

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

**L'INTERACTION ENTRE LES LEUCOCYTES  
ET LES CORONAVIRUS HUMAINS**

Par  
Tina Miletti

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

Jury d'évaluation

Examineur externe	Silvia Vidal, Université d'Ottawa, Faculté de médecine, biochimie, microbiologie et immunologie
Examineur interne	Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Pierre J. Talbot, Centre de recherche en santé humaine



## Résumé

Les pathologies neurologiques sont très diversifiées et restent souvent incomprises. Il est connu que certains agents pathogènes transmissibles comme certains virus possèdent des propriétés neuropathologiques qui pourraient être associées à certaines maladies neurologiques. Ainsi, les coronavirus respiratoires humains (HCoV) ont été associés à la sclérose en plaques (SEP) suite à plusieurs corrélations faites *in vitro* et *in vivo*, dont un potentiel neurotrope associé au virus et la détection de présence d'information génétique virale au cerveau par notre laboratoire. Un des mécanismes possibles de propagation de ce virus vers le système nerveux central (SNC) consiste en une infection des cellules leucocytaires du sang périphérique. Ce projet de recherche visait donc à caractériser la susceptibilité de ces cellules à l'infection par les deux sérotypes connus du HCoV, OC43 et 229E. Dans un premier temps, une panoplie de lignées leucocytaires humaines furent analysées quant à leur susceptibilité à l'infection virale. La détection d'ARNm viral fut effectuée par la méthode de RT-PCR, les protéines virales intracellulaires et de surface furent détectées par cytométrie en flux et la production d'une progéniture virale infectieuse par un test d'immunoperoxydase indirecte sur cellules susceptibles. Également, une corrélation fut effectuée entre la présence de CD13, récepteur cellulaire connu pour HCoV-229E, et la susceptibilité des leucocytes à l'infection, en utilisant la cytométrie en flux. L'effet d'une différenciation et d'une activation cellulaire sur la susceptibilité de ces mêmes lignées de cellules leucocytaires à l'infection fut ensuite évaluée. Finalement, la susceptibilité de cellules du sang périphérique humain (PBMC) à l'infection par les deux virus fut analysée de façon semblable aux lignées cellulaires. Les résultats obtenus permettent de conclure à une infection productive de cellules THP-1 (type promonocytaire) par les deux sérotypes de HCoV, accompagnée d'une infection persistante pour le HCoV-OC43. Une augmentation de la sécrétion de gélatinase B (pro-MMP-9) fut observée par cette lignée promonocytaire lors des infections avec les deux sérotypes. Il fut également démontré que la différenciation des promonocytes en macrophages induite par le phorbol myristate acétate (PMA) rendait ces lignées

résistantes à l'infection. La corrélation des résultats sur les lignées cellulaires n'a pas pu être clairement effectuée avec les PBMC. Ces observations suggèrent que le monocyte, à un certain stade de différenciation, serait susceptible à l'infection par les HCoV et pourrait ainsi servir de véhicule de transport pour les coronavirus humains au SNC. De plus, il pourrait même être un lieu de persistance virale et agir comme réservoir. Par contre, une fois parvenu dans les tissus cibles et suite à sa différenciation, il deviendrait réfractaire à l'infection.

## Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. Pierre Talbot, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

J'aimerais également exprimer ma gratitude envers tous les membres des laboratoires Pierre Tabot et François Denis pour leur contribution scientifique à ce projet par les nombreuses discussions et également, pour l'atmosphère agréable qu'ils ont pu instaurer dans l'aile B de l'édifice 18 du campus Laval de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et amis qui m'ont encouragés tout au long de mes études.

## Table des matières

Résumé.....	i
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des des tableaux.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Introduction.....	1

### REVUE DE LITTÉRATURE

#### 1. Structure et réplication du coronavirus

1.1 Structure des coronavirus.....	2
1.1.1 Protéines structurales.....	2
1.1.2 Protéines non structurales.....	5
1.1.3 Génome viral.....	5
1.1.4 Taxonomie et groupes antigéniques.....	6
1.2 Réplication des coronavirus.....	6
1.2.1 Récepteurs cellulaires.....	8
1.2.1.1 Aminopeptidase N.....	8
1.2.2.2 Acides sialiques.....	9
1.2.2 Pénétration virale et décapsidation.....	10
1.2.3 Modèle de réplication des coronavirus.....	10

#### 2. Pathogenèse coronavirale

2.1 Les coronavirus en général.....	11
2.2 Coronavirus humains (HCoV).....	12
2.3 Modèle murin de démyélinisation.....	13
2.4 Sclérose en plaques (SEP) .....	14
2.5 Coronavirus humain et SEP.....	17

#### 3. Implication des leucocytes dans la pathogenèse virale

3.1 Voies d'entrées au système nerveux central (SNC) .....	17
3.2 Molécules favorisant la dégradation de la barrière hémato-encéphalique..	19
3.2.1 Métalloprotéases de la matrice.....	19
3.2.2 Oxydes nitriques.....	21
3.3 Implication des leucocytes chez le VIH.....	22
3.4 Différenciation et activation.....	23

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 1. Lignées humaines

1.1 Lignées leucocytaires.....	25
1.1.1 Monocytes.....	25
1.1.2 Lymphocytes T.....	25

1.1.3	Lymphocytes B.....	25
1.2	Autres lignées humaines	
1.2.1	Adénocarcinome iléorectal humain.....	25
1.2.2	Fibroblastes pulmonaires d'embryons humains.....	26
1.2.3	Culture cellulaire.....	26
<b>2.</b>	<b>Coronavirus humains (HCoV)</b>	
2.1	Coronavirus humain OC43.....	26
2.2	Coronavirus humain 229E.....	27
<b>3.</b>	<b>Production de F(ab')<sub>2</sub>.....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>Étude de la susceptibilité de lignées leucocytaires humaines à l'infection par les coronavirus humains</b>	
4.1	Détection d'ARNm viral.....	28
4.1.1	Infection des cellules en vue d'une extraction d'ARNm.....	28
4.1.2	Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) .....	28
4.2	Détection de protéines virales.....	30
4.2.1	Infection des cellules leucocytaires en vue d'une analyse en cytométrie en flux.....	30
4.2.2	Préparation des cellules en vue de l'analyse des protéines virales en surface cellulaire par cytométrie en flux.....	31
4.2.3	Préparation des cellules en vue de l'analyse des protéines virales intracellulaires par cytométrie en flux.....	31
4.3	Détection de virus infectieux.....	32
4.3.1	Infection des lignées en vue d'un test d'immunoperoxydase.....	32
4.3.2	Immunoperoxydase indirecte.....	33
4.4	Détection de l'aminopeptidase-N (CD13).....	34
4.5	Caractérisation de l'infection de la lignée promonocytaire THP.1 par les coronavirus humains	
4.5.1	Détection de métalloprotéases de la matrice.....	35
4.5.2	Détection d'oxyde nitrique.....	36
<b>5.</b>	<b>Différenciation.....</b>	<b>36</b>
5.1	Différenciation des lignées monocytaires en macrophage et leur infection	36
5.2	Différenciation de certaines lignées monocytaires en neutrophiles et leur infection.....	37
<b>6.</b>	<b>Activation</b>	
6.1	Activation des lignées lymphocytaires humaines et leur infection.....	39
<b>7.</b>	<b>Étude de la susceptibilité de PBMC humains à l'infection par les HCoV</b>	
7.1	Isolement des PBMC.....	40
7.2	Analyse des lymphocytes T.....	41
7.3	Analyse des monocytes.....	41

7.4	Analyse des macrophages .....	42
-----	-------------------------------	----

## RÉSULTATS

<b>1.</b>	<b>Production de fragments F(ab')<sub>2</sub></b> .....	43
<b>2.</b>	<b>Étude de la susceptibilité de lignées leucocytaires humaines à l'infection par les coronavirus humains</b>	
2.1	HCoV-229E.....	43
2.2	HCoV-OC43.....	45
2.3	Caractérisation de l'infection de la lignée monocyttaire THP.1 par les HCoV.....	47
<b>3.</b>	<b>Différenciation</b>	
3.1	Étude de la susceptibilité à l'infection par les coronavirus humains de lignées monocytaires humaines différenciées en macrophages .....	48
3.2	Analyse de la production virale de la lignée promonocytaire THP.1 infectée de façon persistante avec OC43 une fois différenciée en macrophage.....	49
3.3	Étude de la susceptibilité à l'infection par les coronavirus humains de lignées monocytaires humaines différenciées en neutrophiles.....	49
<b>4.</b>	<b>Activation</b>	
4.1	Étude de la susceptibilité à l'infection par les coronavirus humains de lignées lymphocytaires humaines activées.....	50
<b>5-</b>	<b>Étude de la susceptibilité de PBMC humains à l'infection par les coronavirus humains</b> .....	50

## DISCUSSION

1.	Susceptibilité des lignées leucocytaires humaines à l'infection par les coronavirus humains.....	74
2.	Caractérisation de l'infection de la lignée THP.1 par les HCoV.....	76
3.	Persistence de HCoV-OC43.....	77
4.	Différenciation.....	79
5.	PBMC.....	81

<b>CONCLUSION</b> .....	82
-------------------------	----

<b>Liste de références</b> .....	84
----------------------------------	----

## Liste des figures

**Figure 1** : Gel d'acrylamide détectant les produits de digestion des anticorps 5-11H.6 et 1-10C.1 par la pepsine.

**Figure 2** : Détection, par RT-PCR, de la présence d'ARNm codant la protéine N de HCoV-229E dans les cellules promonocytaires à 1, 4 et 7 jours post-infection. A) cellules promonocytaires U937; B) cellules promonocytaires THP.1.

**Figure 3** : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines S de HCoV-229E à la surface des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

**Figure 4** : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines S de HCoV-229E à l'intérieur des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

**Figure 5** : Détection, par immunoperoxydase indirecte, de la réplication du HCoV-229E à 1, 4 et 7 jours post-infection, de façon extracellulaire et intracellulaire. A) cellules de la lignée lymphocytaire H9; B) cellules de la lignée promonocytaire THP.1.

**Figure 6** : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de l'aminopeptidase-N à la surface des lignées leucocytaires : A) Lignées lymphocytaires B) Lignées monocytaires.

**Figure 7** : Détection, par RT-PCR, de la présence d'ARNm codant la protéine N de HCoV-OC43 dans les cellules promonocytaires à 1, 4 et 7 jours post-infection. A) cellules promonocytaires U937; B) cellules promonocytaires THP.1

**Figure 8** : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines S de HCoV-OC43 à la surface des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

Figure 9: Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines S de HCoV-OC43 à l'intérieur des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

Figure 10 : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines N de HCoV-OC43 à l'intérieur des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

Figure 11: Détection, par immunoperoxydase indirecte, de la réplication du HCoV-OC43 à 1, 4 et 7 jours post-infection de façon extracellulaire et intracellulaire. A) cellules de la lignée promonocyttaire HL-60; B) cellules de la lignée promonocyttaire THP.1.

Figure 12: (A) Détection par cytométrie en flux de la protéine S de HCoV-OC43 à la surface des cellules de la lignée promonocyttaire THP.1 infectée pendant 213 jours (7 mois). (B) Détection par RT-PCR, de la présence d'ARNm codant la protéine N de HCoV-OC43 dans les cellules promonocytaires THP.1 à 213 jours (7 mois) post-infection.

Figure 13 : Analyse de deux métalloprotéases de la matrice, MMP-2 et MMP-9, par zymographie, pour la lignée promonocyttaire THP.1 infectée avec HCoV-229E et HCoV-OC43. (A) Zymographie représentant la sécrétion de gélatinases (B) Zymographie en présence de 10mM EDTA, inhibiteur de gélatinases Ca<sup>2+</sup>-dépendantes.

Figure 14 : Cellules de la lignée promonocyttaire THP.1 (A) différenciées en macrophages par le PMA, suite à un contact de 24 heures ; (B) non différenciées.

Figure 15 : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de l'aminopeptidase-N à la surface des cellules de la lignée promonocyttaire THP.1 différenciées en macrophages, suite à un contact de 24 heures.

Figure 16 : Détection, par immunoperoxydase indirecte, de la réplication du HCoV-OC43 de façon extracellulaire et intracellulaire chez la lignée promonocytaire THP.1 infectée de façon persistante avec HCoV-OC43 puis soumise à une différenciation par le PMA pendant 24 heures.

Figure 17 : Détection des cellules de la lignée HL-60 différenciées en neutrophiles suite à un traitement avec le DMSO, par un test NBT.

Figure 18 : Détection, par RT-PCR, de la présence d'ARNm codant la protéine N de HCoV-229E et de HCoV-OC43 dans les cellules neutrophiles-like, à 1, 4 et 7 jours post-infection.

Figure 19 : Détection, par cytométrie en flux, du marqueur d'activation CD25 à la surface des cellules des lignées de lymphocytes T suite à leur activation par le PMA et l'ionomycine pendant 24 heures : A) cellules non activées B) cellules activées.

Figure 20 : Détection par cytométrie en flux, de l'augmentation du volume des cellules de la lignée de lymphocytes B suite à leur activation par le PMA et l'ionomycine pendant 24 heures. (A) non activées (B) activées.

## Liste des tableaux

Tableau I :Groupes antigéniques de la famille des *Coronavirus*

Tableau II :Virus associés à la sclérose en plaques

Tableau III :Titres viraux associés à l'infection persistante de cellules THP.1 par HCoV-OC43

Tableau IV : Susceptibilité de lignées monocytaires à l'infection par les HCoV.  
Comparison entre les cellules différenciées et non différenciées. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

## Liste des abréviations

AcMo	: anticorps monoclonal
APN	: aminopeptidase-N
ATCC	: American Type Culture Collection
BCV	: coronavirus bovin
CCV	: coronavirus canin
DAB	: 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DICT 50	: titre requis pour tuer 50% des cellules en culture
DMSO	: diméthylsulfoxyde
dNTP	: deoxynucléotide triphosphate
DTT	: dithiothréitol
EDTA	: acide éthylènediaminetétraacétique
EtBr	: bromure d'éthidium
FCV	: coronavirus félin
HCoV	: coronavirus humain
HEPES	: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid
HEV	: virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine
HSV	: virus de l'herpès simplex
HSV-2	: virus de l'herpès simplex-2
IBV	: virus de la bronchite infectieuse aviaire
IgG	: immunoglobuline
iNOS	: synthase d'oxyde nitrique inductible
JHM	: souche du coronavirus murin
KDa	: kilodaltons
M	: molaire
MEM	: Earle's Minimum Essential Medium
MHV	: coronavirus murin (virus de l'hépatite murine)
mL	: millilitre
mM	: millimolaire
MMP	: métalloprotéases de la matrice

MOI	: multiplicité d'infection
NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaNO <sub>2</sub>	: nitrite de sodium
NBT	: nitrobleu tetrazolium
ng	: nanogramme
NO	: oxyde nitrique
ns	: protéine non structurale
pb	: paire de bases
PBMC	: cellules mononuclées de sang périphérique
PBS	: tampon salin phosphaté
PCR	: réaction de polymérase en chaîne
PKC	: protéine kinase C
PMA	: phorbol myristate acétate
p/v	: poids sur volume
PRRSV	: virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin
rpm	: rotations par minutes
RSV	: virus respiratoire syncytial
RT	: transcription inverse
SDS	: sodium dodecyl sulfat
SEP	: sclérose en plaques
SIDA	: syndrome de l'immunodéficience humaine acquise
SNC	: système nerveux central
SVF	: sérum de veau fœtal
TGEV	: virus de la gastro-entérite transmissible du porc
TIMP	: inhibiteur tissulaire de métalloprotéases
T <sub>m</sub>	: température de fusion
TPCK	: N-tosyl-L-phenylalanine chlorométhyl
U	: unités enzymatiques
μg	: microgramme
μL	: microlitre
VIH	: virus de l'immunodéficience humaine

VSV : virus de la stomatite vésiculaire  
v/v : volume sur volume

# **INTRODUCTION**

Depuis les dernières décennies, un intérêt particulier pour les virus neuropathogènes s'est intensifié surtout avec la reconnaissance que le virus de l'immunodéficience humaine était impliqué dans le développement d'une maladie neurologique, le neuro-SIDA, qui représente maintenant la maladie neurologique la plus répandue chez les jeunes adultes.

Le coronavirus humain est un virus causant normalement des maladies de voies respiratoires supérieures mais qui semble de plus en plus être associé avec un potentiel neurotrophe. Plusieurs observations portent à croire que ce virus est impliqué dans des maladies neurologiques comme par exemple la corrélation qui peut être faite avec le coronavirus murin qui cause une neuropathologie chez la souris (Weiner, 1973; Lampert *et al.*, 1973), puis la découverte d'ARN messager de coronavirus humain dans le cerveau humain (Arbour *et al.*, 2000).

Plusieurs mécanismes peuvent être adoptés par un virus pour réussir à pénétrer la barrière hémato-encéphalique et ainsi accéder au SNC. Des voies pouvant être utilisées, celle impliquant le passage viral via les cellules leucocytaires est à la base de la présente étude. L'hypothèse générale derrière ce projet de recherche est que les coronavirus humains peuvent utiliser les cellules du système immunitaire afin d'être transportés vers le cerveau. La susceptibilité de lignées leucocytaires humaines à l'infection coronavirale pourra d'abord nous donner un aperçu de ce qui se passe réellement *in vivo*. Il sera également question de déterminer si l'état de différenciation ou d'activation de ces cellules leucocytaires pourrait modifier leur susceptibilité à l'infection. Finalement, l'analyse de cellules mononuclées de sang périphérique humain (PBMC) nous permettra de corréler certains résultats obtenus sur les lignées avec des interactions virus-cellules pouvant avoir lieu *in vivo*.

# **REVUE DE LITTÉRATURE**

## **1. Structure et réplication du coronavirus**

### **1.1 Structure et caractéristiques des coronavirus**

Les coronavirus sont des virus enveloppés, ayant une morphologie plus ou moins sphérique et un diamètre d'environ 120 nm. Leur nom dérive du fait qu'ils possèdent une frange de péplomères de 20 nm composée d'une glycoprotéine de type I hautement glycolysée, soit la protéine S. Ils sont composés d'une membrane bi-lipidique et de 4 à 5 protéines structurales: la glycoprotéine péplomérique de surface S, la glycoprotéine membranaire M, la phosphoprotéine de la nucléocapside N, la petite protéine de la membrane E et, chez certaines souches, la glycoprotéine hémagglutinine-estérase HE (Lai et Cavanagh, 1997).

#### **1.1.1 Protéines structurales**

La glycoprotéine S, qui a une masse moléculaire de 180 kDa, est la composante la plus exposée à la surface du virion. Elle régule ainsi l'attachement du virus à la cellule (Collins *et al.*, 1982; Daniel *et al.*, 1990 ; Godet *et al.*, 1994; Kubo *et al.*, 1994) et la propagation virale par fusion membranaire entre cellules. Cette protéine est la première cible de la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, des anticorps neutralisants sont induits principalement contre la protéine S (Daniel *et al.*, 1990 ; Collins *et al.*, 1995) et une protection chez des animaux contre certains coronavirus est observée suite à une immunisation avec S seulement (Daniel *et al.*, 1990 ; Ignjatovic et Galli, 1994; Torres *et al.*, 1995). De plus, cette protéine semble être le déterminant majeur de neurovirulence chez la souris (Phillips *et al.*, 1999). À l'intérieur d'une même espèce de coronavirus, cette protéine est la plus variable de toutes les protéines structurales (Lai et Cavanagh, 1997).

La protéine S peut être clivée en S1 (moitié N-terminale) et S2 (moitié C-terminale); la fréquence de clivage variant grandement selon les espèces (Lai et Cavanagh, 1997) et les types cellulaires (Frana *et al.*, 1985). L'initiation de l'infection virale par le coronavirus murin (MHV), par exemple, requiert le clivage protéolytique de la protéine S (Sturman *et al.*, 1985), quoiqu'il n'est pas prérequis et même absent chez certains virus tels les FCV et TGEV (Pocock et Garwes, 1975). On sait également que ce clivage peut être induit, chez

certaines souches virales tel le BCV, par l'addition de trypsine dans le milieu de culture au moment de l'infection, augmentant ainsi la capacité de fusion cellulaire et conséquemment la capacité d'infection (Hogue et Brian, 1986).

La protéine membranaire M est une des protéines coronavirales les plus conservées (Fleming *et al.*, 1983). Cette protéine est une glycoprotéine intégrale de la membrane et des études biochimiques et des analyses de séquences laissent suggérer qu'elle traverse à plusieurs reprises l'enveloppe virale (Rottier *et al.*, 1984; Cavanagh *et al.*, 1986; Armstrong *et al.*, 1984; Rottier *et al.*, 1986). Chez les coronavirus humains, la protéine M est formée de 4 sous-unités (Lai et Cavanagh, 1997). Plusieurs propriétés de la protéine M laissent croire qu'elle est impliquée dans l'assemblage viral, entre autre le fait qu'elle interagit avec la nucléocapside (Sturman *et al.*, 1980). Cependant, cette interaction à elle seule ne peut médier l'assemblage viral. En effet, d'autres facteurs seraient probablement impliqués (Klumperman *et al.*, 1994). Des interactions entre protéines M seraient également nécessaires pour générer la formation de l'enveloppe virale (De Haan *et al.*, 2000).

La protéine N de la nucléocapside est une phosphoprotéine interne, ayant une masse moléculaire de 50 à 60 kDa. Cette protéine est hautement basique, très riche en sérines (Stolhman *et al.*, 1988) et se compose d'unités oligomériques qui sont liées entre-elles par des liens disulfures (Deregt *et al.*, 1987). Elle s'associe à l'ARN génomique pour former une nucléocapside hélicoïdale. La capacité qu'a la protéine N à se lier à l'ARN est nécessaire pour la formation de la nucléocapside et conséquemment de particules virales. En effet, la protéine N seule ne peut être incorporée dans des virions alors que le complexe protéine N-ARN peut l'être (Bos *et al.*, 1996; Vennema *et al.*, 1996). La protéine M participe également au processus de formation du virion en interagissant avec la nucléocapside (Sturman *et al.*, 1980).

La protéine HE ou hémagglutinine-estérase est une protéine de surface retrouvée uniquement chez le deuxième groupe antigénique des coronavirus, soit celui des MHV (voir tableau I). Même dans ce groupe, seules les virus HCoV-OC43, BCV, HEV et

certaines souches de MHV telles le JHM possèdent la HE (Luytjes *et al.*, 1988; Yokomori *et al.*, 1991). Cette glycoprotéine a une masse moléculaire d'environ 65 kDa mais la protéine mature semble exister dans le virion, sous forme de dimère, ancrée à la membrane par son côté C-terminal, formant une frange de spicules courtes visualisée en microscopie électronique (Caul et Egglestone, 1977; Dea et Tijssen, 1988). La protéine HE seule, de façon similaire à la protéine S, peut médier l'hémagglutination et l'hémadsorption (King *et al.*, 1985; Hogue et Brian, 1986; Vlasak *et al.*, 1988; Pfleiderer *et al.*, 1991; Schultze *et al.*, 1991a). Elle agit comme récepteur pour l'acide neuraminique O-acétylé (Vlasak *et al.*, 1988; Schultze *et al.*, 1991b), de façon semblable à la protéine S. Cependant, sa portion estérase détruit l'interaction ligand-récepteur en hydrolysant l'acide O-acétylsalicylique (Schultze *et al.*, 1991a).

De façon semblable, la glycoprotéine HEF (hémagglutinine-estérase-fusion) du virus de l'influenza de type C a également des activités hémagglutinantes et estérases. De plus, la protéine HE des coronavirus partage 29% d'identité en acides aminés avec la protéine HEF de l'influenza de type C (Parker *et al.*, 1989; Kienzle *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1991). Ces observations suggèrent que ces deux protéines auraient un lien évolutif résultant d'une recombinaison entre des ancêtres coronavirus et virus de l'influenza de type C, suite à une co-infection.

Le rôle de la protéine HE dans la biologie des coronavirus n'est pas encore connu. Parmi tous les coronavirus, seul le BCV nécessite HE pour infecter, toutefois, la présence de HE pourrait affecter la virulence de certains autres coronavirus, entre autre au niveau du SNC (Yokomori et Lai, 1992).

La petite protéine de la membrane E fut découverte plus tardivement que les autres protéines structurales. Celle-ci joue cependant un rôle essentiel dans l'assemblage viral. Il a été démontré que E et M sont les deux seules protéines virales absolument nécessaires pour que cet assemblage ait lieu (Bos *et al.*, 1996; Vennema *et al.*, 1996). De plus, il fut récemment découvert que la protéine E semble induire l'apoptose chez certains types cellulaires (An *et al.*, 1999).

### 1.1.2 Protéines non structurales

Les coronavirus ont également des gènes codant pour des protéines non structurales (ns). La plupart de ces gènes et protéines ne sont pas essentiels pour la réplication virale. Cependant, certaines protéines ns pourraient être impliquées dans le tropisme tissulaire ou la pathogénicité. Il y a une très grande hétérogénéité quant à la position sur le génome et au nombre de cadres de lectures ouverts (ORF) des gènes des protéines ns chez les coronavirus. Il y a deux gènes situés entre celui de la polymérase et le gène S ; deux à trois autres sont situés entre le gène S et E ; un seul entre le gène M et N pour le IBV et un à l'extrémité 3' pour les TGEV (Lai et Cavanagh, 1997). La polymérase fait partie des protéines non structurales ; celle-ci sera abordée plus loin.

### 1.1.3 Génome viral

Les coronavirus possèdent un génome d'ARN monocaténaire de polarité positive. Ils sont en fait les plus gros virus à ARN connus avec un génome allant de 27.6 à 31 Kb (Lai et Cavanagh, 1997). Leur grande taille les force à utiliser un mécanisme spécial de synthèse d'ARN afin de contourner les erreurs pouvant survenir pendant cette synthèse. L'ARN viral contient environ 7 à 10 gènes fonctionnels, 4 ou 5 desquels encodent des protéines structurales. L'extrémité 5' du génome des coronavirus est coiffé et l'ARN possède une séquence de tête de 65 à 98 nucléotides qui est également retrouvée à l'extrémité 5' des ARNm. Cette séquence de tête est suivie d'une région non traduite variant de 200 à 400 nucléotides. À l'autre extrémité du génome, on retrouve une autre région non traduite de 200 à 500 nucléotides suivie d'une queue poly-(A).

Presque deux tiers de l'ARN, à partir de sa portion 5', est occupé par le gène codant pour la polymérase, soit le gène 1. Ce gène est complètement séquencé chez IBV, MHV, TGEV et HCoV-229E (Bournsnell *et al.*, 1987 ; Lee *et al.*, 1991 ; Hérold *et al.*, 1993 ; Bonilla *et al.*, 1994 ; Eleouet *et al.*, 1995). Le degré d'identité en acides aminés pour le produit de ce gène est plus élevé que n'importe quel autre produit de gène chez les coronavirus. La polymérase fait environ 740 à 800 kDa. Cependant, des protéines de cette taille ne sont pas identifiées dans des cellules infectées en partie à cause des modifications post-traductionnelles (Lai et Cavanagh, 1997). Elles sont effectivement rapidement

clivées en au moins sept peptides par la polyprotéine elle-même (Compton *et al.*, 1993 ; Baker *et al.*, 1989). Ce gène regroupe deux cadres de lecture ouverts (ORF) qui se chevauchent, soit 1a et 1b. Dans la région du chevauchement, on retrouve des éléments caractéristiques d'un signal de déplacement de cadre de lecture de ribosome (Brierley *et al.*, 1987, 1989 ; Lee *et al.*, 1991 ; Herold et Siddell, 1993) qui est essentiel afin de traduire l'ORF 1b.

En ce qui concerne les gènes codant les protéines non structurales, ils sont entremêlés autour des gènes de protéines structurales et leur emplacement varie grandement d'une espèce à l'autre (Duarte *et al.*, 1994 ; Mounir *et al.*, 1993). Cette variabilité dans l'architecture du génome suggère qu'il n'y a pas beaucoup de conservation pour ces gènes codant des protéines non structurales.

#### **1.1.4 Taxonomie et groupes antigéniques**

Tous les coronavirus font partie du genre *Coronavirus*, dans la famille des *Coronaviridae* (Lai et Cavanagh, 1997). La classification récente des espèces de cette famille résulte en 3 groupes antigéniques (Tableau I). Ces groupes furent raffinés suite à des analyses d'anticorps monoclonaux et de séquençage de nucléotides qui ont révélé des similarités entre les coronavirus de certaines espèces. Dans le premier groupe, TGEV, FCV et CCV sont particulièrement très apparentés, comme le sont tous les membres du groupe deux entre eux. Le seul membre du troisième groupe, IBV, diffère non seulement des membres des autres groupes mais démontre d'énormes différences entre ses propres espèces (Cavanagh *et al.*, 1994).

## **1.2 Réplication des coronavirus**

La réplication du coronavirus a entièrement lieu dans le cytoplasme. Il a été démontré que MHV peut se répliquer dans des cellules énucléées et également en présence d'actinomycine D et d'  $\alpha$ -amantadine, soit des agents inhibant la transcription de facteurs nucléaires, suggérant donc que les facteurs nucléaires ne semblent pas être nécessaires pour cette tâche (Brayton *et al.*, 1981 ; Wilhelmsen *et al.*, 1981). Toutefois, cet aspect n'a

Tableau IGroupes antigéniques des *Coronavirus*

		Groupe antigénique
TGEV	Virus de la gastro-entérite transmissible porcine	1
FCV	Coronavirus félin	1
CCV	Coronavirus canin	1
HCoV-229E	Coronavirus humain 229E	1
PEDV	Virus de diarrhée épidémique porcin	1
MHV	Virus de l'hépatite murine	2
BCV	Coronavirus bovin	2
HCoV-OC43	Coronavirus humain OC43	2
HEV	Virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine	2
TCV	Coronavirus de dinde	2
IBV	Virus de la bronchite infectieuse aviaire	3

(Lai et Cavanagh, 1997)

pas encore été résolu puisque des chercheurs ont démontré que certains coronavirus comme le IBV et HCoV-229E, ne pouvaient plus se répliquer en présence d'inhibiteurs de facteurs nucléaires (Evans et Simpson, 1980 ; Kennedy et Jonhson-Lussenberg, 1979).

### **1.2.1 Récepteurs cellulaires**

La découverte que MHV et d'autres coronavirus ont la capacité de se lier à des cellules non susceptibles à l'infection aussi bien qu'à des cellules susceptibles (Van Dinter et Flintoff, 1987 ; Kooi *et al.*, 1988, 1991) semble indiquer qu'une liaison non spécifique pourrait représenter une étape préalable au processus d'attachement, mais non essentielle à celui de l'infection. En effet, la première étape essentielle à l'infection est l'attachement du virus à la cellule cible via des récepteurs cellulaires spécifiques. L'expression d'un récepteur n'est cependant pas toujours suffisant pour établir une infection virale. Par exemple, les récepteurs prototypes pour le MHV, soit le MHVR-1, ne sont exprimés que sur les cellules susceptibles au MHV, soit le foie, les voies gastro-intestinales, les cellules B, macrophages et cellules endothéliales mais non sur les cellules T (Coutelier *et al.*, 1994; Godfraind *et al.*, 1995). Cependant, ce récepteur du MHV est également exprimé dans d'autres cellules comme celles du rein, qui elles, ne sont pas susceptibles à ce virus (Knobler *et al.*, 1984). La quantité de récepteur présent pourrait également déterminer, dans certains cas, la susceptibilité relative ou la résistance de certaines cellules à l'infection virale (Sawicki *et al.*, 1995 ; Chen et Baric, 1996). Ainsi, il peut tout de même y avoir corrélation entre l'expression d'un récepteur et la susceptibilité de certaines cellules à l'infection virale. Il peut arriver à l'occasion qu'un virus infecte une cellule en empruntant un mécanisme indépendant d'un récepteur. Par exemple, des cellules murines infectées par le MHV peuvent se fusionner avec des cellules humaines n'exprimant pas de récepteur spécifique au MHV et causer l'infection de ces dernières (Gallagher *et al.*, 1992).

#### **1.2.1.1 Aminopeptidase-N (APN)**

Les récepteurs cellulaires spécifiques pour les HCoV-229E, le TGEV et peut être même le cytomégalovirus ont été identifiés comme étant l'aminopeptidase-N (APN) de l'espèce correspondante, également appelé CD13 (Delmas *et al.*, 1992; Yeager *et al.*, 1992).

L'APN est un enzyme de 150 kDa et fait parti de la famille des métalloprotéases associées à la membrane. Il est grandement distribué sur différents types cellulaires, entre autre au niveau de l'épithélium du petit intestin (Olsen *et al.*, 1997). Il est généralement accepté que la fonction physiologique primaire de l'APN est de convertir les oligopeptides retrouvés dans la lumière du petit intestin en acides aminés pour qu'ils puissent ensuite être absorbés. Outre le petit intestin, on retrouve l'APN également au niveau de l'endomètre, du rein, de la rate et du cerveau (Kenny *et al.*, 1987; Olsen *et al.*, 1995). Le rôle physiologique de cet enzyme dans ces tissus n'est toutefois pas bien connu, quoiqu'il a été suggéré qu'il pourrait être impliqué dans la dégradation de peptides de régulation (Kenny *et al.*, 1987). Il a même été suggéré que l'APN pourrait être impliqué dans le remodelage d'antigènes en vue de leur présentation puisqu'il a été retrouvé sur des cellules du système immunitaire comme des monocytes, granulocytes et même sur des lymphocytes T activés (Sanderink *et al.*, 1988 ; Riemann *et al.*, 1994 ; Razak et Newland, 1992 ; Look, 1989).

Certains anticorps dirigés contre l'APN peuvent empêcher l'attachement du HCoV-229E (Yeager *et al.*, 1992). Cependant, le site catalytique de son activité protéase n'est pas requis pour la fonction de récepteur. De plus, des inhibiteurs d'APN n'empêchent pas l'infection virale (Delmas *et al.*, 1994). Il a récemment été démontré que des déterminants localisés dans la partie N-terminale de l'APN médient l'infection par HCoV-229E alors que pour le TGEV l'infection est médiée par des déterminants retrouvés dans la partie C-terminale (Kolb *et al.*, 1998).

### 1.2.1.2 Acides sialiques

Le HCoV-OC43 et le BCV utilisent des résidus d'acide sialiques *O*-acétylés (Vlasak *et al.*, 1988). Chez le HCoV-OC43, la protéine S reconnaît ces résidus comme déterminants alors que la protéine HE clive ces mêmes liens, compromettant peut être l'attachement du virus à un certain niveau (Schultze *et al.*, 1992; Schultze *et al.*, 1991b ; Herrler *et al.*, 1991). Les acides sialiques sont nécessaires afin d'avoir une infection par HCoV-OC43 puisque l'infection n'est plus possible en leur absence (Schultze et Herrier, 1992). Cependant, il est peu probable qu'ils soient les récepteurs primaires utilisés par ces virus

puisque la distribution de ces molécules est presque ubiquitaire. Le récepteur spécifique des HCoV-OC43 n'est pas encore connu.

### **1.2.2 Pénétration virale et décapsidation**

Le mécanisme de pénétration des coronavirus dans la cellule cible n'est pas clair. Certains groupes suggèrent que les particules virales entrent via endocytose (Krzystyniak et Dupuy, 1984). Cependant, d'autres études démontrent que le virus entre par fusion directe entre virion et membrane plasmique (Doughri *et al.*, 1976; Kooi *et al.*, 1991; Weismiller *et al.*, 1990; Payne et Storz, 1988; Li et Cavanagh, 1992). Il est possible que les coronavirus utilisent ces deux moyens pour internaliser une cellule. Le mécanisme exact d'entrée peut aussi dépendre du type cellulaire et de la souche virale (Mizzen *et al.*, 1985 ; Kooi *et al.*, 1991). La phase de décapsidation marque le début de l'activité des fonctions génomiques. Elle correspond à la dissociation de la protéine N et de l'ARN viral.

### **1.2.3 Modèle de réplication des coronavirus**

La première étape suivant la décapsidation du virus est la synthèse de l'ARN-polymérase ARN-dépendante (Holmes 1990). La polymérase est traduite à partir du gène 1 à l'extrémité 5' de l'ARN génomique et son activité n'est détectable seulement qu'une heure après le début de l'infection (Brayton *et al.*, 1982). Cette polymérase virale est responsable de la synthèse des brins négatifs d'ARN à partir de l'ARN de départ et pour la transcription subséquente des ARNm à partir des brins négatifs.

Puisque les coronavirus possèdent des génomes à ARN très longs, un mécanisme spécial de réplication est nécessaire. Leur génome est polyadénylé en 3' et coiffé en 5'. De plus, il y a des ARNm sous-génomiques ayant des extrémités 3'-co-terminales et ils contiennent tous une séquence de tête identique. Le mécanisme de transcription qu'utilisent les coronavirus pour produire ces ARNm sous-génomiques n'est pas confirmé mais fut l'objet de plusieurs spéculations puisque le séquençage des ARNm sous-

génomiques a démontré qu'ils doivent nécessairement parvenir d'une transcription discontinue.

Le modèle adopté jusqu'à récemment, appelé «leader-primed transcription», disait que les ARNm sous-génomiques étaient transcrits directement de brins négatifs de longueur génomique (Baric *et al.*, 1985). Cette spéculation était basée sur l'incapacité de trouver, dans des cellules infectées, des ARN négatifs de longueurs sous-génomiques ou des intermédiaires de réplication contenant des brins négatifs de longueurs sous-génomiques. Ces structures ont cependant été récemment identifiées (Sethna et Brian, 1997; Sawicki et Sawicki, 1998; Baric et Yount, 2000) et sont transcriptionnellement actives. Le nouveau modèle de transcription proposé est donc appelé extension discontinue en 3' des brins négatifs. Ce modèle prédit que les ARN de longueurs sous-génomiques seraient synthétisés directement par transcription à partir du génome d'ARN positif. Ces ARN négatifs de différentes longueurs auraient des séquences de tête communes en 5' et serviraient comme matrices pour la production des ARNm positifs sous-génomiques (Sethna et Brian, 1997; Sawicki et Sawicki, 1998; Baric et Yount, 2000). Chaque ARNm est par la suite traduit en général en une seule protéine et l'assemblage se fait lorsqu'il y a interaction entre l'ARN génomique et la protéine structurale N (Holmes, 1990). Celle-ci semble se lier avec la séquence de tête de l'ARN et déclenche ainsi l'assemblage du virus (Lai et Cavanagh, 1997).

## **2. Pathogenèse coronavirale**

### **2.1 Les coronavirus en général**

Les coronavirus sont responsables de diverses pathologies respiratoires, entériques et neurologiques chez différentes espèces animales. Les hôtes principalement susceptibles à l'infection par les coronavirus sont les oiseaux et les mammifères. Les coronavirus aviaires sont surtout responsables d'infections respiratoires aiguës alors que chez les mammifères, les coronavirus causent aussi des infections gastro-intestinales. À titre d'exemple, le coronavirus humain privilégie les voies respiratoires alors que le coronavirus bovin cause plutôt une maladie entérique (Myint, 1994). Les symptômes découlant d'infections coronavirales diffèrent ainsi selon le tropisme cellulaire du virus.

Les coronavirus ont des spécificités d'hôtes assez élevées : ils infectent généralement l'espèce animale de leur origine (Wege *et al.*, 1982). Des exceptions sont cependant connues, comme pour le MHV qui peut infecter le singe et causer une démyélinisation au niveau du SNC (Murray *et al.*, 1992; Cabirac *et al.*, 1994), suggérant ainsi une certaine flexibilité au niveau de cette spécificité d'hôte.

## 2.2 Coronavirus humains (HCoV)

Le premier coronavirus humain à être isolé fut d'un lavage nasal d'un enfant mâle souffrant d'un rhume. Ce virus avait la capacité d'induire le rhume lorsque inoculé intranasalement chez des patients volontaires (Tyrrell et Bynoe, 1965). Pendant la même période, Hamre et Procknow (1966) ont caractérisés des nouveaux agents infectieux isolés des voies respiratoires de patients atteints de rhumes. Un de ces agents fut le sérotype coronaviral 229E et fut cultivé sur des cellules WI-38. Le sérotype OC43 fut isolé quelques années plus tard par McIntosh *et al.* (1967a) et fut cultivé initialement sur des cultures d'organes puis adapté à se répliquer dans des cerveaux de souris nouveaux nés. Plusieurs coronavirus humains existent mais peu d'entre eux sont bien caractérisés. Il est cependant possible de les classer dans deux sérogroupes, soit 229E et OC43.

La plupart des analyses épidémiologiques effectuées sur les coronavirus humains furent faits à partir d'études sérologiques. Les valeurs étaient sûrement sous-estimées puisqu'il est connu que pas tous les virus peuvent être détectés de façon sérologique et non plus être adaptés à survivre en culture (Larson *et al.*, 1980). Une étude épidémiologique du sérotype OC43 suggère qu'il y a des pics d'infections pendant la période d'hiver à printemps et ce, à chaque trois ans, (Monto et Lim, 1974). Les mêmes conclusions furent trouvés pour le sérotype 229E (Cavallaro et Monto, 1970).

Entre 15% et 35% des rhumes sont attribuables aux coronavirus humains (Myint, 1994), l'incubation moyenne de ces virus dans le corps étant de 3 jours (Tyrrell *et al.*, 1993). Des maladies non associés aux voies respiratoires supérieures, furent également corrélées avec les coronavirus humains. Par exemple, une étude sérologique a associé les coronavirus humains avec des pneumonies, myocardites et méningites (Riski et Hovi, 1980). D'autres

études corrélient ces virus avec des infections respiratoires d'hôpitaux comme la détresse respiratoire chez les nouveaux nés (Sizun *et al.*, 1995). Les HCoV peuvent possiblement aussi engendrer des exacerbations d'asthme (Pattemore *et al.*, 1992).

Ces virus semblent également être impliqués dans des maladies néphropathiques (Apostolov *et al.*, 1975) et du tractus gastro-intestinal (Resta *et al.*, 1985 ; Macnaughton et Davies, 1981 ; Gerna *et al.*, 1985). De plus, les HCoV sont de plus en plus associés à des pathologies neurologiques comme la sclérose en plaques et la maladie de Parkinson (Talbot et Jovenne, 1992).

### **2.3 Modèle murin de démyélinisation**

Les modèles animaux de maladies neurologiques ont contribué à soulever un intérêt pour une possible étiologie virale dans la sclérose en plaques (SEP) et ont permis de pouvoir caractériser les différentes étapes d'une infection virale menant à la pathologie. Parmi les modèles, celui du coronavirus murin (MHV) s'avère très important. Il y a plusieurs souches antigéniquement et biologiquement différenciables du MHV, deux desquelles (JHM et A59) peuvent induire une démyélinisation chez la souris (Barthold. 1986). Le virus MHV-JHM fut originalement isolé d'une souris paralysée dans les années '40 (Bailey *et al.*, 1949; Cheever *et al.*, 1949) et est devenu depuis un bon modèle d'étude pour les maladies du SNC induits par les virus (Weiner, 1973; Lampert *et al.*, 1973). Lorsque des souris adultes sont infectées par le MHV, on peut percevoir l'apparition d'une encéphalomyélite avec infection de cellules du SNC telles des neurones, cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) où 95% des souris ne survivent pas. Les quelques survivants développent une maladie neurologique chronique ressemblant à la sclérose en plaques, c'est-à-dire montrant des plaques de démyélinisation dans le cerveau et la moëlle épinière ainsi que des cycles de remyélinisation et démyélinisation. Certaines études ont suggéré que cette maladie neurodégénérative chez la souris dérive d'un mécanisme auto-immunitaire (Wang *et al.*, 1990) plutôt qu'à une destruction directe des oligodendrocytes (Houtman et Fleming, 1996). En effet, la démyélinisation peut être prévenue en immunosupprimant ces souris. Également, la maladie auto-immune peut-être initiée en transférant adoptivement les lymphocytes T de la rate de souris malades à des souris

normales. Il a aussi été démontré que l'infection par le MHV-JHM chez la souris et le rat induit des cellules T auto-réactives (Kyuwa *et al.*, 1991 ; Watanabe *et al.*, 1983).

Le MHV peut accéder au SNC par transport neural via le nerf olfactif (Lavi *et al.*, 1988; Barnett et Perlman, 1993). Cependant, il a été spéculé que des macrophages infectés (Bang et Warwick, 1960) pourraient participer à la dissémination virale au SNC, comme ils le font pour d'autres virus tels le VIH. L'infection des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique par le MHV pourrait également contribuer à faire accéder le virus au SNC (Joseph *et al.*, 1989).

#### **2.4 Sclérose en plaques (SEP)**

La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire du SNC qui détruit la gaine de myéline des fibres nerveuses. Cette inflammation est due à une activation incontrôlée et encore inexplicquée du système immunitaire. En effet, les causes de cette maladie neurologique restent encore inconnues. Il y a cependant plusieurs études qui démontrent que des facteurs génétiques prédisposent certaines personnes à développer cette maladie mais également que certains facteurs environnementaux sont mis en jeu (Sadovnick et Ebers, 1993). Ainsi, la difficulté de recherche des causes spécifiques de la sclérose en plaques réside dans le fait qu'elle est d'étiologie multifactorielle (Talbot, 1995).

Des observations suggèrent que plusieurs facteurs génétiques sont liés à la susceptibilité à la SEP (Oger et Arnason, 1987). Certains allèles des antigènes d'histocompatibilité furent initialement associés avec la SEP dans les années '70 (Alter *et al.*, 1976). Depuis, les antigènes d'histocompatibilité de classe II de type HLA-DR2, dont les gènes sont portés par le chromosome 6, furent les seuls à être liés de façon convaincante à cette maladie (Hillert et Olerup, 1993). D'autres gènes, tels les gènes encodant les récepteurs de lymphocytes T et la MBP (protéine basique de la myéline) furent également associés à la susceptibilité à cette maladie (Ebers *et al.*, 1996; Ebers et Sadovnick, 1994; Hockertz *et al.*, 1998).

Des études faits chez des jumeaux homozygotes ne révèlent pas de concordance de la maladie entre les deux individus (Utz *et al.*, 1993). Ces données suggèrent que des

facteurs environnementaux sont nécessairement mis en jeu dans la SEP. Une panoplie de suggestions dépourvues de données convaincantes furent avancées telle l'implication de microorganismes comme les spirochètes, mycoplasmes, protozoaires, rickettsie, etc. ou de d'autres facteurs environnementaux comme le climat, l'hygiène, l'exposition à certains animaux, etc. (Talbot, 1995). Cependant, l'hypothèse virale est celle qui semble la plus plausible et la seule démontrant des preuves scientifiques. Elle spécule qu'un ou des virus joue(nt) un rôle de déclenchement, soit dans l'initiation de la maladie et/ou dans la propagation et rechutes de celle-ci chez des individus génétiquement prédisposés (Sibley *et al.*, 1985; Kurtzke *et al.*, 1993; Waksman 1995). Plusieurs virus neurotropes sont ainsi associés dans la pathogénèse de la SEP (Tableau II).

Un nombre de mécanismes directs ou indirects différents par lesquels les virus pourraient induire une démyélinisation ont été postulés (Weiner *et al.*, 1973). De façon directe, un virus peut induire des effets cytopathiques au niveau des oligodendrocytes, qui sont les cellules produisant la myéline, en les infectant. Un virus pourrait également détruire directement la myéline par ses propres protéines. Cependant, un effet indirect provenant du virus et impliquant le système immunitaire est plus plausible. En effet, certains composants du système immunitaire pourraient s'attaquer aux cellules endothéliales qui composent la barrière hémato-encéphalique et donc rendre le SNC vulnérable. Également, il pourrait y avoir l'induction d'une sensibilisation aux antigènes de la myéline suite aux relargage de ceux-ci lors d'une infection et même suite à leur association à des composants de l'enveloppe virale ou à des protéines virales pour former des nouvelles structures immunogéniques (Gonzalez-Scarano et Tyler, 1987).

Tableau IIVirus associés à la sclérose en plaques

Rougeole
Rubéole
Oreillons
Rage
<i>Inflenza type C</i>
<i>Para-influenza type 1</i>
Respiratoire syncitial
Flavivirus
Coronavirus
T-lymphotrope type 1
Cytomégalovirus
Epstein-Barr
Vaccine (variole)
<i>Herpes simplex</i>
Varicelle
HHV-6 (Berardelli, 1997; Akhyani <i>et al.</i> , 2000)

(Modifié de Talbot, 1995)

## 2.5 Coronavirus humains et SEP

L'isolement de deux coronavirus, nommés SD et SK, du SNC de deux patients atteints de la SEP fut un premier indice reliant les coronavirus à cette maladie (Burks *et al.*, 1980). Il y a eu cependant des études qui ont suggéré une origine murine plutôt qu'humaine de ces deux isolats (Weiss, 1983; Fleming *et al.*, 1988). D'autres publications donnent une importance plus directe de l'implication des coronavirus dans la SEP. En effet, des observations ultrastructurales de virus (Tanaka *et al.*, 1976) ainsi que la présence d'anticorps dirigés contre les HCoV (Salmi *et al.*, 1982) furent retrouvés chez les patients souffrant de SEP. De plus, une étude démontre une corrélation significative entre les rhumes et les périodes d'exacerbations de SEP plus élevée (Johnson-Lussenberg et Zheng, 1987). Cette même étude évoque une association entre l'infection par HCoV-229E chez les patients atteints de SEP par rapport aux témoins normaux. De plus, Arbour *et al.* confirma, en 2000, la présence de l'ARN des HCoV dans les cerveaux de gens atteints de SEP.

Plusieurs lignées cellulaires d'origines neurales comme des oligodendrocytes, astrocytes et neurones sont susceptibles aux HCoV-229E et HCoV-OC43 (Talbot *et al.*, 1994 ; Arbour *et al.*, 1999a, Arbour *et al.*, 1999b). En ce qui concerne les HCoV-OC43, une persistance fut même décelée chez des lignées de même type (Arbour *et al.*, 1999b). De plus, les deux sérotypes de coronavirus humains ont la capacité d'infecter des cultures primaires d'astrocytes fœtaux et adultes et de microglies adultes (Bonavia *et al.*, 1997) ainsi que des cellules endothéliales de cerveaux humains (Cabirac *et al.*, 1995).

## 3. Implication des leucocytes dans la pathogenèse virale

### 3.1 Voies d'entrées au système nerveux central (SNC)

Un virus peut se rendre au SNC de plusieurs façons. La capacité qu'ont les virus à accéder au SNC (neuroinvasion) dépend en partie de leur voie d'entrée. Un mécanisme possible de pénétration virale au cerveau est le transport neuronal. En effet, certains neurones, comme les motoneurons de la moëlle épinière, ont les noyaux cellulaires localisés dans le SNC mais leurs prolongements axonaux sont à l'extérieur du SNC. Pour certains virus, comme le virus de la rage, le poliovirus et certains réovirus par exemple,

le transport viral des neurones périphériques aux motoneurones serait la seule chose requise pour initier la neuroinvasion. Ainsi, l'infection directe de ganglions dorsaux par exemple donne directement accès au SNC (Gonzalez-Scarano et Tyler, 1987). Un autre exemple de transport neuronal est observé avec le réovirus mammaire, qui lorsque injecté au niveau du coussinet de la patte chez la souris, est rapidement incorporé par les fibres nerveuses sensorielles et motrices près du site d'inoculation pour être transporté de façon rétrograde vers la moëlle épinière (Flamand *et al.*, 1991) D'autres virus comme le poliovirus et une souche de réovirus peuvent accéder au cerveau par des terminaisons nerveuses se trouvant dans la paroi intestinale (Morrison *et al.*, 1991). Dans certains cas, le nerf olfactif peut également être utilisé pour se rendre au SNC comme peuvent le faire le MHV (Lavi *et al.*, 1988 ; Barnett et Perlman, 1993), le poliovirus, le VSV et le HSV (Anderson et Field, 1982).

Les voies utilisées par des virus retrouvés dans le sang pour accéder au SNC sont parfois très complexes (Johnson, 1982). Une de ces voies est celle d'une infection directe des cellules endothéliales formant la barrière hémato-encéphalique. Ce mécanisme est utilisé par plusieurs virus tels certains picornavirus (Zurbriggen et Fujinami, 1988), certains togavirus comme le Virus de la Forêt de Semliki (Soilu-Hanninen, 1994) et des rétrovirus (Pitts *et al.*, 1987).

Les vaisseaux sanguins du SNC sont séparés du parenchyme du cerveau par la barrière hémato-encéphalique, qui est composée de cellules endothéliales fermement jointes ensemble. Une rupture ou dégradation de cette barrière pourrait également faciliter l'entrée de virus retrouvé libre (virémie) dans la circulation sanguine (Sellers, 1969). Plusieurs molécules peuvent contribuer à ce phénomène comme des métalloprotéases de matrice (MMP) et l'oxyde nitrique (NO) qui seront abordés plus en détail au point 3.2.1. et 3.2.2.

Finalement, un virus peut atteindre le SNC en étant transporté à l'intérieur ou sur des leucocytes circulants. Les mécanismes exact de pénétration des leucocytes circulants infectés dans le parenchyme du cerveau ne sont pas bien connus. On sait cependant

qu'une barrière hémato-encéphalique défectueuse facilite grandement ce phénomène. De plus, ces leucocytes infectés pourraient pénétrer également par diapédèse (Peluso *et al.*, 1985). En effet, ce dernier mécanisme pourrait être aidé par des molécules de surfaces tel le LFA-1 (leucocyte function antigen-1), des molécules d'adhésions ou des intégrines qui se verraient augmentées à la surface des cellules infectées (Attibele *et al.*, 1993 ; Hildreth et Orentas, 1989 ; Rossen *et al.*, 1989). Certaines cytokines surexprimées par certains leucocytes pendant l'infection tels le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , pourraient également faire augmenter le niveau d'expression des molécules d'adhésions sur les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Hess *et al.*, 1996). Ces dernières cytokines peuvent également avoir un effet toxique direct sur les cellules endothéliales si elles sont présentes en trop grandes quantités (Sharma *et al.*, 1992).

### **3.2 Molécules favorisant la dégradation de la barrière hémato-encéphalique**

La barrière hémato-encéphalique protège le cerveau des fluctuations systémiques présentes dans le sang en régulant l'échange de substances entre le système vasculaire et le système nerveux central. Cette barrière physiologique est composée de cellules endothéliales fermement reliées par des jonctions serrées et se voit côtoyée de cellules astrocytaires, de péricytes et de microglies (Riseau et Wolburg, 1990). Plusieurs molécules pro-inflammatoires peuvent contribuer à la rupture de la barrière hémato-encéphalique. Une dégradation de cette barrière mène généralement à un influx de liquides et de protéines dans le tissu cervical (Bradbury, 1993) et facilite l'entrée de leucocytes (Sellers, 1969).

#### **3.2.1 Métalloprotéases de la matrice (MMP)**

Certaines protéases peuvent créer une rupture au niveau de la barrière hémato-encéphalique en dégradant la lamina basale, matrice qui sépare les cellules endothéliales des péricytes et astrocytes adjacents.

Les gélatinases ou collagénases de type IV font parties de la famille des métalloprotéases de la matrice qui regroupe au moins 16 endopeptidases connues (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993 ; Stetler-Stevenson *et al.*, 1996 ; Chambers et Matrisian, 1997). Ces gélatinases

consistent en un enzyme de 72 kDa, la gélatinase A ou proMMP-2 et de 92 kDa, soit la gélatinase B ou proMMP-9. Ces derniers sont des enzymes calcium et zinc-dépendants sécrétés sous forme de zymogènes inactifs étant activés par la suite dans la matrice extracellulaire par différents mécanismes (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993 ). Ils possèdent un résidu cystéine, au niveau d'une chaîne N-latérale, qui est lié à un ion de zinc retrouvé dans le site actif de l'enzyme. Cette liaison zinc-cystéine permet de maintenir la forme latente, alors qu'une perturbation de cette liaison, impliquant un clivage du propeptide, cause un changement conformationnel qui mène à l'activation de l'enzyme (Stetler-Stevenson *et al.*, 1989). Les proMMP-2 et proMMP-9 possèdent donc un poids moléculaire plus élevé que l'enzyme actif respectif (Van Wart et Birkedal-Hansen, 1990). La proMMP-9 est activée par d'autres métalloprotéases comme la MMP-3 (Murphy et Knäuper, 1997), alors que la proMMP-2 se voit activé par des métalloprotéases de la matrice de type membranaire (MT-MMP) (Knäuper et Murphy, 1997). Les MMP peuvent être inhibés par des inhibiteurs naturels de métalloprotéases, soit les TIMP (TIMP-1, -2, -3 et -4) (Gomez *et al.*, 1997) ou synthétiques tel l'EDTA ou la *o*-phénanthroline.

Les MMP-2 et MMP-9 dégradent les collagènes dénaturés (gélatines), les collagènes natifs de type IV, soit le collagène qui est retrouvé dans la plupart des structures membranaires *in vivo*, ainsi que les collagènes natifs de type V comme la vitronectine et l'élastine. De plus, la MMP-2 peut également dégrader la fibronectine, la laminine et des collagènes de types VII et X (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

Les gélatinases sont produites par plusieurs types cellulaires comme les cellules endothéliales, épithéliales et les cellules du système hématopoïétique. Chez les cellules leucocytaires, la sécrétion de gélatinases est variée et peut être modulée par des cytokines, chimiokines et divers facteurs de croissance. Les neutrophiles, par exemple, relarguent la MMP-9 lorsque mis en présence de TNF- $\alpha$  ou d'IL-8 (Borregaard et Cowland, 1997 ; Masure *et al.*, 1991). Cette même MMP est régulée à la hausse chez les monocytes/macrophages par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Welgus *et al.*, 1992). Au niveau des lymphocytes T, l'IL-2 induit la sécrétion de la MMP-2 et régule à la hausse celle de la MMP-9 qui est normalement sécrétée de façon constitutive (Leppert *et al.*, 1995).

Des métalloprotéases de la matrice furent récemment associées à certains désordres neurologiques. En effet, une régulation à la hausse de la MMP-3 et la MMP-9 semble être retrouvée chez des patients atteints de sclérose en plaques (Ozenci *et al.*, 1999). Également des quantités anormalement élevées de MMP-2, MMP-7 et MMP-9 furent retrouvées dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de démence reliée au VIH (Conant *et al.*, 1999). Certains virus ont également la capacité d'induire la sécrétion de gélatinases par des leucocytes qu'ils infectent. Par exemple, des monocytes infectés par le VIH sécrètent une quantité plus importante de MMP-9 (Dhawan *et al.*, 1995). Il est à noter que plusieurs types de MMP peuvent contribuer à la dégradation de la barrière hémato-encéphalique et donc être impliqués dans des neuropathologies. Cependant, les MMP-2 et MMP-9 sont étudiées plus en détails puisque l'approche expérimentale nécessaire à leur identification, soit la zymographie, est relativement simple.

### 3.2.2 Oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO) est un radical libre inorganique produit *in vivo* par une série d'enzymes indépendantes appelés NO synthases. Le NO a plusieurs rôles fondamentaux dans la biologie d'organismes supérieurs (Nathan et Xie, 1994). Par exemple, lorsqu'il est généré par la synthase de NO qui est constitutivement exprimée par les cellules endothéliales (ecNOS), il est un composant essentiel des mécanismes de signalisations contrôlant la vasodilatation. Dans le SNC, le NO sécrété par certains neurones par un autre enzyme exprimé constitutivement, fonctionne comme intermédiaire dans la neurotransmission (Snyder et Brecht, 1992 ; Schmidt et Walter, 1994). Même si le NO a d'importants rôles physiologiques dans le SNC, il peut également médier la neurotoxicité dans plusieurs pathologies. Une NO synthase inductible (iNOS) peut également être présente dans plusieurs types cellulaires pour la production d'oxyde nitrique.

Certaines cellules du système immunitaire, lorsque activées ou infectées, peuvent générer de l'oxyde nitrique qui, étant donné ses effets toxiques propres ou à ceux de ses dérivés, induit des dommages tissulaires (Rubbo *et al.*, 1996). Certaines bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* (Jagannath *et al.*, 1998) ou certains virus comme HSV-2

(Baskin *et al.*, 1997) peuvent induire la production de NO dans des macrophages. Ainsi, ces cellules pourraient participer au dérèglement de la barrière hémato-encéphalique.

### **3.3 Implication des leucocytes chez le VIH**

La pénétration du VIH dans le cerveau est l'événement crucial dans la neuropathologie qui est associée à ce virus, soit la démence du neuro-SIDA. Les mécanismes cellulaires entourant cette neuropathologie sont complexes et peu définis.

Le VIH semble accéder au SNC par l'infiltration de lymphocytes T infectés (Williams et Hickey, 1995) ou monocytes infectés (Nottet *et al.*, 1996 ; Persidsky *et al.*, 1999). Ces cellules peuvent adhérer à l'endothélium du cerveau (Nottet *et al.*, 1996) et migrer à travers la barrière hémato-encéphalique pour fréquemment se retrouver dans l'espace périvasculaire des vaisseaux sanguins du cerveau. Ce passage de leucocytes infectés au cerveau est également démontré par des expériences effectuées *in vitro* (Persidsky *et al.*, 1999). De façon alternative, les cellules endothéliales peuvent être infectées par le VIH et pourraient transmettre le virus aux astrocytes, qui sont les cellules nourricières du cerveau qui sont en contact direct avec la barrière hémato-encéphalique (Brack-Werner, 1999). Le VIH peut également accéder au cerveau par les fenestrations de l'endothélium capillaire ou passer à travers les cellules endothéliales sans toutefois les infecter (Bomsel, 1997). Ce virus pourrait même se rendre au SNC en passant par le liquide céphalo-rachidien (Schmid *et al.*, 1994).

Le macrophage et le monocyte infectés sont intimement liés dans la neuropathogénèse et restent la voie principale de passage viral au cerveau. Il est suggéré que les monocytes infectés sont les principaux agents de dissémination du virus aux lymphocytes T puisque ces deux types cellulaires sont en contact lors de la présentation d'antigènes (Pauza, 1988). Le recrutement de phagocytes mononucléés dans le cerveau pendant la maladie gouverne la progression de la neuropathologie. Cependant, les mécanismes responsables de cette migration de leucocytes infectés au SNC sont mal connus. Il est connu que les monocytes/macrophages servent de réservoir pour le VIH en contenant les virions dans des vacuoles intracytoplasmiques et procurant ainsi aux virus un moyen d'échapper à la

surveillance immunitaire (Burke *et al.*, 1985). Le cycle de réplication du virus est régulé par des facteurs physiologiques impliqués dans la maturation et la différenciation des leucocytes à partir de leurs précurseurs dans la moëlle épinière (Nottet *et al.*, 1996).

### 3.4 Différenciation et activation

La différenciation est un phénomène normal du processus de développement et du maintien de l'homéostasie cellulaire et reflète généralement une expression altérée du potentiel génétique de la cellule (Duan *et al.*, 1997). *In vitro*, des esters de phorbols tel le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ont la capacité d'induire une différenciation complète de monocytes en macrophages (Auwerx, 1991 ; Auwerx *et al.*, 1992). Une différenciation induite chimiquement par le PMA fonctionne en activant la protéine kinase C (PKC) et ressemble à une différenciation ayant normalement lieu *in vivo* (Livneh et Fishman, 1997 ; Nishizuka, 1995).

Le stade de différenciation de la cellule monocyttaire est, dans certains cas, très important pour la susceptibilité virale. Par exemple, la réplication du VIH-1 augmente dans des lignées promyélocytaires une fois ces cellules différenciées par un ester de phorbol (Folks *et al.*, 1988). Le même phénomène est observé pour le cytomégalo virus humain (Weinshenker *et al.*, 1988). L'effet contraire est observé chez le PRRSV (Duan *et al.*, 1997), chez le virus de la rougeole (Helin *et al.*, 1999) et le poliovirus (Roivainen et Hovi, 1989) par exemple, où la différenciation de cellules monocyttares bloque la réplication virale.

Un autre phénomène induisant des changements phénotypiques et fonctionnels aux cellules est l'activation. *In vivo*, la plupart des lymphocytes existent dans le stade G0, soit dans un stade de repos, ayant très peu de cytoplasme et une activité métabolique très faible. Rare sont les virus qui peuvent infecter ces cellules, cependant, l'exposition de ces lymphocytes à des agents activateurs pourrait changer leurs susceptibilité face à certains virus. Le VSV par exemple réussit à infecter des lymphocytes B de façon beaucoup plus productive lorsque ceux-ci sont préalablement activés par le PMA/Ionomycine *in vitro* (Schmidt *et al.*, 1994).



# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **1. LIGNÉES HUMAINES**

### **1.1 Lignées leucocytaires humaines**

#### **1.1.1 Monocytes**

La lignée THP.1 est issue d'un clonage de cellules isolées d'une leucémie monocyttaire aiguë (ATCC, Manassas, VA). La lignée promonocytaire U-937 (ATCC) provient d'un lymphome histiocytique et fut produite en 1976 par Sundstrum et Nilsson. La lignée HL-60 (ATCC) a été initialement obtenue dans le laboratoire de Collins (1997) du clonage de cellules isolées d'une leucémie promyélocytique aiguë. Les lignées THP.1 et U-937 nous ont été fournies par le laboratoire de Dr. Daniel Oth de l'INRS-Institut Armand-Frappier et la lignée HL-60 du laboratoire du Dr. Mathieu Cellier de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

#### **1.1.2 Lymphocytes T**

La lignée H9 dérive d'un lymphome humain. La lignée Jurkat, clone E6-1, est issue d'une leucémie aiguë (ATCC). Les lignées MT-2 et MT-4 proviennent leucémies de cellules T. Ces quatre lignées lymphocytaires nous ont été fournies par le Dr. Mark Wainberg de l'Institut de recherche Lady Davis à l'Hôpital Juif de Montréal, associé à l'Université McGill.

#### **1.1.3 Lymphocytes B**

La lignée Raji fut établie d'un lymphome de Burkitt et fut offerte par le Dr. Val Micusan, ancien chercheur de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

### **1.2 Autres lignées humaines**

#### **1.2.1 Adénocarcinome iléorectal humain**

Les cellules HRT-18 furent établies par Tompkins *et al.* en 1974 et servent depuis entre autre pour la production du coronavirus humain OC43 (Weiss, 1983). Cette lignée a servi lors du test d'immunoperoxydase indirecte pour déterminer le nombre de particules virales infectieuses (sérotypé OC43) produit par les cellules leucocytaires étudiées. Ces cellules furent obtenues du Dr. David Brian de l'Université du Tennessee à Knoxville, États-Unis.

### **1.2.2 Fibroblastes pulmonaires d'embryons humains**

Les cellules L132 furent obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC). Cette lignée est connue comme étant susceptible au coronavirus humain 229E (Bradburne, 1969) et sert donc à la production de ce virus. Cette lignée a servi lors de l'essai d'immunoperoxydase indirect afin de déterminer le nombre de particules virales infectieuses (sérotypé 229E) produit par les cellules leucocytaires étudiées.

### **1.2.3 Culture cellulaire**

Toutes les lignées étaient maintenues dans une étuve à une température de 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub> (v/v) (Forma Scientific, Ohio, USA). Le milieu de culture pour les lignées leucocytaires était du RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, New York, USA) additionné de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (P.A. Biologicals Co, Sidney, Australia), de 50 µg/mL de gentamicine (Gibco BRL) et de 2-mercaptoéthanol 2x10<sup>-5</sup> M pour les lignées monocytaires.

Les lignées HRT-18 et L-132 étaient conservées dans un milieu constitué de moitié de «Earle's Minimum Essential Medium» (MEM) (Gibco BRL) et de moitié de 199 Hank (Gibco BRL) additionné de 1,7% (v/v) de bicarbonate de sodium (Gibco BRL), de 50 µg/mL de gentamicine (Gibco BRL) et de 5% (v/v) ou 10% (v/v) de SVF (P.A. Biologicals Co) pour L-132 et HRT-18 respectivement.

## **2. CORONAVIRUS HUMAINS**

### **2.1 Coronavirus humain OC43**

Le sérotypé HCoV-OC43 (ATCC) fut initialement isolé d'un patient atteint d'un rhume (McIntosh et al., 1967). Les virus utilisés lors des expériences furent issus du quatrième et cinquième passage sur la lignée HRT-18 et avaient un titre viral d'environ 5,5 x 10<sup>6</sup> DICT<sub>50</sub>/mL lorsque titré par essai d'immunoperoxydase indirecte.

## 2.2 Coronavirus humain 229E

Le sérotype HCoV-229E (ATCC) provient d'un patient atteint d'une infection des voies respiratoires supérieures (Hamre et Procknow, 1966). Le stock viral utilisé lors des expériences fut issu du troisième passage sur la lignée L-132 et avait un titre viral d'environ  $5,5 \times 10^6$  DICT<sub>50</sub>/mL lorsque titré par essai d'immunoperoxydase indirecte.

## 3. Production de fragments F(ab')<sub>2</sub>

La production de fragments F(ab')<sub>2</sub> fut nécessaire suite à la constatation d'un niveau trop élevé de bruit de fond due à la présence d'attachement non-spécifique via les récepteurs Fc des anticorps complets, surtout lors des expériences de cytométrie en flux. Un blocage de récepteurs à la surface des cellules n'a pas résolu le problème d'attachement non spécifique.

Une solution de 1 mg/mL de pepsine (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) fut donc préparée dans du tampon citrate 0,1 M pH 3,5. L'échantillon d'anticorps, préalablement purifié par chromatographie standard sur colonne de Protéine-A-Sepharose (Manil *et al.*, 1986), fut acidifié à pH 3,5 avec du tampon acide citrique 0,01M (pH 2,8), additionné de 100 unités enzymatiques de pepsine/mg et placé dans un bain-marie à 37°C. Le temps optimal de digestion fut déterminé par un essai préliminaire où la digestion fut arrêtée à différents temps. La réaction enzymatique fut ensuite neutralisée par du Tris-HCl 3M (pH 8,8) pour obtenir une concentration finale de 0,3 M Tris-HCl. L'échantillon fut purifié sur une colonne de Protéine A-Sepharose. Les fractions contenant les F(ab')<sub>2</sub> furent récupérées alors que les portions Fc seules où encore liées à un anticorps complet restèrent liées à la colonne. Les fractions contenant les F(ab')<sub>2</sub> furent mises ensembles et dialysées contre du PBS (KCl 2,68mM, NaCl 137mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM) pour être ensuite concentrées avec du carboxyméthylcellulose-sels de Na (Aquacide II; Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA, USA). Les F(ab')<sub>2</sub> furent quantifiés par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) qui consiste en la lecture de la densité optique par lecteur d'absorbance ELISA (STL-labinstruments, Autriche). Le test colorimétrique est mis au point par Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### **4. Étude de la susceptibilité des lignées leucocytaires**

##### **4.1 Détection d'ARNm viral**

###### **4.1.1 Infection des cellules en vue d'une extraction d'ARNm**

Les cellules furent comptées suite à un brassage léger des flacons afin de les dissocier et  $9 \times 10^6$  cellules furent centrifugées pendant 7 minutes à 1000 rpm (GS-6R Centrifuge ; Beckman, Palo Alto, CA, USA). Celles-ci furent ensuite mises en contact avec l'une ou l'autre des souches virales à une multiplicité d'infection de 1,0, avec l'addition de trypsine TPCK (Sigma) à 10 unités/mL pour le HCoV-OC43. Il est à noter qu'une MOI de 1,0 fut choisie suite à des expériences préliminaires effectuées avec différentes MOI, soit de 0,1, 1,0 et 3,0. Les meilleurs résultats furent obtenus avec la MOI de 1,0. De plus, des expériences préliminaires, également faits avec et sans trypsine TPCK, nous ont confirmé que la présence de cet enzyme fut importante dans l'infection (voir section 2.2 dans les résultats). Le contact entre cellules et virus s'effectuait dans un Pétri de 6 cm de diamètre (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ., USA) pendant 5 heures à 33°C 5% (v/v) CO<sub>2</sub> avec agitations régulières. Suite à trois lavages effectués dans du milieu RPMI 1640 complet sans SVF (Gibco BRL) les cellules furent transférées dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup> pour cellules en suspension (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) contenant 30 mL de milieu. Il y a eu récolte des cellules à différents temps correspondant à 1, 4 et 7 jours post-infection puis lavage de celles-ci de 5 à 8 fois au PBS afin de se débarrasser de tout virus extracellulaire. Les témoins non infectés furent obtenus en effectuant les mêmes manipulations sauf que l'incubation initiale de 5 heures s'effectuait en présence de milieu et non pas de virus. Des témoins à 4°C furent également produits en effectuant les mêmes manipulations sur glace. Ces témoins à 4°C nous ont permis de s'assurer que le virus détecté par le test n'était pas que du virus attaché à la surface des cellules de façon non spécifique puisque aucune réplication virale ne peut s'effectuer à cette basse température.

###### **4.1.2 Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)**

La première paire d'amorces utilisées pour le RT-PCR comportait les amorces E7 et E9 décrites par Arbour *et al.* (1999a). Celles-ci sont des oligonucléotides de 20 pb (20-mers) ayant 55% de GC et une T<sub>m</sub> de 59°C. E7 correspondait aux nucléotides 819 à 838 sur

l'ARNm 7 codant pour la protéine de la nucléocapside (N) du HCoV-229E (Schreiber *et al.*, 1989) et fut utilisé lors des PCR. La séquence de E7 était 5'-TCTGCCAAGAGTCTTGCTCG-3'. E9, quant à elle, correspondait aux nucléotides 1035 à 1054 sur l'ARNm 7 codant pour la protéine de la nucléocapside (N) du HCoV-229E et fut utilisé lors des réactions de RT et de PCR. La séquence de E9 était 5'-AGCATAGCAGCTGTTGACGG-3'.

La deuxième paire d'amorces, soit O1 et O3, était préalablement définie par Stewart *et al.*, (1992). Celles-ci représentaient des oligonucléotides de 24 pb (24-mers) ayant 54 % de GC et une Tm de 66°C et 65°C. O1 correspondait aux nucléotides 215 à 238 sur l'ARNm 7 codant pour la protéine de la nucléocapside du HCoV-OC43 (Kamahora *et al.*, 1989) et fut utilisé lors des PCR. Sa séquence était 5'-CCCAAGCAAAGTCTACCTCTCAG-3'. O3, quant à lui, comportait les nucléotides 497 à 520 sur l'ARNm 7 codant pour la protéine de la nucléocapside (N) du HCoV-OC43 et fut utilisé lors des RT-PCR. La séquence de O3 était 5'-GTAGACTCCGTCAATATCGGTGCC-3'.

Pour la RT, 5 µg d'ARN cellulaire total, préalablement extrait en utilisant le phénol et la guanidine isothiocyanate (TRIzol™; Gibco BRL), fut combiné à 40 pmol d'amorces inverses complémentaires, complété dans un volume total de 29 µL avec de l'eau. Cette réaction eu lieu dans des tubes pour PCR (Sarstedt, Ville St-Laurent, Qc., Canada) avec une incubation de 5 minutes à 65°C, suivi d'un lent refroidissement jusqu'à 37°C (pour briser les structures secondaires et permettre l'attachement des amorces) dans un thermocycleur (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA). Après refroidissement sur glace, 21 µL de mélange pour la transcription inverse (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) fut ajouté. Ce mélange contenait 50 U de transcriptase inverse Expand™ Moloney murine leukemia virus (Mo-MuLV-RT), 60 U d'inhibiteur d'ARNases RNA Guard™, 0,4 mM de déoxynucléotides triphosphates (dNTP)-sel de Na, tampon RT [50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 40mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% (v/v) Tween-20], 10 mM de dithiothréitol (DTT). Une incubation de 90 minutes à 37°C fut ensuite effectuée.

Pour le PCR, un cinquième (25  $\mu$ L) de l'ADN complémentaire fut utilisé avec 75  $\mu$ L de mélange à PCR (Roche Diagnostics). Ce mélange contenait le tampon fourni par la compagnie (10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl), 0,4 mM de dNTP-sels de Li, 2mM  $MgCl_2$  et 50 pmol de chaque amorce pour HCoV-229E et 20 pmol de chaque amorce pour HCoV-OC43. Cette solution fut placée dans le thermocycleur pour subir une incubation de 5 minutes à 94°C, puis 5 minutes à 60°C. Par la suite, 2,5 U d'ADN polymérase Expand™ high-fidelity PCR system (Roche Diagnostics) fut ajouté avant que le thermocycleur effectue 30 cycles de 2 minutes à 72°C, 1 minute à 94°C et 2 minutes à 60°C. Une incubation finale de 10 minutes à 72°C fut effectuée avant de conserver le tout à 4°C.

Les produits de PCR furent déposés sur gel d'agarose 1,5% (p/v) additionné de bromure d'éthidium (EtBr) 1  $\mu$ g/mL, puis soumis à une migration sous un voltage de 120 V. Les bandes représentant les amplicons d'ADN furent visualisées en utilisant le IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, CA, USA).

## **4.2 Détection de protéines virales**

### **4.2.1 Infection des cellules leucocytaires en vue d'une analyse en cytométrie en flux**

Les cellules furent comptées suite à un brassage léger des flacons afin de les dissocier et  $9 \times 10^6$  cellules furent centrifugées pendant 7 minutes à 1000 rpm (GS-6R Centrifuge : Beckman). Celles-ci furent ensuite mises en contact avec l'une ou l'autre des souches virales à une multiplicité d'infection de 1,0 avec l'addition de trypsine TPCK (Sigma) à 10 unités/mL pour le HCoV-OC43. Le contact entre cellules et virus s'effectuait dans un Pétri de 6 cm de diamètre (Becton Dickinson) pendant 5 heures à 33°C 5% (v/v)  $CO_2$  avec agitations régulières. Suite à trois lavages effectués dans du milieu RPMI 1640 complet sans SVF (Gibco BRL), les cellules furent transférées dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup> pour cellules en suspensions (Corning Costar Corporation) contenant 30 mL de milieu. Il y a eu récolte des cellules à différents temps correspondant à 1, 4 et 7 jours post-infection. Les témoins non infectés furent obtenus en effectuant les mêmes manipulations sauf que l'incubation initiale de 5 heures s'effectuait en présence de milieu et non pas de virus. Des témoins à 4°C furent également produits en effectuant les mêmes manipulations sur

glace cependant seulement  $3 \times 10^6$  cellules furent mises en contact avec le virus pendant 5 heures.

#### **4.2.2 Préparation des cellules en vue de l'analyse des protéines virales en surface cellulaire par cytométrie en flux**

La préparation des cellules pour la cytométrie en flux fut effectuée au moment de la récolte des lignées cellulaires préalablement infectées. Un marquage indirect des protéines virales en surface fut effectué dans des tubes pour cytométrie en polystyrène à fond rond (Becton Dickinson) en incubant  $1 \times 10^6$  cellules dans un volume de 50  $\mu\text{L}$  de PBS. Après un lavage au PBS, les cellules furent fixées pendant une heure à température pièce, à l'aide d'une solution de PBS contenant 2% (p/v) de paraformaldéhyde à pH 7.2 diluée 1/8 dans un volume de 1 mL. Suite à un autre lavage au PBS, 10  $\mu\text{L}$  des anticorps monoclonaux  $\text{F(ab')}_2$  ou des témoins isotypiques correspondants furent ajoutés au culot cellulaire et une incubation de 30 minutes à 4°C suivit. L'anticorps 5-11H.6, utilisé à une concentration optimisée de 1  $\mu\text{g}$  pour  $1 \times 10^6$  cellules sert pour la détection de la protéine S des HCoV-229E alors que l'anticorps 1-10C.1, à une même concentration, fut utilisé pour détecter la protéine S des HCoV-OC43. Les anticorps 5-11H.6 et 1-10C.1 furent produits dans notre laboratoire à partir de souris BALB/c immunisées par HCoV-229E ou HCoV-OC43. Afin de se débarrasser des anticorps libres, trois lavages au PBS ont précédé une deuxième incubation de 30 minutes, à 4°C et à la noirceur, avec 10  $\mu\text{L}$  par tube de  $\text{F(ab')}_2$  de chèvre dirigé contre les IgG de souris couplé à la phycoérythrine (DAKO Diagnostics Canada Inc, Mississauga, Ontario, Canada) utilisé à 1  $\mu\text{g}$  par tube. Suite à trois autres lavages au PBS, les cellules furent analysées à l'aide d'un cytomètre Coulter EPICS XL-MCL.

#### **4.2.3 Préparation des cellules en vue de l'analyse des protéines virales intracellulaires par cytométrie en flux**

La préparation des cellules pour la cytométrie en flux fut encore une fois effectuée au moment de la récolte des lignées cellulaires préalablement infectées. Un marquage indirect des protéines virales en surface fut effectué dans des tubes falcon pour la

cytométrie en polystyrène à fond rond (Becton Dickinson) en incubant  $1 \times 10^6$  cellules dans un volume de 50  $\mu\text{L}$  de PBS. Après un lavage au PBS, les cellules furent fixées pendant une heure à température pièce, à l'aide d'une solution de PBS contenant 2% (p/v) de paraformaldéhyde à pH 7,2 diluée 1/8 dans un volume de 1 mL. Suite à un lavage au PBS, 1mL d'une solution de PBS contenant 0,3% (p/v) de saponine (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA) fut utilisé afin de perméabiliser les cellules pendant 15 minutes à 37°C. Toutes les manipulations qui suivirent furent effectuées à 4°C. Un lavage au PBS contenant 0,1% (p/v) de saponine (ICN Biomedicals) fut effectué avant d'ajouter l'AcMo ou du témoin isotypique correspondant, pendant 30 minutes à 4°C.

L'Ac F(ab')<sub>2</sub> 5-11H.6 fut utilisé pour la détection de la protéine S de HCoV-229E et 1-10C.1 pour la protéine S de HCoV-OC43. Puisque ces deux anticorps sont des IgG1, 5-11H.6 fut utilisé comme témoin isotypique pour 1-10C.1 et vis-versa. En ce qui concerne la détection de la protéine N de HCoV-OC43, l'Ac F(ab')<sub>2</sub> 4-E11.3, un IgG1, fut utilisé puis 5-11H.6 comme témoin isotypique correspondant. Ces anticorps furent dilués avec la solution de lavage contenant 0,1% (p/v) de saponine à 0,1  $\mu\text{g}$  pour  $1 \times 10^6$  cellules dans un volume de 10 $\mu\text{L}$  par tube. Suite à trois autres lavages avec la solution de PBS-0,1% (p/v) saponine, 1 $\mu\text{g}$  par tube d'un anticorps monoclonal F(ab')<sub>2</sub> de chèvre dirigé contre les IgG de souris et couplé à la phycoérythrine (DAKO Diagnostics Canada) fut ajouté aux cellules pour 30 minutes à 4°C. Les tubes furent ensuite lavés deux fois avec la solution de lavage utilisée précédemment afin d'enlever le conjugué en surplus puis trois fois avec du PBS pour se débarrasser de la saponine avant l'analyse des cellules à l'aide d'un cytomètre Coulter EPICS XL-MCL.

### **4.3 Détection de virus infectieux**

#### **4.3.1 Infection des lignées en vue d'un test d'immunoperoxydase indirecte**

Les cellules furent comptées suite à un brassage léger des flacons afin de les dissocier et 4,5 x 10<sup>6</sup> cellules furent centrifugées pendant 7 minutes à 1000 rpm (GS-6R Centrifuge ; Beckman). Celles-ci furent ensuite mises en contact avec l'une ou l'autre des souches virales comme décrit à la section 4.1.1. Suite à trois lavages effectués dans du milieu RPMI 1640 complet sans SVF (Gibco BRL), les cellules furent réparties en trois Pétris correspondant chacun à un temps d'incubation différent, soit 1, 4 et 7 jours post-infection

pour ensuite être incubées dans un volume final de 6 mL à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Le Pétri «1 jour» recevait 2 x 10<sup>6</sup> cellules, celui correspondant à 4 jours recevait 1,5 x 10<sup>6</sup> cellules et celui correspondant à 7 jours, 1 x 10<sup>6</sup> cellules. Cette répartition permettait de prévoir la croissance des cellules afin que le nombre de cellules à la récolte soit quasi-semblable.

Au moment des récoltes, les cellules furent comptées puis centrifugées pendant 7 minutes à 1000 rpm (GS-6R Centrifuge ; Beckman). Le surnageant fut conservé pour le test d'immunoperoxydase extracellulaire. Le culot cellulaire subit trois lavages au PBS avant d'être resuspendu dans 6 mL de RPMI 10% (v/v) SVF et de subir trois cycles de congélations-décongélations afin de récupérer les virions intracellulaires. Les surnageants provenant du contenu cytoplasmique furent conservés en vue du test d'immunoperoxydase intracellulaire. Les témoins non infectés furent obtenus en effectuant les mêmes manipulations sauf que l'incubation initiale de 5 heures fut effectuée en présence de milieu. Des témoins à 4°C furent également produits en effectuant les manipulations sur glace. Pour ces derniers témoins, seulement 3 x 10<sup>6</sup> cellules furent cependant mises en contact avec le virus pendant 5 heures et suite aux trois lavages, le culot de cellules seulement fut traité pour récolter les virions cytoplasmiques.

#### **4.3.2 Immunoperoxydase indirecte**

Cette technique est utilisée pour mesurer la production de virus infectieux par les lignées cellulaires. Des cellules déjà connues comme étant susceptibles aux HCoV furent placées au fond de 96 puits Linbro (ICN Biomedicals). La lignée HRT-18 fut utilisée pour mesurer le HCoV-OC43 et la lignée L132 pour mesurer le HCoV-229E. Les échantillons furent dilués en série dans un volume de 100 µL/puits sur le feuillet semi-confluent de cellules susceptibles. Le milieu utilisé fut le même qu'utilisé lors de la production des HCoV sur les lignées susceptibles correspondantes, soit du moitié-moitié 1% (v/v) SVF (P.A. Biologicals) additionné ou non de trypsine TPCK (Sigma) 10U/mL. Après une incubation de 2 heures à 33°C 5%CO<sub>2</sub>, 100µL de milieu moitié-moitié 1% (v/v) SVF fut ajouté à chaque puits. Après 4 ou 5 jours d'incubation à 33°C 5% (v/v) CO<sub>2</sub> les cellules furent lavées avec du PBS puis fixées pendant 20 minutes avec une solution de peroxyde d'hydrogène 0,3 % (v/v) (Sigma) dans du méthanol 100%. Celles-ci furent ensuite

séchées à l'air puis lavées une fois au PBS avant d'être mises en contact avec l'ascite de souris anti-viral 5-11H.6 pour HCoV-229E dilué 1/500 et 1-10C.1 pour HCoV-OC43 dilué 1/200. Les cellules furent incubées pendant 2 heures à 37°C avec 5% (v/v) CO<sub>2</sub> suivi de 5 lavages au PBS. Un second anticorps de chèvre conjugué à la peroxydase de Raifort et dirigé contre les IgG de souris (KPL, Rockwood, Ontario, Canada) dilué 1/500 fut ajouté puis une incubation de 2 heures à 37°C sans CO<sub>2</sub> suivit. La réaction fut révélée avec 0,025% (p/v) DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Bio-Rad), additionné de 0,01% (v/v) peroxyde d'hydrogène. La réaction enzymatique fut finalement arrêtée par addition d'eau. Le titre viral fut calculé par la méthode de Kärber (Payment et Pavilanis, 1980) suite à l'observation colorimétrique au microscope optique. Le virus seul fut utilisé comme témoin positif alors que le milieu seul fut utilisé comme témoin négatif.

#### **4.4 Détection d'aminopeptidase-N**

L'aminopeptidase-N ou CD13 fut analysé par cytométrie en flux sur toutes les lignées afin de pouvoir corrélérer sa présence avec l'infection par les HCoV-229E.

Un marquage direct de l'aminopeptidase-N à la surface cellulaire fut effectué dans des tubes pour cytométrie en polystyrène à fond rond (Becton Dickinson) en incubant  $1 \times 10^6$  cellules dans un volume de 50 µL de PBS par tube. Après un lavage au PBS, 20 µL d'Ac F(ab')<sub>2</sub> anti-CD13 couplé à la phycoérythrine (Pharmingen, Becton Dickinson) ou le témoin isotypique correspondant, soit un Ac F(ab')<sub>2</sub> IgG1 couplé à la phycoérythrine (Pharmingen, Becton Dickinson) utilisé à 1 µg par tube fut ajouté aux cellules et une incubation de 30 minutes à 4°C à la noirceur suivit. Afin de se débarrasser des anticorps libres, trois lavages au PBS furent effectués puis les cellules furent analysées à l'aide d'un cytomètre Coulter EPICS XL-MCL.

## **4.5 Caractérisation de l'infection de la lignée promonocytaire THP.1 par les HCoV**

### **4.5.1 Métalloprotéases de la matrice**

La sécrétion et les activités gélatinases de MMP-2 et MMP-9 furent détectées par zymographie à base de gélatine en utilisant une version modifiée de la méthode de Heussen et Dowdle (1980).

Les échantillons de surnageants cellulaires furent recueillis de cellules infectées ou non et mises en culture à différents temps dans du milieu sans SVF. Un échantillon de cellules, à  $0,5 \times 10^6$  cellules/mL, fut également mis en contact avec une concentration finale de 100 ng/mL de PMA (phorbol myristate acétate) (Sigma) afin de servir de témoin positif. Il est à noter que la trypsine ne fut pas utilisée lors des infections par HCoV-OC43 puisque cet enzyme a également un potentiel de dégradation de gélatine. Tous les échantillons furent concentrés 10 fois par ultracentrifugation en utilisant des filtres à centrifuger Centricon® YM-50 (Amicon, Millipore Corporation, Bedford, MA). Une normalisation des échantillons fut ensuite faite par rapport au nombre de cellules comptées lors de la prise de l'échantillon. Un dosage de protéines selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) fut également effectué sur les échantillons récoltés.

Par la suite, les surnageants furent incubés avec 5  $\mu$ L de tampon d'échantillon [4% (v/v) saccharose (Anachemia, Montréal, Qc, Canada), 10% (p/v) SDS (Gibco BRL) et 0,1% (p/v) bleu de bromophénol (Bio-Rad)] pendant 15 minutes à 37°C pour ensuite être déposés sur un gel d'acrylamide 9 % (p/v) contenant 0,4% (p/v) de gélatine. L'électrophorèse fut effectuée en utilisant un système électrophorétique (Bio-Rad) sous voltage constant de 100 volts pour environ 3 heures à température pièce. Les gels furent ensuite lavés deux fois pendant 15 minutes sous agitation avec une solution de 2,5% (v/v) Triton X-100 (Bio-Rad) afin d'éliminer le SDS et permettre aux enzymes de se renaturer avant d'être incubés dans un tampon d'activation (15mM CaCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-base, pH 7,4) pour 18 heures sous agitation et à température pièce. Les zymogrammes furent ensuite révélés avec une solution de coloration [0,1% (p/v) bleu de Coomassie (Bio-Rad) dans une solution acide acétique: méthanol (1:3)] pendant 30 minutes sous agitation, puis

décolorés [acide acétique: méthanol (1:3)] jusqu'à l'apparition de bandes blanches de dégradation de gélatine sur fond bleu. Des standards de protéines pré-colorés («broad range») (Bio-Rad) furent utilisés pour déterminer les masses moléculaires des gélatinases. Les bandes furent visualisées en utilisant le IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, CA, USA) et semi-quantifiés par densitométrie (AlphaImager™ software, Canberra Packard Canada). De plus, des gels similaires faits de façon parallèles furent incubés dans un tampon d'activation contenant 10mM EDTA (Sigma), un inhibiteur spécifique de gélatinases/type IV Ca<sup>2+</sup>-dépendantes afin de confirmer la spécificité des activités observées.

#### **4.5.2 Oxyde nitrique**

La production de NO<sub>2</sub> fut évaluée dans le surnageant de culture en utilisant le réactif de Greiss selon le protocole conseillé (Sigma) afin de déterminer la production d'oxyde nitrique par les cellules (Green *et al.*, 1982). Les surnageants de cellules promonocytaires THP.1, non infectées ou infectées par l'un ou l'autre des HCoV ainsi que les témoins négatifs et positifs, furent distribués dans des plateaux 96-puits Linbro (ICN Biomedicals) et additionnés d'un volume équivalent de réactif. Suite à une période d'incubation de 15 minutes à la noirceur, l'absorbance fut mesuré à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA (BIO-TEK Instruments, Burlington, VT, USA). La concentration micromolaire du NO<sub>2</sub> fut déterminé à l'aide d'une courbe standard de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) et le bruit de fond fut soustrait des données en utilisant du milieu acellulaire.

### **5. Différenciation**

#### **5.1 Différenciation des lignées monocytaires en macrophage et leur infection**

Les lignées monocytaires furent comptées suite à un brassage léger des flacons afin de les dissocier et 15x10<sup>6</sup> cellules furent centrifugées pendant 7 minutes à 1000 rpm (GS-6R Centrifuge ; Beckman). Celles-ci furent ensuite mises en contact avec une concentration finale de 100 ng/mL de PMA (phorbol myristate acétate) (Sigma) dans un volume de 30 mL de milieu RPMI 1640 (Sigma) complétement de 10% (v/v) de SVF (P.A. Biologicals) dans un Pétri de 15 cm de diamètre (Nunc, Roskilde, Denmark). Des Pétris semblables furent également préparés en parallèle pour servir de témoins non infectés et infectés à

4°C. Également de façon parallèle, un Pétri sans l'ajout de PMA fut préparé. La différenciation de monocytes en macrophages fut complète après 24 heures et confirmée de façon qualitative en observant l'adhérence des cellules macrophagiques par microscopie optique inverse (Diaphot-TMD; Nikon, Tokyo, Japan). Également, la présence d'aminopeptidase-N fut analysée à la surface cellulaire par cytométrie en flux (détaillé à la section 4.4) suite à un décollage des cellules avec une solution d'EDTA 0,4 mM (Sigma) pour 10 minutes à 37°C.

Suite à la différenciation, les cellules adhérentes furent mises en contact avec une concentration virale permettant une MOI de 1,0 avec ou sans la trypsine TPCK (Sigma) selon la souche virale étudiée. Les cellules étaient incubées pendant 5 heures à 33°C ou à 4°C et soumises à des agitations régulières. Les cellules maintenant macrophagiques subissaient trois lavages dans du RPMI 1640 (Gibco BRL) complet sans SVF avant d'être remises en culture pour différents temps, soit 1, 4 et 7 jours, dans leur milieu habituel avec ou sans TPCK.

La cytométrie en flux détaillée à la section 4.2 permet l'analyse des protéines virales S de surface et intracellulaire pour les deux sérotypes de HCoV et N intracellulaire pour HCoV-OC43. Afin d'analyser les cellules par cytométrie, une étape préalable de décollage des cellules fut fait à l'aide d'une solution d'EDTA 0,4 mM (Sigma). De plus, un témoin positif utilisant des cellules adhérentes fut utilisé, soit les cellules HRT-18 infectées par HCoV-OC43 ou L-132 infectées par HCoV-229E.

L'immunoperoxydase indirecte détaillée à la section 4.3 quantifiait des virions produits par les cellules infectées.

## **5.2 Différenciation de certaines lignées monocytaires en neutrophiles**

Les cellules de la lignée promonocytaire HL-60 ont des caractéristiques promonocytaires. Cependant, elles possèdent également un potentiel double de différenciation. En effet, elles peuvent se différencier en macrophages lorsque mises en présence d'esters de

phorbols tels le PMA ou en neutrophiles lorsque mises en présence de DMSO (diméthylsulfoxyde).

Les cellules furent initialement passées à  $0,3 \times 10^6$  cellules /mL et resuspendues dans du RPMI 1640 (Sigma) complet contenant 10% (v/v) SVF (P.A. Biologicals), complété de 1,25% (v/v) DMSO (Sigma). Au troisième jour de la différenciation, les cellules furent repassées à  $0,5 \times 10^6$  cellules /mL et resuspendues dans le même milieu avec 1,25% de DMSO. Au cinquième jour de différenciation, les cellules furent passées à  $1 \times 10^6$  cellules /mL toujours dans le même milieu et au sixième jour, les cellules étaient normalement différenciées. Il fut important d'effectuer un comptage cellulaire à chaque jour de leur différenciation afin de vérifier que leur croissance ne ralentissait pas et qu'elles n'atteignaient jamais  $1 \times 10^6$  cellules/mL.

L'analyse de pourcentage de monocytes différenciées en neutrophiles fut effectuée par un test NBT. Ce test consistait à mettre les cellules en contact avec le NBT (nitrobleu tetrazolium) afin de déterminer l'activité oxydase de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) chez les neutrophiles. Les superoxydes des neutrophiles réduisent le NBT en formazan pour ainsi former un précipité noir dans les cellules positives.

Les cellules de la lignée devenue neutrophile-like furent comptées suite à un brassage léger des flacons afin de les dissocier et  $1 \times 10^6$  cellules furent mises dans un tube de 1,5 mL (Nunc) et centrifugées pendant 7 minutes à 1200 rpm (GS-6R Centrifuge ; Beckman). Celles-ci furent ensuite mises en contact avec une concentration finale de  $1 \times 10^{-7}$  M de PMA (phorbol myristate acétate) (Sigma) et de 20  $\mu$ L d'une solution 0,1% NBT (p/v) (Sigma) puis le tube fut complété à un volume final de 1 mL avec du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL). Une incubation de 30 minutes à 37°C avec 5% (v/v) CO<sub>2</sub> suivit. Les cellules positives étaient visibles en microscopie optique inverse (Diaphot-TMD; Nikon) et le pourcentage de cellules différenciées (noires) calculé par rapport aux cellules non différenciées (blanches).

Suite à leur différenciation, les cellules furent mises en contact avec une concentration virale permettant une MOI de 1,0, avec ou sans la trypsine TPCK (Sigma) selon la souche virale étudiée. Les cellules étaient incubées pendant 5 heures à 33°C ou à 4°C et soumises à des agitations régulières. Les cellules maintenant constituées d'un mélange de neutrophiles et monocytes (puisque le pourcentage de différenciation n'est jamais absolu) subissaient trois lavages dans du RPMI 1640 (Gibco BRL) complet sans SVF avant d'être remises en culture pour différents temps, soit 1, 4 et 7 jours, dans leur milieu habituel avec DMSO (Sigma), avec ou sans TPCK (Sigma). Une extraction d'ARNm par méthode de TRIzol<sub>TM</sub> fut ensuite effectuée afin d'effectuer des RT-PCR comme décrit à la section 4.1.

## **6. Activation**

### **6.1 Activation des lignées lymphocytaires humaines et leur infection**

Toutes les lignées lymphocytaires de type T, soit H9, Jurkat, MT-2 et MT-4 et la lignée lymphocytaire de type B, Raji, furent activées par le PMA/ionomycine. Une cinétique d'activation dans le temps fut d'abord effectuée afin de voir à quel moment il y avait activation maximale. Cette activation est représentée par l'induction de CD25 ou récepteur de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-2 à la surface cellulaire des lignées lymphocytaires T et par l'augmentation du volume cellulaire pour la lignée lymphocytaire B (Larsen, 1990; Mizuguchi *et al.*, 1986).

Les cellules furent comptées suite à un brassage léger des flacons puis  $3 \times 10^6$  cellules pour chaque temps (0 à 48 heures) furent centrifugées pendant 7 minutes à 1000 rpm (GS-6R Centrifuge ; Beckman). Celles-ci furent mises en présence de 20 ng/mL de PMA (Sigma) et de 1  $\mu$ M d'ionomycine (Sigma) avant d'être prélevées au temps voulu. L'analyse du CD25 pour les lignées lymphocytaires de type T fut effectuée par cytométrie en flux comme décrit à la section 4.4, à l'aide d'un anticorps dirigé contre CD25 couplé à la phycoérythrine (Pharmingen, Becton Dickinson). La cytométrie en flux permit également l'analyse de l'augmentation de volume des cellules activées de la lignée lymphocytaire de type B. Une fois le temps d'activation maximale déterminé, soit 24 heures, une quantité plus importante de cellules furent activées afin de pouvoir procéder

aux infections. Les cellules activées furent par la suite mises en contact avec une concentration virale permettant une MOI de 1,0, avec ou sans la trypsine TPCK (Sigma) selon la souche virale étudiée et furent incubées pendant 5 heures à 33°C ou à 4°C et soumises à des agitations régulières. Trois lavages dans du RPMI 1640 (Gibco BRL) complet sans SVF furent effectués sur les cellules avant de les remettre en culture pour différents temps, soit 1, 4 et 7 jours, dans leur milieu habituel, avec ou sans TPCK (Sigma).

La cytométrie en flux, détaillée à la section 4.2, permet l'analyse des protéines virales S de surface et intracellulaire pour les deux sérotypes de HCoV et N intracellulaire pour HCoV-OC43. L'immunoperoxydase indirecte, détaillée à la section 4.3, quantifiait des virions produits par les cellules infectées.

## **7. Étude de la susceptibilité de PBMC humains à l'infection par les coronavirus humain**

### **7.1 Isolement des PBMC**

L'isolation des PBMC se fit à partir de 60 mL de sang périphérique héparinisé provenant de donneurs sains. Celui-ci fut centrifugé à 1800 rpm (GS-6R Centrifuge ; Beckman) pendant 10 minutes afin de dissocier le sérum du sang. Le sérum fut décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C puis centrifugé une fois pour ensuite être conservé à 4°C. La couche contenant les cellules voulues se situait juste en dessous de la couche de sérum. Celle-ci fut recueillie puis complétée à 50 mL avec du RPMI 1640 sans sérum avant d'être centrifugé pendant 30 minutes à 1800 rpm (GS-6R Centrifuge ; Beckman) à travers une couche de Ficoll-Hypaque (2x15mL) (Gibco). L'anneau de PBMC fut ensuite prélevé et lavé dans 50 mL de RPMI 1640 sans sérum avant d'effectuer trois autres lavages. Le dernier lavage se fit dans de RPMI complet, soit contenant 10mM HEPES (Gibco BRL), 1mM sodium pyruvate (Gibco BRL), des acides aminés non essentiels (Gibco BRL), 100 U/mL de pénicilline (Gibco BRL), 100 µg/mL streptomycine (Gibco BRL), 1 µg/mL fungizone (Gibco BRL).

## **7.2 Analyse des lymphocytes T**

Environ vingt millions de PBMC furent mises dans un flacon de 25 cm<sup>2</sup> pour cellules en suspensions (Corning Costar Corporation) pour une heure à 37°C afin de faire adhérer les monocytes. Le surnageant, contenant les lymphocytes, fut ensuite récolté puis les cellules mises en contact avec l'une ou l'autre des souches de HCoV à une MOI de 1,0 pendant 5 heures à 33°C. Les cellules furent ensuite lavées et remises en culture pendant quatre jours dans le RPMI complet décrit précédemment additionné de 10% sérum autologue décomplémenté prélevé initialement. Des cellules non infectées et infectées à 4°C servirent de témoins négatifs

L'analyse de l'infection des lymphocytes T fut ensuite effectuée par cytométrie en flux. Le protocole utilisé fut le même que décrit à la section 4.2.2 avec l'ajout d'une étape supplémentaire à la fin, soit un contact de 30 min avec un AcMo dirigé contre CD4 couplé à la phycoérythrine (Pharmingen, Becton Dickinson). Il s'agit donc d'une analyse de cellules par double marquage. La production de virions infectieux fut également effectuée par immunoperoxydase indirecte comme décrit à la section 4.3.

## **7.3 Analyse des monocytes**

L'isolement de PBMC fut effectué tel que décrit à la section 7.1. Suite à la récolte du surnageant qui contenait les lymphocytes, les monocytes adhérents au flacon furent lavés avec du RPMI complet sans sérum puis mis en contact avec l'une ou l'autre des souches de HCoV à une MOI d'environ 1,0 pendant 5 heures à 33°C. Les cellules furent ensuite lavées et remises en culture pendant 1, 4 et 7 jours dans le RPMI complet décrit précédemment sans sérum. Des cellules non infectées et infectées à 4°C servirent de témoins négatifs.

L'analyse de l'infection des monocytes fut ensuite effectuée par cytométrie en flux comme décrit à la section 4.2.2 et par immunoperoxydase indirecte comme décrit à la section 4.3.

#### **7.4 Analyse des macrophages**

Pour obtenir le phénotype macrophagique, le protocole utilisé fut le même que celui décrit à la section 7.2 avec une modification : le RPMI complet fut additionné de 10% (v/v) sérum autologue. En effet, le sérum semble contenir des éléments encore non identifiés qui sont essentiels à la différenciation *in vitro* de monocytes en macrophages (Musson, 1983).

L'analyse de l'infection des macrophages fut ensuite effectuée par cytométrie en flux comme décrit à la section 4.2.2 et immunoperoxydase comme décrit à la section 4.3.

# RÉSULTATS

## **1. Production de fragments F(ab')<sub>2</sub>**

Les anticorps 5-11H.6 dirigé contre la protéine S du HCoV-229E et 1-10C.1 dirigé contre la protéine S du HCoV-OC43 furent clivés et seules leur fragments F(ab')<sub>2</sub> représenté dans les puits #2 et #3 (Figure 1) ont servi au cours des expériences. Les puits #1 et #3 représentent les anticorps complets purifiés, non digérés.

## **2. Étude de la susceptibilité de lignées leucocytaires humaines à l'infection par les coronavirus humains.**

### **2.1. Susceptibilité à l'infection par les HCoV-229E**

De toutes les lignées leucocytaires analysées pour le virus HCoV-229E en RT-PCR, une seule s'est avérée positive, soit la lignée promonocytaire THP.1 (Figure 2B), où des amplicons d'ARNm codant la protéine N virale sont détectés à 1, 4 et 7 jours post-infection. Les puits #5 à 7 représentant les témoins négatifs, soit respectivement les cellules non infectées, le témoin à 4°C et le témoin H<sub>2</sub>O de PCR étaient négatifs. Le puits #1 contenait le témoin positif, c'est-à-dire les cellules L-132 infectées par HCoV-229E. Ces cellules sont connues comme étant susceptibles à ces virus (Bradburne, 1969). Aucune différence significative d'intensité n'est apparente entre les puits positifs # 2 à 4. La figure 2A représente une lignée qui s'est avérée négative en RT-PCR, soit la lignée promonocytaire U937.

L'étape subséquente fut de vérifier si les protéines virales étaient présentes à la surface et à l'intérieur de ces cellules. Toutes les lignées cellulaires furent toutefois analysées afin de confirmer le résultat précédent obtenu par RT-PCR. Une fois de plus, la lignée promonocytaire THP.1 fut la seule positive. Comme démontré à la figure 3, l'AcMo F(ab')<sub>2</sub> dirigé contre la protéine S de HCoV-229E a détecté un faible signal à 1 et 4 jours post-infection chez les cellules THP.1 infectées, contrairement à l'anticorps isotypique. L'AcMo F(ab')<sub>2</sub> dirigé contre la protéine S n'a pas réagit avec les cellules non infectées. Également, aucun signal positif ne fut détecté chez le témoin à 4°C (courbe non représentée) et les cellules sans anticorps (autofluorescence). Ainsi, l'expression de la protéine virale S était présente à la surface des cellules infectées jusqu'à 4 jours post-infection. Le déplacement moyen par rapport aux témoins négatifs fut estimé à 0,44 log

pour les cellules infectées mis en présence de l'AcMo dirigé contre la protéine S à 1 jour post-infection et de 0,32 log à 4 jours post-infection.

Un signal positif pour la même protéine virale fut retrouvé de façon intracellulaire chez cette lignée promonocytaire (Figure 4). Cependant, celle-ci n'était faiblement détectable qu'à 1 jour post-infection par rapport aux témoins négatifs. La détection de la protéine N par cytométrie en flux n'a pu être effectuée pour le sérotype HCoV-229E puisque aucun anticorps dirigé contre cette protéine n'était disponible.

Différentes expériences préliminaires d'analyses de protéines virales et de RT-PCR furent effectuées à différentes MOI sur la lignée THP.1, soit à 0,1, 1,0 et 3,0. De faibles résultats positifs étaient détectables à une MOI de 0,1. La MOI de 1,0 et 3,0 donnaient les mêmes résultats positifs. Toutes les expériences subséquentes furent donc effectués à une MOI de 1,0.

L'analyse de la production virale par l'essai immunoperoxydase indirecte nous a permis d'évaluer la capacité de la lignée promonocytaire THP.1 à produire du virus infectieux HCoV-229E. De toutes les lignées analysées, THP.1 était la seule pouvant supporter une réplication virale par HCoV-229E (Figure 5B). Cette lignée sécrétait des taux de particules infectieuses de l'ordre de 4,0 à 1,5 log  $DICT_{50}/mL$ . Les courbes de titres infectieux pour les particules virales intracellulaires et recueillies dans le surnageant évoluaient de façon quasi-parallèles au cours de l'étude, soit jusqu'à 7 jours post-infection, les titres étant relativement plus élevés dans le surnageant que dans les cellules. La production virale se voyait par contre diminuer avec le temps. En effet, aucune production virale n'a pu être observée à 10 jours post infection (résultats non montrés). La figure 5A représente une lignée qui s'est avérée négative pour HCoV-229E en immunoperoxydase, soit la lignée lymphocytaire H9. Aucune production n'a été observée dans les témoins négatifs, soit les cellules non infectées et infectées à 4°C (résultats non montrés).

La prochaine étape fut de corrélérer l'infection par le HCoV-229E avec la présence de son récepteur cellulaire, l'aminopeptidase-N ou CD13. En cytométrie en flux, aucun signal positif avec l'anticorps dirigé contre CD13 ne fut détecté sur les lignées de lymphocytes T, soit H9, Jurkat, MT-2 et MT-4 ni sur la lignée de lymphocytes B, Raji (Figure 6A, représentant la lignée de lymphocytes T Jurkat comme exemple). Quant aux lignées de cellules promonocytaires, soit HL-60, U937 et THP.1, un déplacement estimé à 1,9 log fut observé pour la courbe correspondant aux cellules mises en présence de l'anticorps dirigé contre CD13 (Figure 6B, représentant la lignée promonocytaire THP.1 comme exemple) contrairement au témoin isotypique. Ceci indiquait donc que les trois lignées promonocytaires possédaient le récepteur cellulaire spécifique aux HCoV-229E, c'est-à-dire l'aminopeptidase-N, à leur surface.

## **2.2 Susceptibilité à l'infection par les HCoV-OC43**

Une même tendance de susceptibilité à l'infection semblait surgir lors de l'analyse de toutes les lignées leucocytaires infectées par HCoV-OC43 effectuée par RT-PCR. Ainsi, seule la lignée promonocytaire THP.1 s'est avérée positive (Figure 7B). Les puits #2, 3 et 4 démontrent bien la présence d'ARNm codant pour la protéine N de HCoV-OC43 dans les cellules infectées respectivement pour 1, 4 et 7 jours. Quant aux puits correspondants aux cellules non infectées, au témoin à 4°C et au témoin H<sub>2</sub>O de PCR (puits #5 à 7 respectivement), aucun amplicon n'était présent. Le puits #1 contenait le témoin positif qui, cette fois-ci, fut la lignée HRT-18 infectée par HCoV-OC43. Cette lignée fut déjà démontrée comme étant susceptible à l'infection par ce virus (Weiss, 1983). La figure 7A représente une lignée qui s'est avérée négative, soit la lignée promonocytaire U937.

La présence de protéines virales analysée par cytométrie en flux fut plus marquée pour le HCoV-OC43 que pour HCoV-229E. Effectivement, on remarque bien que le signal pour les cellules THP.1 infectées par HCoV-OC43 mises en présence de l'AcMo F(ab')<sub>2</sub> dirigé contre la protéine S de HCoV-OC43 était positif à 4 et 7 jours post-infection (Figure 8). De plus, ce signal positif s'intensifiait avec le temps. Le déplacement moyen à 4 jours fut estimé à 0,7 log et à 7 jours à 1,5 log par rapport aux témoins négatifs. Aucun signal positif ne fut détecté pour les cellules seules sans anticorps, les cellules non infectées, le

témoin isotypique et le témoin à 4°C. Il est à noter également qu'à 7 jours post-infection, le signal semble être bimodal, c'est-à-dire un signal représentant l'infection de cellules en phase G2 du cycle cellulaire soit prêts à être divisées et contenant ainsi deux fois plus de virus.

Le même profil de cytométrie a été retrouvé lorsque cette même protéine virale S (Figure 9) et la protéine virale N (Figure 10) furent analysées intracellulairement. Le signal à 7 jours post-infection n'est toutefois pas bimodal dans ces deux dernières analyses.

Toutes les lignées furent une fois de plus soumises à un essai d'immunoperoxydase indirecte, cette fois ci pour la détection de la production virale des HCoV-OC43. La lignée THP.1 était la seule positive une fois de plus (Figure 11B). La lignée promonocytaire produisait cette fois des titres de particules infectieuses de l'ordre de 4,0 à 9,0 log DICT<sub>50</sub>/mL. Les courbes de production virales extracellulaires et intracellulaires suivaient une même tendance, soit une augmentation de la production de virus dans le temps jusqu'à 7 jours post-infection. Les titres viraux extracellulaires étaient plus élevés que ceux intracellulaires. Aucune production virale ne fut observée pour les témoin négatifs, soit les cellules non infectées et infectées à 4°C (résultats non montrés). La figure 11A représente une lignée qui s'est avérée négative pour HCoV-OC43 en immunoperoxydase, soit la lignée promonocytaire HL-60.

Contrairement au HCoV-229E, la lignée THP.1 semblait supporter la réplication de HCoV-OC43 de façon persistante. En effet, des hauts titres viraux furent toujours observables à 4 et 7 mois post-infection (Tableau III). Ceux-ci diminuaient cependant avec le temps et les titres les plus élevés étaient toujours détectés de façon extracellulaire plutôt qu'intracellulaire. Il est à noter que la présence d'ARNm viral (Figure 12A) et de protéines virales (Figure 12B) étaient toujours détectées jusqu'à 7 mois post-infection.

Il est à noter que des expériences préliminaires d'analyses de production de virus infectieux furent fait avec et sans présence de l'enzyme TPCK pour la lignée THP.1 avec HCoV-OC43. La présence de l'enzyme nous donnaient des titres d'environ 1 log plus

élevés pour les cellules infectées que lorsqu'il n'était pas présent. La trypsine TPCK fut donc utilisée lors des infections impliquant le virus HCoV-OC43.

### **2.3 Caractérisation de l'infection de la lignée promonocytaire THP.1 par les HCoV**

Afin de mieux caractériser les conséquences de l'infection de la lignée promonocytaire THP.1 par les deux sérotypes de coronavirus humains, certaines molécules furent analysées, soit certaines métalloprotéases de la matrice et l'oxyde nitrique qui pourraient faciliter le passage viral à travers la barrière hémato-encéphalique.

Une analyse, par zymographie, de certaines métalloprotéases de la matrice ou gélatinases potentiellement sécrétées par la lignée THP.1 lorsque celle-ci est infectée par l'un ou l'autre des HCoV fut effectuée. La protéolyse par l'enzyme peut être observée par l'apparition de bandes blanches sur fond coloré. Puisqu'une normalisation en fonction du nombre de cellules fut faite entre les échantillons, l'intensité de la bande reflète de façon quasi-proportionnelle la quantité de MMP contenu dans le puits. Ainsi, une comparaison entre les échantillons a pu être effectuée (Figure 13A). On remarque donc que les deux gélatinases pouvant être visualisées par ce gel, soit la proMMP-9 et proMMP-2, ne sont presque pas présentes dans le surnageant des cellules non infectées (puits #2 et 7). Dans le puits #4, contenant le surnageant de THP.1 infecté par HCoV-229E pendant 48 heures, on remarque l'induction de la proMMP-9 à 92 kDa. Cet enzyme semble être régulé à la hausse en fonction du temps puisque la bande s'intensifiait à 72 heures (puits #9). Quant au surnageant des THP.1 infectés par HCoV-OC43, il semble contenir une plus forte quantité de proMMP-9 seulement à 72 heures (puits #10) par rapport à 48 heures (puits #5). La proMMP-2 représentée par les bandes à 72 kDa, ne semble pas être modulée par l'infection des cellules THP.1. Les puits #3 et 8 contenaient les témoins positifs, soit le surnageant des cellules THP.1 en présence de PMA. En effet, le PMA est connu comme inducteur de grandes quantités de proMMP-9 dans cette lignée (Campbell *et al.*, 1991).

Aucun signal n'était détectable sur un même gel fait de façon parallèle, mis en présence d'un inhibiteur spécifique aux gélatinases, l'EDTA démontrant bien ainsi la spécificité des enzymes décelés (Figure 13B).

Aucune présence d'oxyde nitrique ne fut décelée lors de l'analyse par le réactif de Greiss.

### **3. Différenciation**

Cette partie du projet pris naissance lorsque les résultats préliminaires suggéraient que la lignée THP.1 était susceptible à l'infection par les HCoV alors que les deux autres lignées promonocytaires ne l'étaient pas. Comme ces lignées n'ont pas été immortalisées au même stade de différenciation, il fut stipulé que l'état de différenciation pourrait avoir un effet sur la susceptibilité à l'infection.

#### **3.1 Étude de la susceptibilité à l'infection par les HCoV de lignées monocytaires humaines différenciées en macrophages**

L'adhérence des macrophages provenant de monocytes préalablement en suspension fut visualisée en microscopie optique comme démontré à la figure 14. Les cellules montraient un phénotype caractéristique de macrophages, c'est-à-dire des corps cellulaires assez volumineux, des pseudopodes, sont devenues adhérentes et ont cessé de proliférer après 24 heures d'exposition au PMA. Ces observations correspondent avec celles décrites dans la littérature (Minta et Pambrun, 1985).

L'aminopeptidase-N analysée à la surface des cellules par cytométrie en flux fut décelée dans une même proportion que sur les cellules non différenciées, soit promonocytaires (Figure 15). Ainsi, on observait un déplacement d'environ 1,9 log pour les cellules mises en présence de l'anticorps dirigé contre le CD13 contrairement au témoin isotypique et aux cellules sans anticorps.

Aucune protéine virale n'a pu être décelée à la surface ni à l'intérieur des cellules par cytométrie en flux. Lorsqu'on soumettait les cellules de la lignée THP.1, qui étaient préalablement susceptibles à l'infection par les deux sérotypes de HCoV, à une

différenciation préalablement à l'infection, aucune protéine virale ne fut retrouvée. Quant-à la production de virus infectieux, il n'y a eu évidemment aucune réplication virale chez les lignées devenues macrophagiques (Tableau IV).

### **3.2 Analyse de la production virale de la lignée promonocytaire THP.1 infectée de façon persistante avec OC43 une fois différenciée en macrophage**

Il s'agissait ici de voir s'il y avait une modulation dans la production de virus infectieux par la lignée THP.1 déjà infectée de façon persistante avec HCoV-OC43. L'immunoperoxydase indirecte a révélé une diminution significative de production de virus infectieux par la lignée lorsque celle-ci est soumise à une différenciation par le PMA, ceci observée de façon extracellulaire et intracellulaire (Figure 16). En effet, les colonnes grises représentent les titres viraux de la lignée THP.1 infectée pendant 7 mois avec HCoV-OC43 alors que les colonnes lignées représentent les titres viraux, beaucoup moins élevés, 24 heures après une différenciation au PMA, les cellules étant donc différenciées en macrophages.

### **3.3 Étude de la susceptibilité à l'infection par les coronavirus humains de lignées monocytaires humaines différenciées en neutrophiles**

Le test NBT révélait des pourcentages de différenciation allant généralement de 40% à 50%. Un exemple représentant un 43% de différenciation est illustré (Figure 17). Les cellules noires représentent les neutrophiles alors que les cellules blanches sont les cellules HL-60 non différenciées.

L'analyse par RT-PCR (Figure 18) sur la population mixte de neutrophiles infectées ou non s'est avérée non concluante. En effet, trois fois sur quatre, les échantillons faits à 4°C démontraient des bandes positives. Les témoins non infectés se sont avérés négatifs. Il semblait donc y avoir un attachement non spécifique du virus au niveau de ces cellules.

## **4. Activation**

### **4.1 Étude de la susceptibilité à l'infection par les coronavirus humains de lignées lymphocytaires humaines activées**

L'activation des cellules lymphocytaires de type T fut démontré par l'induction de CD25 (récepteur de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-2) à la surface cellulaire suite au contact avec le PMA, activateur de la PKC, et l'ionomycine, ionophore de  $\text{Ca}^{+}$  intracellulaire, pendant 24 heures. L'analyse par cytométrie en flux a démontré un important déplacement d'environ 0,8 log de la courbe correspondant aux cellules activées mises en présence de l'anticorps dirigé contre CD25 contrairement à l'anticorps isotypique et aux cellules sans anticorps (Figure 19B). Aucun signal n'a été observé sur les cellules non activées (Figure 19A). Quant aux cellules lymphocytaires de type B, l'activation fut prouvé par l'augmentation du volume cellulaire visualisé par cytométrie en flux (Figure 20).

L'aminopeptidase-N ne fut pas décelée par cytométrie en flux sur les lignées activées. Les analyses d'ARNm viral, des protéines virales ainsi que la production de virus infectieux se sont également avérées négatives (résultats non montrés).

## **5. Étude de la susceptibilité de PBMC humains à l'infection par les HCoV**

Lors de l'analyse des lymphocytes T par cytométrie en flux, aucun signal avec l'anticorps dirigé contre la protéine virale S de HCoV-OC43 et HCoV-229E ne fut détecté. Également, aucune production virale ne fut décelée par immunoperoxydase indirecte. (resultats non montrés).

Aucun signal positif ne fut détecté en cytométrie en flux avec les monocytes incubés avec HCoV- OC43 ou HCoV-229E. En immunoperoxydase indirecte, un résultat positif fut observé une fois sur les trois essais. Lors de l'analyse des macrophages par cytométrie en flux, aucun signal avec l'anticorps dirigé contre la protéine virale S de HCoV-OC43 et HCoV-229E ne fut détecté. Également, aucune production virale ne fut décelée par immunoperoxydase indirecte (resultats non montrés).

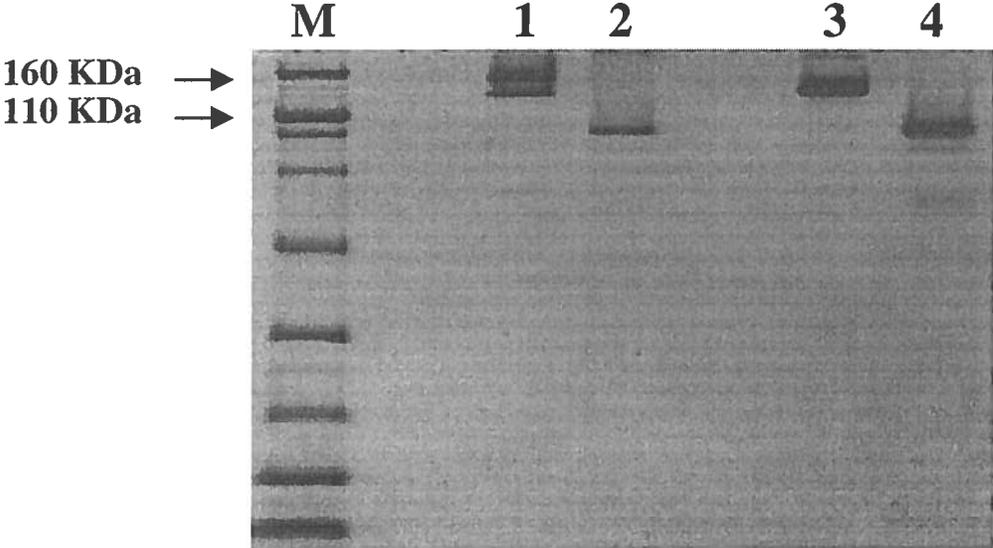


Figure 1: Gel d'acrylamide 7,5% (p/v) SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, détectant les produits de digestion des anticorps 5-11H.6 et 1-10C.1 par la pepsine. M: marqueur de masse moléculaire; 1: anticorps 5-11H.6 purifié, non digéré; 2 :fragments F(ab')<sub>2</sub> de 5-11H.6; 3:anticorps 1-10C.1 purifié non digéré; 4:fragments F(ab')<sub>2</sub> de 1-10C.1

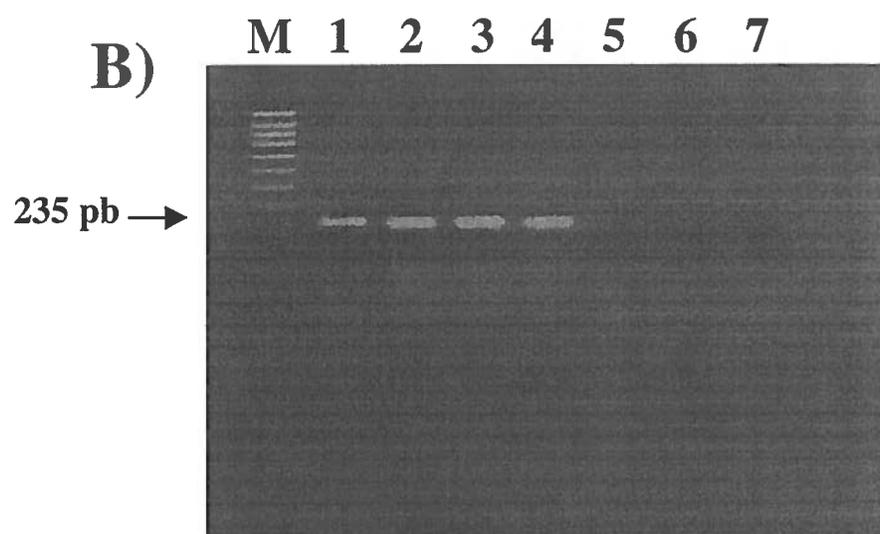
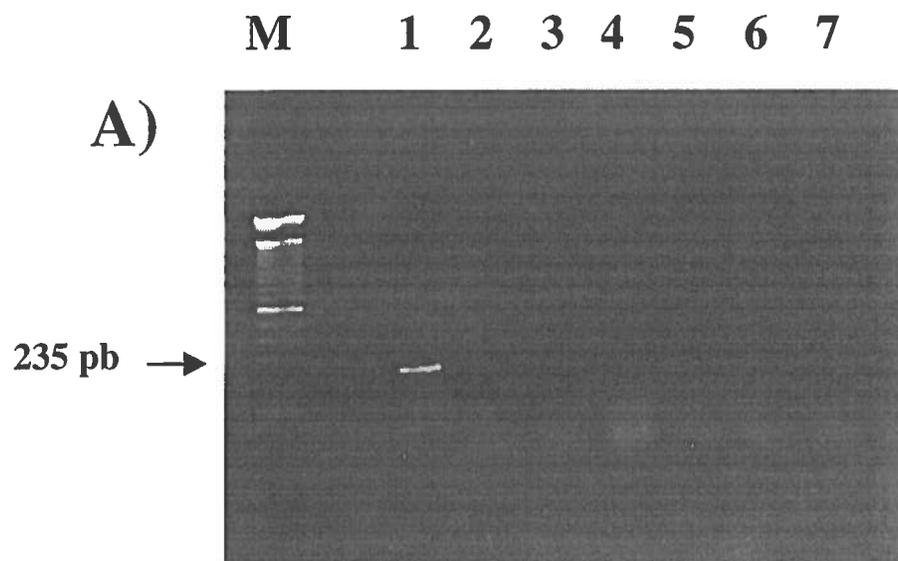


Figure 2 : Détection, par RT-PCR, de la présence d'ARNm codant la protéine N de HCoV-229E dans les cellules promonocytaires à 1, 4 et 7 jours post-infection. Un dixième des amplicons de PCR obtenus fut déposé sur gel d'agarose 1,5% (p/v) pour la séparation électrophorétique. A) cellules promonocytaires U937; B) cellules promonocytaires THP.1; M: marqueur de masse moléculaire; 1: L-132 infectées par HCoV-229E; 2: cellules à 1 jour post-infection; 3: cellules à 4 jours post-infection; 4: cellules à 7 jours post-infection; 5: cellules non infectées; 6: témoin à 4°C; 7: témoin H<sub>2</sub>O.

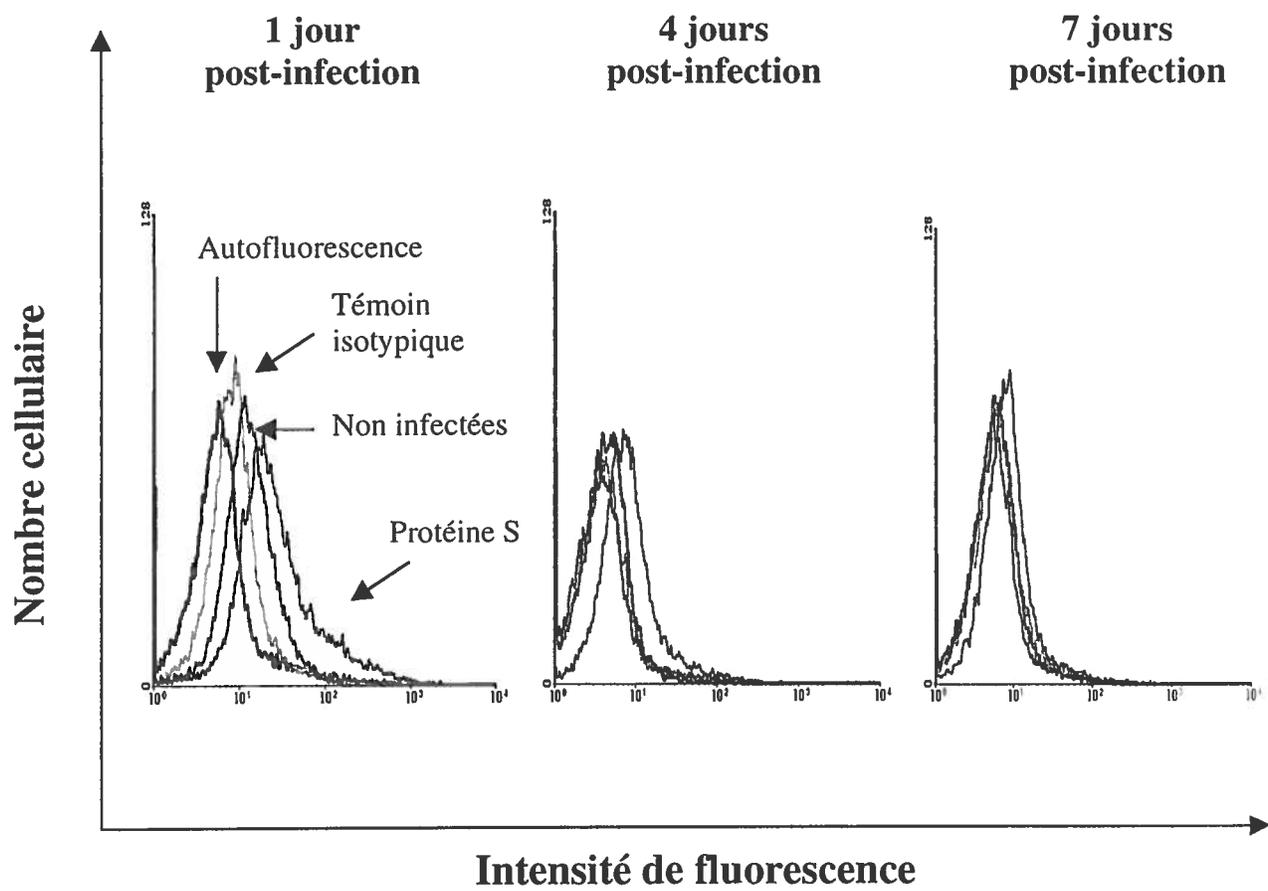


Figure 3 : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines S de HCoV-229E à la surface des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

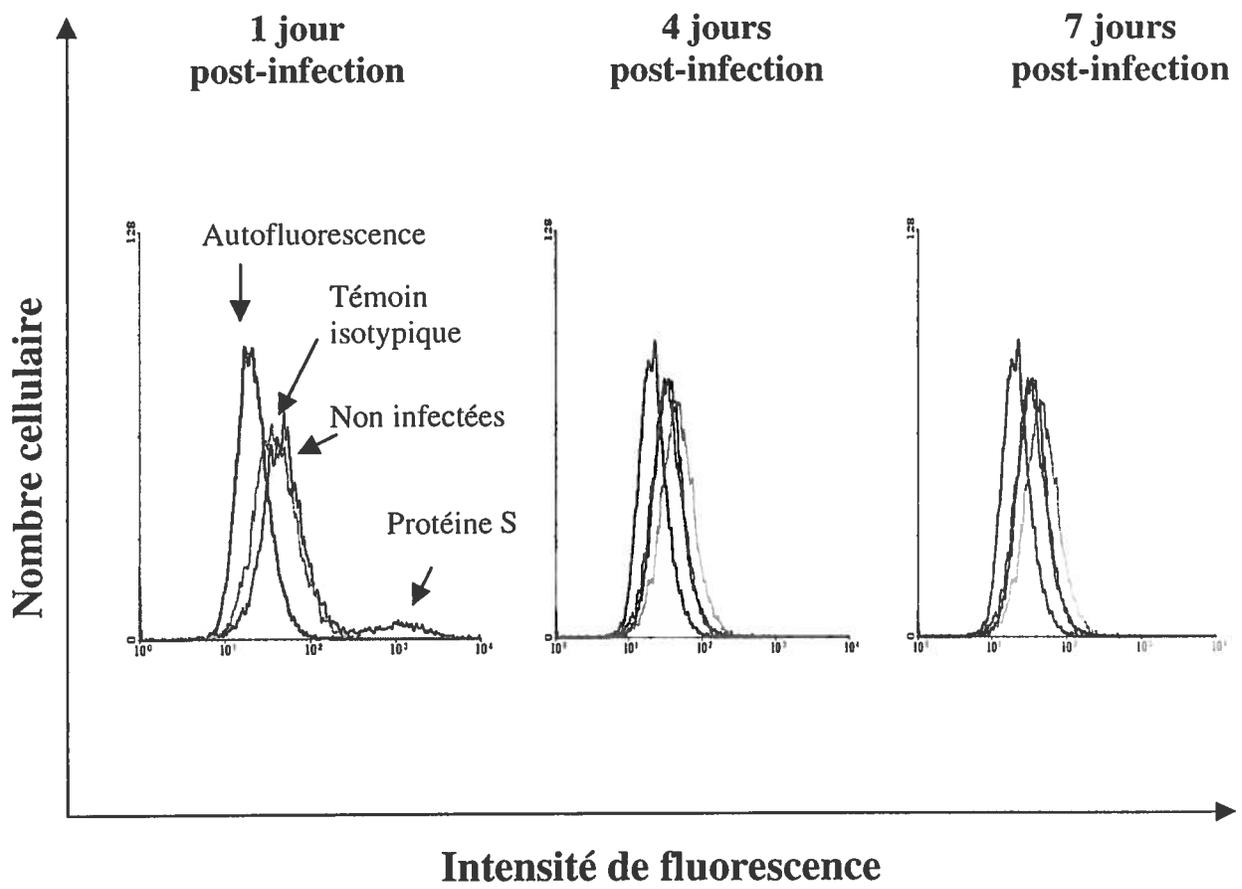
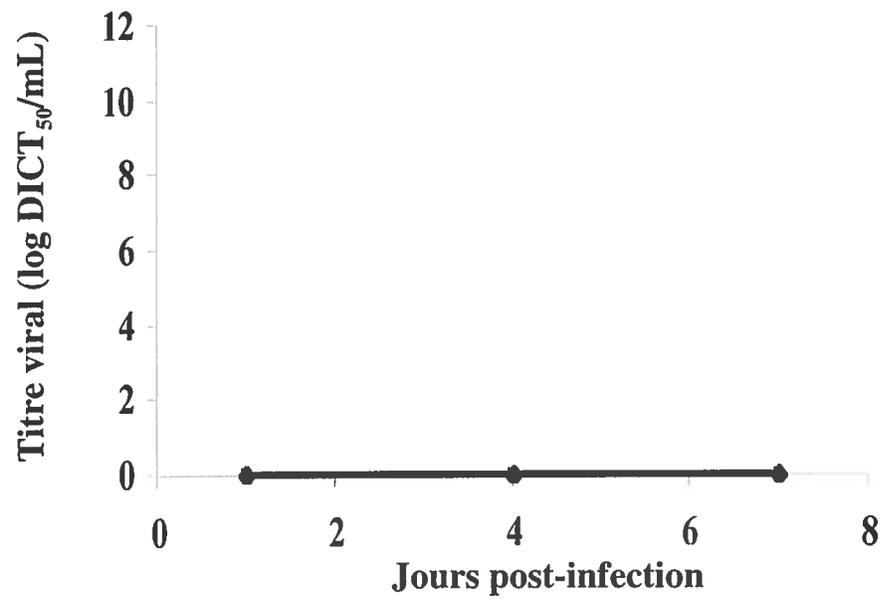
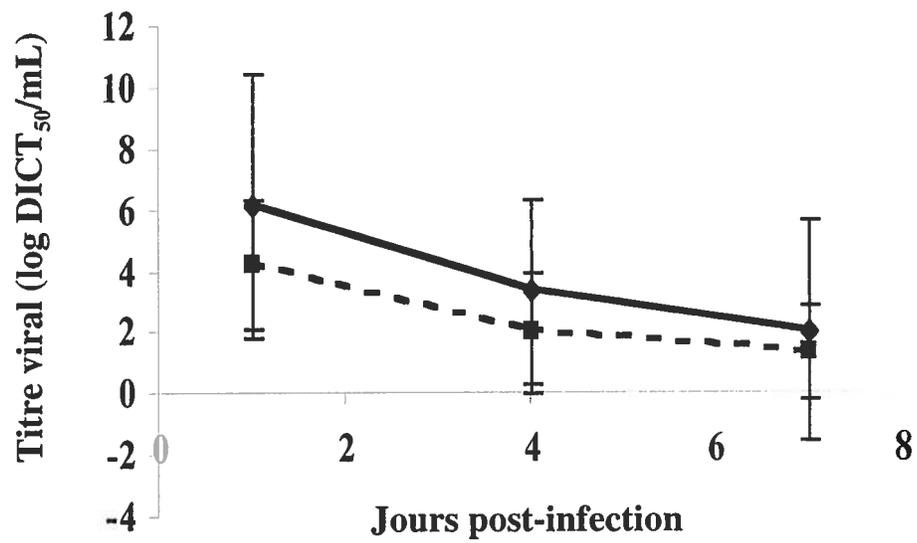


Figure 4: Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines S de HCoV-229E à l'intérieur des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

**A)****B)**

**Figure 5:** Détection, par immunoperoxydase indirecte, de la réplication du HCoV-229E à 1, 4 et 7 jours post-infection, de façon extracellulaire et intracellulaire. A) cellules de la lignée lymphocytaire H9; B) cellules de la lignée promonocytaire THP.1. Ligne pleine: virus extracellulaire ; ligne pointillée: virus intracellulaire.

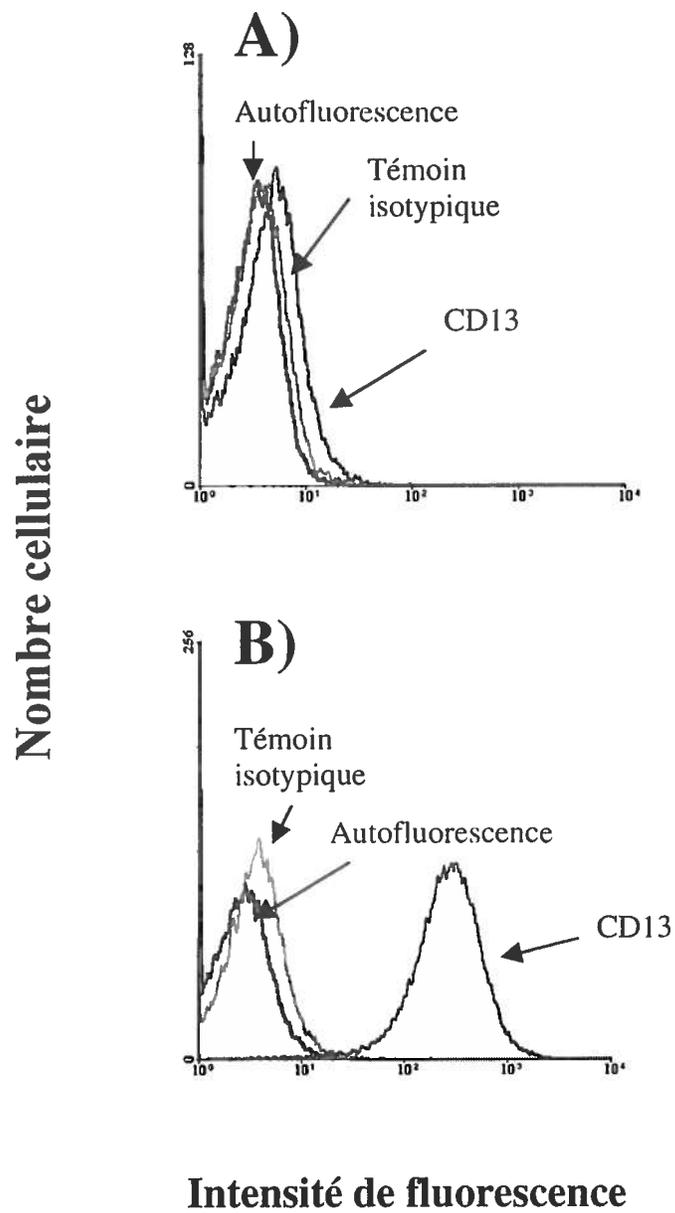


Figure 6 : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de l'aminopeptidase-N à la surface des lignées leucocytaires : A) Lignées lymphocytaires (lignée Jurkat représentée ici) B) Lignées monocytaires (lignée THP.1 représentée ici).

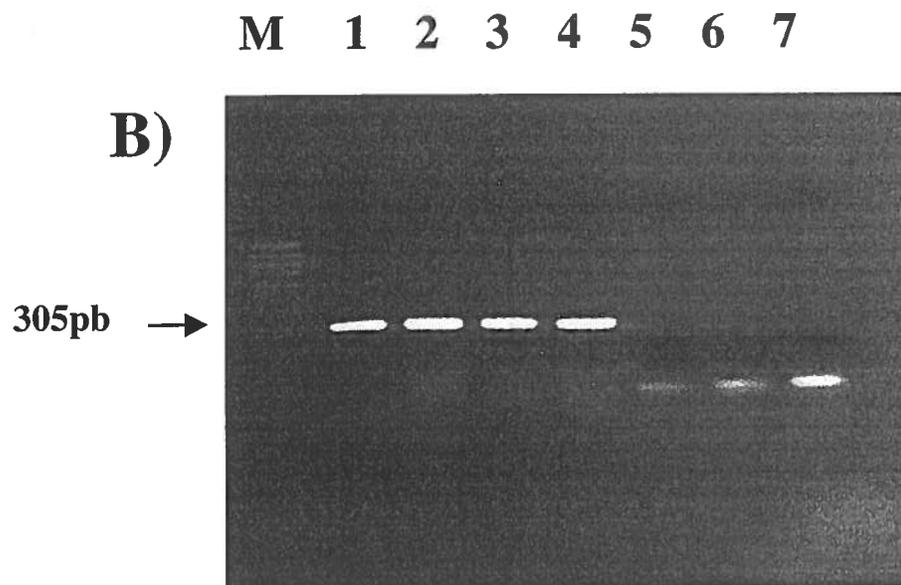
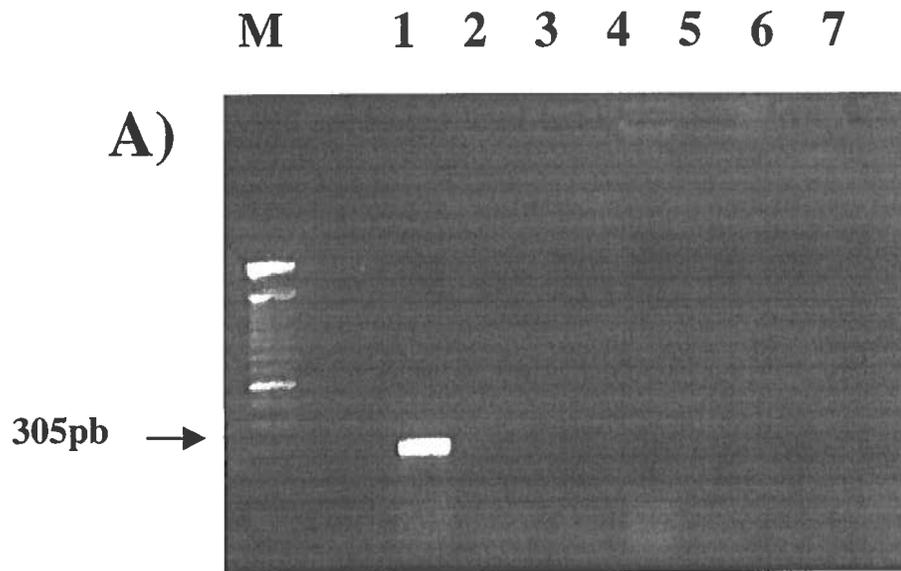


Figure 7 : Détection, par RT-PCR, de la présence d'ARNm codant pour la protéine N de HCoV-OC43 dans les cellules promonocytaires à 1, 4 et 7 jours post-infection. Un dixième des amplicons de PCR obtenus fut déposé sur gel d'agarose 1,5% pour la séparation électrophorétique. A) cellules promonocytaires U937; B) cellules promonocytaires THP.1; M: marqueur de masse moléculaire; 1: HRT-18 infectées par HCoV-OC43; 2: cellules à 1 jour post-infection; 3: cellules à 4 jours post-infection; 4: cellules à 7 jours post-infection; 5: cellules non infectées; 6: témoin à 4°C; 7: témoin H<sub>2</sub>O.

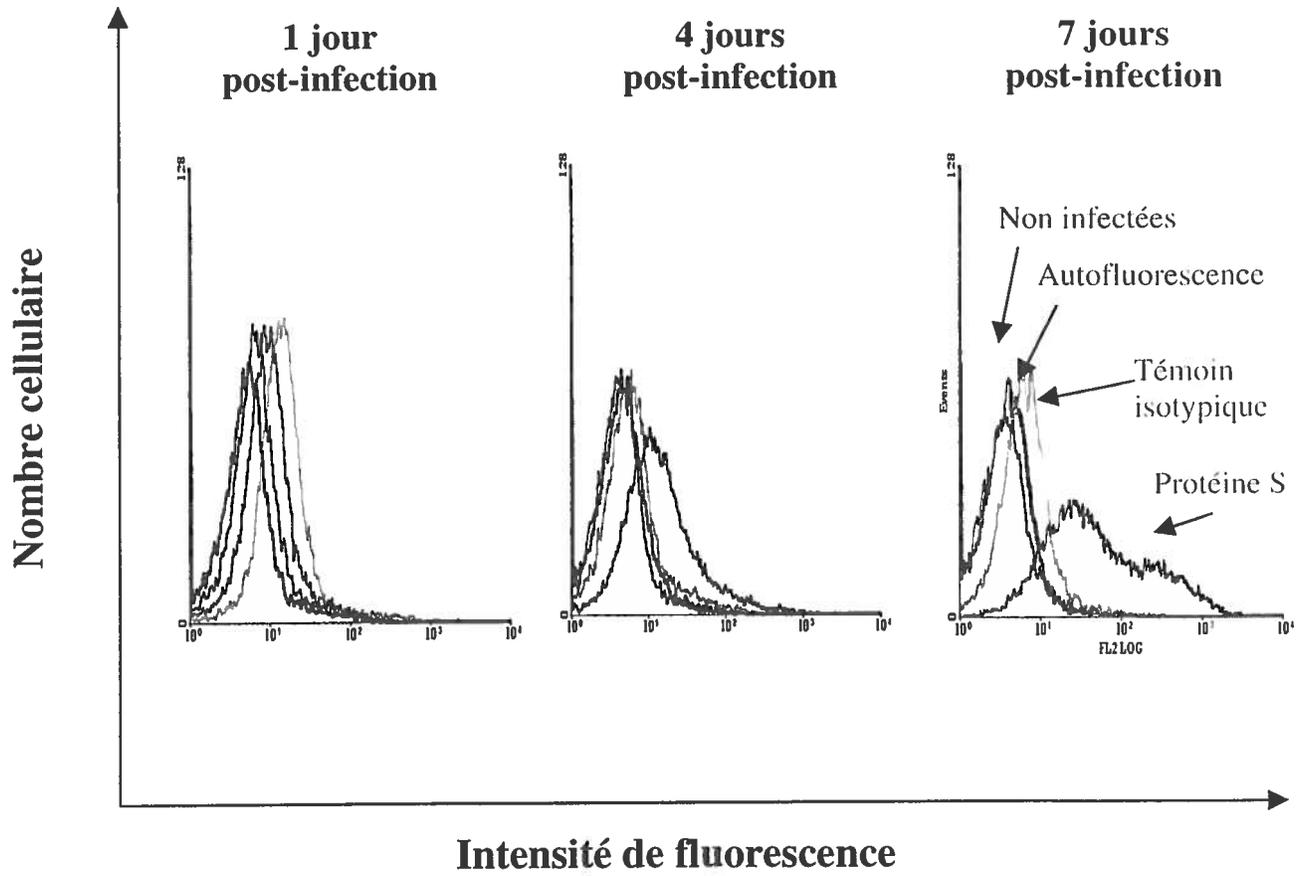


Figure 8 : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines S de HCoV-OC43 à la surface des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

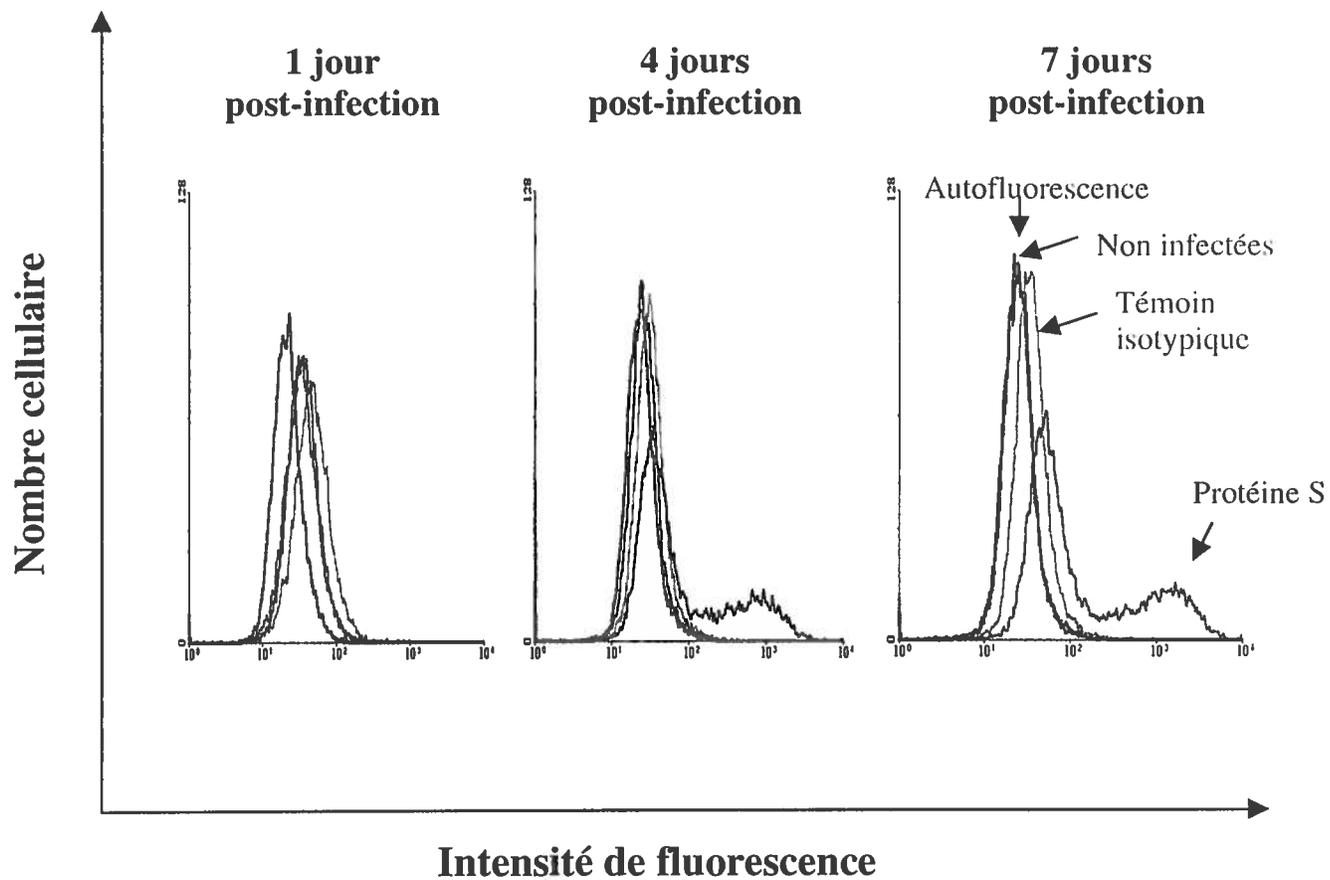


Figure 9: Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines S de HCoV-OC43 à l'intérieur des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

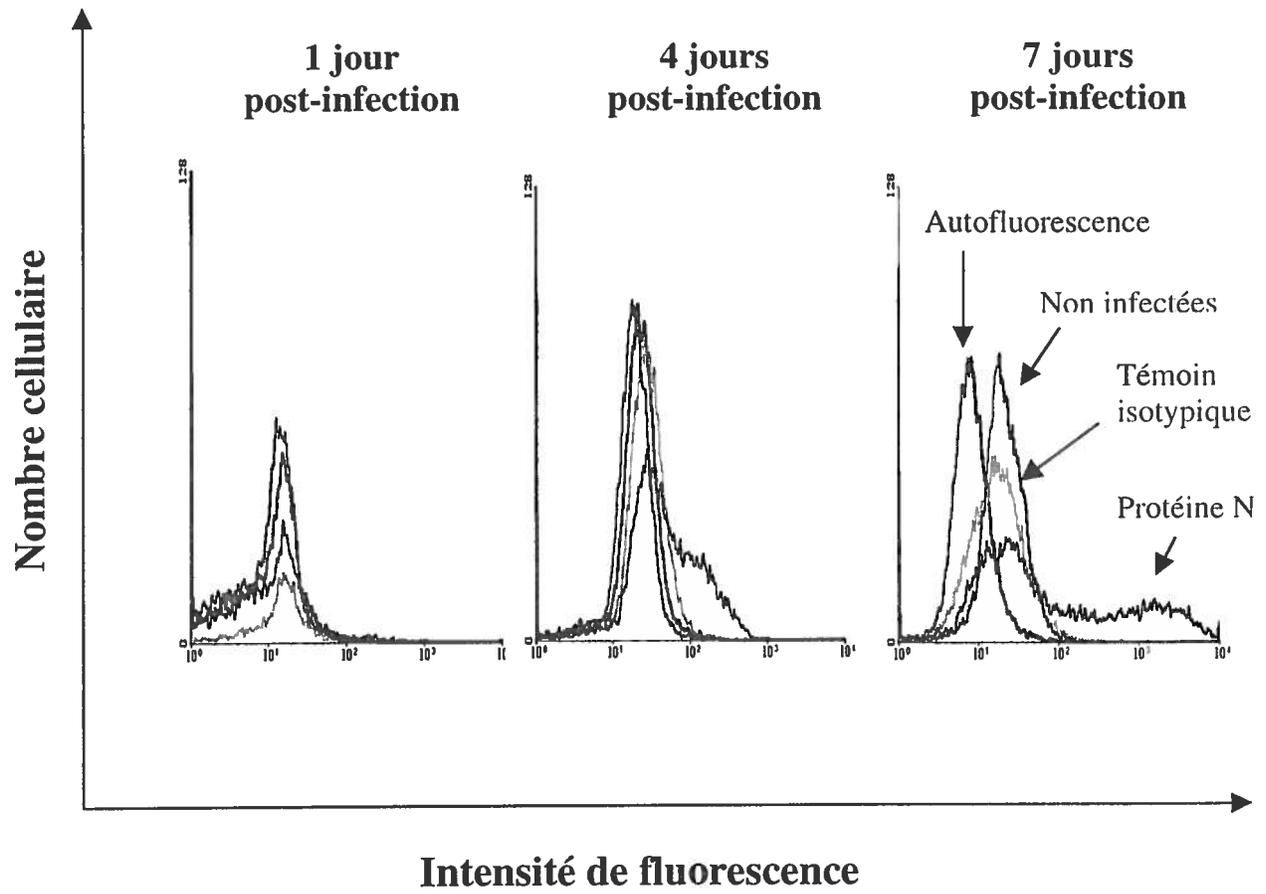


Figure 10 : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de protéines N de HCoV-OC43 à l'intérieur des cellules promonocytaires THP.1 à 1, 4 et 7 jours post-infection.

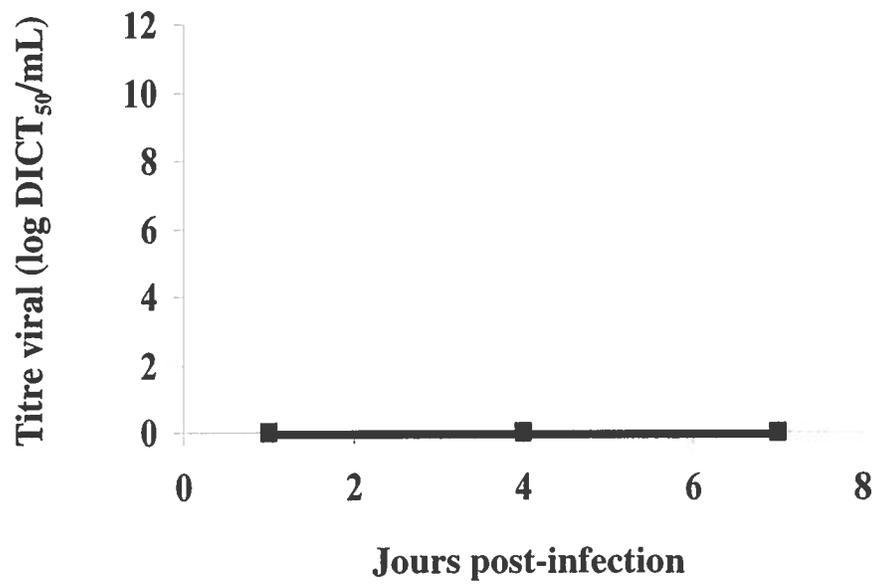
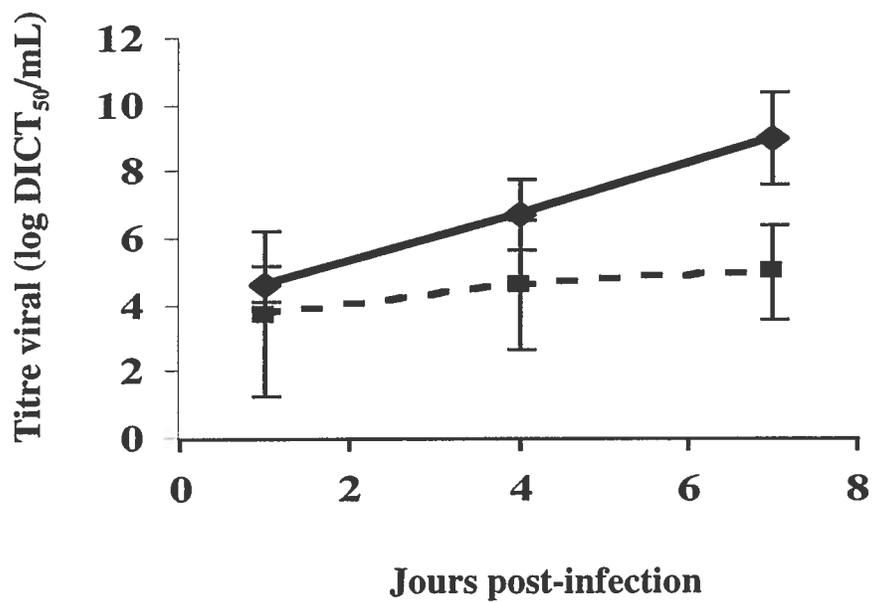
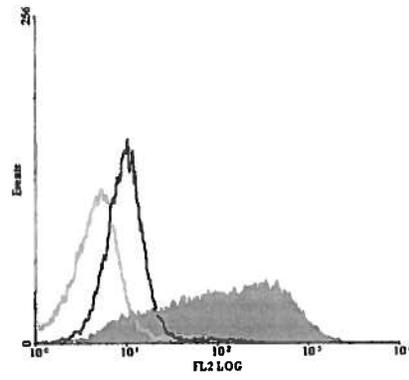
**A)****B)**

Figure 11: Détection, par immunoperoxydase indirecte, de la réplication du HCoV-OC43 à 1, 4 et 7 jours post-infection de façon extracellulaire et intracellulaire. A) cellules de la lignée promonocytaire HL-60; B) cellules de la lignée promonocytaire THP.1. Ligne pleine: virus extracellulaire ; ligne pointillée: virus intracellulaire.

Tableau III: Titres viraux associés à l'infection persistante de la lignée promonocytaire THP.1 avec HCoV-OC43

Temps post-infection	DICT <sub>50</sub> /mL Extracellulaire	DICT <sub>50</sub> /mL Intracellulaire
1 jour	4,63	3,75
4 jours	6,75	4,63
7 jours	9,0	5,0
<b>124 jours (4 mois)</b>	<b>6,5</b>	<b>3,0</b>
<b>213 jours (7 mois)</b>	<b>2,75</b>	<b>2,25</b>

A)



B)

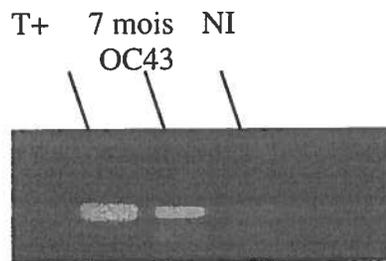


Figure 12: (A) Détection par cytométrie en flux de la protéine S de HCoV-OC43 à la surface des cellules de la lignée promonocytaire THP.1 infectée pendant 213 jours (7 mois). (B) Détection par RT-PCR, de la présence d'ARNm codant la protéine N de HCoV-OC43 dans les cellules promonocytaires THP.1 à 213 jours (7 mois) post-infection et le témoin positif. Un dixième des amplicons de PCR obtenus fut déposé sur gel d'agarose 1,5% (p/v) pour la séparation électrophorétique.



Figure 13 : Analyse de deux métalloprotéases de la matrice, MMP-2 et MMP-9, par zymographie, pour la lignée promonocytaire THP.1 infectée avec HCoV-229E et HCoV-OC43. 1: marqueur de masse moléculaire; 2: cellules non infectées à 48 heures; 3: cellules traitées au PMA pour 48 heures; 4: cellules infectées par HCoV-229E pour 48 heures; 5: cellules infectées par HCoV-OC43 pour 48 heures; 6: marqueur de masse moléculaire; 7: cellules non infectées à 72 heures; 8:cellules traitées au PMA pour 72 heures; 9: cellules infectées par HCoV-229E pour 72 heures; 10: cellules infectées par HCoV-OC43 pour 72 heures. (A) Zymographie représentant la sécrétion de gélatinases (B) Zymographie en présence de 10mM EDTA, inhibiteur de gélatinases  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes.

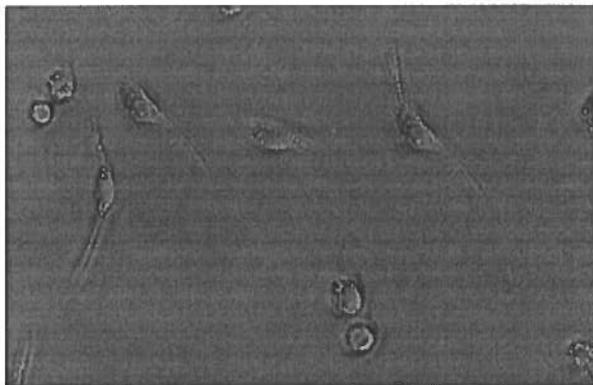
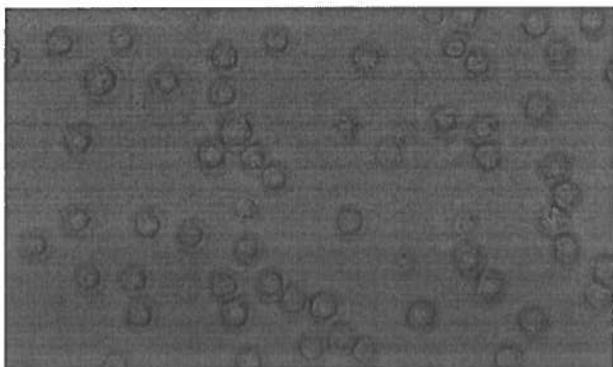
**A)****B)**

Figure 14 : Cellules de la lignée promonocytaire THP.1 (A) différenciées en macrophages par le PMA, suite à un contact de 24 heures ; (B) non différenciées.

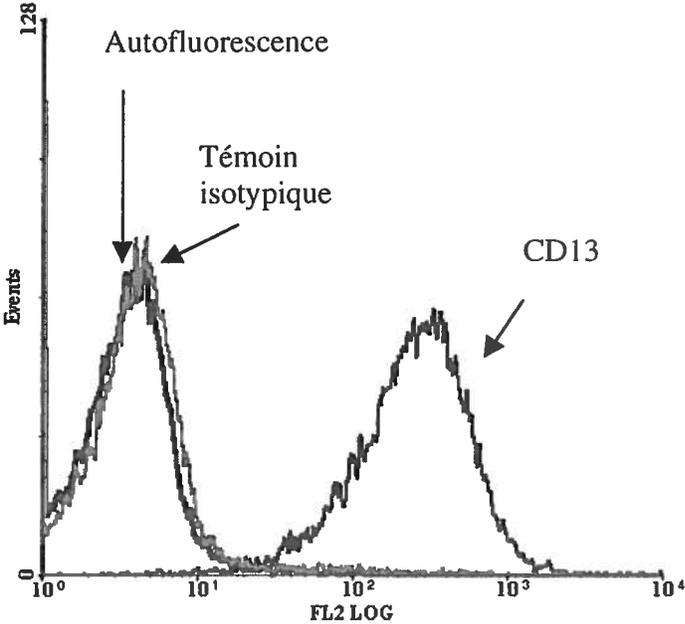


Figure 15 : Détection, par cytométrie en flux, de la présence de l'aminopeptidase-N à la surface des cellules de la lignée promonocytaire THP.1 différenciées en macrophages, suite à un contact de 24 heures.



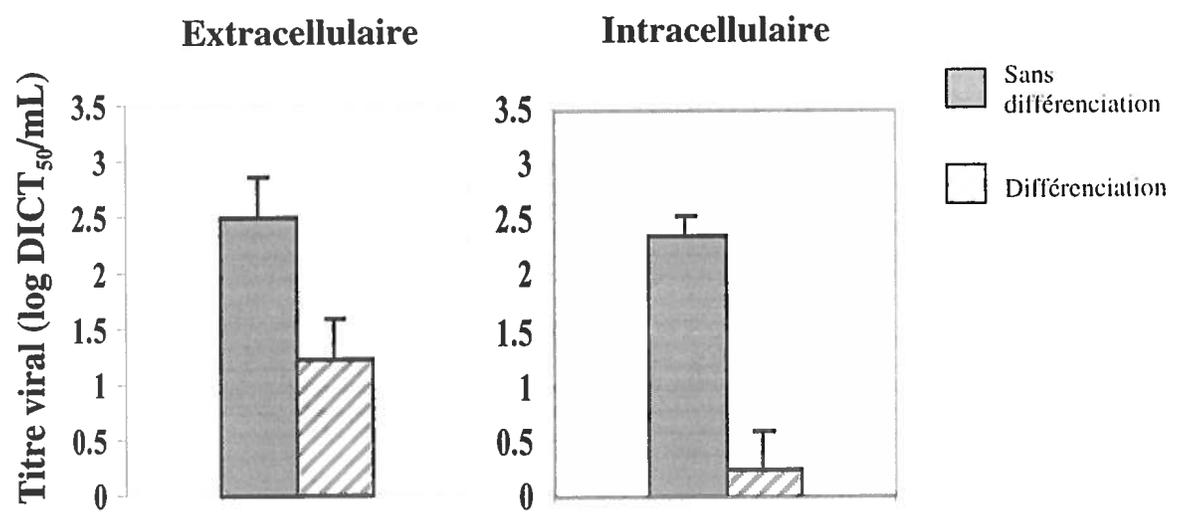


Figure 16 : Détection, par immunoperoxydase indirecte, de la réplication du HCoV-OC43 de façon extracellulaire et intracellulaire chez la lignée promonocytaire THP.1 infectée de façon persistante avec HCoV-OC43 puis soumise à une différenciation par le PMA pendant 24 heures.

**Différenciée en  
neutrophile-like**

**Non  
différenciée**

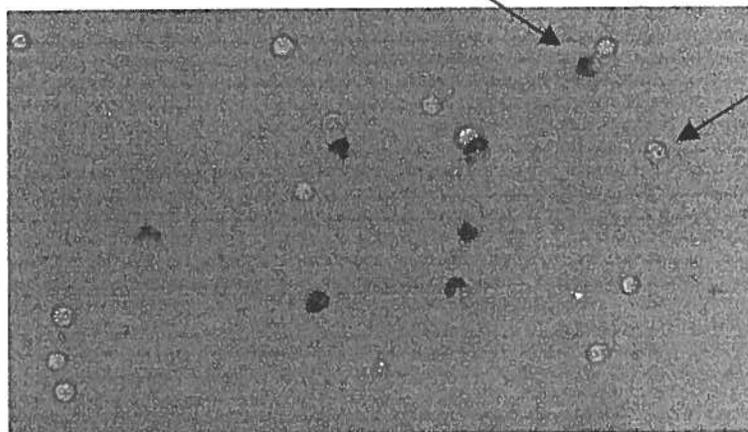


Figure 17 : Détection, par un test NBT, des cellules de la lignée HL-60 différenciées en neutrophiles suite à un traitement avec le DMSO. Les cellules différenciées sont noires (environ 43%) ; les cellules non différenciées sont blanches.

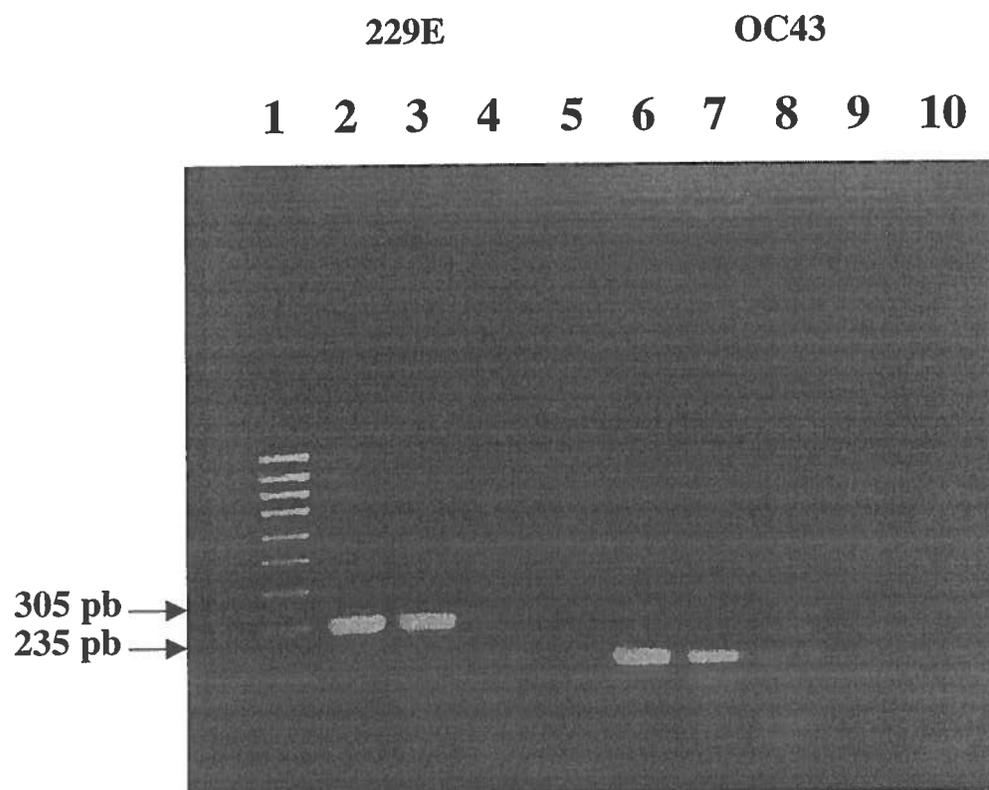


Figure 18: Détection, par RT-PCR, de la présence d'ARNm codant pour la protéine N de HCoV-229E et de HCoV-OC43 dans les cellules neutrophiles-like, à 1, 4 et 7 jours post-infection.

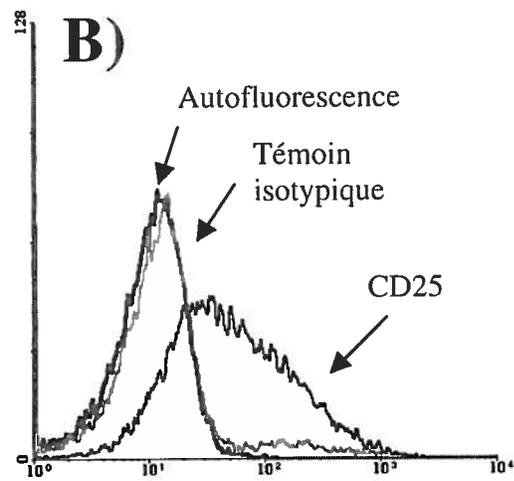
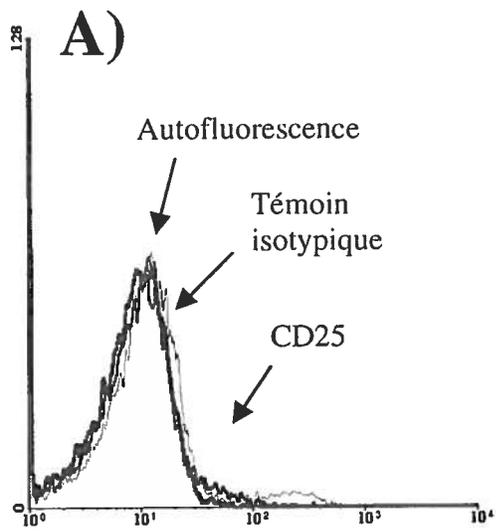
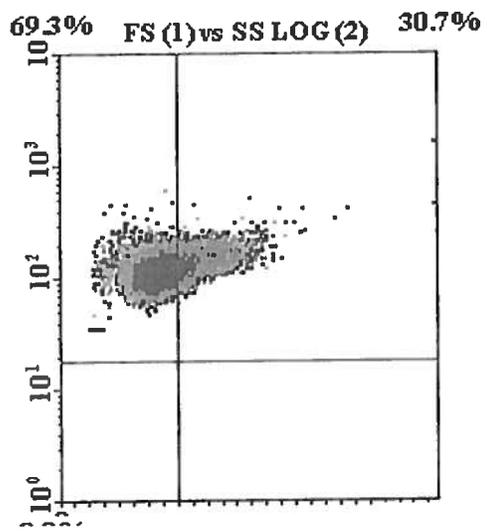


Figure 19 : Détection, par cytométrie en flux, du marqueur d'activation ou CD25 à la surface des cellules des lignées de lymphocytes T ( lignée Jurkat représentée ici) suite à leur activation par le PMA et l'ionomycine pendant 24 heures : A) cellules non activées  
B) cellules activées.

A)



B)

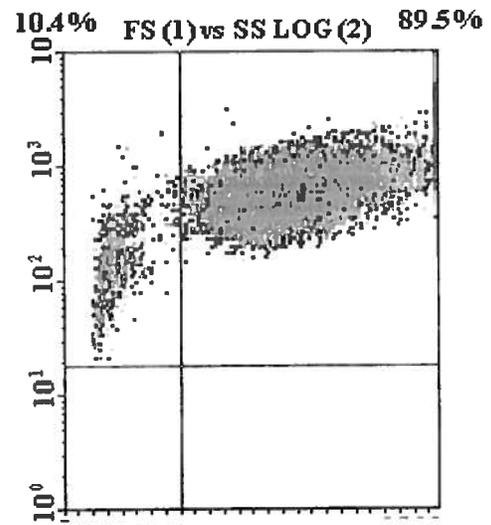


Figure 20 : Détection par cytométrie en flux, de l'augmentation du volume des cellules de la lignée de lymphocytes B suite à leur activation par le PMA /ionomycine pendant 24 heures. (A) non activées (B) activées.

# **DISCUSSION**

Même si les pathologies du SNC sont diverses et difficiles à élucider, certains exemples de maladies neurologiques à étiologie virale, aujourd'hui mieux caractérisées, nous servent de modèles de comparaison afin d'étudier les interactions virus-cellules pouvant avoir lieu dans ces situations. La démence associée au VIH-1 est un exemple de maladie neurodégénérative qui est beaucoup étudiée (Price *et al.*, 1988). Il est connu que l'invasion de grandes quantités de monocytes infectés dans le SNC dans la phase tardive de la maladie est ce qui caractérise le mieux cette neuropathologie (Price *et al.*, 1988). Outre le fait que les monocytes/macrophages constituent un élément clé au niveau des défenses immunitaires spécifiques et non spécifiques contre les infections virales, ces cellules peuvent agir comme des cibles hautement susceptibles à certains virus et même devenir des réservoirs viraux. Ce phénomène est effectivement celui qui est retrouvé chez le VIH.

Le coronavirus murin ou MHV est un très bon modèle animal de neuropathologie puisqu'il cause chez la souris une maladie mimant sur plusieurs aspects de la SEP chez l'humain. Depuis longtemps, la susceptibilité des macrophages murins aux coronavirus de souris est connue (Lamontagne *et al.*, 1989 ; Bang et Warwick, 1960). En ce qui concerne les HCoV, très peu de choses sont connues quant à leurs interactions avec les cellules du système immunitaire. Des macrophages humains primaires furent démontrés comme étant susceptibles au HCoV-OC43 (Collins, 1998) ainsi qu'à HCoV-229E (Patterson et Macnaughton, 1982). La virémie chez le modèle murin est presque toujours présente tandis que chez l'humain, elle est plutôt transitoire (Lai et Cavanagh, 1997).

Les présents travaux démontrent pour la première fois la susceptibilité d'une lignée monocyttaire humaine aux HCoV. Ces résultats pourraient suggérer une ressemblance avec les phénomènes présents avec le VIH chez l'humain, soit que ces cellules aideraient à transporter le virus vers le SNC. De plus, nous avons observé que cette susceptibilité semble être influencée par l'état de différenciation de ces cellules.

L'utilisation de lignées cellulaires pour la plupart de nos travaux ont présenté plusieurs avantages dont celui d'avoir accès à une grande quantité de cellules ayant des

caractéristiques similaires d'une expérience à l'autre. De plus, les lignées nous ont donné la possibilité d'étudier le phénomène de persistance, puisque les cellules primaires ne survivent généralement pas plus qu'une semaine en culture. Il est également observé dans d'autres modèles viraux comme le MHV chez la souris ou le VIH chez l'humain, que les résultats obtenus chez les lignées concordent fortement avec ceux obtenus sur les cellules primaires (Tardieu *et al.*, 1986).

### **1. Susceptibilité des lignées leucocytaires humaines à l'infection par les HCoV**

Des huit lignées leucocytaires étudiées, seulement une est susceptible à l'infection par les deux sérotypes de HCoV, soit la lignée promonocytaire THP.1. L'ensemble des lignées lymphocytaires ne sont pas susceptibles à l'infection par ni l'un ni l'autre des HCoV. En effet, la lignée THP.1 semble supporter une infection aiguë par HCoV-229E, démontré par la présence d'ARNm viral jusqu'à 7 jours post-infection, de protéines virales S en surface et intracellulairement à 1 jour post-infection et de particules virales par immunoperoxydase indirecte. La production de virions infectieux HCoV-229E par THP.1 diminue avec le temps jusqu'à atteindre une  $DICT_{50}$  non détectable à 10 jours post-infection. Même si le RT-PCR n'était pas quantitatif, une diminution d'intensité des bandes sur le gel auraient normalement dû apparaître pour corrélérer avec la diminution de protéines virales observé par cytométrie en flux et de particules virales en immunoperoxydase. Cette observation pourrait indiquer un blocage survenant au niveau de la traduction de protéines virales. D'autres expériences seront nécessaires afin d'appuyer cette hypothèse.

L'infection de la lignée THP.1 par HCoV-OC43 semble être persistante puisque les éléments viraux sont toujours détectés après 7 mois post-infection (Tableau III) soit l'ARNm viral, les protéines virales S intracellulaires et extracellulaires et N et la production de virus infectieux. Également, le signal bimodal retrouvé pour la protéine S à la surface des cellules par cytométrie en flux pourrait représenter l'infection de cellules qui sont en phase G2, soit qui ont deux fois plus d'ADN et donc prêts à être divisées. Ces cellules auraient logiquement deux fois plus de virus qu'une cellule en tout autre phase du cycle cellulaire. Ce résultat pourrait donc suggérer que l'infection est dépendante de la

phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule ou que l'infection induirait la cellule à se diviser, toutefois, ce résultat n'est jamais observable lors de l'analyse la protéine S de façon intracellulaire ni lors de l'analyse de la protéine N. Le virus de la vaccine, par exemple, pousse la cellule qu'il infecte à entrer en phase S du cycle cellulaire (Wali et Strayer, 1999). Des expériences subséquentes sur l'ADN cellulaire devrons donc être effectuées pour confirmer cette hypothèse.

Contrairement à ce qui est démontré chez les coronavirus murins (Lamontagne et Dupuis, 1984 ; 1989), nos résultats suggèrent que les lymphocytes T et B humains ne sont pas susceptibles à l'infection par les HCoV. Il est cependant à noter que les lignées de lymphocytes utilisées au cours des expériences étaient de types CD4+ et qu'une seule lignée B fut testée. Ainsi, l'analyse de d'autres types de lignées sera utile. Lamontagne et Dupuy ont observés en 1989 que le MHV-3 à la capacité d'infecter des cellules de la rate, soit des lymphocytes B et T ainsi que des cellules thymiques. Toujours en concordance avec ces derniers travaux, une persistance de MHV à également été établie sur une lignée lymphocytaire murine, soit la lignée YAC (Lamontagne et Dupuy, 1984). Dans notre cas, chez l'homme, il semble que les lymphocytes possèdent une résistance intrinsèque à l'infection par le HCoV, soit une inhabilité à être infectées et supporter une réplication virale. Ce phénomène est également retrouvé chez d'autres virus comme le virus de l'herpes simplex humain (Sarmiento et Kleinerman, 1990).

Un autre résultat intéressant fut obtenu suite à l'analyse de l'aminopeptidase-N ou CD13 en surface des cellules des trois lignées promonocytaires. En effet, toutes les lignées promonocytaires expriment cette molécule, soit le récepteur pour le HCoV-229E. Nos travaux suggèrent donc que même si ce récepteur est essentiel (Delmas *et al.*, 1992 ; Yeager *et al.*, 1992), il n'est probablement pas le seul facteur impliqué dans l'infection. Les études menées jusqu'à aujourd'hui qui ont déterminé que l'aminopeptidase-N agissait comme récepteur pour certains coronavirus furent surtout basées sur des expériences destinées soit au blocage du récepteur afin de vérifier que l'infection n'est plus possible (Delmas *et al.*, 1992 ; Yeager *et al.*, 1992), soit à rendre susceptible à l'infection une lignée n'exprimant pas initialement le récepteur en transfectant ce dernier (Soderberg *et*

*al.*, 1993). Ainsi, d'autres études devront être effectuées afin de déterminer si un second récepteur doit être nécessaire pour l'établissement d'une infection par le HCoV-229E. Le TGEV, par exemple, utilise l'aminopeptidase-N comme récepteur principal (Delmas *et al.*, 1995) cependant, un second récepteur restreint aux entérocytes de porcs nouveaux nés fut également trouvé (Weingartl et Derbyshire, 1994).

## **2. Caractérisation de l'infection de la lignée promonocytaire THP.1 par les HCoV**

Il a été suggéré que l'augmentation de molécules inflammatoires pourrait participer à la pathogenèse de plusieurs maladies neurologiques en dégradant les constituants de la barrière hémato-encéphalique ou même en recrutant des leucocytes au SNC (Kieseier *et al.*, 1999).

L'analyse de certaines métalloprotéases de la matrice suggère que les promonocytes semblent sécréter une plus grande quantité de proMMP-9 lorsqu'elles sont infectées. Des résultats similaires furent observés chez des monocytes/macrophages infectées avec le VIH-1 (Chapel *et al.*, 1994). L'infection de ces cellules contribuerait ainsi à faire sécréter une molécule, qui lorsque activée, induirait des dommages à la barrière hémato-encéphalique. Cette métalloprotéase pourrait être augmentée de façon directe, soit par l'interaction des protéines virales avec des protéines cellulaires. En effet, il a récemment été démontré pour le VIH-1 que la protéine virale tat induit la MMP-9 dans des monocytes en interagissant avec des protéines tyrosine phosphatases et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Kumar *et al.*, 1999). L'augmentation de la proMMP-9 pourrait également être fait de façon indirecte, soit par des cytokines sécrétées en plus grandes quantités lors de l'infection. En effet, il est connu que le TNF- $\alpha$  et l'IL1- $\beta$  augmentent la production de MMP-9 dans les monocytes/macrophages (Welgus *et al.*, 1992). Il est intéressant de mentionner que la gélatinase B ou MMP-9 fut récemment corrélée avec des maladies démyélinisantes, telle la SEP (Lichtinghagen *et al.*, 1999; Kieseier *et al.*, 1999). En effet, les cellules du système immunitaire sont la source majeure de MMP impliquées dans le dommage de la barrière hémato-encéphalique et ayant également la capacité de cliver la MBP (Proost *et al.*, 1993). Ainsi, l'infection de cellules du système immunitaire par les HCoV sont compatibles avec le fait que ces virus peuvent être impliqués dans une

maladie comme la SEP, ici, en contribuant à la dégradation de la barrière hémato-encéphalique de façon indirecte comme récemment démontré par Edwards *et al.* (2000).

### 3. Persistance de HCoV-OC43

Nos travaux démontrent l'établissement d'une infection persistante de la lignée promonocytaire THP.1 par le HCoV-OC43. Ce sérotype viral a également la capacité d'établir des infections persistantes chez plusieurs lignées du SNC comme la lignée oligodendrocytaire MO3.13, neurogliale H4 et astrocytaires U-87 MG et U-373 (Arbour *et al.*, 1999b ; Collins et Sorensen, 1986).

L'établissement de la persistance dans la lignée THP.1 fut détectée au début de nos travaux, nous permettant donc souvent d'utiliser cette lignée comme témoin positif. La réplication du HCoV-OC43 dans ces cellules ne semblait pas modifier l'apparence de celles-ci. Cependant, la croissance cellulaire semblait être ralentie. La quantité de virions infectieux produit semblait également diminuer avec le temps passant d'une  $DICT_{50}$  extracellulaire initiale d'environ 9,0 log/mL à 2,75 log/mL après 7 mois d'infection et une  $DICT_{50}$  initiale intracellulaire d'environ 4,5 log<sub>10</sub>/mL à 2,25 log<sub>10</sub>/mL après 7 mois d'infection. Cette baisse de production de virus infectieux pourrait être expliquée par une sorte d'atténuation du virus pouvant être observé suite à de nombreux passages dans une culture cellulaire. Les coronavirus possèdent une grande fréquence de recombinaison ou de mutation (Lai et Cavanagh, 1997). En effet, suite à ces nombreux passages, les coronavirus peuvent subir des délétions ou des substitutions variables même en absence de pression sélective expérimentale. (Lai et Cavanagh, 1997). Les délétions sont le plus souvent vu au niveau du gène codant pour la protéine S surtout au niveau de la région hypervariable encodant pour la sous-unité S1. La diminution de production de virus infectieux peut aussi être expliquée par une augmentation de la concentration de particules défectives. Les coronavirus ont la capacité de générer des particules défectives. (Lai et Cavanagh, 1997). Ainsi, l'augmentation de la concentration de ces particules fera conséquemment diminuer le titre infectieux puisque ces derniers interféreront avec la réplication du virus sauvage. Ce dernier phénomène est observé pour le virus de la rage infectant des lignées promonocytaires par exemple (Ray *et al.*, 1995). Les mécanismes

décrits ci-haut, pouvant intervenir dans la persistance du HCoV-OC43 dans des cellules promonocytaires *in vitro* nécessiteront toutefois des analyses subséquentes.

Selon Mizzen *et al.*, (1983), la persistance observée avec le MHV serait régulée par des propriétés de la culture cellulaire et non d'une cellule individuelle. Un équilibre stable serait atteint entre le virus et la population cellulaire infectée n'impliquant habituellement qu'une fraction des cellules. Les coronavirus humains n'induisent normalement pas d'effets cytopathiques lorsqu'ils infectent des cellules, contrairement aux MHV. Cependant, les nombreux passages effectués lors de l'infection persistante pourraient faire émerger des variants viraux qui auraient une faible capacité cytopathique. Certains chercheurs ont observés que dans des cultures infectées de façon persistante avec le MHV, certaines cellules n'expriment plus le récepteur spécifique à ce virus (Chen et Baric, 1996). Ces cellules, suite à l'infection n'ont plus de récepteur en surface et deviennent résistantes au virus. Ainsi, les cellules susceptibles, c'est-à-dire celles exprimant le récepteur, sont détruites par l'infection alors que les autres cellules, n'exprimant pas le récepteur, restent en vie, libérant toutefois des particules virales infectieuses tout en ayant la capacité de redevenir susceptible en réexprimant le récepteur et de subir un effet cytopatique par le virus. La persistance est également établie de cette façon pour le rétrovirus aviaire par exemple (Weiss et Taylor, 1995). L'inhibition d'expression du récepteur viral serait peut-être due à l'interaction intracellulaire du virion avec des récepteurs naissants (Chen et Baric, 1996).

La découverte que les virus peuvent tuer les cellules via apoptose a ouvert de nouvelles voies de recherche (Hinshaw *et al.*, 1994 ; Tolskaya *et al.*, 1995). En effet, l'inhibition d'apoptose par bcl-2 suite à l'infection, pourrait promouvoir la persistance virale.

Les coronavirus humains ont donc la capacité de se répliquer dans des constituants cellulaires du système immunitaire qui habituellement servent à éliminer le virus. Il en résulte un avantage sélectif pour le virus, qui cause une sorte d'immunosuppression contre soi-même (Oldstone, 1989).

#### 4. Différenciation

Les résultats démontrant que les HCoV ont la capacité d'infecter la lignée THP.1 et non les deux autres lignées monocytaires suggèrent qu'il y a une corrélation entre la susceptibilité à l'infection et le stade de différenciation cellulaire. En effet, ces trois lignées sont chacune à un stade de différenciation différent ayant par contre toutes des caractéristiques monocytaires et étant facilement induits à maturer vers des macrophages avec des esters de phorbols tel le PMA (Okada *et al.*, 1986 ; Helin *et al.*, 1999). Ces lignées cellulaires sont normalement utilisées comme modèles pour les études d'interactions entre virus et monocytes même si leur stade de différenciation n'est pas normalement retrouvé en très grand nombre dans la circulation sanguine de sujets normaux. HL-60 est la lignée la plus immature et est apparentée à un stade de progéniture myéloïde initiale alors que THP.1 et U937 appartiennent plutôt à un stade de différenciation plus éloigné, soit promonocytaire. La lignée U937 est même un peu plus mature que THP.1 (Okada *et al.*, 1986 ; Helin *et al.*, 1999). Ainsi, dans notre cas, les coronavirus humains auraient la capacité d'infecter le stade de différenciation représenté par la lignée THP.1, suggérant que la susceptibilité monocytaires à l'infection par les HCoV est limitée à une période courte dans leur processus naturel de différenciation.

Il fut intéressant de vérifier si une différenciation complète, la seule pouvant être réalisée, des lignées promonocytaires en macrophages pourrait modifier la susceptibilité à l'infection. Une différenciation induite chimiquement à la capacité de modifier leur perméabilité pour plusieurs virus. La réplication de VIH-1 dans la lignée monocytaires U-937 est inhibée suite à la différenciation de celle-ci par le PMA (Roivainen et Hovi, 1989). Un phénomène semblable peut être observé par exemple chez le RSV ou la différenciation de lignées promonocytaires ne permet plus au virus d'infecter de façon productive la lignée (Cirino *et al.*, 1993). Le phénomène contraire pour des lignées monocytaires est retrouvé chez les virus de l'herpes simplex -1 et le cytomégalovirus humain (Tenney et Morahan, 1991; Weinshenker *et al.*, 1988). Nos résultats indiquent qu'une différenciation de la lignée THP.1 préalablement à l'infection, rend cette lignée non susceptible aux deux sérotypes de HCoV. De plus, une différenciation de cette lignée déjà infectée de façon persistante avec HCoV-OC43, pousse celle-ci à produire une

quantité beaucoup moindre de particules virales infectieuses. Les mécanismes par lequel le PMA réussit à empêcher ou même à inhiber une infection virale sont incertains. Il est cependant connu que les propriétés biologiques du PMA sont généralement considérées comme étant représentatifs des phénomènes de différenciation *in vivo*, soit l'activation de la protéine kinase C, un enzyme impliqué dans plusieurs réponses cellulaires (Duan *et al.*, 1997). Il serait intéressant de faire des analyses avec d'autres composés, tel les acides rétinoïques et la 1,25-dihydroxyvitamine D3 (VD3), permettant la différenciation des monocytes en macrophages. En effet, ces composés n'utilisent pas les mêmes voies de signalisation pour différencier la cellule (Matikainen et Hurme, 1994; Schwende *et al.*, 1996).

L'analyse de l'APN sur les cellules différenciées par cytométrie en flux nous donne des résultats comparables aux cellules non différenciées. Ainsi, le PMA ne semble pas agir en régulant à la baisse la quantité de récepteurs spécifiques aux HCoV-229E. Cependant, il pourrait agir sur la cellule en diminuant l'expression d'autres molécules pouvant agir comme co-récepteurs viraux qui ne sont pas encore identifiés. De plus, il pourrait y avoir inhibition de facteurs cellulaires essentiels à la réplication virale ou même la production de facteurs pouvant intervenir au niveau de cette réplication comme par exemple des cytokines tels l'interféron  $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$ .

Le stade de différenciation des monocytes humains semble donc être un élément essentiel qui pourrait être au centre des mécanismes impliqués dans une persistance au niveau des cellules et même de l'établissement d'un réservoir viral. Ainsi, ce résultat suggère que lorsque le monocyte infecté se rend dans un tissu et se différencie en macrophage, il se verra libérer beaucoup moins de particules virales. Ainsi, les résultats de différenciation suggèrent que le monocyte, à un certain stade de différenciation, peut être infecté par les HCoV. Ensuite, durant son processus de maturation en macrophages, la quantité de particules virales libérée sera beaucoup moindre mais encore existante.

En ce qui concerne les neutrophiles, il n'est pas clair si ces cellules sont susceptibles aux HCoV puisque les signaux positifs observés par RT-PCR pourraient seulement être du à

un attachement non spécifique très élevé. Il a récemment été démontré que le VIH-1 a la capacité de se lier aux lymphocytes B via la molécule CD21, sans toutefois les infecter. Ces cellules agissent comme des réservoirs extracellulaires de virus transportant tout de même les particules virales aux lymphocytes T et ayant la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique (Moir *et al.*, 2000). Ainsi, le même phénomène pourrait exister avec les HCoV et les neutrophiles. Ces cellules représentent près de 70% des cellules du sang périphérique, ainsi, une interaction avec les HCoV aurait sans doute une contribution significative à leur dissémination vers le SNC. D'autres expériences seront nécessaires afin de confirmer cet avancement.

Les résultats démontrés avec les lignées cellulaires ne concordent pas avec ceux observés chez les PBMC. Evidemment, les expériences avec les PBMC devront être refaites. Afin de tirer des conclusions valables, il sera nécessaire d'utiliser le même donneur pour effectuer les triplicatas à l'intérieur d'une même expérience. Également, plusieurs expériences devront être effectuées avec des donneurs différents afin d'analyser toutes les diverses susceptibilités aux HCoV possibles.

# CONCLUSION

Le projet d'étude consistait d'abord à démontrer la susceptibilité de lignées leucocytaires humaines à l'infection par les coronavirus humain, de caractériser quelques mécanismes entourant ces infections, de déterminer si un changement d'état cellulaire pouvait modifier cette susceptibilité puis d'essayer de corrélérer certains de ces résultats avec ceux obtenus chez des cellules mononuclées du sang périphérique humain.

Pour la première fois, une lignée promonocytaire fut démontré susceptible aux deux sérotypes de HCoV. L'infection de THP.1 par HCoV-229E est aiguë et semble nécessiter un co-récepteur encore non-identifié, alors qu'elle est persistante pour HCoV-OC43. Ces résultats suggèrent que le promonocyte pourrait être la voie d'entrée par lequel le coronavirus humain se rend au cerveau et pourrait même servir de réservoir viral au niveau du sang périphérique. De plus, nos résultats démontrent que ces cellules produisent une plus grande quantité de proMMP-9 lorsque infectées. Ainsi, non seulement ces cellules transporteraient le virus au SNC mais ils pourraient se voir contribuer à la destruction de la barrière hémato-encéphalique via les métalloprotéinases lors de pathologies neurologiques, telle la SEP.

Nos études démontrent pour la première fois également que l'infection du monocyte semble être dépendante du stade de différenciation de la cellule. En effet, les promonocytes rendus macrophagiques *in vitro*, ne semblent plus être susceptible à une réplication coronavirale. Également la réplication est diminuée lorsqu'on soumet la lignée promonocytaire infectée avec HCoV-OC43 à une différenciation. Ce résultat suggère qu'une fois la cellule monocytaire infectée se rend dans un tissu, comme le cerveau par exemple, il se verra libérer moins de virus infectieux, mais encore assez pour créer un dommage.

Les résultats préliminaires obtenus sur les neutrophiles ne sont pas encore concluants mais pourraient suggérer un attachement non spécifique du virus à la surface de ces cellules, contribuant tout de même à la dissémination de celui-ci au SNC.

Une corrélation avec les PBMC n'a pas pu être effectuée au stade préliminaire, d'autres expériences s'avèrent nécessaires.

Les résultats obtenus sur l'interaction des leucocytes et des coronavirus humains restent à être caractérisés d'avantage afin de pouvoir mieux déterminer la contribution de ces cellules dans des maladies neurodégénératives. En effet, il serait intéressant d'analyser par exemple l'apport d'autres molécules pouvant dégrader la barrière hémato-encéphalique, telles diverses cytokines. L'analyse de l'interaction des HCoV avec les cellules provenant de patients souffrant de neuropathologies comme la SEP par rapport à des témoins normaux serait une avenue future intéressante.

### Liste de références

- AKHYANI N., R. Berti, M. B. Brennan, S. S. Soldan, J. M. Eaton, H. F. McFarland et S. Jacobson. 2000. «Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV-6): increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis». J Infect Dis, vol. 182, no. 5, p. 1321-1325.
- ALTER M., M. Harshe, V. E. Anderson, L. Emme et E. J. Yunis. 1976. «Genetic association of multiple sclerosis and HL-A determinants». Neurology, vol. 26, no. 1, p. 31-36.
- AN S., C. J. Chen, X. Yu, J. L. Leibowitz et S. Makino. 1999. «Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer». J Virol, vol. 73, no. 9, p. 7853-7859.
- ANDERSON J. R. et H. J. Field. 1982. «The development of retinitis in mice with nonfatal herpes simplex encephalitis». Neuropathol Appl Neurobiol, vol. 8, no. 4, p. 277-287.
- APOSTOLOV K. et P. Spasic. 1975. «Evidence of a viral aetiology in endemic (Balkan) nephropathy». Lancet, vol.2, no. 7948, p. 1271-1273.
- ARBOUR N., G. Coté, C. Lachance, M. Tardieu, N. R. Cashman et P. J. Talbot. 1999. «Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43». J Virol, vol. 73, no. 4, p. 3338-3350.
- ARBOUR N., S. Ékandé, 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». J Virol, vol. 73, no. 4, p. 3326-3337.
- ARBOUR N., R. Day, J. Newcombe et P. J. Talbot. 2000. «Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses». J Virol, vol. 74, no. 19, p. 8913-8921.
- ARBOUR N., S. Ekande, G. Coté, C. Lachance, F. Changnon, M. Tardieu et N. R. Cashman. 1999. «Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E». J Virol, vol. 73, no. 4, p.3326-2237.
- ARMSTRONG J., H. Niemann, S. Smeekens, P. Rottier et G. Warren. 1984. «Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus». Nature, vol. 308, no. 5961, p. 751-752.
- ATTIBELE N., P. R. Wyde, J. Trial, S. C. Smole, C. W. Smith et R. D. Rossen. 1993. «Measles virus-induced changes in leucocyte function antigen 1 expression and leucocyte aggregation : possible role in measles virus pathogenesis». J Virol, vol. 67, no. 2, p. 1075-1079.

AUWERX J. 1991. «The human leukemia cell line, THP.1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation». Experimentia, vol. 47, no. 1, p. 22-31.

AUWERX J., B. Staels, F. Van Vaeck et J. L. Ceuppens. 1992. «Changes in IgG Fc receptor expression induced by phorbol 12-myristate 13-acetate treatment of THP.1 monocytic leukemia cells». Leuk Res, vol. 16, no. 3, p. 317-327.

BAILEY O. T., A. M. Pappenheimer, F. S. Cheever et J. B. Daniels. 1949. «A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. II. Pathology. J Exp Med, vol. 90, p. 195-212.

BAKER S. C., C. K. Shieh, L. H. Soe, M. F. Chang, D. M. Vannier et M. M. Lai. 1989. «Identification of a domain required for autoproteolytic cleavage of murine coronavirus gene A polyprotein». J Virology, vol. 63, no. 9, p. 3693-3699.

BANG , F. B. et A. Warwick. 1960. «Mouse macrophages as host cells for the mouse hepatitis virus and the genetic base of their susceptibility». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 46, p. 1065-1075.

BARIC R. S., S. A. Stohlman, M. K. Razavi et M. M. Lai. 1985. «Characterization of leader-related small RNAs in coronavirus-infected cells : further evidence for leader-primed mechanism of transcription». Virus Res, vol. 3, no. 1, p. 19-33.

BARIC R. S. et B. Yount. 2000. «Subgenomic negative-strand RNA function during mouse hepatitis virus infection». J Virol, vol. 74, no.9, p. 4039-4046.

BARNETT E. M. et S. Perlman. 1993. «The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM». Virology, vol. 194, no. 1, p. 185-191.

BARTHOLD S.W., D. S. Beck, A. L. Smith. 1986 «Mouse hepatitis virus nasoencephalopathy is dependent upon virus strain and host genotype». Arch Virol, vol. 91, no. 3-4, p. 247-56.

BASKIN H., S. Ellermann-Eriksen, J. Lovmand et S. C. Mogensen. 1997. «Herpes simplex virus type 2 synergizes with interferon-gamma in the induction of nitric oxide production in mouse macrophages through autocrine secretion of tumour necrosis factor-alpha». J Gen Virol, vol. 78, no. 1, p. 195-203.

BERARDELLI P. 1997. «Herpesvirus linked to multiple sclerosis». Science, vol. 278, no. 5344, p. 1710.

BIRKEDAL-HANSEN H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo et J. A. Engler. 1993. «Matrix metalloproteinases: a review». Crit Rev Oral Biol Med, vol. 4, no. 2, p. 197-250.

- BOMSEL M. 1997. «Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier». Nat Med, vol. 3, no. 1, p. 42-7.
- BONAVIA A., N. Arbour, V. W. Yong et P. J. Tabot. 1997. «Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43». J Virol, vol. 71, no. 1, p. 800-806.
- BONILLA P. J., A. E. Gorbalenya et S. R. Weiss. 1994. «Mouse hepatitis virus strain A59 RNA polymerase gene ORF 1a: heterogeneity among MHV strains». Virology, vol. 198, no. 2, p. 736-740.
- BORREGAARD N. et J. B. Cowland. 1997. «Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte». Blood, vol. 89, no. 10, p. 3503-3521.
- BOS E. C., W. Luytjes, H. V. Van der Meulen, H. K. Koerten et W. J. Spaan. 1996. «The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus». Virology, vol. 218, no. 1, p. 52-60.
- BOURSNELL M. E., T. D. Brown, I. J. Foulds, P. F. Green, F. M. Tomley et M. M. Binns. 1987. «The complete nucleotide sequence of avian infectious bronchitis virus: analysis of the polymerase-coding region». Adv Exp Med Biol, vol. 218, p. 15-29.
- BRACK-WERNER R. 1999. «Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis». AIDS, vol. 14, no. 13, p. 1-22.
- BRADBURNE A. F. 1969. «Sensitivity of L132 cells to some “new” respiratory viruses». Nature, vol. 221, no. 175, p. 85-86.
- BRADBURY M. W. 1993. «The blood-brain barrier». Exp Physiol, vol. 78, no. 4, p. 453-472.
- BRADFORD M. M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding». Anal. Biochem, vol. 72, p. 248-254.
- BRAYTON P. R., R. G. Ganges et S. A. Stohlman. 1981. «Host cell nuclear function and murine hepatitis virus replication». J Gen Virol, vol. 56, no. 2, p. 457-460.
- BRAYTON P. R., M. M. Lai et S. A. Stohlman. 1982. «Characterization of two RNA polymerase activities induced by mouse hepatitis virus». J Virol, vol. 42, no. 3, p. 847-853.
- BRIERLEY I, M. E. Bournnell, M. M. Binns, B. Bilimoria, V. C. Blok, T. D. Brown et S. C Inglis. 1987. «An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBM», vol 6, no. 12, p. 3779-3785.

BRIERLEY I, P. Digard et S. C. Inglis. 1989. «Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal : requirement for an RNA pseudoknot», vol. 57, no. 4, p. 537-547.

BURKS J. S., B. L. DeVald, L. D. Jankovsky et J. C. Gerdes. 1980. «Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients». Science, vol. 209, no. 4459, p. 933-934.

CABIRAC G. F., K. F. Soike, J. Y. Zhang, K. Hoel, C. Butunoi, G. Y. Cai, S. Johnson et R. S. Murray. 1994. «Entry of coronavirus into primate CNS following peripheral infection». Microb Pathog, vol. 16, no. 5, p. 349-357.

CABIRAC G. F., R. S. Murray, L. B. McLaughlin, D. M. Skolnick, B. Hogue, K. Dorovini-Zis et P. J. Didier. 1995. «In vitro interaction of coronaviruses with primate and human brain microvascular endothelial cells». Adv Exp Med Biol, vol. 380, p. 79-88.

CAUL E. O. et S. I. Egglestone. 1977. «Further studies on human enteric coronavirus». Arch Virol, vol. 54, no. 1-2, p. 107-117.

CAVALLARO J. J. et A. S. Monto. 1970. «Community-wide outbreak of infection with a 229E-like coronavirus in Tecumseh, michigan». J Infect Dis, vol. 122, no. 4, p. 272-279.

CAVANAGH D., P. J. Davis et D. J. Pappin. 1986. «Coronavirus IBV glycopeptides : locational studies using proteases and saponin, a membrane permeabilizer». Virus Res, vol. 4, no. 2, p. 145-156.

CAVANAGH D., D. A. Brian, M. A. Brinton, L. Enjuanes, K. V. Holmes, M. C. Horzineck, M. M. Lai, H. Laude, P. G. W. Plagemann, S. G. Sidell, W. Span, F. Taguchi et P. J. Talbot. 1994. «Revisin of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus and Arterivirus genera». Arch Virol, vol. 135, no. 1-2, p. 227-237.

CHAMBERS A. F. et L. M. Matrisian. 1997. «Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis». J Natl cancer Inst, vol. 89, no. 17, p. 1260-1270.

CHAPEL C., V. Camara, P. Clayette, S. Salvat, A. Mabondzo, V. Lebond, D. Marce, C. Lafuma et D. Dormont. 1994. «Modulations of 92kDa gelatinase B and its inhibitors are associated with HIV-1 infection in human macrophage culture». Boichem Biophys Res Commun, vol. 204, no. 3, p. 1272-1278.

CHEEVERS F. S., J. B. Daniels, A. M. Pappenheimer et O. T. Bailey. 1949. « A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. I. Isolation and biological properties of the virus». J Exp Med, vol. 90, p. 181-194.

- CHEN W. et R. S. Baric. 1996. «Molecular anatomy of mouse hepatitis virus persistence : coevolution of increased host cell resistance and virus virulence». J Virol, vol. 70, no. 6, p. 3947-3960.
- CIRINO N. M., J. R. Panuska, A. Villani, H. Taraf, N. A. Rebert, R. Merolla, P. Tsivitse et I. A. Gilbert. 1993. «Restricted replication of respiratory syncytial virus in human alveolar macrophages». J Gen Virol, vol. 74, no. 8, p. 1527-1537.
- COLLINS A. R. 1995. «Identification of 120 kD and 30 kD receptors for human coronavirus OC43 in cell membrane preparations for newborn mouse brain». Adv Exp Med Biol, vol. 380, p. 387-390.
- COLLINS A. R. 1998. « Human macrophages are susceptible to coronavirus OC43». Adv Exp Med Biol., vol. 440, p. 635-639.
- COLLINS A. R., R. L. Knobler, H. Powell et M. J. Buchmeier. 1982. «Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell--cell fusion». Virology, vol. 119, no.2, p. 358-371.
- COLLINS A. R. et O. Sorensen. 1986. «Regulation of viral persistence in human glioblastoma and rhabdomyosarcoma cells infected with coronavirus OC43». Microb Pathog, vol. 1, no. 6, p. 573-782.
- COMPTON S. R., S. W. Barthold et A. L. Smith. 1993. «The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses». Lab Anim Sci, vol. 43, no. 1, p. 15-28.
- CONANT K., J. C. McArthur, D. E. Griffin, L. Sjulson, L. M. Wahl et D. N. Irani. 1999. «Cerebrospinal fluid levels of MMP-2, 7, and 9 are elevated in association with human immunodeficiency virus dementia». Ann Neurol, vol. 46, no. 3, p. 391-398.
- COUTELIER J. P., C. Godfraind, G. S. Dveksler, M. Wysocka, C. B. Cardellichio, H. Noel et K. V. Holmes. 1994. «B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules that serve as receptors for murine coronavirus». Eur J Immunol, vol. 24, no. 6, p. 1383-1390.
- DANIEL C. et P. J. Talbot. 1990. «Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59». Virology, vol. 174. No. 1, p. 87-94.
- DEA S. et P. Tijssen. 1988. «Identification of structural proteins of turkey enteric coronavirus». Arch Virol, vol. 99, no. 3-4, p. 173-186.
- De Haan C. A., H. Vennema et P. J. Rottier. 2000. «Assembly of the coronavirus envelope : homotypic interactions between the M proteins». J Virol, vol. 74, no. 11, p. 4967-4978.

DELMAS B., J. Gelfi, R. L'Haridon, L. K. Vogel, H. Sjostrom, O. Noren et H. Laude. 1992. «Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV». Nature, vol. 357, no. 6377, p. 417-420.

DELMAS B., J. Gelfi, E. Kut, H. Sjostrom, O. Noren et H. Laude. 1994. «Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site». J Virol, vol. 68, no. 8, p. 5216-5224.

DELMAS B., E. Kut, J. Gelfi et H. Laude. 1995. «Overexpression of TGEV cell receptor impairs the production of virus particles». Adv Exp Med Biol, vol. 380, p. 379-385.

DEREGT D., M. Sabara et L. A. Babiuk. 1987. «Structural proteins of bovine coronavirus and their intracellular processing». J Gen Virol, vol. 68, no. 11, p. 2863-2877.

DHAWAN S., L. M. Wahl, A. Heredia, Y. Zhang, J. S. Epstein, M. S. Meltzer et I. K. Hewlett. 1995. «Interferon-gamma inhibits HIV-induced invasiveness of monocytes». J Leukoc Biol, vol. 58, no. 6, p. 713-716.

DOUGHRI A. M., J. Storz, I. Hajer et H. S. Fernando. 1976. «Morphology and morphogenesis of a coronavirus infecting intestinal epithelial cells of newborn calves». Exp Mol Pathol, vol. 25, no. 3, p. 355-370.

DUAN X., H. J. Nauwynck et M. B. Pensaert. 1997. «Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)». Arch Virol, vol. 142, no. 12, p. 2483-2497.

DUARTE M., K. Tobler, A. Bridgen, D. Rasschaert, M. Ackermann et H. Laude. 1994. «Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF». Virology, vol. 198, no. 2, p. 466-476.

EBERS G. C et A. D. Sadovnick. 1994. «The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility». J Neuroimmunol, vol. 54, p. 1-17.

EBERS G. C., K. Kukay, D. E. Bulman, A. D. Sadovnick, G. Rice, C. Anderson, H. Armstrong, K. Cousin, R. B. Bell, W. Hader, D. W. Paty, S. Hashimoto, J. Oger, P. Duquette, S. Warren, T. Gray, P. O'Connor, A. Nath, A. Auty, L. Metz, G. Francis, J. E. Paulseth, T. J. Murray, W. Pryse-Phillips, R. Nelson, M. Freedman, D. Brunet, J. P. Bouchard, D. Hinds et N. Risch. 1996. «A full genome search in multiple sclerosis. Nat Genet, vol. 13, p. 472-476.

ELEOUET J. F., D. Rasschaert, P. Lambert, L. Levy, P. Vende et H. Laude. 1995. «Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus». Virology, vol. 206, no. 2, p. 817-822.

EVANS M. R. et R. W. Simpson. 1980. «The coronavirus avian infectious bronchitis virus requires the cell nucleus and host transcriptional factors». Virology, vol. 105, no. 2, p. 582-591.

FLAMAND A., J. P. Gagner, L. A. Morrison et B. N. Fields. 1991. «Penetration of the nervous systems of suckling mice by mammalian reoviruses». J Virol, vol. 65, no. 1, p. 123-131.

FLEMING J. O., S. A. Stohlman, R. C. Harmon, M. M. Lai, J. A. Frelinger et L. P. Weiner. 1983. «Antigenic relationships of murine coronavirus : analysis using monoclonal antibodies to JHM (MHV-4) virus». Virology, vol. 131, no. 2, p. 296-307.

FLEMING J. O., F. A. Zaatari, W. Gilmore, J. D. Berne, J. S. Burks, S. A. Stohlman, W. W. Tourtellotte et L. P. Weiner. 1988. «Antigenic assessment of coronaviruses isolated from patients with multiple sclerosis». Arch Neurol, vol. 45, no. 6, p. 629-633.

FOLKS T. M., J. Justement, A. Kinter, S. Schnittman, J. Orenstein, G. Poli et A. S. Fauci. 1988. «Characterization of a promonocyte clone chronically infected with HIV and inducible by 13-phorbol-12-myristate acetate». J Immunol, vol. 140, no. 4, p. 1117-1122.

FRANA M. F., J. N. Behnke, L. S. Sturman et K. V. Holmes. 1985. «Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus : host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion». Journal of Virology, vol. 56, no. 3, p. 912-920.

GALLAGHER T. M., M. J. Buchmeier et S. Perlman. 1992. «Cell receptor-independent infection by a neurotropic murine coronavirus». Virology, vol. 191, no. 1, p. 517-522.

GERNA G., N. Passarani, M. Battaglia et E. G. Rondanelli. 1985. «Human enteric coronaviruses: antigenic relatedness to human coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis». J infect Dis, vol. 151, no. 5, p. 796-803.

GODFRAIND C., S. G. Langreth, C. B Cardellichio, R. Knobler, J.P. Coutelier, M. Dubois-Dalcq et K. V. Holmes. 1995. «Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. Lab Invest, vol. 73, no. 5, p. 615-627.

GODET M., J. Grosclaude, B. Delmas et H. Laude. 1994. «Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein». Journal of Virology, vol. 68, no.12, p. 8008-8016.

GOMEZ D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji et U. P. Thorgeirsson. 1997. «Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions». Eur J Cell Biol, vol. 74, no. 2, p. 111-122.

GONZALEZ-SCARANO F. et K. L. Tyler, 1987.«Molecular pathogenesis of neurotropic viral infections» Ann Neurol. , vol. 22, no. 5, p. 565-74.

GREEN L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok et S. R. Tannenbaum. 1982. «Analysis of nitrate, nitrite, and (15N)nitrate in biological fluids». Anal Biochem, vol. 126, no.1, p. 131-138.

HAMRE D. et J. J. Procknow. 1966. «A new virus isolated from the human respiratory tract». Proc soc exp Biol Med, vol. 121, no. 1, p. 190-193.

HELIN E., A. A. Salmi, r. Vanharanta et R. Vainionpaa. 1999. «Measles virus replication in cells of myelomonocytic lineage is dependent on cellular differentiation stage». Virology, vol. 253, no. 1, p. 35-42.

HEROLD J. et S. G. Siddell. 1993. «An 'elaborated' pseudoknot is required for high frequency frameshifting during translation of HCV 229E polymerase mRNA». Nucleic Acids Res, vol. 21, no. 25, p. 5838-5842.

HERRLER G., S. Szepanski et B. Schultze. 1991. «9-O-acetylated sialic acid, a receptor determinant for influenza C virus and coronaviruses». Behring Inst Mitt, vol. 89, p. 177-184.

HESS D. C., Y. Thompson, A. Sprinkle, J. Carroll et J. Smith. 1996. «E-selectin expression on human brain microvascular endothelial cells». Neurosci Lett,

HEUSSEN C. et E. B. Dowdle. 1980. «Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrilamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates». Anal Biochem, vol. 102, no. 1, p. 196-202.

HILDRETH J. E. et R. J. Orentas. 1989. « Involvement of a leucocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation». Science, vol 244, no. 4908, p. 1075-1078.

HILLERT J. et O. Olerup. 1993. «Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15, DQ6, Dw2 haplotype». Neurology, vol. 43, no. 1, p. 163-168.

HINSHAW V. S., C. W. Olsen, N. Dybdahl-Sissoko et D. Evans. 1994. «Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses». J Virology, vol. 68, no. 6, p. 3667-3673.

- HOCKERTZ M. K., D. W. Paty et S. S. Beall. 1998. «Susceptibility to relapsing-progressive multiple sclerosis is associated with inheritance of genes linked to the variable region of the TcR beta locus: use of affected family-based controls». Am J Hum Genet, vol. 62, p. 373-385.
- HOGUES B. G et D. A. Brian. 1986. «Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43». Virus Res, vol. 5, no. 2-3, p. 131-144.
- HOLMES, K. V. 1990. Coronaviridae and their replication, dans B. N. Fields, D. M. Knipe *et al.* (ed.), Virology, Second Edition. New York: Raven Press, Ltd.
- HOUTMAN J. J. et J. O. Fleming. 1996. «Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination» J Neurovirol, vol. 2, no. 6, p. 361-376.
- IGNJATOVIC J. et L. Galli. 1994. «The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens». Arch. Virol., vol. 138, no. 1-2, p. 117-134.
- JAGANNATH C., J. K. Actor et R. L. Jr. Hunter. 1998. «Induction of nitric oxide in human monocytes and monocyte cell lines by Mycobacterium tuberculosis». Nitric Oxide, vol. 2, no. 3, p. 174-186.
- JOHNSON-LUSSENBERG C. M et Q. Zheng. 1987. «Coronavirus and multiple sclerosis : results of a case/control longitudinal serological study». Adv Exp Med Biol, vol. 218, p. 421-429.
- JOHNSON R. T. 1968. «Pathogenesis for viral infections of the nervous system». N Engl J Med, vol. 278, no. 2, p. 84-92.
- JOHNSON R. T. 1982. «Viruses and chronic neurological diseases». Johns Hopkins Med J, vol. 150, no. 4, p. 132-140.
- JOSEPH J., R. L. Knobler, F. D. Lublin et M. N. Hart. 1989. «Differential modulation of MHC class I antigen expression on mouse brain endothelial cells by MHV-4 infection». J Neuroimmunol, vol. 22, no. 3, p. 241-253.
- KAMAHORA T., L. H. Soe et M. M. Lai. 1989. «Sequence analysis of nucleocapsid gene and leader RNA of human coronavirus OC43». Virus Res, vol. 12, no. 1, p. 1-9.
- KENNEDY D. A et C. M. Johnson-Lussenburg. 1979. «Inhibition of coronavirus 229E replication by actinomycin D». J Virol, vol. 29, no. 1, p. 401-404.
- KENNY A. J., S. L. Stephenson et A. J. Turner. 1987. Cell surface peptidases, dans A. J. Kenny et A. J. Turner (ed.), Mammalian ectoenzymes. New York: Elsevier Scientific Publisher Co., Inc.

KIENZLE T. E., S. Abraham, B. G. Hogue et D. A. Brian. 1990. «Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin-esterase protein». Journal of Virology, vol. 64, no. 4, p. 1834-1838.

KIESEIER B. C., T. Seifert, G. Giovannoni et H. P. Hartung. 1999. «Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment». Neurology, vol. 53, no. 1, p. 20-25.

KING B., B. J. Potts, D. A. Brian. 1985. «Bovine coronavirus hemmagglutinin protein». Virus res, vol. 2, no. 1, p. 53-59.

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, vol. 68, no. 10, p. 6523-6534.

KNOBLER R. L., B. A. Taylor, M. K. Wooddell, W. G. Beamer et M. B. Oldstone. 1984. «Host genetic control of mouse hepatitis virus type-4 (JHM strain) replication. II. The gene locus for susceptibility is linked to the Svp-2 locus on mouse chromosome 7». Exp Clin Immunogenet, vol 1, no. 4, p. 217-222.

KOLB A. F., A. Hegyi, J. Maile, A. Heister, M. Hagemann et S. G. Siddell. 1998. «Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N». Adv Exp Med Biol, vol. 440, p. 61-67.

KOOI C., L. Mizzen, C. Alderson, M. Daya et R. Anderson. 1988. «Early events of importance in determining host cell permissiveness to mouse hepatitis virus infection». J Gen Virol, vol. 69, no. 6, p. 1125-1135.

KOOI C., M. Cervin and R. Anderson. 1991. «Differentiation of acid-pH-dependent and -nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus». Virology, vol. 180, no. 1, p. 108-119.

KRZYSTYNIAK K. et J. M. Dupuy. 1984. «Entry of mouse hepatitis virus 3 into cells». J Gen Virol, vol. 65, no. 1, p. 227-231.

KUBO H., Y. K., Yamanda et F. Taguchi. 1994. «Localisation of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein». Journal of Virology, vol. 68, no. 9, p. 5403-5410.

KUMAR A., S. Dhawan, A. Mukhopadhyay et B. B. Aggarwal. 1999. «Human immunodeficiency virus-1-tat induces matrix metalloproteinase-9 in monocytes through protein tyrosine phosphatase-mediated activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B». FEBS Letters, vol. 462, no. 1-2, p. 140-144.

KURTZKE J. F., K. Hyllested, A. Heltberg et A. Olsen. 1993. «Multiple sclerosis in the Faroe Islands. 5. The occurrence of the fourth epidemic as validation of transmission». Acta Neurol Scand, vol. 88, no. 3, p. 161-173.

KYUWA S., K. Yamaguchi, Y. Toyoda et K. Fujiwara. 1991. «Induction of self-reactive T cells after murine coronavirus infection». J Virol, vol. 65, no. 4, p. 1789-1795.

LAI M. M. et D. Cavanagh. 1997. «The molecular biology of coronaviruses». Adv Virus Res, vol. 48, p. 1-100.

LAMONTAGNE L., D. Decarie et J. M. Dupuy. 1989. «Host cell resistance to mouse hepatitis virus type 3 is expressed in vitro in macrophages and lymphocytes». Viral Immunol, vol. 2, no. 1, p. 37-45.

LAMONTAGNE L. M. et J. M. Dupuy. 1984. «Persistent infection with mouse hepatitis virus 3 in mouse lymphoid cell lines». Infect Immun, vol. 44, no. 3, p. 716-723.

LAMPERT P. W., J. K. Sims et A. J. Kniazeff. 1973. «Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies». Acta Neuropathol (Berl), vol. 24, no. 1, p. 76-85.

LARSEN C. S. 1990. «Activation of human T lymphocytes by phorbol-12,13-dibutyrate and ionomycin». Scand J Immunol, vol. 31, no. 3, p. 353-360.

LARSON H. E. S. E. Reed et D. A. Tyrell. 1980. «Isolation of rhinoviruses and coronavirus from 38 colds in adults». J Med Virol, vol. 5, no. 3, p. 221-229.

LAVI E., P. S. Fishman, M. K. Highkin et S. R. Weiss. 1988. «Limbic encephalitis after inhalation of a murine coronavirus». Lab Invest, vol. 58, no. 1, p. 31-36.

LEE H. J., C. K. Shieh, A. E. Gorbalenya, E. V. Koonin, N. La Monica, J. Tuler, A. Bagdzhadzhyan et M. M. Lai. 1991. «The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase». Virology, vol. 180, no. 2, p. 567-582.

LI D. et D. Cavanagh. 1992. «Coronavirus IBV-induced membrane fusion occurs at near-neutral pH». Arch Virol, vol. 122, no. 3-4, p. 307-316.

LICHTINGHAGEN R., T. Seifert, A. Kracke, S. Marckmann, U. Wurster et F. Heidenreich. 1999. «Expression of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor mononuclear blood cells of patients with multiple sclerosis». J Neuroimmunology, vol. 99, no. 1, p. 19-26.

LIVNEH E. et D. D. Fishman. 1997. «Linking protein kinase C to cell-cycle control». E J Biochem, vol. 248, no. 1, p. 1-9.

LOOK A. T., R. A. Ashmun, L. H. Shapiro et S. C. Peiper. 1989. «Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N». J Clin Invest, vol. 83, no. 4, p. 1299-1307.

LUYTJES W., P. J. Bredenbeek, A. F. Noten, M. C. Horzinek et W. J. Spaan. 1988. «Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2 : indications for RNA recombination between coronavirus and influenza C virus». Virology, vol. 166, no. 2, p. 415-422.

MACNAUGHTON M. R. et H. A. Davies. 1981. «Human enteric coronaviruses. Brief review.». Arch Virol, vol. 70, no. 4, p. 301-313.

MANIL L., P. Motte, P. Pernas, F. Troalen, C. Bohuon et D. Bellet. 1986. «Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. Yield and purity in two-dimensional gel electrophoresis». J Immunol Methods, vol. 90, no. 1, p. 25-37.

MASURE S., P. Proost, J. Van Damme et G. Opdenakker. 1991. «Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8». Eur J Biochem, vol. 198, no. 2, p. 391-398.

MATIKAINEN S et M. Hurme. 1994. «Comparison of retinoic acid and phorbol myristate acetate as inducers of monocytic differentiation». Int J Cancer, vol. 57, no. 1, p. 98-103.

MCINTOSH K., J. H., W. B. Becker, R. M. Chanock. 1967. «Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 58, no. 6, p. 2268-2273.

MCINTOSH K., J. H. Dees, W. B. Becker, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock. 1967. «Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 57, no. 4, p. 933-940.

MIZUGUCHI J., M. A. Beaven, J. H. Li et W. E. Paul. 1986. «Phorbol myristate acetate inhibits anti-IgM-mediated signaling in resting B cells». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 83, no. 12, p. 4474-4478.

MIZZEN L., S. Cheley, M. Rao, R. Wolf et R. Anderson. 1983. «Fusion resistance and decreased infectability as major host determinants of coronavirus persistence». Virology, vol. 128, no. 2, p. 407-417.

MIZZEN L., A. Hilton, S. Cheley et R. Anderson. 1985. «Attenuation of murine coronavirus infection by ammonium chloride». Virology, vol. 142, no. 2, p. 378-388.

MOIR S., A. Malaspina, Y. Li, T. W. Chun, T. Lowe, J. Adelsberger, M. Base , L. A. Ehler, S. Liu, R. T. Jr. Davey, J. A. Mican et A. S. Fauci. 2000. «B cells of HIV-1 infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus activated T cells». J Exp Med, vol. 192, no. 5, p. 637-646.

MONTO A. S. et S. K. Lim. 1974. «The Tecumseh study of respiratory illness. VI. Frequency of and relationship between outbreaks of coronavirus infection». J Infect Dis, vol. 129, no. 3, p. 271-276.

MORRISON L. A., R. L. Sidman et B. N. Fields. 1991. «Direct spread of reovirus from the intestinal lumen to the central nervous system through vagal autonomic nerve fibers». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 88, no. 9, p. 3852-3856.

MOUNIR S., P. Labonte et P. J. Talbot. 1993. «Characterization of the nonstructural and spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43 : comparison with bovine enteric coronavirus». Adv Exp Med Biol, vol. 342, p. 61-67.

MURPHY G. et V. Knauper. 1997. «Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the “hemopexin“ domain?». Matrix Biol, vol. 15, no. 8-9, p. 511-518.

MURRAY R. S., G. Y. Cai, K. Hoel, J. Y Zhang, K. F. Soike et G. F. Cabirac. 1992. «Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system». Virology, vol. 188, no. 1, p. 274-284.

MUSSON R. A. 1983. « Human serum induces maturation of human monocytes in vitro. Changes in cytolytic activity, intracellular lysosomal enzymes, and nonspecific esterase activity». Am J Pathol, vol. 111, no. 3, p. 331-340.

MYINT S.H. 1994. «Human coronaviruses-a brief review». Rev Med, vol. 4, p. 35-46.

NATHAN C. et Q. W. Xie. 1994. «Nitric oxide synthases : roles, tolls and controls». Cell, vol 78, no. 6, p. 915-918.

NISHIZUKA Y. 1995. «Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses». FASEB J, vol. 9, no. 7, p. 484-496.

NOTTET H. S., Y. Persidsky, V. G. Sasseville, A. N. Nukuna, P. Bock, Q. H. Zhai, L. R. Sharer, R. D. McComb, S. Swindells, C. Soderland et H. E. Gendelman. 1996. «Mechanisms for the transendothelial migration of HIV-1-infected monocytes into brain». J Immunol, vol. 156, no. 3, p. 1284-1295.

OGER J., O. Sabouraud et B. Arnason. 1987. «Génétique de la sclérose en plaques» Médecine/Sciences, vol. 3, p. 13-18.

OKADA M., N. Yoshimura, Y. Ichimori, S. Kishimoto, S. Nakai, N. Nishino et T. Kishimoto. 1986. «Immunologic and molecular characterizations of T cell-derived T cell activating factor». J Immunology, vol. 136, no. 4, p. 1288-1294.

OLDSTONE M. B. 1989. «Viral persistence». Cell, vol. 56, no. 4, p. 517-520.

- OLSEN J., I. Classen-Linke, H. Sjostrom et O. Noren. 1995. «Pseudopregnancy induces the expression of hepatocyte nuclear factor-1 beta and its target gene aminopeptidase N in rabbit endometrium via the epithelial promoter». Biochem J, vol. 312, no. 1, p. 31-37.
- OLSEN J., K. Kokholm, O. Noren et H. Sjostrom. 1997. «Structure and expression of aminopeptidase N». Adv Exp Med Biol, vol. 421, p. 47-57.
- OZENCI V., L. Rinaldi, N. Teleshova, D. Matusевичius, P. Kivisakk, M. Kouwenhoven et H. Link. 1999. «Metalloproteinases and their tissue inhibitors in multiple sclerosis». J Autoimmun, vol. 12, no. 4, p. 297-303.
- PARKER S. E., T. M. Gallagher et M. J. Buchmeier. 1989. «Sequence analysis reveals extensive polymorphism and evidence of deletions within the E2 glycoprotein gene of several strains of murine hepatitis virus». Virology, vol. 173, no. 2, p. 664-673.
- PATTEMORE P. K., S. L. Johnston et P. G. Bardin. 1992. «Viruses as precipitants of asthma symptoms. I. Epidemiology». Clin exp Allergy, vol. 22, no. 3, p. 325-236.
- PATTERSON S. et M. R. Macnaughton. 1982. «Replication of human respiratory coronavirus strain 229E in human macrophages». J Gen Virol, vol. 60, p. 307-14.
- PAUZA C. D. 1988. «HIV persistence in monocytes leads to pathogenesis and AIDS». Cell Immunol, vol. 112, no. 2, p. 414-424.
- PAYNE H. R. et J. Storz. 1988. «Analysis of cell fusion induced by bovine coronavirus infection». Arch Virol, vol. 103, no. 1-2, p. 27-33.
- PELUSO R., A. Haase, L. Stowring, M. Edwards et P. Ventura. 1985. «A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes». Virology, vol. 147, no. 1, p. 231-236.
- PERSIDSKY Y. 1999. «Model systems for studies of leukocyte migration across the blood - brain barrier». J Neurovirol, vol. 5, no. 6, p. 579-90.
- PFLEIDERER M., E. Routledge, G. Herrler et S. G. Siddell. 1991. «High level transient expression of the murine coronavirus haemagglutinin-esterase». J Gen Virol, vol. 72, no. 6, p. 1309-1315.
- PHILLIPS J. J., M. M. Chua, E. Lavi et S. R. Weiss. 1999. «Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses : the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence». J Virol, vol. 73, no. 9, p. 7752-7760.
- PITTS O. M., J. M. Powers, J. A. Bilello et P. M. Hoffman. 1987. «Ultrastructural changes associated with retroviral replication in central nervous system capillary endothelial cells». Lab Invest, vol. 56, no. 4, p. 401-409.

POCOCK D. H., D. J. Garwes. 1975. «The influence of pH on the growth and stability of transmissible gastroenteritis virus in vitro». Arch Virol, vol. 49, no. 2-3, p. 239-247.

PRICE R. W., B. Brew, J. Sidtis, M. Rosenblum, A. C. Scheck et P. Cleary. 1988. «The brain in AIDS : central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex». Science, vol. 239, no. 4840, p. 586-592.

PROOST P., J. Van Damme et G. Opdenakker. 1993. «Leucocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens for human myelin basic protein». Biochem Biophys Res Commun, vol. 192, no. 3, p. 1175-1181.

RAY N.B., L. C. Ewalt et D. L. Lodmell. 1995. «Rabies virus replication in primary murine bone marrow macrophages and in human and murine macrophage-like cell lines: implications for viral persistence». J Virol., vol. 69, no. 2, p. 764-72.

RAZAK K. et A. C. Newland. 1992. «Induction of CD13 expression on fresh myeloid leukaemia : correlation of CD13 expression with aminopeptidase-N activity». Leuk Res, vol. 16, no. 6-7, p. 625-630.

RESTA S., J. P. Luby, C. R. Rosenfeld et J. D. Siegel. 1985. «Isolation and propagation of a human enteric coronavirus». Science, vol. 229, no. 4717, p. 978-981.

RIEMANN D., B. Gohring et J. Langner. 1994. «Expression of aminopeptidase N/CD13 in tumour-infiltrating lymphocytes from human renal cell carcinoma». Immunol Lett, vol. 42, no. 1-2, p. 19-23.

RISEAU W. et H. Wolburg. 1990. «Development of the blood-brain barrier». Trends Neurosci, vol. 13, no. 5, p. 174-178.

RISKI H. et T. Hovi. 1980. «Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold». J Med Virol, vol. 6, no. 3, p. 259-265.

ROIVAINEN M. et T. Hovi. 1989. «Replication of poliovirus in human mononuclear phagocytic cell lines is dependent on the stage of cell differentiation». J Med Virol, vol. 27, no. 2, p. 91-94.

ROSSEN R. D., C. W. Smith, A. H. Laughter, C. A. Noonan, D. C. Anderson, W. M. McShan, M. Y. Hurvitz et F. M. Orson. 1989. «HIV-1-stimulated expression of CD11/CD18 integrins and ICAM-1 : a possible mechanism for extravascular dissemination of HIV-1-infected cells». Trans Assoc Am Physicians, vol. 102, p. 117-130.

ROTTIER P., D. Brandenburg, J. Armstrong, B. Van der Zeijst et G. Warren. 1984. «Assembly in vitro of a spanning membrane protein of the endoplasmic reticulum : the E1 glycoprotein of coronavirus mouse hepatitis virus A59». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 81, no. 5, p. 1421-1425.

- ROTTIER P. J., G. W. Welling, S. Welling-Wester, H.G. Niesters, J. A. Lenstra et B. A. Van der Zeijst. 1986. «Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1». Biochemistry, vol. 25, no. 6, p. 1335-1339.
- RUBBO H., V. Darley-Usmar, B. A. Freeman. 1996 «Nitric oxide regulation of tissue free radical injury». Chem Res Toxicol, vol. 9, no. 5, p. 809-20.
- SADOVNICK A. D. et G. C. Ebers. 1993. «Epidemiology of multiple sclerosis : a critical overview». Can J Neurol Sci, vol. 20, no. 1, p. 17-29.
- SALMI A., B. Ziola, T. Hovi et M. Reunanen. 1982. «Antibodies to coronavirus OC43 and 229E in multiple sclerosis patients». Neurology, vol. 32, no. 3, p. 292-295.
- SANDERINK G. J., Y. Artur et G. Siest. 1988. «Human aminopeptidases : a review of the literature». J Clin Chem Clin Biochem, vol. 26, no. 12, p. 795-807.
- SARMIENTO M. et E. S. Kleinerman. 1990. «Innate resistance to herpes virus infection. Human lymphocyte and monocyte inhibition of viral replication». J Immunol, vol. 144, no. 5, p. 1942-1953.
- SAWICKI S. G., J. H. Lu et K. V. Holmes. 1995. «Persistent infection of cultured cells with mouse hepatitis virus (MHV) results from the epigenetic expression of the MHV receptor». J Virol, vol. 69, no. 9, p. 5535-5543.
- SAWICKI S. G. et D. L. Sawicki. 1998. «A new model for coronavirus transcription». Adv Exp Med Biol, vol. 440, p. 215-219.
- SCHMIDT H. H. et U. Walter. 1994. «NO at work». Cell, vol. 78, no. 6, p. 919-925.
- SCHREIBER S. S., T. Kamahora et M. M. Lai. 1989. «sequence analysis of the nucleocapsid protein of human coronavirus 229E». Virology, vol. 169, no. 1, p. 142-151.
- SCHULTZE B., H. J. Gross, R. Brossmer et G. Herrler. 1991. «The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant». Journal of Virology, vol. 65, no. 11, p. 6232-6237.
- SCHULTZE B., K. Wang, H. D. Klenk et G. Herrler. 1991. «Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity». Virology, vol. 180, no. 1, p. 221-228.
- SCHULTZE B., D. et G. Herrler. 1992. «Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells». J Gen Virol, vol. 73, no. 4, p. 901-906.

SCHULTZE B., D. Cavanagh et G. Herrler. 1992. «Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic-containing receptors on erythrocytes». Virology, vol. 189, no. 2, p. 792-794.

SCHWENDE H., E. Fitzke, P. Ambs et P. Dieter. 1996. «Differences in the state of differentiation of THP.1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3». J Leukoc Biol, vol. 59, no. 4, p. 555-561.

SELLERS M. I. 1969. «studies on the entry of viruses into the central nervous system of mice via the circulation. Differential effects of vasoactive amines and CO<sub>2</sub> on virus infectivity». J Exp Med, vol. 129, no. 4, p. 719-746.

SETHNA P. B. et D. A. Brian. 1997. «Coronavirus genomic and subgenomic minus-strand RNAs copartition in membrane-protected replication complex». J. Virol, vol. 71, no. 10, p. 7744-7749.

SHARMA S.A., T. W. Olchowy, Z. Yang, M. A. Breider. 1992. «Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 alpha enhance lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury». J Leukoc Biol, vol. 51, no. 6, p. 579-85.

SIBLEY W. A., C. R. Bamford et K. Clark. 1985. «Clinical viral infections and multiple sclerosis». Lancet, vol. 1, p. 1313-1315

SIZUN J., D. Soupre, J. D. Giroux et M. C. Legrand. 1995. «Nosocomial respiratory infection due to coronavirus in neonatal intensive care units: prospective evaluation». Arch Pediatr, vol. 1995, no. 10, p. 1020-1021.

SNYDER S. H. et D. S. Bredt. 1992. «Biological roles of nitric oxide». Sci Am, vol. 266, no. 5, p. 68-71, 74-77.

SODERBERG C., T. D. Giugni, J. A. Zaia, S. Larsson, J. M. Wahlberg et A. Moller. 1993. «CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection». J virology, vol. 67, no. 11, p. 6576-6585.

SOILU-HANNINEN M., J. P. Eralinna, V. Hukkanen, M. Roytta, A. A. Salmi et R. Salonen. 1994. «Semliki Forest virus infects mouse brain endothelial cells and causes blood-barrier damage». J Virol, vol. 68, no. 10, p. 6291-6298.

STEWART J. N., S. Mounir et P. J. Talbot. 1992. «Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients». Virology, vol. 191, no. 1, p. 502-505.

STETLER-STEVENSON W. G., R. Hewitt et M. Corcoran. 1996. «Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic». Semin Cancer Biol, vol. 7, no. 3, p. 147-154.

STOHLMAN S. A., R. S. Baric, G. N. Nelson, L. H. Soe, M. L. Welter et R. J. Deans. 1988. «Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein». Journal of Virology, vol. 62, no. 11, p. 4288-4295.

STURMAN L. S., K. V. Holmes et J. Behnke. 1980. «Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid». Journal of Virology, vol. 33, no. 1, p. 449-462.

STURMAN L. S., C. S. Ricard et K. V. Holmes. 1985. «Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus : activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments». Journal of Virology, vol. 56, no. 3, p. 904-911.

TALBOT P. J. 1995. «Implication des virus dans la sclérose en plaques». Médecine/Science, vol. 11, no. 6, p. 837-843.

TALBOT P. J., S. Ekande, N. R. Cashman, S. Mounir et J. N. Stewart. 1994. «Neurotropism of human coronavirus 229E». Adv Exp Med Biol, vol. 342, p. 339-346.

TALBOT P. J. et P. Jouvence. 1992. «Le potentiel neurotrope des coronavirus». Médecine/Science, vol. 8, no. 2, p. 119-125.

TANAKA R., Y. Iwasaki et H. Koprowski. 1976. «Intracisternal virus-like particles in brain of a multiple sclerosis patient». J Neurol Sci, vol. 28, no. 1, p. 121-126.

TARDIEU M. O., O. Boespflug et T. Barbé. 1986. «Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells». J Virol, vol. 60, p. 574-582.

TENNEY D. J. et P. S. Morahan. «Differentiation of the U937 macrophage cell line removes early block of HSV-1 infection». Viral Immunology, vol. 4, no. 2, p. 91-102.

TOLSKAYA E. A., L. I. Romanova, M. S. Kolesnikova, T. A. Ivannikova, E. A. Smina, N. T. Raikhlin et V. I. Agol. 1995. «Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus». J Virology, 69, no. 2, p. 1181-1189.

TOMPKINS W. A., A. M. Watrach, J. D. Schmale, R. M. Schultz et J. A. Harris. 1974. «Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum». J Natl Cancer Inst, vol. 52, no. 4, p. 1101-1110.

TORRES J. M., C. Sanchez, C. Sune, C. Smerdou, L. Prevec, F. Graham et L. Enjuanes. 1995. «Induction of antibodies protecting against transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) by recombinant adenovirus expressing TGEV spike protein». Virology, vol. 213, no. 2, p. 503-516.

TYRELL D. A. et M. L. Bynoe. 1965. «Cultivation of a novel type of common cold virus in organ cultures». Br Med. J., vol. 1, p. 1467-1470.

TYRELL D. A., S. Cohen et J. E. Schlarb. 1993. «Signs and symptoms in common colds». Epidemiol Infect, vol. 111, no. 1, p. 143-156.

UTZ U., W. E. Biddison, H. F. McFarland, D. E. McFarlin, M. Flerlage et R. Martin. 1993. «Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identical twins correlates with multiple sclerosis». Nature, vol. 364, no. 6434, p. 243-247.

VAN DINTER S. et W. F. Flintoff. 1987. «Rat glial C6 cells are defective in murine coronavirus internalization». J Gen Virol, vol. 68, no.6, p. 1677-1685.

VAN WART H. E. et H. Birkedal-Hansen. 1990. «The cysteine switch:a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 87, no. 14, p. 5578-5582.

VENNEMA H., G. J. Godeke, J. W. Rossen, W. F. Voorhout, M. C. Horzinek, D. J. Opstelten et P. J. Rottier. 1996. «Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes». EMBO J, vol. 15, no. 8, p. 2020-2028.

VLASAK R., W. Luytjes, W. Spaan et P. Palese. 1988. «human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 85, no. 12, p. 4526-4529.

WAKSMAN B. H. 1995. «Multiple sclerosis. More genes versus environment». Nature, vol. 377, no. 6545, p. 105-106.

WALI A et D. S. Strayer. 1999. « Infection with vaccinia virus alters regulation of cell cycle progression ». DNA Cell Biol , vol. 18, no. 11, p. 837-43.

WANG F. I., S. A. Stohlman et J. O. Fleming. 1990. «Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated». J Neuroimmunol, vol. 30, no. 1, p. 31-41.

WATANABE R., H. Wege et V. ter Meulen. 1983. «Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis». Nature, vol. 305, no. 5930, p. 150-153.

WEGE H., S. Siddell and V. Meulen. 1982. «The biology and pathogenesis of coronaviruses». Curr Top Microbiol Immunol, vol. 99, p. 165-200.

WEINER L. P. 1973. «Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis». Arch Neurol, vol. 28, no. 5, p. 298-303.

WEINGARTL H. M. et J. B. Derbyshire. 1994. «Evidence for a putative second receptor for porcine transmissible gastroenteritis virus on the villous enterocytes of newborn pigs». J Virol, vol. 68, no. 11, p. 7253-7259.

WEISMILLER D. G., L. S. Sturman, M. J. Buchmeier, J. O. Fleming and K. V. Holmes. 1990. «Monoclonal antibodies to the peplomer glycoprotein of coronavirus mouse hepatitis virus identify two subunits and detect a conformational change in the subunit released under mild alkaline conditions». J Virol, vol. 64, no. 6, p. 3051-3055.

WEISS S. R. 1983. «Coronaviruses SD and SK share extensive nucleotide homology with murine coronavirus MHV-A59, more than that shared between human and murine coronaviruses». Virology, vol. 126, no. 2, p. 669-677.

WEISS R. A. et C. S. Taylor. 1995. «Retrovirus receptors» Cell, vol. 82, no. 4, p. 531-533.

WEINSHENKER B. G., S. Wilton, G. P. Rice. 1988. «Phorbol ester-induced differentiation permits productive human cytomegalovirus infection in a monocytic cell line». J Immunology, vol. 140, no. 5, p. 1625-1631.

WELGUS H. G., R. M. Senior, W. C. Parks, A. J. Kahn, T. J. Ley, S. D. Shapiro et E. J. Campbell. 1992. «Neutral proteinase expression by human mononuclear phagocytes: a prominent role of cellular differentiation». Matrix Suppl, vol. 1, p. 363-367.

WILELMSEN K. C., J. L. Leibowitz, C. W. Bond et J. A. Robb. 1981. «The replication of murine coronaviruses in enucleated cells». Virology, vol. 110, no. 1, p. 225-230.

WILLIAMS K.C. and W. F. Hickey. 1995. «Traffic of hematogenous cells through the central nervous system». Curr Top Microbiol Immunol, vol. 202, p. 221-45.

YEAGER C. L., R. A. Ashmun, R. K. Williams, C. B. Cardellicchio, L. H. Shapiro, A. T. Look et K. V. Holmes. 1992. «Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E». Nature, vol. 357, no. 6377, p. 420-422.

YOKOMORI K., L. R. Banner et M. M. Lai. 1991. «Heterogeneity of gene expression of the hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronaviruses». Virology, vol. 183, no. 2, p. 647-657.

YOKOMORI K. et M. M. Lai. 1992. «The receptor for mouse hepatitis virus in the resistant mouse strain SJL is functional : implications for the requirement of a second factor for viral infection». Journal of Virology, vol, 66, no. 12, p. 6931-6938.

YOKOMORI K., M. Asanaka, S. A. Stohlman, S. Makino, R. A. Shubin, W. Gilmore, L. P. Weiner, F. I. Wang et M. M. Lai. 1992. «Neuropathogenicity of mouse hepatitis virus JHM isolates differing in hemagglutinin-esterase protein expression». J Neurovirology, vol. 1, no. 5-6, p. 330-339.

ZHANG X. M., K. G. Kousoulas et J. Storz. 1991. «The hemagglutinin/esterase glycoprotein of bovine coronavirus : sequence and functional comparisons between virulent and avirulent strains». Virology, vol. 185, no. 2, p. 847-852.

ZURBRIGGEN A. et R. S. Fujinami. 1988. «Theiler's virus infection in nude mice : viral RNA in vascular endothelial cells». J Virol, vol. 62, no. 10, p. 3589-3596.