomic analysis of 16 Colorado human NL63 coronaviruses identifies a new genotype, high sequence diversity in the N-terminal domain of the spike gene and evidence of recombination. » *Journal of General Virology* 93 (PART 11): 2387-2398. doi:10.1099/vir.0.044628-0.
- Donnou, Sabrina. 2007. « Caractérisation des cellules microgliales adultes et de leur potentiel en immunothérapie des tumeurs cérébrales. » Université d'Angers.
- Dougherty, Karen D, Cheryl F Dreyfus et Ira B Black. 2000. « Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. » *Neurobiology of disease* 7: 574-85. doi:10.1006/nbdi.2000.0318.
- Doyle, Declan A., Alice Lee, John Lewis, Eunjoon Kim, Morgan Sheng et Roderick MacKinnon. 1996. « Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein- binding domain: Molecular basis of peptide recognition by PDZ. » *Cell* 85 (7): 1067-1076. doi:10.1016/S0092-8674(00)81307-0.
- Drokhlyansky, Eugene, Didem Göz Aytürk, Timothy K Soh, Ryan Chrenek, Elaine O'Loughlin, Charlotte Madore, Oleg Butovsky et Constance L Cepko. 2016. « The brain parenchyma has a type I interferon response that can limit virus spread. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (1). National Academy of Sciences: 201618157. doi:10.1073/pnas.1618157114.
- Drosten, Christian, Stephan Günther, Wolfgang Preiser, Sylvie van der Werf, Hans-Reinhard Brodt, Stephan Becker, Holger Rabenau, Marcus Panning, Larissa Kolesnikova, Ron A.M. Fouchier, Annemarie Berger, Ana-Maria Burguière, Jindrich Cinatl, Markus Eickmann, Nicolas Escriou, Klaus Grywna, Stefanie Kramme, Jean-Claude Manuguerra, Stefanie Müller, Volker Rickerts, Martin Stürmer, Hans-Dieter Klenk Simon Vieth, Albert D.M.E. Osterhaus, Herbert Schmitz et Hans Wilhelm Doerr. 2003. « Identification of a novel

- coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. » *N. Engl. J. Med.* 348: 1967-1976.
- Du, Yangzhou et Cheryl F. Dreyfus. 2002. « Oligodendrocytes as providers of growth factors. » *Journal of Neuroscience Research* 68 (6): 647-654. doi:10.1002/jnr.10245.
- Eggers, Christian, Gabriele Arendt, Katrin Hahn, Ingo W. Husstedt, Matthias Maschke, Eva Neuen-Jacob, Mark Obermann, Thorsten Rosenkranz, Eva Schielke et Elmar Straube. 2017. « HIV-1-associated neurocognitive disorder: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. » *Journal of Neurology*. Springer Berlin Heidelberg: 1-13. doi:10.1007/s00415-017-8503-2.
- Ellencrona, Karin, Asim Syed et Magnus Johansson. 2009. « Flavivirus NS5 associates with host-cell proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and regulating synaptic membrane exocytosis-2 (RIMS2) via an internal PDZ binding mechanism. » *Biological Chemistry* 390 (4): 319-323. doi:10.1515/BC.2009.041.
- Ewart, G D, T Sutherland, P W Gage et G B Cox. 1996. « The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. » *Journal of virology* 70 (10): 7108-15.
- Farley, Alistair, Carolyn Johnstone, Charles Hendry et Ella McLafferty. 2014. « Nervous system: part 1. » *Nursing Standard* 28 (31): 46-51. doi:10.7748/ns2014.04.28.31.46.e7004.
- Favreau, Dominique J., M. Meessen-Pinard, M. Desforges et P. J. Talbot. 2012. « Human Coronavirus-Induced Neuronal Programmed Cell Death Is Cyclophilin D Dependent and Potentially Caspase Dispensable. » *Journal of Virology* 86 (1): 81-93. doi:10.1128/JVI.06062-11.
- Favreau, Dominique J, Marc Desforges, Julien R St-Jean et Pierre J Talbot. 2009. « A human coronavirus OC43 variant harboring persistence-associated mutations in the S glycoprotein differentially induces the unfolded protein response in human neurons as compared to wild-type virus. » *Virology* 395 (2): 255-67. doi:10.1016/j.virol.2009.09.026.
- Feng, Wei et Mingjie Zhang. 2009. « Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. » *Nature reviews. Neuroscience* 10 (2): 87-99. doi:10.1038/nrn2540.
- Fischer, F, C F Stegen, P S Masters et W A Samsonoff. 1998. « Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus

assembly. » *Journal of virology* 72 (10): 7885-94.

Fouchier, Ron A M, Nico G Hartwig, Theo M Bestebroer, Berend Niemeyer, Jan C de Jong, James H Simon et Albert D M E Osterhaus. 2004. « A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (16): 6212-6. doi:10.1073/pnas.0400762101.

Frese, Kristopher K, Siu Sylvia Lee, Darby L Thomas, Isabel J Latorre, Robert S Weiss, Britt A Glaunsinger et Ronald T Javier. 2003. « Selective PDZ protein-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein. » *Oncogene* 22 (5): 710-21. doi:10.1038/sj.onc.1206151.

Freundt, Eric C, Li Yu, Cynthia S Goldsmith, Sarah Welsh, Aaron Cheng, Boyd Yount, Wei Liu, Matthew B Frieman, Ursula J Buchholz, Gavin R Screaton, Jennifer Lippincott-Schwartz, Sherif R Zaki, Xiao-Ning N Xu, Ralph S Baric, Kanta Subbarao et Michael J Lenardo. 2010. « The open reading frame 3a protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus promotes membrane rearrangement and cell death. » *Journal of virology* 84 (2): 1097-1109. doi:10.1128/JVI.01662-09.

Frieman, M., B. Yount, M. Heise, S. A. Kopecky-Bromberg, P. Palese et R. S. Baric. 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. doi:10.1128/JVI.01012-07.

Fronhoffs, S, G Totzke, S Stier, N Wernert, M Rothe, T Bruning, B Koch, A Sachinidis, H Vetter et Y Ko. 2002. « A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. » *Mol Cell Probes* 16 (2): 99-110. doi:10.1006/mcpr.2002.0405.

Fünfschilling, Ursula, Lotti M. Supplie, Don Mahad, Susann Boretius, Aiman S. Saab, Julia Edgar, Bastian G. Brinkmann, Celia M. Kassmann, Iva D. Tzvetanova, Wiebke Möbius, Francisca Diaz, Dies Meijer, Ueli Suter, Bernd Hamprecht, Michael W. Sereda, Carlos T. Moraes, Jens Frahm, Sandra Goebbels et Klaus-Armin Nave. 2012. « Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. » *Nature*: 0-5. doi:10.1038/nature11007.

Gaunt, E. R., A. Hardie, E. C J Claas, P. Simmonds et K. E. Templeton. 2010. « Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. » *Journal of Clinical Microbiology* 48 (8): 2940-2947. doi:10.1128/JCM.00636-10.

- Gerna, Giuseppe, Giulia Campanini, Francesca Rovida, Elena Percivalle, Antonella Sarasini, Antonietta Marchi et Fausto Baldanti. 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. doi:10.1002/jmv.20645.
- Gerna, Giuseppe, Nilda Passarani, Massimo Battaglia et Elio G. Rondanelli. 1985. « Human enteric coronaviruses: Antigenic relatedness to human coronavirus oc43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. » *Journal of Infectious Diseases* 151 (5): 796-803. doi:10.1093/infdis/151.5.796.
- Giaume, Christian, Annette Koulakoff, Lisa Roux, David Holcman et Nathalie Rouach. 2010. « Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. » *Nature Reviews Neuroscience* 11 (2). Nature Publishing Group: 87-99. doi:10.1038/nrn2757.
- Gladue, D. P., L. G. Holinka, E. Largo, I. Fernandez Sainz, C. Carrillo, V. O'Donnell, R. Baker-Branstetter, Z. Lu, X. Ambroggio, G. R. Risatti, J. L. Nieva et M. V. Borca. 2012. « Classical Swine Fever Virus p7 Protein Is a Viroporin Involved in Virulence in Swine. » *Journal of Virology* 86 (12): 6778-6791. doi:10.1128/JVI.00560-12.
- Godet, Murielle, Rene L'Haridon, Jean Francois Vautherot et Hubert Laude. 1992. « TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. » *Virology* 188 (2): 666-675. doi:10.1016/0042-6822(92)90521-P.
- Goldstein, Stephen A., Joshua M. Thornbrough, Rong Zhang, Babal K. Jha, Yize Li, Ruth Elliott, Katherine Quiroz-Figueroa, Annie I. Chen, Robert H. Silverman et Susan R. Weiss. 2017. « Lineage A Betacoronavirus NS2 Proteins and the Homologous Torovirus Berne pp1a Carboxy-Terminal Domain Are Phosphodiesterases That Antagonize Activation of RNase L. » Sous la dir. de Stanley Perlman. *Journal of Virology* 91 (5): e02201-16. doi:10.1128/JVI.02201-16.
- Goodbourn, S., L. Didcock et R. E. Randall. 2000. « Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasure. » *J. Gen. Virol., Londres* v.81 (2000): 2341.2364. doi:10.1099/0022-1317-81-10-2341.
- Grambas, Setareh, Michael S. Bennett et Alan J. Hay. 1992. « Influence of amantadine resistance mutations on the pH regulatory function of the M2 protein of influenza A viruses. » *Virology* 191 (2): 541-549. doi:10.1016/0042-6822(92)90229-I.

- Griffin, Stephen D C, Lucy P. Beales, Dean S. Clarke, Oliver Worsfold, Stephen D. Evans, Joachim Jaeger, Mark P G Harris, David J. Rowlands et Hans Dieter Klenk. 2003. « The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. » *FEBS Letters* 535 (1-3): 34-38. doi:10.1016/S0014-5793(02)03851-6.
- De Groot, Raoul J. 2006. « Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. » *Glycoconjugate Journal* 23 (1-2): 59-72. doi:10.1007/s10719-006-5438-8.
- de Groot, Raoul J., S. C. Baker, R. Baric, Luis Enjuanes, A. E. Gorbalenya, K. V. Holmes, S. Perlman, L. Poon, P. J. M. Rottier, P. J. Talbot, P. C. Y. Woo et J Ziebuhr. 2012. « Coronaviridae. » In *Virus Taxonomy*, sous la dir. de A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, et E. J. Lefkowitz, Academic P, 806-828. New York, NY: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-384684-6.00068-9.
- Gu, Jiang, Encong Gong, Bo Zhang, Jie Zheng, Zifen Gao, Yanfeng Zhong, Wanzhong Zou, Jun Zhan, Shenglan Wang, Zhigang Xie, Hui Zhuang, Bingquan Wu, Haohao Zhong, Hongquan Shao, Weigang Fang, Dongshia Gao, Fei Pei, Xingwang Li, Zhongpin He, Danzhen Xu, Xeying Shi, Virginia M Anderson et Anthony S-Y Leong. 2005. « Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. » *The Journal of experimental medicine* 202 (3): 415-24. doi:10.1084/jem.20050828.
- de Haan, Cornelis A.M. et Peter J.M. Rottier. 2005. « Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses. » *Advances in Virus Research* 64 (5): 165-230. doi:10.1016/S0065-3527(05)64006-7.
- Hamre, D et J J Procknow. 1966. « A new virus isolated from the human respiratory tract. » *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 121 (1): 190-3.
- Haydon, P G. 2001. « GLIA: listening and talking to the synapse. » *Nature Reviews Neuroscience* 2 (3): 185-193. doi:10.1038/35058528.
- Hemachudha, Thiravat, Gabriella Ugolini, Supaporn Wacharapluesadee, Witaya Sungkarat, Shanop Shuangshoti et Jiraporn Laothamatas. 2013. « Human rabies: Neuropathogenesis, diagnosis, and management. » *The Lancet Neurology* 12 (5). Elsevier Ltd: 498-513. doi:10.1016/S1474-4422(13)70038-3.
- Hendry, Charles, Alistair Farley, Ella McLafferty et Carolyn Johnstone. 2014. « Nervous system:

- part 2. » *Nursing Standard* 28 (32): 45-49. doi:10.7748/ns2014.04.28.32.45.e7931.
- Hill, David P. et Kent A. Robertson. 1998. « Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: Methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. » *Brain Research Protocols* 2 (3). Elsevier: 183-190. doi:10.1016/S1385-299X(97)00041-X.
- Hirano, N., R. Nomura, T. Tawara et K. Tohyama. 2004. « Neurotropism of swine haemagglutinating encephalomyelitis virus (coronavirus) in mice depending upon host age and route of infection. » *Journal of Comparative Pathology* 130 (1): 58-65. doi:10.1016/S0021-9975(03)00083-5.
- Hodgson, Teri, Rosa Casais, Brian Dove, Paul Britton et Dave Cavanagh. 2004. « Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. » *Journal of virology* 78 (24): 13804-11. doi:10.1128/JVI.78.24.13804-13811.2004.
- van der Hoek, Lia, Krzysztof Pyrc, Maarten F Jebbink, Wilma Vermeulen-Oost, Ron J M Berkhout, Katja C Wolthers, Pauline M E Wertheim-van Dillen, Jos Kaandorp, Joke Spaargaren et Ben Berkhout. 2004. « Identification of a new human coronavirus. » *Nature medicine* 10 (4): 368-373. doi:10.1038/nm1024.
- Hong, Mei et William F. DeGrado. 2012. « Structural basis for proton conduction and inhibition by the influenza M2 protein. » *Protein Science*. doi:10.1002/pro.2158.
- Hsieh, Yi-Ching, Hui-Chun Li, Shih-Chi Chen et Shih-Yen Lo. 2008. « Interactions between M protein and other structural proteins of severe, acute respiratory syndrome-associated coronavirus. » *Journal of biomedical science* 15 (6): 707-17. doi:10.1007/s11373-008-9278-3.
- Huang, Xingchuan, Wenjuan Dong, Aleksandra Milewska, Anna Golda, Yonghe Qi, Quan K Zhu, Wayne a Marasco, Ralph S Baric, Amy C Sims, Krzysztof Pyrc, Wenhui Li et Jianhua Sui. 2015. « 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. doi:10.1128/JVI.00854-15.
- Iacono, Kathryn T, Lubna Kazi et Susan R Weiss. 2006. « Both spike and background genes contribute to murine coronavirus neurovirulence. » *Journal of virology* 80 (14): 6834-43.

doi:10.1128/JVI.00432-06.

- Ichinohe, Takeshi, Iris K Pang et Akiko Iwasaki. 2010. « Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. » *Nature Immunology* 11 (5). Nature Publishing Group: 404-410. doi:10.1038/ni.1861.
- Ickes, Dawn E., Tom M. Venetta, Yupa Phonphok et Ken S. Rosenthal. 1990. « Tromantadine inhibits a late step in herpes simplex virus type 1 replication and syncytium formation. » *Antiviral Research* 14 (2): 75-85. doi:10.1016/0166-3542(90)90045-9.
- Jackson, David, Md Jaber Hossain, Danielle Hickman, Daniel R. Perez et Robert A. Lamb. 2008. « A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (11): 4381-6. doi:10.1073/pnas.0800482105.
- Jacomy, Hélène, Gabriela Fragoso, Guillermina Almazan, Walter E. Mushynski et Pierre J. Talbot. 2006. « Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. » *Virology* 349 (2): 335-346. doi:10.1016/j.virol.2006.01.049.
- Jacomy, Hélène, Julien R St-Jean, Elodie Brison, Gabriel Marceau, Marc Desforges et Pierre J Talbot. 2010. « Mutations in the spike glycoprotein of human coronavirus OC43 modulate disease in BALB/c mice from encephalitis to flaccid paralysis and demyelination. » *Journal of neurovirology* 16 (4): 279-93. doi:10.3109/13550284.2010.497806.
- Jacomy, Hélène et Pierre J. Talbot. 2003. « Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. » *Virology* 315 (1): 20-33. doi:10.1016/S0042-6822(03)00323-4.
- James, Claire et Sally Roberts. 2016. « Viral Interactions with PDZ Domain-Containing Proteins—An Oncogenic Trait? » *Pathogens* 5 (1): 8. doi:10.3390/pathogens5010008.
- Jang, H., D. Boltz, K. Sturm-Ramirez, K. R. Shepherd, Y. Jiao, R. Webster et R. J. Smeyne. 2009. « Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (33): 14063-14068. doi:10.1073/pnas.0900096106.
- Javier, R. T. et A. P. Rice. 2011. « Emerging Theme: Cellular PDZ Proteins as Common Targets of Pathogenic Viruses. » *Journal of Virology* 85 (22): 11544-11556. doi:10.1128/JVI.05410-11.
- Jessen, Kristjan R. 2004. « Glial cells. » *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (10): 1861-1867. doi:10.1016/j.biocel.2004.02.023.

- Jimenez-Guardeño, Jose M., Jose L. Nieto-Torres, Marta L. DeDiego, Jose a. Regla-Nava, Raul Fernandez-Delgado, Carlos Castaño-Rodriguez et Luis Enjuanes. 2014. « The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. » *PLoS pathogens* 10 (8): e1004320. doi:10.1371/journal.ppat.1004320.
- Jimenez-Guardeño, Jose M, Jose A Regla-Nava, Jose L Nieto-Torres, Marta L DeDiego, Carlos Castaño-Rodriguez, Raul Fernandez-Delgado, Stanley Perlman et Luis Enjuanes. 2015. « Identification of the Mechanisms Causing Reversion to Virulence in an Attenuated SARS-CoV for the Design of a Genetically Stable Vaccine. » *PLoS pathogens* 11 (10): e1005215. doi:10.1371/journal.ppat.1005215.
- De Jong, Arjan S., Henk Jan Visch, Fabrizio De Mattia, Michiel M. Van Dommelen, Herman G. Swarts, Tomas Luyten, Geert Callewaert, Willem J. Melchers, Peter H. Willems et Frank J. Van Kuppeveld. 2006. « The coxsackievirus 2B protein increases efflux of ions from the endoplasmic reticulum and Golgi, thereby inhibiting protein trafficking through the Golgi. » *Journal of Biological Chemistry* 281 (20): 14144-14150. doi:10.1074/jbc.M511766200.
- de Jong, Arjan S, Fabrizio de Mattia, Michiel M Van Dommelen, Kjerstin Lanke, Willem J G Melchers, Peter H G M Willems et Frank J M van Kuppeveld. 2008. « Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. » *Journal of virology* 82 (7): 3782-90. doi:10.1128/JVI.02076-07.
- Kandel, Eric, James Schwartz, Thomas Jessell, Steven Siegelbaum et A Hudspeth. 2013. « Principles of Neural Science: » 1709.
- Kanzawa, Noriyuki, Kazuo Nishigaki, Takaya Hayashi, Yuichi Ishii, Souichi Furukawa, Ayako Niino, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Kouichi Morita, Kouji Matsushima, Mai Quynh Le, Takao Masuda et Mari Kannagi. 2006. « Augmentation of chemokine production by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 proteins through NF- κ B activation. » *FEBS Letters* 580 (30): 6807-6812. doi:10.1016/j.febslet.2006.11.046.
- Kazi, Lubna, Arjen Lissenberg, Richard Watson, Raoul J De, Susan R Weiss et Raoul J De Groot. 2005. « Expression of Hemagglutinin Esterase Protein from Recombinant Mouse Hepatitis Virus Enhances Neurovirulence. » *Journal of virology* 79 (24): 15064-15073. doi:10.1128/JVI.79.24.15064.
- Kell, Alison M. et Michael Gale. 2015. « RIG-I in RNA virus recognition. » *Virology* 479-480. Elsevier: 110-121. doi:10.1016/j.virol.2015.02.017.

- Keng, Choong Tat, Sara Åkerström, Cynthia Sau Wai Leung, Leo L.M. Poon, J. S. Malik Peiris, Ali Mirazimi et Yee Joo Tan. 2011. « SARS coronavirus 8b reduces viral replication by down-regulating E via an ubiquitin-independent proteasome pathway. » *Microbes and Infection* 13 (2): 179-188. doi:10.1016/j.micinf.2010.10.017.
- Kennedy, Mary B. 1995. « Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. » *Trends in Biochemical Sciences* 20 (9): 350. doi:10.1016/S0968-0004(00)89074-X.
- Kettenmann, Helmut, Frank Kirchhoff et Alexei Verkhratsky. 2013. « Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. » *Neuron* 77 (1). Elsevier Inc.: 10-18. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.023.
- Keyaerts, Els, Sandra Li, Leen Vijgen, Evelien Rysman, Jannick Verbeeck, Marc Van Ranst et Piet Maes. 2009. « Antiviral activity of chloroquine against human coronavirus OC43 infection in newborn mice. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (8): 3416-3421. doi:10.1128/AAC.01509-08.
- Khan, Sehaam, Burtram C. Fielding, Timothy H P Tan, Chih Fong Chou, Shuo Shen, Seng Gee Lim, Wanjin Hong et Yee Joo Tan. 2006. « Over-expression of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3b protein induces both apoptosis and necrosis in Vero E6 cells. » *Virus Research* 122 (1-2): 20-27. doi:10.1016/j.virusres.2006.06.005.
- Kipnis, Jonathan, Sachin Gadani et Noël C Derecki. 2012. « Pro-cognitive properties of T cells. » *Nature reviews. Immunology* 12 (9). Nature Publishing Group: 663-9. doi:10.1038/nri3280.
- Kiyono, T, A Hiraiwa, M Fujita, Y Hayashi, T Akiyama et M Ishibashi. 1997. « Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21): 11612-6. doi:10.1073/pnas.94.21.11612.
- Klein, Robyn S et Christopher A Hunter. 2017. « Protective and Pathological Immunity during Central Nervous System Infections. » *Immunity* 46 (6). Elsevier Inc.: 891-909. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.012.
- Klumperman, J, J K Locker, A Meijer, M C Horzinek, H J Geuze et P J Rottier. 1994. « Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. » *Journal of virology* 68 (10): 6523-34.
- Koetzner, Cheri a, Lili Kuo, Scott J Goebel, Amy B Dean, Monica M Parker et Paul S Masters. 2010. « Accessory protein 5a is a major antagonist of the antiviral action of interferon against murine coronavirus. » *Journal of virology* 84 (16): 8262-74. doi:10.1128/JVI.00385-10.

- Kopecky-Bromberg, Sarah a, Luis Martínez-Sobrido, Matthew Frieman, Ralph a Baric et Peter Palese. 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. doi:10.1128/JVI.01782-06.
- Kranjec, C. et L. Banks. 2011. « A Systematic Analysis of Human Papillomavirus (HPV) E6 PDZ Substrates Identifies MAGI-1 as a Major Target of HPV Type 16 (HPV-16) and HPV-18 Whose Loss Accompanies Disruption of Tight Junctions. » *Journal of Virology* 85 (4): 1757-1764. doi:10.1128/JVI.01756-10.
- Krijnse-Locker, Jacomine, Maria Ericsson, Peter J M Rottier et Gareth Griffiths. 1994. « Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: Evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. » *Journal of Cell Biology* 124 (1-2): 55-70. doi:10.1083/jcb.124.1.55.
- Ksiazek, Thomas G., Dean Erdman, Cynthia S. Goldsmith, Sherif R. Zaki, Larry J. Anderson Teresa Peret, Shannon Emery, Suxiang Tong, Carlo Urbani, James A. Comer, Wilina Lim, Pierre E. Rollin, Scott F. Dowell, Ai-Ee Ling, Charles D. Humphrey, P Wun et M.D. and the SARS Working Group. 2003. « A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. » *The New England journal of medicine*: 1953-1966.
- Kuo, Lili, Kelley R Hurst et Paul S Masters. 2007. « Exceptional flexibility in the sequence requirements for coronavirus small envelope protein function. » *Journal of virology* 81 (5): 2249-62. doi:10.1128/JVI.01577-06.
- Kuo, Lili et Paul S Masters. 2003. « The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. » *Journal of virology* 77 (8): 4597-608. doi:10.1128/JVI.77.8.4597.
- Kuo, Lili et Paul S Masters. 2010. « Evolved variants of the membrane protein can partially replace the envelope protein in murine coronavirus assembly. » *Journal of virology* 84 (24): 12872-85. doi:10.1128/JVI.01850-10.
- Lafon, Monique. 2011. *Evasive Strategies in Rabies Virus Infection. Advances in Virus Research*, 1^{re}éd. Vol. 79. s.l.: Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-387040-7.00003-2.
- Lafon, Monique, Françoise Megret, Mireille Lafage et Christophe Prehaud. 2006. « The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. » *Journal of molecular neuroscience : MN* 29 (3): 185-94. doi:10.1385/JMN:29:3:185.
- Lambert, Francine, Helene Jacomy, Gabriel Marceau et Pierre J Talbot. 2008. « Titration of

- human coronaviruses using an immunoperoxidase assay. » *Journal of visualized experiments : JoVE* (14). doi:10.3791/751.
- Lane, Thomas E et Martin P Hosking. 2010. « The pathogenesis of murine coronavirus infection of the central nervous system. » *Critical reviews in immunology* 30 (2): 119-30.
- Langereis, Martijn a, Arno L W van Vliet, Willemijn Boot et Raoul J de Groot. 2010. « Attachment of mouse hepatitis virus to O-acetylated sialic acid is mediated by hemagglutinin-esterase and not by the spike protein. » *Journal of virology* 84 (17): 8970-4. doi:10.1128/JVI.00566-10.
- Latchman, Y E, S C Liang, Y Wu, T Chernova, R A Sobel, M Klemm, V K Kuchroo, G J Freeman et A H Sharpe. 2004. « PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. » *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 (29): 10691-10696. doi:10.1073/pnas.0307252101.
- Latorre, Isabel J., Michael H Roh, Kristopher K Frese, Robert S Weiss, Ben Margolis et Ronald T Javier. 2005. « Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. » *Journal of cell science* 118 (Pt 18): 4283-93. doi:10.1242/jcs.02560.
- Lau, Susanna K.P., Patrick C.Y. Woo, Cyril C.Y. Yip, Herman Tse, Hoi Wah Tsoi, Vincent C.C. Cheng, Paul Lee, Bone S.F. Tang, Chris H.Y. Cheung, Rodney A. Lee, Lok Yee So, Yu Lung Lau, Kwok Hung Chan et Kwok Yung Yuen. 2006. « Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. » *Journal of Clinical Microbiology* 44 (6): 2063-2071. doi:10.1128/JCM.02614-05.
- Lee, Ho-Jin et Jie J Zheng. 2010. « PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. » *Cell communication and signaling : CCS* 8: 8. doi:10.1186/1478-811X-8-8.
- Lee, Siu Sylvia, Robert S. Weiss et Ronald T. Javier. 1997. « Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (13): 6670-5. doi:10.1073/pnas.94.13.6670.
- Leibowitz, Julian L, Rajiv Srinivasa, Shawn T Williamson, Ming Ming Chua, Mingfeng Liu, Samantha Wu, Hyojeung Kang, Xue-Zhong Ma, Jianhua Zhang, Itay Shalev, Robert Smith, Melville J Phillips, Gary a Levy et Susan R Weiss. 2010. « Genetic determinants of mouse

- hepatitis virus strain 1 pneumovirulence. » *Journal of virology* 84 (18): 9278-9291. doi:10.1128/JVI.00330-10.
- Leparc-Goffart, I, S T Hingley, M M Chua, X Jiang, E Lavi et S R Weiss. 1997. « Altered pathogenesis of a mutant of the murine coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in the spike protein. » *Virology* 239 (1): 1-10. doi:10.1006/viro.1997.8877.
- Leparc-Goffart, I, S T Hingley, M M Chua, J Phillips, E Lavi et S R Weiss. 1998. « Targeted recombination within the spike gene of murine coronavirus mouse hepatitis virus-A59: Q159 is a determinant of hepatotropism. » *Journal of virology* 72 (12): 9628-36.
- Lepiller, Q., H. Barth, F. Lefebvre, R. Herbrecht, P. Lutz, R. Kessler, S. Fafi-Kremer et F. Stoll-Keller. 2013. « High incidence but low burden of coronaviruses and preferential associations between respiratory viruses. » *Journal of Clinical Microbiology* 51 (9): 3039-3046. doi:10.1128/JCM.01078-13.
- Li, Fang. 2016. « Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. » *Annual Review of Virology* 3 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, California 94303-0139, USA: annurev-virology-110615-042301. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301.
- Li, Wendong, Zhengli Shi, Meng Yu, Wuze Ren, Craig Smith, Jonathan H Epstein, Hanzhong Wang, Gary Crameri, Zhihong Hu, Huajun Zhang, Jianhong Zhang, Jennifer McEachern, Hume Field, Peter Daszak, Bryan T Eaton, Shuyi Zhang et Lin-Fa Wang. 2005. « Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. » *Science (New York, N.Y.)* 310 (5748): 676-679. doi:10.1126/science.1118391.
- Li, Yan, Wahyu Surya, Stephanie Claudine et Jaume Torres. 2014. « Structure of a conserved golgi complex-targeting signal in coronavirus envelope proteins. » *Journal of Biological Chemistry* 289 (18): 12535-12549. doi:10.1074/jbc.M114.560094.
- Li, Yuanyuan, Haipeng Li, Ruyan Fan, Bo Wen, Jian Zhang, Xiaoying Cao, Chengwu Wang, Zhanyi Song, Shuochi Li, Xiaojie Li, Xinjun Lv, Xiaowang Qu, Renbin Huang et Wenpei Liu. 2017. « Coronavirus Infections in the Central Nervous System and Respiratory Tract Show Distinct Features in Hospitalized Children. » *Intervirology* 59 (3). Karger Publishers: 163-169. doi:10.1159/000453066.
- Liao, Y., J. Lescar, J. P. Tam et D. X. Liu. 2004. « Expression of SARS-coronavirus envelope

- protein in *Escherichia coli* cells alters membrane permeability. » *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325 (1): 374-380. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.050.
- Liao, Y, Q Yuan, J Torres, J P Tam et D X Liu. 2006. « Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. » *Virology* 349 (2): 264-75. doi:10.1016/j.virol.2006.01.028.
- Licitra, Beth N., Gerald E. Duhamel et Gary R. Whittaker. 2014. « Canine enteric coronaviruses: Emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. » *Viruses* 6 (8): 3363-3376. doi:10.3390/v6083363.
- Liddelow, Shane A et Ben A Barres. 2017. « Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. » *Immunity* 46 (6). Elsevier Inc.: 957-967. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.006.
- Lim, K. P. et D. X. Liu. 2001. « The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. » *Journal of Biological Chemistry* 276 (20): 17515-17523. doi:10.1074/jbc.M009731200.
- Lin, Chun Ming, Linda J. Saif, Douglas Marthaler et Qihong Wang. 2016. « Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. » *Virus Research* 226. Elsevier B.V.: 20-39. doi:10.1016/j.virusres.2016.05.023.
- Lissenberg, A, M M Vrolijk, A L W van Vliet, M A Langereis, J D F de Groot-Mijnes, P J M Rottier et R J de Groot. 2005. « Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. » *Journal of virology* 79 (24): 15054-63. doi:10.1128/JVI.79.24.15054-15063.2005.
- Liu, D. X. et S. C. Inglis. 1991. « Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. » *Virology* 185 (2): 911-917. doi:10.1016/0042-6822(91)90572-S.
- Liu, Ding Xiang, To Sing Fung, Kelvin Kian Long Chong, Aditi Shukla et Rolf Hilgenfeld. 2014. « Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. » *Antiviral Research* 109 (1). Elsevier B.V.: 97-109. doi:10.1016/j.antiviral.2014.06.013.
- Liu, Hongbing, Lisa Golebiewski, Eugene C Dow, Robert M Krug, Ronald T Javier et Andrew P Rice. 2010. « The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. » *Journal of virology* 84

(21): 11164-74. doi:10.1128/JVI.01278-10.

- Lopez, Carlos F, Mauricio Montal, J Kent Blasie, Michael L Klein et Preston B Moore. 2002. « Molecular dynamics investigation of membrane-bound bundles of the channel-forming transmembrane domain of viral protein U from the human immunodeficiency virus HIV-1. » *Biophysical journal* 83 (3). Elsevier: 1259-67. doi:10.1016/S0006-3495(02)73898-8.
- Lopez, Lisa A, Ariel Jones, William D Arndt et Brenda G Hogue. 2006. « Subcellular Localization of SARS-CoV Structural Proteins. » In , 494:297-300. s.l.: s.n. doi:10.1007/978-0-387-33012-9_51.
- Lopez, Lisa A, Ambere J Riffle, Steven L Pike, Douglas Gardner et Brenda G Hogue. 2008. « Importance of conserved cysteine residues in the coronavirus envelope protein. » *Journal of virology* 82 (6): 3000-3010. doi:10.1128/JVI.01914-07.
- Lu, Jun Xia, Simon Sharpe, Rodolfo Ghirlando, Wai Ming Yau et Robert Tycko. 2010. « Oligomerization state and supramolecular structure of the HIV-1 Vpu protein transmembrane segment in phospholipid bilayers. » *Protein Science* 19 (10): 1877-1896. doi:10.1002/pro.474.
- Lu, Wei, Bo-Jian Zheng, Ke Xu, Wolfgang Schwarz, Lanying Du, Charlotte K L Wong, Jiadong Chen, Shuming Duan, Vincent Deubel et Bing Sun. 2006. « Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (33): 12540-5. doi:10.1073/pnas.0605402103.
- Luik, Philipp, Chee Chew, Jussi Aittoniemi, Jason Chang, Paul Wentworth, Raymond A Dwek, Philip C Biggin, Catherine Vénien-Bryan et Nicole Zitzmann. 2009. « The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 12712-6. doi:10.1073/pnas.0905966106.
- Madan, Vanessa, Meritxell De Jesús García, Miguel a. Sanz et Luis Carrasco. 2005. « Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. » *FEBS Letters* 579 (17): 3607-3612. doi:10.1016/j.febslet.2005.05.046.
- Maeda, J, J F Repass, a Maeda et S Makino. 2001. « Membrane topology of coronavirus E protein. » *Virology* 281 (2): 163-169. doi:10.1006/viro.2001.0818.
- Masters, Paul S. 2006. « The Molecular Biology of Coronaviruses. » *Advances in Virus Research*

65 (6): 193-292. doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3.

Matsuura, Eiji, Yoshihisa Yamano et Steven Jacobson. 2010. « Neuroimmunity of HTLV-I infection. » *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 5 (3): 310-325. doi:10.1007/s11481-010-9216-9.

Matthews, Krystal L., Christopher M. Coleman, Yvonne van der Meer, Eric J. Snijder et Matthew B. Frieman. 2014. « The ORF4b-encoded accessory proteins of Middle East respiratory syndrome coronavirus and two related bat coronaviruses localize to the nucleus and inhibit innate immune signalling. » *Journal of General Virology* 95 (PART 4): 874-882. doi:10.1099/vir.0.062059-0.

McBride, Ruth, Marjorie van Zyl et Burtram C. Fielding. 2014. « The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. » *Viruses* 6 (8): 2991-3018. doi:10.3390/v6082991.

McIntosh, K, J H Dees, W B Becker, A Z Kapikian et R M Chanock. 1967. « Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57 (4): 933-940. doi:10.1073/pnas.57.4.933.

Meessen-Pinard, Mathieu, Alain Le Coupanec, Marc Desforages et Pierre J. Talbot. 2017. « Pivotal Role of Receptor-Interacting Protein Kinase 1 and Mixed Lineage Kinase Domain-Like in Neuronal Cell Death Induced by the Human Neuroinvasive Coronavirus OC43. » Sous la dir. de Douglas S. Lyles. *Journal of Virology* 91 (1): e01513-16. doi:10.1128/JVI.01513-16.

Meinl, Edgar, Markus Krumbholz et Reinhard Hohlfeld. 2006. « B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: Migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. » *Annals of Neurology* 59 (6): 880-892. doi:10.1002/ana.20890.

Miller, Katelyn D., Matthias J. Schnell et Glenn F. Rall. 2016. « Keeping it in check: chronic viral infection and antiviral immunity in the brain. » *Nature Reviews Neuroscience* 17 (12). Nature Publishing Group: 766-776. doi:10.1038/nrn.2016.140.

Morfopoulou, Sofia, Julianne R. Brown, E. Graham Davies, Glenn Anderson, Alex Virasami, Waseem Qasim, Wui K. Chong, Michael Hubank, Vincent Plagnol, Marc Desforages, Thomas S. Jacques, Pierre J. Talbot et Judith Breuer. 2016. « Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal Encephalitis. » *New England Journal of Medicine* 375 (5). Massachusetts Medical Society: 497-498. doi:10.1056/NEJMc1509458.

Moynagh, Paul N. 2005. « TLR signalling and activation of IRFs: Revisiting old friends from the

- NF- κ B pathway. » *Trends in Immunology* 26 (9): 469-476. doi:10.1016/j.it.2005.06.009.
- Nair, Aji, Terra J. Frederick et Stephen D. Miller. 2008. « Astrocytes in multiple sclerosis: A product of their environment. » *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (17): 2702-2720. doi:10.1007/s00018-008-8059-5.
- Nair, Sharmila et Michael S. Diamond. 2015. « Innate immune interactions within the central nervous system modulate pathogenesis of viral infections. » *Current Opinion in Immunology* 36 (Figure 1). Elsevier Ltd: 47-53. doi:10.1016/j.coi.2015.06.011.
- Nal, Béatrice, Cheman Chan, Francois Kien, Lewis Siu, Jane Tse, Kid Chu, Jason Kam, sabelle Staropoli, Bernadette Crescenzo-Chaigne, Nicolas Escriou, Sylvie van der Wef, Kwok Yung Yuen et Ralf Altmeyer. 2005. « Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. » *Journal of General Virology* 86 (5): 1423-1434. doi:10.1099/vir.0.80671-0.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. 2017. « Meningitis and Encephalitis Fact Sheet | National Institute of Neurological Disorders and Stroke. »
- Navas, Sonia, S H Seo, M M Chua, J Das Sarma, E Lavi, S T Hingley et S R Weiss. 2001. « Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in the liver and cause hepatitis. » *Journal of virology* 75 (5): 2452-7. doi:10.1128/JVI.75.5.2452-2457.2001.
- Navas, Sonia et Susan R Weiss. 2003. « Murine coronavirus-induced hepatitis: JHM genetic background eliminates A59 spike-determined hepatotropism. » *Journal of virology* 77 (8): 4972-8. doi:10.1128/JVI.77.8.4972.
- Nave, Klaus-Armin et Hauke B. Werner. 2014. « Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. » *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (1): 503-533. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013101.
- Nayak, Debasis, Bernd H Zinselmeyer, Kara N Corps et Dorian B McGavern. 2012. « In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS. » *Intravital* 1 (2): 95-106. doi:10.4161/intv.22823.
- Niemeyer, D., T. Zillinger, D. Muth, F. Zielecki, G. Horvath, T. Suliman, W. Barchet, F. Weber, C. Drosten et M. A. Muller. 2013. « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Accessory Protein 4a Is a Type I Interferon Antagonist. » *Journal of Virology* 87 (22): 12489-12495. doi:10.1128/JVI.01845-13.

- Nieto-Torres, Jose L., Marta L. DeDiego, Carmina Verdiá-Báguena, Jose M. Jimenez-Guardeño, Jose A. Regla-Nava, Raul Fernandez-Delgado, Carlos Castaño-Rodriguez, Antonio Alcaraz, Jaume Torres, Vicente M. Aguilera et Luis Enjuanes. 2014. « Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. » *PLoS pathogens* 10 (5). Public Library of Science: e1004077. doi:10.1371/journal.ppat.1004077.
- Nieto-Torres, Jose L., Carmina Verdiá-Báguena, Jose M. Jimenez-Guardeño, Jose a. Regla-Nava, Carlos Castaño-Rodriguez, Raul Fernandez-Delgado, Jaume Torres, Vicente M. Aguilera et Luis Enjuanes. 2015. « Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. » *Virology* 485. Elsevier: 330-339. doi:10.1016/j.virol.2015.08.010.
- Nieto-Torres, Jose L, Marta L Dediego, Enrique Alvarez, Jose M Jiménez-Guardeño, Jose a Regla-Nava, Mercedes Llorente, Leonor Kremer, Shen Shuo et Luis Enjuanes. 2011. « Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. » *Virology* 415 (2). Elsevier Inc.: 69-82. doi:10.1016/j.virol.2011.03.029.
- Nieva, J L, V Madan et L Carrasco. 2012. « Viroporins: structure and biological functions. » *Nat Rev Microbiol* 10 (8). Nature Publishing Group: 563-574. doi:10.1038/nrmicro2820.
- Nimmerjahn, Axel, Frank Kirchhoff et Fritjof Helmchen. 2005. « Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. » *Science* 308 (May): 1314-1319. doi:10.1126/science.1110647.
- Nourry, Claire, Seth G N Grant et Jean-paul Borg. 2003. « PDZ domain proteins: plug and play! » *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2003 (April): RE7. doi:10.1126/stke.2003.179.re7.
- Obenauer, John C., Jackie Denson, Perdeep K Mehta, Xiaoping Su, Suraj Mukatira, David B Finkelstein, Xiequn Xu, Jinhua Wang, Jing Ma, Yiping Fan, Karen M Rakestraw, Robert G Webster, Erich Hoffmann, Scott Krauss, Jie Zheng, Ziwei Zhang et Clayton W Naeve. 2006. « Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. » *Science (New York, N.Y.)* 311 (5767): 1576-80. doi:10.1126/science.1121586.
- Obitsu, Saemi, Nursarat Ahmed, Hironori Nishitsuji, Atsuhiko Hasegawa, Ken ichi Nakahama, Ikuo Morita, Kazuo Nishigaki, Takaya Hayashi, Takao Masuda et Mari Kannagi. 2009. « Potential enhancement of osteoclastogenesis by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 protein. » *Archives of virology* 154 (9): 1457-1464. doi:10.1007/s00705-

009-0472-z.

- Ontiveros, E, T S Kim, T M Gallagher et S Perlman. 2003. « Enhanced virulence mediated by the murine coronavirus, mouse hepatitis virus strain JHM, is associated with a glycine at residue 310 of the spike glycoprotein. » *J Virol* 77 (19): 10260-10269. doi:10.1128/JVI.77.19.10260.
- Ortego, Javier, Juan E. Ceriani, Cristina Patiño, Juan Plana et Luis Enjuanes. 2007. « Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. » *Virology* 368 (2): 296-308. doi:10.1016/j.virol.2007.05.032.
- Ortego, Javier, David Escors, Hubert Laude et Luis Enjuanes. 2002. « Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. » *Journal of virology* 76 (22): 11518-11529. doi:10.1128/JVI.76.22.11518-11529.2002.
- Park, C O et T S Kupper. 2015. « The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. » *Nature Medicine* 21 (7): 688-697. doi:10.1038/nm.3883.
- Parthasarathy, Krupakar, Huang Lu, Wahyu Surya, Ardcharaporn Vararattanavech, Konstantin Pervushin et Jaime Torres. 2012. « Expression and purification of coronavirus envelope proteins using a modified bêta-barrel construct. » *Protein Expression and Purification* 85 (1): 133-141. doi:10.1016/j.pep.2012.07.005.
- Parthasarathy, Krupakar, Lifang Ng, Xin Lin, Ding Xiang Liu, Konstantin Pervushin, Xiandi Gong et Jaime Torres. 2008. « Structural flexibility of the pentameric SARS coronavirus envelope protein ion channel. » *Biophysical journal* 95 (6): L39-41. doi:10.1529/biophysj.108.133041.
- Paul, Sophie, Céline Ricour, Caroline Sommereyns, Frédéric Sorgeloos et Thomas Michiels. 2007. « Type I interferon response in the central nervous system. » *Biochimie* 89 (6-7): 770-778. doi:10.1016/j.biochi.2007.02.009.
- Pavlovic, D, D C Neville, O Argaud, B Blumberg, R A Dwek, W B Fischer et N Zitzmann. 2003. « The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (10): 6104-6108. doi:10.1073/pnas.1031527100.
- Peiris, J S M, S T Lai, L L M Poon, Y Guan, L Y C Yam, W Lim, J Nicholls, W K S Yee, W W Yan, M T Cheung, V C C Cheng, K H Chan, D N C Tsang, R W H Yung, T K Ng et K Y Yuen. 2003. « Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. » *Lancet*

361 (9366): 1319-1325. doi:10.1016/S0140-6736(03)13077-2.

Perez, Mar, Blanca García-Barreno, José A. Melero, Luis Carrasco et Rosario Guinea. 1997. « Membrane Permeability Changes Induced in *Escherichia coli* by the SH Protein of Human Respiratory Syncytial Virus. » *Virology* 235 (2): 342-351. doi:10.1006/viro.1997.8696.

Pervushin, Konstantin, Edward Tan, Krupakar Parthasarathy, Xin Lin, Feng Li Jiang, Dejie Yu, Ardcharaporn Vararattanavech, Tuck Wah Soong, DX Ding Xiang Liu et Jaume Torres. 2009. « Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel. » Sous la dir. de Ralph S. Baric. *PLoS Pathogens* 5 (7). Public Library of Science: e1000511. doi:10.1371/journal.ppat.1000511.

Pinto, Lawrence H., Leslie J. Holsinger et Robert A. Lamb. 1992. « Influenza virus M2 protein has ion channel activity. » *Cell* 69 (3): 517-528. doi:10.1016/0092-8674(92)90452-I.

Pinto, Lawrence H. et Robert A. Lamb. 2006. « The M2 proton channels of influenza A and B viruses. » *Journal of Biological Chemistry* 281 (14): 8997-9000. doi:10.1074/jbc.R500020200.

Préhaud, Christophe, Nicolas Wolff, Elouan Terrien, Mireille Lafage, Françoise Mégret, Nicolas Babault, Florence Cordier, Gene S Tan, Elodie Maitrepierre, Pauline Ménager, Damien Chopy, Sylviane Hoos, Patrick England, Muriel Delepierre, Matthias J Schnell, Henri Buc et Monique Lafon. 2010. « Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. » *Science signaling* 3 (August 2016): ra5. doi:10.1126/scisignal.2000510.

Purves, Dale, George J Augustine, David Fitzpatrick, Lawrence C Katz, Anthony-Samuel LaMantia, James O McNamara et S Mark Williams. 2001. *Generation of Neurons in the Adult Brain*. s.l.: Sinauer Associates.

Raamsman, M J, J K Locker, A de Hooge, A A de Vries, G Griffiths, H Vennema et P J Rottier. 2000. « Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. » *Journal of virology* 74 (5): 2333-42. doi:10.1128/JVI.74.5.2333-2342.2000.

Racaniello, Vincent R. 2006. « One hundred years of poliovirus pathogenesis. » *Virology* 344 (1): 9-16. doi:10.1016/j.virol.2005.09.015.

Raghava, Smita, Kristina M. Giorda, Fabian B. Romano, Alejandro P. Heuck et Daniel N. Hebert. 2013. « SV40 late protein VP4 forms toroidal pores to disrupt membranes for viral release. »

- Biochemistry* 52 (22): 3939-3948. doi:10.1021/bi400036z.
- Ransohoff, Richard M. et Astrid E. Cardona. 2010. « The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. » *Nature* 468 (7321): 253-262. doi:10.1038/nature09615.
- Ransohoff, Richard M et Britta Engelhardt. 2012. « The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. » *Nature reviews. Immunology* 12 (9). Nature Publishing Group: 623-35. doi:10.1038/nri3265.
- Regla-Nava, Jose a., Jose L. Nieto-Torres, Jose M. Jimenez-Guardeño, Raul Fernandez-Delgado, Craig Fett, Carlos Castaño-Rodríguez, Stanley Perlman, Luis Enjuanes et Marta L. DeDiego. 2015. « Severe Acute Respiratory Syndrome Coronaviruses with Mutations in the E Protein Are Attenuated and Promising Vaccine Candidates. » *Journal of Virology* 89 (7): 3870-3887. doi:10.1128/JVI.03566-14.
- Resta, Silvia, James P Luby, Charles R Rosenfeld et Jane D Siegel. 1985. « Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. » *Science Magazine- Journal* 229 (4717): 978-981. doi:10.1126/science.2992091.
- Rhoades, Ross E., Jenna M. Tabor-Godwin, Ginger Tsueng et Ralph Feuer. 2011. « Enterovirus infections of the central nervous system. » *Virology* 411 (2). Elsevier Inc.: 288-305. doi:10.1016/j.virol.2010.12.014.
- Richard, Daniel, Jean-François Camps, Daniel Eugène, Monique Gauthier et Yves Gioanni. 2013. *Neurosciences - Tout le cours en fiches: 190 fiches de cours, QCM corrigés et focus biomédicaux*. s.l.: s.n.
- Riski, Hellevi et Tapani Hovi. 1980. « Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. » *Journal of Medical Virology* 6 (3): 259-265. doi:10.1002/jmv.1890060309.
- Rochon, Danielle, Isabelle Rouse et Richard Robitaille. 2001. « Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (11): 3819-3829. doi:10.1016/0166-2236(94)90016-7.
- Rousset, R, S Fabre, C Desbois, F Bantignies et P Jalinet. 1998. « The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. » *Oncogene* 16 (5): 643-54. doi:10.1038/sj.onc.1201567.
- Ruch, Travis R et Carolyn E Machamer. 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). American Society for Microbiology: 675-85. doi:10.1128/JVI.01570-10.
- Ruch, Travis R et Carolyn E Machamer. 2012a. « The coronavirus E protein: Assembly and beyond. » *Viruses* 4 (3): 363-382. doi:10.3390/v4030363.
- Ruch, Travis R et Carolyn E Machamer. 2012b. « A single polar residue and distinct membrane topologies impact the function of the infectious bronchitis coronavirus E protein. » Sous la dir. de Paul Masters. *PLoS pathogens* 8 (5). Public Library of Science: e1002674. doi:10.1371/journal.ppat.1002674.
- Russo, Fabiele Baldino, Patricia Jungmann et Patricia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga. 2017. « Zika infection and the development of neurological defects. » *Cellular Microbiology* 19 (6). doi:10.1111/cmi.12744.
- Saif, Linda J. 2010. « Bovine respiratory coronavirus. » *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26 (2). Elsevier Ltd: 349-364. doi:10.1016/j.cvfa.2010.04.005.
- Saito, Atsushi, Yutaro Nakashima, Kenta Shimba, Yuzo Takayama, Kiyoshi Kotani et Yasuhiko Jimbo. 2015. « Modulation of neuronal network activity using magnetic nanoparticle-based astrocytic network integration. » *Biomaterials science* 3 (8). Royal Society of Chemistry: 1228-1235. doi:10.1039/c5bm00092k.
- Sakaguchi, Takemasa, George P. Leser et Robert A. Lamb. 1996. « The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus. » *Journal of Cell Biology* 133 (4): 733-747. doi:10.1083/jcb.133.4.733.
- Sawicki, Stanley G, Dorothea L Sawicki et Stuart G Siddell. 2007. « A contemporary view of coronavirus transcription. » *Journal of virology* 81 (1): 20-9. doi:10.1128/JVI.01358-06.
- Schnell, Jason R et James J Chou. 2008. « Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. » *Nature* 451 (7178): 591-595. doi:10.1038/nature06531.
- Schwartz, Michal et Jonathan Kipnis. 2011. « A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity. » *Brain, Behavior, and Immunity* 25 (5). Elsevier Inc.: 817-819. doi:10.1016/j.bbi.2010.12.015.
- Scott, Claire et Stephen Griffin. 2015. « Viroporins: Structure, function and potential as antiviral targets. » *Journal of General Virology* 96 (8): 2000-2027. doi:10.1099/vir.0.000201.
- Shen, Liang, Yang Yang, Fei Ye, Gaoshan Liu, Marc Desforges, Pierre J. Talbot et Wenjie Tan.

2016. « Safe and sensitive antiviral screening platform based on recombinant human coronavirus OC43 expressing the luciferase reporter gene. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (9): 5492-5503. doi:10.1128/AAC.00814-16.
- Shrivastava, S, A Mukherjee, R Ray et R B Ray. 2013. « Hepatitis C virus induces interleukin-1beta (IL-1beta)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. » *J Virol* 87 (22): 12284-12290. doi:10.1128/jvi.01962-13.
- Siu, Y. L., K. T. Teoh, J. Lo, C. M. Chan, F. Kien, N. Escriou, S. W. Tsao, J. M. Nicholls, R. Altmeyer, J. S. M. Peiris, R. Bruzzone et B. Nal. 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. doi:10.1128/JVI.01052-08.
- Slauson, D O et J P Finn. 1972. « Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. » *Journal of the American Veterinary Medical Association* 160 (5): 729-34.
- Sola, Isabel, Fernando Almazán, Sonia Zúñiga et Luis Enjuanes. 2015. « Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. » *Annual review of virology* 2 (1): 265-288. doi:10.1146/annurev-virology-100114-055218.
- Songyang, Z., A.S. Fanning, C. Fu, J. Xu, S. M. Marfatia, A. H. Chishti, A. Crompton, A. C. Chan, J. M. Anderson et L. C. Cantley. 1997. « Recognition of Unique Carboxyl-Terminal Motifs by Distinct PDZ Domains. » *Science* 275 (5296): 73-77. doi:10.1126/science.275.5296.73.
- Soubies, Sébastien M, Christelle Volmer, Guillaume Croville, Josianne Loupias, Brigitte Peralta, Pierrette Costes, Caroline Lacroux, Jean-Luc Guérin et Romain Volmer. 2010. « Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence. » *Journal of virology* 84 (13): 6733-6747. doi:10.1128/JVI.02427-09.
- St-Jean, Julien R, Marc Desforges, Fernando Almazán, Hélène Jacomy, Luis Enjuanes et Pierre J Talbot. 2006. « Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. » *Journal of virology* 80 (7): 3670-4. doi:10.1128/JVI.80.7.3670-3674.2006.
- Stamatovic, Svetlana M, Richard F Keep et Anuska V Andjelkovic. 2008. « Brain endothelial cell-cell junctions: how to “open” the blood brain barrier. » *Current neuropharmacology* 6 (3): 179-92. doi:10.2174/157015908785777210.
- Steinmann, Eike, Francois Penin, Stephanie Kallis, Arvind H. Patel, Ralf Bartenschlager et Thomas Pietschmann. 2007. « Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and

- release of infectious virions. » *PLoS Pathogens* 3 (7): 0962-0971. doi:10.1371/journal.ppat.0030103.
- Strebel, K, T Klimbait et M A Martin. 1988. « A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16 kilodalton product. » *Science*. 241 (1987): 1221-1223.
- Stricker, Nicole L., Karen S. Christopherson, Byungdoo A. Yi, Peter J. Schatz, Ronald W. Raab, Glenn Dawes, Douglas E. Bassett, David S. Bredt et Min Li. 1997. « PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. » *Nature Biotechnology* 15 (4). Nature Publishing Company: 336-42. doi:10.1038/nbt0497-336.
- Suhy, David A, Thomas H Giddings et Karla Kirkegaard. 2000. « Remodeling the Endoplasmic Reticulum by Poliovirus Infection and by Individual Viral Proteins: an Autophagy-Like Origin for Virus-Induced Vesicles. » *Journal of virology* 74 (19): 8953-8965. doi:10.1128/JVI.74.19.8953-8965.2000.
- Sun, Min, Jiale Ma, Zeyanqiu Yu, Zihao Pan, Chengping Lu et Huochun Yao. 2017. « Identification of two mutation sites in spike and envelope proteins mediating optimal cellular infection of porcine epidemic diarrhea virus from different pathways. » *Veterinary Research* 48 (1). BioMed Central: 1-13. doi:10.1186/s13567-017-0449-y.
- Surya, Wahyu, Yan Li, Carmina Verdià-Bàguena, Vicente M. Aguilera et Jaume Torres. 2015. « MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. » *Virus research* 201: 61-6. doi:10.1016/j.virusres.2015.02.023.
- Suzuki, Tadaki, Yasuko Orba, Yuki Okada, Yuji Sunden, Takashi Kimura, Shinya Tanaka, Kazuo Nagashima, William W. Hall et Hirofumi Sawa. 2010. « The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. » *PLoS Pathogens* 6 (3). doi:10.1371/journal.ppat.1000801.
- Takeda, Makoto, Andrew Pekosz, Kevin Shuck, Lawrence H. Pinto et Robert a. Lamb. 2002. « Influenza A Virus M2 Ion Channel Activity Is Essential for Efficient Replication in Tissue Culture. » *Society* 76 (3): 1391-1399. doi:10.1128/JVI.76.3.1391.
- Takeuchi, Kaoru et Robert A Lambi. 1994. « Influenza Virus M2 Protein Ion Channel Activity Stabilizes the Native Form of Fowl Plague Virus Hemagglutinin during Intracellular Transport. » *Journal of virology* 68 (2): 911-919.
- Tanner, Julian A., Bo Jian Zheng, Jie Zhou, Rory M. Watt, Jie Qing Jiang, Kin Ling Wong, Yong Ping Lin, Lin Yu Lu, Ming Liang He, Hsiang Fu Kung, Andreas J. Kesel et Jian Dong Huang. 2005. « The adamantane-derived bananins are potent inhibitors of the helicase activities and

- replication of SARS coronavirus. » *Chemistry and Biology* 12 (3): 303-311. doi:10.1016/j.chembiol.2005.01.006.
- Tekes, G. et H. J. Thiel. 2016. *Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. Advances in Virus Research*, 1^{re}éd. Vol. 96. s.l.: Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.002.
- Teoh, Kim-Tat, Yu-Lam Siu, Wing-Lim Chan, Marc A Schlüter, Chia-Jen Liu, J S Malik Peiris, Roberto Bruzzone, Benjamin Margolis et Béatrice Nal. 2010. « The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. » *Molecular biology of the cell* 21 (22): 3838-52. doi:10.1091/mbc.E10-04-0338.
- Terrien, Elouan, Alain Chaffotte, Mireille Lafage, Zakir Khan, Christophe Préhaud, Florence Cordier, Catherine Simenel, Muriel Delepierre, Henri Buc, Monique Lafon et Nicolas Wolff. 2012. « Interference with the PTEN-MAST2 Interaction by a Viral Protein Leads to Cellular Relocalization of PTEN. » (August). doi:10.1126/scisignal.2002941.
- Thornbrough, Joshua M., Babal K. Jha, Boyd Yount, Stephen A. Goldstein, Yize Li, Ruth Elliott, Amy C. Sims, Ralph S. Baric, Robert H. Silverman et Susan R. Weiss. 2013. « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus NS4b Protein Inhibits Host RNase L Activation. » *mBio* 7 (June): 1-9. doi:10.1128/mBio.00258-16.Editor.
- Tonikian, Raffi, Yingnan Zhang, Stephen L. Sazinsky, Bridget Currell, Jung-Hua Hua Yeh, Boris Reva, Heike a. Held, Brent a. Appleton, Marie Evangelista, Yan Wu, Xiaofeng Xin, Andrew C. Chan, Somasekar Seshagiri, Laurence a. Lasky, Chris Sander, Charles Boone, Gary D. Bader et Sachdev S. Sidhu. 2008. « A specificity map for the PDZ domain family. » *PLoS Biology* 6 (9). Public Library of Science: 2043-2059. doi:10.1371/journal.pbio.0060239.
- Torres, Jaume, Uma Maheswari, Krupakar Parthasarathy, Lifang Ng, Ding Xiang Liu et Xiandi Gong. 2007. « Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein. » *Protein science* 16: 2065-2071. doi:10.1110/ps.062730007.
- Torres, Jaume, Krupakar Parthasarathy, Xin Lin, Rathi Saravanan, Andreas Kukol et Ding Xiang Liu. 2006. « Model of a putative pore: the pentameric alpha-helical bundle of SARS coronavirus E protein in lipid bilayers. » *Biophysical journal* 91 (3). Elsevier: 938-47. doi:10.1529/biophysj.105.080119.

- Torres, Jaume, Jifeng Wang, Krupakar Parthasarathy, Ding Xiang Liu et Ding Xiang. 2005. « The transmembrane oligomers of coronavirus protein E. » *Biophysical journal* 88 (2). Elsevier: 1283-90. doi:10.1529/biophysj.104.051730.
- Trandem, K., Q. Jin, K. A. Weiss, B. R. James, J. Zhao et S. Perlman. 2011. « Virally Expressed Interleukin-10 Ameliorates Acute Encephalomyelitis and Chronic Demyelination in Coronavirus-Infected Mice. » *Journal of Virology* 85 (14): 6822-6831. doi:10.1128/JVI.00510-11.
- Triantafilou, Kathy, Satwik Kar, Frank J. M. van Kuppeveld et Martha Triantafilou. 2013. « Rhinovirus-Induced Calcium Flux Triggers NLRP3 and NLRC5 Activation in Bronchial Cells. » *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49 (6): 923-934. doi:10.1165/rcmb.2013-0032OC.
- Triantafilou, Kathy, Satwik Kar, Emmanouil Vakakis, Sailesh Kotecha et Martha Triantafilou. 2013. « Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. » *Thorax* 68 (1): 66-75. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-202182.
- Triantafilou, Kathy et Martha Triantafilou. 2014. « Ion flux in the lung: Virus-induced inflammasome activation. » *Trends in Microbiology* 22 (10). Elsevier Ltd: 580-588. doi:10.1016/j.tim.2014.06.002.
- Tseng, Ying-Tzu, Shiu-Mei Wang, Kuo-Jung Huang et Chin-Tien Wang. 2014. « SARS-CoV envelope protein palmitoylation or nucleocapsid association is not required for promoting virus-like particle production. » *Journal of Biomedical Science* 21 (1): 34. doi:10.1186/1423-0127-21-34.
- Tyler, K. L., J. Pape, R. J. Goody, M. Corkill et B. K. Kleinschmidt-DeMasters. 2006. « CSF findings in 250 patients with serologically confirmed West Nile virus meningitis and encephalitis. » *Neurology* 66 (3): 361-365. doi:10.1212/01.wnl.0000195890.70898.1f.
- Tyrrell, D A et M L Bynoe. 1965. « Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. » *British medical journal* 1 (5448): 1467-70. doi:10.1136/bmj.1.5448.1467.
- Uchino, Hiroyuki, Kazuo Ushijima et Yukio Ikeda. 2015. *Neuroanesthesia and cerebrospinal protection. Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection*. s.l.: s.n. doi:10.1007/978-4-431-54490-6.
- Ujike, Makoto et Fumihiko Taguchi. 2015. « Incorporation of spike and membrane glycoproteins

- into coronavirus virions. » *Viruses* 7 (4): 1700-1725. doi:10.3390/v7041700.
- Vabret, A., J. Dina, E. Brison, J. Brouard et F. Freymuth. 2009. « Coronavirus humains (HCoV). » *Pathologie Biologie* 57 (2): 149-160. doi:10.1016/j.patbio.2008.02.018.
- Venkatagopalan, Pavithra, Sasha M. Daskalova, Lisa a. Lopez, Kelly a. Dolezal et Brenda G. Hogue. 2015. « Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. » *Virology* 478. Elsevier: 75-85. doi:10.1016/j.virol.2015.02.005.
- Verdiá-Báguena, Carmina, Jose L. Nieto-Torres, Antonio Alcaraz, Marta L. Dediego, Luis Enjuanes et Vicente M. Aguilera. 2013. « Analysis of SARS-CoV e protein ion channel activity by tuning the protein and lipid charge. » *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1828 (9). Elsevier B.V.: 2026-2031. doi:10.1016/j.bbamem.2013.05.008.
- Verdiá-Báguena, Carmina, Jose L. Nieto-Torres, Antonio Alcaraz, Marta L. DeDiego, Jaime Torres, Vicente M. Aguilera et Luis Enjuanes. 2012. « Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. » *Virology* 432 (2): 485-494. doi:10.1016/j.virol.2012.07.005.
- Verma, Saguna, Mukesh Kumar, Ulziiyargal Gurjav, Stephanie Lum et Vivek R. Nerurkar. 2010. « Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. » *Virology* 397 (1). Elsevier Inc.: 130-138. doi:10.1016/j.virol.2009.10.036.
- Vezzani, Annamaria et Barbara Viviani. 2015. « Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. » *Neuropharmacology* 96 (PA). Elsevier Ltd: 70-82. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.10.027.
- Vijgen, Leen, Els Keyaerts, Elie Moe, Piet Maes, Griet Dusein et Marc Van Ranst. 2005. « Development of One-Step , Real-Time , Quantitative Reverse Transcriptase PCR Assays for Absolute Quantitation of. » *Journal of Clinical Microbiology* 43 (11): 5452-5456. doi:10.1128/JCM.43.11.5452.
- Walz, Wolfgang. 2000. « Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. » In *Neurochemistry International*, 36:291-300. s.l.: s.n. doi:10.1016/S0197-0186(99)00137-0.
- Wang, Chang, Robert A. Lamb et Lawrence H. Pinto. 1994. « Direct measurement of the influenza A virus M2 protein ion channel activity in mammalian cells. » *Virology*. doi:10.1006/viro.1994.1628.
- Wang, Gefei F, Weizhong Li et Kangsheng Li. 2010. « Acute encephalopathy and encephalitis

caused by influenza virus infection. » *Current opinion in neurology* 23 (3). Current opinion in neurology: 305-11.

Watanabe, Shinji, Tokiko Watanabe et Yoshihiro Kawaoka. 2009. « Influenza A Virus Lacking M2 Protein as a Live Attenuated Vaccine. » *Journal of Virology* 83 (11): 5947-5950. doi:10.1128/JVI.00450-09.

Watanabe, Tokiko, Shinji Watanabe, Hiroshi Ito et Hiroshi Kida. 2001. « Influenza A Virus Can Undergo Multiple Cycles of Replication without M2 Ion Channel Activity Influenza A Virus Can Undergo Multiple Cycles of Replication without M2 Ion Channel Activity. » *Society* 75 (12): 5656-5662. doi:10.1128/JVI.75.12.5656.

Wei, Yan Quan, Hui Chen Guo, Hu Dong, Hai Ming Wang, Jin Xu, De Hui Sun, Shou Guo Fang, Xue Peng Cai, Ding Xiang Liu et Shi Qi Sun. 2014. « Development and characterization of a recombinant infectious bronchitis virus expressing the ectodomain region of S1 gene of H120 strain. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (4): 1727-1735. doi:10.1007/s00253-013-5352-5.

Weiss, Robert S. et Ronald T. Javier. 1997. « A carboxy-terminal region required by the adenovirus type 9 E4 ORF1 oncoprotein for transformation mediates direct binding to cellular polypeptides. » *Journal of Virology* 71 (10): 7873-7880.

Weiss, Susan R. et Julian L. Leibowitz. 2011. « Coronavirus pathogenesis. » *Advances in Virus Research* 81: 85-164. doi:10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2.

Westerbeck, Jason W. et Carolyn E. Machamer. 2015. « A Coronavirus E Protein is Present in Two Distinct Pools with Different Effects on Assembly and the Secretory Pathway. » *Journal of Virology* (July 2015): JVI.01237-15. doi:10.1128/JVI.01237-15.

Whitehead, S S, a Bukreyev, M N Teng, C Y Firestone, M St Claire, W R Elkins, P L Collins et B R Murphy. 1999. « Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. » *Journal of virology* 73 (4): 3438-3442. doi:10.1128/JVI.73.4.3438-3442.

Whitley, Richard J. 2006. « Herpes simplex encephalitis: Adolescents and adults. » *Antiviral Research* 71 (2-3 SPEC. ISS.): 141-148. doi:10.1016/j.antiviral.2006.04.002.

Wilkins, Alastair, Henry Majed, Robert Layfield, Alastair Compston et Siddharthan Chandran. 2003. « Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived

- neurotrophic factor. » *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (12): 4967-4974. doi:23/12/4967 [pii].
- Willott, E, M S Balda, a S Fanning, B Jameson, C Van Itallie et J M Anderson. 1993. « The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (August): 7834-7838. doi:10.1073/pnas.90.16.7834.
- Wilson, Lauren, Peter Gage et Gary Ewart. 2006. « Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. » *Virology* 353 (2): 294-306. doi:10.1016/j.virol.2006.05.028.
- Wilson, Lauren, Carolyn Mckinlay, Peter Gage et Gary Ewart. 2004. « SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. » *Virology* 330 (1): 322-331. doi:10.1016/j.virol.2004.09.033.
- de Wit, Emmie, Neeltje van Doremalen, Darryl Falzarano et Vincent J. Munster. 2016. « SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. » *Nature Reviews Microbiology* 14 (8). Nature Publishing Group: 523-534. doi:10.1038/nrmicro.2016.81.
- Woo, Patrick C Y, Susanna K P Lau, Chung-ming Chu, Kwok-hung Chan, Hoi-wah Tsoi, Yi Huang, H L Beatrice, Rosana W S Poon, James J Cai, Wei-kwang Luk, Leo L M Poon, Samson S Y Wong, Yi Guan, J S Malik, Beatrice H L Wong, J S Malik Peiris et Kwok-yung Yuen. 2005. « Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus , Coronavirus HKU1 , from Patients with Pneumonia Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus , Coronavirus HKU1 , from Patients with Pneumonia. » *Journal of virology* 79 (2): 884-895. doi:10.1128/JVI.79.2.884.
- Woods, Daniel F. et Peter J. Bryant. 1993. « ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. » *Mechanisms of Development* 44 (2-3): 85-89. doi:10.1016/0925-4773(93)90059-7.
- World Health Organization. 2004. « Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. » World Health Organization.
- World Health Organization. 2017. « Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – Saudi Arabia. » World Health Organization.
- Wozniak, Ann L., Stephen Griffin, David Rowlands, Mark Harris, MinKyung Yi, Stanley M. Lemon et Steven A. Weinman. 2010. « Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7

- protein and its contribution to infectious virus production. » *PLoS Pathogens* 6 (9). doi:10.1371/journal.ppat.1001087.
- Xu, J, S Zhong, J Liu, L Li, Y Li, X Wu, Z Li, P Deng, J Zhang, N Zhong, Y Ding et Y Jiang. 2005. « Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the brain: potential role of the chemokine mig in pathogenesis. » *Clin Infect Dis* 41 (8): 1089-1096. doi:10.1086/444461.
- Yagami, K, K Hirai et N Hirano. 1986. « Pathogenesis of haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV) in mice experimentally infected by different routes. » *Journal of Comparative Pathology* 96 (6): 645-657. doi:10.1016/0021-9975(86)90061-7.
- Ye, Fei et Mingjie Zhang. 2013. « Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. » *Biochem. J* 455: 1-14. doi:10.1042/BJ20130783.
- Ye, Ye et Brenda G Hogue. 2007. « Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly. » *Journal of virology* 81 (7): 3597-607. doi:10.1128/JVI.01472-06.
- Yeh, E Ann, Arlene Collins, Michael E. Cohen, Patricia K. Duffner et Howard Faden. 2004. « Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. » *Pediatrics* 113 (1 Pt 1): e73-6. doi:10.1542/peds.113.1.e73.
- Young, V. A. et G. F. Rall. 2009. « Making it to the synapse: Measles virus spread in and among neurons. » *Current Topics in Microbiology and Immunology* 330: 3-30. doi:10.1007/978-3-540-70617-5_1.
- Yu, Xin, Weizhen Bi, Susan R Weiss et Julian L Leibowitz. 1994. « Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein. » *Virology* 202 (2): 1018-1023. doi:10.1006/viro.1994.1430.
- Yuan, Q., Y. Liao, J. Torres, J. P. Tam et D. X. Liu. 2006. « Biochemical evidence for the presence of mixed membrane topologies of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein expressed in mammalian cells. » *FEBS Letters* 580 (13): 3192-3200. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.076.
- Zaki, Ali Moh, Sander van Boheemen, Theo M. Bestebroer, Albert D.M.E. Osterhaus et Ron A.M. Fouchier. 2012. « Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. » *The New England Journal of Medicine* 367 (19): 1814-20. doi:10.1056/NEJMoa1211721.
- Zebedee, S L et R a Lamb. 1988. « Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction

of virus growth and detection of M2 in virions. » *Journal of virology* 62 (8): 2762-2772.

Zhang, Ronghua, Kai Wang, Wei Lv, Wenjing Yu, Shiqi Xie, Ke Xu, Wolfgang Schwarz, Sidong Xiong et Bing Sun. 2013. « The ORF4a protein of human coronavirus 229E functions as a viroporin that regulates viral production. » *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838 (4): 1088-1095. doi:10.1016/j.bbamem.2013.07.025.

Zhang, Ronghua, Kai Wang, Xianqiang Ping, Wenjing Yu, Zhikang Qian, Sidong Xiong et Bing Sun. 2015. « The ns12.9 accessory protein of human coronavirus OC43 is a viroporin involved in virion morphogenesis and pathogenesis. » *Journal of Virology* (September): JVI.01986-15. doi:10.1128/JVI.01986-15.

Zhao, Ling, Babal K. Jha, Ashley Wu, Ruth Elliott, John Ziebuhr, Alexander E. Gorbalenya, Robert H. Silverman et Susan R. Weiss. 2012. « Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. » *Cell Host and Microbe* 11 (6). Elsevier Inc.: 607-616. doi:10.1016/j.chom.2012.04.011.

Zumla, Alimuddin, David S. Hui et Stanley Perlman. 2015. « Middle East respiratory syndrome. » *The Lancet* 386 (9997). Elsevier Ltd: 995-1007. doi:10.1016/S0140-6736(15)60454-8.