

**GENEVIÈVE BOUCHARD**

**CARACTÉRISATION DE LYMPHOCYTES T  
ANTI-MYÉLINE ET CORONAVIRUS HUMAIN OC43  
DANS LA SCLÉROSE EN PLAQUES**

Mémoire

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

Jury d'évaluation:

Pascale Martine Duplay Ph.D.

Louis Flamand Ph.D.

Pierre Talbot Ph.D.

Avril 1999

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Université du Québec

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
Table des matières .....	III
Liste des tableaux .....	VI
Liste des figures .....	VII
Liste des abréviations .....	VIII
Sommaire .....	X
1. Introduction .....	1
2. Revue bibliographique .....	4
2.1 La sclérose en plaques .....	5
2.1.1 Définition .....	5
2.1.2 Caractéristique pathologiques .....	5
2.1.3 Épidémiologie de la sclérose en plaques .....	7
2.1.3.1 Facteurs génétiques .....	7
2.1.3.2 Facteurs environnementaux .....	9
2.1.4 La gaine de myéline et ses protéines .....	12
2.1.5 Le modèle animal de la sclérose en plaques .....	16
2.1.6 Les hypothèses de l'étiologie de la sclérose en plaques .....	17
2.1.7 Mécanismes d'activation des lymphocytes T périphériques auto-réactifs .....	17
2.2 Les coronavirus .....	21
2.2.1 Classification .....	21
2.2.2 Structure .....	21
2.2.3 Les protéines structurales .....	26
2.3 Les coronavirus humains .....	28
2.3.1 Morphologie et structure .....	28
2.3.2 Épidémiologie .....	28
2.3.3 Pathologie .....	29
2.3.4 Immunologie .....	29
2.3.5 Indices de l'implication des coronavirus humains dans le développement de la sclérose en plaques .....	30

3. Approche expérimentale .....	33
3.1 Culture cellulaire et production de virus.....	34
3.1.1 Souche du virus .....	34
3.1.2 Cellules .....	34
3.1.3 Production de virus.....	35
3.1.4 Purification partielle du virus.....	36
3.1.5 Purification totale du virus.....	37
3.1.6 Préparation des grilles pour la microscopie électronique.....	37
3.1.7 Technique de quantification des protéines virales en suspension.....	38
3.1.8 Détermination du titre infectieux de HCV-OC43 .....	38
3.1.8.1 Immunoperoxydase indirecte .....	38
3.1.8.2 Détection du virus .....	40
3.2 Immunofluorescence indirecte.....	40
3.2.1 Préparation des lames d'immunofluorescence .....	40
3.2.2 Vérification de la présence d'anticorps sériques anti- coronavirus HCV-OC43 chez les donneurs par immunofluorescence indirecte .....	41
3.3 Obtention de lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43, anti-PBM et anti-PPL chez les donneurs atteints de sclérose en plaques et chez les donneurs témoins .....	42
3.3.1 Les donneurs .....	42
3.3.2 Les antigènes .....	43
3.3.2.1 Coronavirus humain HCV-OC43 .....	43
3.3.2.2 Protéine basique de la myéline .....	43
3.3.2.3 Protéine protéolipidique .....	45
3.3.3 Milieu de culture des lymphocytes T humains .....	45
3.3.4 Isolement des leucocytes mononucléaires .....	46
3.3.5 Première stimulation antigénique des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection .....	51
3.3.6 Deuxième stimulation antigénique des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection .....	52
3.3.7 Troisième, quatrième et cinquième stimulations antigéniques des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection .....	53
3.3.8 Test de prolifération avec incorporation de thymidine tritiée .....	56
3.4 Congélation des CPA .....	58
3.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS et tricine .....	59
3.6 Cytofluorométrie .....	60

4. Résultats .....	63
4.1. Production de virus HCV-OC43 purifié .....	64
4.2. Isolement de la PBM humaine .....	65
4.3. Les donneurs .....	65
4.3.1 Profil d'histocompatibilité des donneurs .....	65
4.3.2 Evaluation de la séropositivité des donneurs envers HCV-OC43 par immunofluorescence .....	70
4.4. Réactivité des lignées de lymphocytes T obtenues des donneurs atteints de sclérose en plaques et des témoins en santé envers les antigènes PBM, HCV-OC43 et PPL .....	73
4.5. Caractérisation des lignées anti-HCV-OC43 .....	82
4.5.1. Spécificité des lignées envers les protéines structurales du HCV-OC43 .....	82
4.5.2. Restriction HLA-DR de la reconnaissance de HCV-OC43 par les lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43 .....	85
4.5.3. Evaluation du phénotype de lignées anti-OC43 par cytofluorométrie .....	85
5. Discussion .....	92
6. Conclusion .....	105
Remerciements .....	110
Bibliographie .....	112

## LISTE DES TABLEAUX

		Page
TABLEAU 1:	Les coronavirus, leur groupe antigénique, leur hôte naturel ainsi que les pathologies provoquées par leur infection	22
TABLEAU 2:	Profil d'histocompatibilité des donneurs SEP	71
TABLEAU 3:	Profil d'histocompatibilité des donneurs témoins	72
TABLEAU 4:	Réactivité des lignées de lymphocytes T des donneurs SEP aux antigènes de sélection (PBM, PPL et HCV-OC43)	75
TABLEAU 5:	Réactivité des lignées de lymphocytes T des donneurs témoins aux antigènes de sélection (PBM, PPL et HCV-OC43)	77
TABLEAU 6:	Fréquence des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection selon les catégories sexe, restriction HLA et forme de la SEP chez les donneurs SEP et les donneurs témoins	80
TABLEAU 7:	Caractérisation des lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43: spécificité envers les protéines structurales du virus	84
TABLEAU 8:	Restriction HLA-DR des lignées de lymphocytes T spécifiques au virus HCV-OC43	86
TABLEAU 9:	Evaluation du phénotype de lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43 par cytofluorométrie	89

## LISTE DES FIGURES

		Page
FIGURE 1:	Structure de la myéline	13
FIGURE 2:	Mécanismes d'activation des lymphocytes T périphériques auto-réactifs	19
FIGURE 3:	Schéma de la structure d'un coronavirus	24
FIGURE 4:	Gradient de Ficoll-Paque avant et après centrifugation	47
FIGURE 5:	Centrifugation des tubes de sang avant de le diluer pour le déposer sur le Ficoll-Paque	49
FIGURE 6:	Deuxième stimulation antigénique des lymphocytes T de la première stimulation antigénique	54
FIGURE 7:	Électrophorèse du virus HCV-OC43 purifié, sur gel de polyacrylamide avec SDS et tricine	65
FIGURE 8:	Électrophorèse de la protéine basique de la myéline isolée, sur gel de polyacrylamide avec SDS et tricine	68
FIGURE 9:	Exemple de résultats obtenus en cytofluorométrie pour une lignée $CD_8^+ CD_3^+$ d'un donneur témoin	90

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\beta$ -Me:	$\beta$ -mercaptoéthanol
ASB:	albumine sérique bovine
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA:	cellules de présentation de l'antigène
CNPase:	nucléotide phosphodiesterase cyclique
CNS:	central nervous system
cpm:	count per minute
DAB	tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine
dH <sub>2</sub> O:	eau distillée
DITC <sub>50</sub> :	dose infectieuse à 50% en culture de tissus
DMSO:	diméthylsulfoxyde
DTT:	dithiothréitol
EAE:	encéphalomyélite allergique expérimentale
EDTA:	acide éthylènediaminetétraacétique
Etbr:	bromure d'éthidium
FITC:	isothiocyanate de fluorescéine
GAM:	glycoprotéine associée à la myéline
GOM:	glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline
HCV:	coronavirus humain (human coronavirus)
HHV-6:	virus herpès 6 humain
HLA-DR:	human leucocyte antigen-DR; sous-région du complexe majeur d'histocompatibilité chez l'humain
HRT-18:	cellule humaine d'une tumeur rectale
hsp:	heat shock protein
i/e:	intra/extra; suspension de virus HCV-OC43 (virus entier et protéines virales structurales et non structurales)
IgG:	immunoglobuline de type G
IL-2	interleukine-2



LCR:	liquide céphalo-rachidien
MBP:	myelin basic protein
MHV:	virus de l'hépatite murine
MOI:	multiplicité d'infection
n.a.:	non applicable
PBM:	protéine basique de la myéline
PBS:	tampon phosphate ("Dubelco's Phosphate-Buffered Saline")
PE:	phycoérythrine
PEG:	polyéthylène glycol
PMSF:	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PLP:	proteolipid protein
PPL:	protéine protéolipidique
rpm:	rotations par minute
RPMI complet	RPMI 1640 contenant 10 mM de tampon HEPES, 100 unités/mL de pénicilline, 100 unités/mL de streptomycine, 1,25 µg/mL d'amphotéricine B, 10% de sérum humain commercial ou 5% de sérum humain commercial et 5% de sérum humain autologue ou 10% de sérum humain autologue et 50 µM de β-mercaptoéthanol
SDS:	dodécylsulphate de sodium
SDS-PAGE:	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SEP:	sclérose en plaques
SNC:	système nerveux central
SNP:	système nerveux périphérique
SVF:	sérum de veau foetal
TCR:	récepteur des cellules T
TEMED:	N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
[ <sup>3</sup> H]TTP:	thymidine tritiée
U/mL	unités par mL
U.V.	ultra-violet

## SOMMAIRE

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC) qui serait occasionnée par des lymphocytes T spécifiques aux antigènes de la myéline. Ces lymphocytes T auto-réactifs pourraient être activés en raison du mimétisme moléculaire entre des antigènes de la myéline tels que la protéine basique de la myéline (PBM) ainsi que la protéine protéolipidique (PPL) et plusieurs virus. En effet, il a été rapporté qu'une forte proportion de lignées de lymphocytes T reconnaissant la PBM et le coronavirus humain 229E a été obtenue chez des personnes atteintes de SEP. Pour évaluer l'implication possible de l'autre souche coronavirale humaine OC43, ainsi que la PPL dans ces réactions croisées, des lignées de lymphocytes T spécifiques à la PBM, la PPL et au virus OC43 ont été obtenues avec succès de huit donneurs atteints de SEP ainsi que de huit donneurs témoins de même âge et de même sexe. Avec l'utilisation de protéines de la myéline purifiées, du lysat de cellules infectées et du virus purifié, aucune activation lymphocytaire croisée entre la PBM, la PPL et le coronavirus OC43 n'a pu être observée. L'évaluation de la restriction HLA de la reconnaissance du virus par les lymphocytes T, a démontré que les lignées obtenues étaient pour la plupart restreintes par le HLA-DR. Finalement, la cytofluorométrie a permis d'évaluer le phénotype des lignées spécifiques au virus ( $CD_4^+ CD_3^+$  ou  $CD_8^+ CD_3^+$ ), qui ont été pour la majorité des lignées de phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$ . Ces résultats démontrent la présence d'une immunité cellulaire spécifique au coronavirus humain OC43. Toutefois, dans les conditions expérimentales utilisées et avec les donneurs qui ont participé à l'étude, cette souche de coronavirus humain, contrairement à la souche 229E, ne semble pas activer les lignées de lymphocytes T spécifiques à la PBM et à la PPL.

## SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating inflammatory disease of the central nervous system (CNS) considered to be mediated by myelin-reactive T-cells. These autoreactive T-cells could be activated by molecular mimicry between myelin antigens such as myelin basic protein (MBP) and proteolipid protein (PLP) and several viral pathogens. Indeed, a high proportion of MBP and human coronavirus (HCV) cross-reactive T-cells was reported in MS patients that involved HCV strain 229E. To evaluate the possible involvement of the other HCV strain (OC43) and PLP in such cross-reactivity, OC43-, MBP, and PLP-reactive T-cell lines were successfully established from eight MS patients and eight sex- and age-matched healthy controls. Using purified human myelin proteins, infected cell lysates and purified virus, no T-cell cross-reactivity, was observed between MBP, PLP and OC43. HLA restriction measurements showed that HCV-OC43 reactive T-cell lines were mostly HLA-DR restricted. Flow cytometric evaluation of surface phenotypes ( $CD_4^+ CD_3^+$  or  $CD_8^+ CD_3^+$ ) of virus-reactive cells indicates that the majority were  $CD_4^+ CD_3^+$ . These results demonstrate the presence of HCV-OC43-specific cellular immunity in humans. However, they are not consistent with the involvement of this strain of human coronavirus, unlike the 229E strain, in activation of MBP- or PLP-specific T-cells in MS, at least under the experimental conditions used and with the donors who participated in the study.

## **INTRODUCTION**

La sclérose en plaques est une maladie démyélinisante inflammatoire chronique du système nerveux central, qui détruit progressivement la gaine de myéline des neurones de l'encéphale et de la moelle épinière. Cette destruction progressive affecte la transmission de l'influx nerveux et provoque chez les personnes atteintes des symptômes variés tels que des pertes d'équilibre, des engourdissements, de la fatigue extrême, des tremblements, de la paralysie, de l'ataxie, de la douleur, etc. (Hauser et Goodkin, 1998). Cette maladie affecte environ 150 individus par 100 000 habitants au Canada (Cossette *et al.*, 1998). Toutefois, son étiologie n'est pas encore connue mais selon des études épidémiologiques, elle serait multifactorielle. En fait, des facteurs génétiques ainsi qu'environnementaux seraient impliqués dans le développement de la sclérose en plaques (Talbot, 1995).

De nombreux microorganismes ont été suggérés comme agent d'initiation de la maladie. Parmi ceux-ci, on retrouve les coronavirus humains (HCV-OC43 et HCV-229E) qui sont impliqués dans près du tiers des rhumes (Myint, 1994). Plusieurs travaux de recherche ont associé les coronavirus humains à la sclérose en plaques.

Parmi les nombreuses hypothèses formulées pour tenter d'expliquer l'implication des coronavirus dans le développement de la sclérose en plaques, l'une d'entre elle suggère qu'un lymphocyte T auto-réactif spécifique à un antigène de la myéline serait activé par mimétisme moléculaire entre des antigènes de la myéline et le micro-organisme ayant infecté l'individu. L'activation des lymphocytes T auto-réactifs spécifiques à des antigènes de la myéline induirait la destruction progressive de la gaine de myéline (Talbot *et al.*, 1996). Récemment, une étude a suggéré que le mimétisme moléculaire entre le coronavirus humain HCV-229E et la protéine basique de la myéline était possible. En effet, des lignées de lymphocytes T provenant de donneurs atteints de sclérose en plaques ont à la fois reconnu le virus et la protéine basique de la myéline dans 29% des cas alors que cette proportion n'est que de 1,3% chez les donneurs témoins en santé (Talbot *et al.*, 1996).

Ainsi, ce projet avait pour but d'évaluer la possibilité de l'implication de l'autre coronavirus humain, HCV-OC43, dans ce type de réactions immunitaires croisées qui pourraient être impliquées dans le développement de la sclérose en plaques. Pour se faire, des lignées de lymphocytes T spécifiques à deux antigènes de la myéline, la protéine basique de la myéline et la protéine protéolipidique ainsi que des lignées spécifiques au coronavirus HCV-OC43 ont été obtenues de donneurs atteints de sclérose en plaques et de donneurs témoins. Par la suite, l'hypothèse du mimétisme moléculaire entre la PPL ou la PBM et le coronavirus HCV-OC43 a été vérifié en évaluant si les lignées de lymphocytes T obtenus reconnaissaient à la fois l'antigène de la myéline et le coronavirus.

Finalement, pour la première fois, la spécificité envers les protéines structurales et non structurales, la restriction HLA de la reconnaissance des antigènes ainsi que le phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$  et  $CD_8^+ CD_3^+$  des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus humain HCV-OC43 ont été évalués.

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **2.1 La sclérose en plaques**

### **2.1.1 Définition**

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante qui affecte surtout la matière blanche du cerveau et de la moelle épinière, tous deux constituant le système nerveux central (SNC). Parfois, il est possible de retrouver des lésions au niveau de la matière grise du SNC. Cette pathologie doit son nom à des régions disséminées (dans l'espace et dans le temps) d'inflammation et de dégénérescence chronique de la gaine de myéline, entraînant la formation de plaques démyélinisées macroscopiquement visibles. Cette maladie provoque ainsi des troubles de la conduction de l'information nerveuse entraînant chez le patient atteint, différents troubles neurologiques. Ses manifestations sont variables et peuvent entraîner des problèmes qui s'étendent d'une forme bénigne à une forme débilite et invalidante (Hauser et Goodkin, 1998).

### **2.1.2 Caractéristiques pathologiques**

La SEP est une maladie dont les lésions provoquées par l'inflammation produisent des plaques de démyélinisation visibles à l'oeil nu. Elles sont situées au niveau du SNC sans toucher le système nerveux périphérique (SNP) (Raine, 1994). Le SNC est constitué de l'encéphale et de la moelle épinière. Cette division du système nerveux est composée de deux zones visuellement différentes, la matière blanche et la matière grise. La matière blanche est constituée d'agrégations de prolongements de neurones, entourés d'une gaine de myéline. La matière grise est, pour sa part, composée de corps cellulaires, de dendrites, et de terminaisons axonales ou de la névroglie ainsi que de faisceaux d'axones non myélinisés. Cette zone de matière grise ne contient pas de myéline. De plus, le SNC est composé de cellules qui lui sont uniques. Il y a tout d'abord les neurones qui servent à la conduction nerveuse de l'information, les cellules de la microglie jouant le rôle de macrophage, les astrocytes ayant pour fonction de former la barrière hémato-encéphalique, de servir de support physique et nourricier et finalement, les



oligodendrocytes qui servent à synthétiser la myéline au niveau de l'encéphale (Willis, 1996; Tortora et Grabowski, 1994).

Les plaques de démyélinisation sont retrouvées dans la matière blanche et occasionnellement, elles peuvent toucher la matière grise. Les lésions du SNC sont caractérisées par une infiltration de lymphocytes T et de macrophages. Le processus inflammatoire induit une dissolution des feuilles multilamellaires de la myéline, entraînant une disparition progressive de la myéline à l'endroit de l'inflammation. A mesure que la lésion progresse, les astrocytes prolifèrent, les macrophages ainsi que les cellules de la microglie phagocytent les débris de la myéline. Parfois, une remyélinisation partielle des plaques survient. Par contre, il est beaucoup plus rare d'observer une remyélinisation significative des plaques (Hauser et Goodkin, 1998). Cette maladie peut provoquer chez les individus atteints, des pertes d'équilibre, des problèmes d'acuité visuelle, des engourdissements, de la fatigue extrême, des tremblements, de la paralysie, de l'ataxie, de la douleur, etc. (Hauser et Goodkin, 1998).

Quatre formes d'évolution de la maladie ont été décrites. La première est une forme cyclique où les individus subissent des exacerbations entrecoupées de périodes de rémission au cours desquelles les patients récupèrent complètement, partiellement ou nullement. La seconde forme est dénommée progressive secondaire où la forme cyclique caractérise les débuts de la maladie. Par la suite la forme cyclique est suivie d'une phase progressive de la maladie sans période de rémission entre les crises de sclérose en plaques. La troisième est une forme progressive primaire (progressive-chronique) où la forme cyclique est absente et où les patients subissent une maladie progressive sans phase de rémission tout au long de la maladie. Enfin, les personnes affectées par la forme progressive primaire peuvent parfois subir des phases de rémission superposées. Cette dernière forme très peu courante est une forme progressive cyclique "progressive-relapsing" (Hauser et Goodkin, 1998).

### **2.1.3 Épidémiologie de la sclérose en plaques**

La SEP est une affection du système nerveux central qui survient principalement chez les jeunes adultes. En Amérique du Nord, la prévalence de cette maladie est de plus de 60 individus par 100 000 habitants alors qu'elle passe à environ 150 individus par 100 000 habitants au Canada (Kurtzke, 1980; Talbot, 1995). La fréquence de la SEP augmente régulièrement de l'adolescence jusqu'à l'âge de 35 ans, puis diminue graduellement avec l'âge (Hauser et Goodkin, 1998; Talbot, 1995).

La SEP est une maladie des climats tempérés et son incidence augmente en fonction de la latitude au nord et au sud de l'équateur (Hauser et Goodkin, 1998). La SEP est une maladie dont l'incidence est plus élevée chez les femmes que chez les hommes. En effet, elle est environ deux fois plus fréquente chez la femme (Hauser et Goodkin, 1998; Duquette *et al.*, 1992). Malgré tous les efforts consacrés à la recherche depuis de nombreuses années, l'étiologie de la SEP demeure encore inconnue (Cossette *et al.*, 1998). Des études épidémiologiques ont démontré toutefois, que cette maladie serait multifactorielle, causée par des facteurs génétiques ainsi qu'environnementaux (Sadovnick et Ebers, 1993).

#### **2.1.3.1 Facteurs génétiques**

Des études épidémiologiques qui ont démontré une variation de la fréquence de la SEP chez différents groupes ethniques retrouvés dans le même environnement, supportent l'hypothèse du rôle de la génétique dans le développement de la SEP (Hauser et Goodkin, 1998). D'autres études épidémiologiques ont démontré que dans environ 23% des cas de SEP, une autre personne de la famille était atteinte de cette même maladie (Sadovnick *et al.*, 1988). On a aussi observé que l'incidence de la SEP est beaucoup plus élevée chez les individus d'origine caucasienne et ce fait s'explique par la présence beaucoup plus fréquente de gènes associées à la SEP dans cette population. En effet, on retrouve principalement ces gènes parmi ceux du complexe majeur d'histocompatibilité de classe

II. Ces derniers sont retrouvés sur le chromosome 6. La plus forte incidence est associée à la sous-région HLA-DR2 *i.e* l'haplotype HLA-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 (Oksenberg, 1996; Hillert et Olerup, 1993). En fait, deux études ont démontré que l'haplotype HLA-DR2 est retrouvé chez 50 à 60% des malades atteints de SEP alors que cette fréquence n'est que d'environ 20% chez les témoins en santé (Olerup *et al.*, 1989; Spielman et Nathenson, 1982). De plus, l'haplotype HLA-DR2 est retrouvé plus fréquemment chez les femmes, ce qui expliquerait en partie, sans négliger la présence de facteurs hormonaux, la fréquence plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Duquette *et al.*, 1992).

De plus, les gènes associés aux récepteurs des cellules T (TCR) (Utz *et al.*, 1993; Steinman *et al.*, 1992; Beall *et al.*, 1989; Oksenberg *et al.*, 1989; Seboun *et al.*, 1989) ainsi que le gène de la protéine basique de la myéline (Ibsen et Clausen, 1995), ont été envisagés comme marqueurs génétiques de la SEP. Toutefois, malgré les associations génétiques potentielles observées, aucun des gènes proposés ne semble être indispensable au développement de la maladie (Ebers et Sadovnick, 1994).

Dans un autre ordre d'idée, l'hypothèse que l'affinité du TCR des lymphocytes T envers les protéines de la myéline des personnes atteintes de SEP soit différente de celle des personnes en santé pourrait être intéressante. En effet, chez les patients atteints de SEP, il pourrait y avoir un dérèglement de la sélection thymique qui entraînerait la conservation des lymphocytes T autoréactifs (antigènes de la myéline) dont l'avidité envers ces antigènes serait plus élevée que celle des lymphocytes T autoréactifs des témoins en santé. Une étude a voulu caractériser la réponse des lymphocytes T envers l'épitope 83-99 de la PBM chez des patients atteints de SEP et chez des témoins en santé en analysant l'utilisation et l'affinité du TCR, la spécificité fine, la production de cytokines, l'activité cytolytique et l'expression de molécules à la surface des cellules (Hemmer *et al.*, 1997). Cette étude a réussi à démontrer qu'il y avait une très grande hétérogénéité entre les donneurs au niveau de la reconnaissance de l'antigène, des fonctions et des phénotypes cellulaires pour un même épitope. Une autre étude, a démontré que chez des patients

atteints de SEP et suivis pendant trois ans, la population de lymphocytes T spécifiques à la PBM change au fur et à mesure que la SEP évolue (Lovett-Racke *et al.*, 1997). Ainsi, ces résultats montrent combien il est difficile de démontrer la véracité de l'hypothèse d'un degré d'affinité du TCR des lymphocytes T autoréactifs différents entre les patients atteints de SEP et les témoins en santé.

Finalement, il a été remarqué que certaines populations vivant dans des régions à haut risque, ne développent pas la maladie (Oger *et al.*, 1987). Ainsi, toutes ces études confirment l'implication de facteurs génétiques en plus de facteurs environnementaux dans le développement de la SEP.

### **2.1.3.2 Facteurs environnementaux**

Puisque les études portant sur les facteurs génétiques n'ont pas permis d'associer définitivement et complètement la SEP à un ou plusieurs gènes particuliers et que des personnes génétiquement prédisposées ne développent pas nécessairement la maladie, des facteurs environnementaux doivent donc être en cause dans le développement de la SEP. Des études ont été réalisées auprès d'individus provenant d'une région à faible risque et qui ont immigré vers une région à haut risque de développer la SEP. Lorsque ces individus immigraient vers la région à haut risque après l'âge de 15 ans, leur risque de développer la maladie ne changeait pas alors que s'ils immigraient avant cet âge, leur chance d'être atteint de la SEP augmentait au même niveau que ceux étant nés dans la région à haut risque (Skegg, 1991). Ces observations suggèrent qu'une exposition à un facteur environnemental avant l'âge de 15 ans prédispose l'individu à développer la SEP. En dernier lieu, des études impliquant des couples de jumeaux identiques, où au moins un des deux jumeaux était atteint de la SEP ont démontré que dans 25 à 40% des cas seulement, les deux jumeaux avaient développé la maladie (Kurtzke, 1993).

De nombreuses hypothèses ont été formulées pour déterminer les facteurs environnementaux impliqués. Ainsi, certains ont soulevé l'hypothèse de l'implication des

spiroquêtes, des mycoplasmes, des protozoaires, des rickettsies ou autres micro-organismes ainsi que du climat, de la diète, de l'exposition à certains animaux et aux rayons cosmiques sans toutefois y apporter des données expérimentales significatives (Talbot, 1995).

Toutefois, l'hypothèse de l'implication des virus dans la sclérose en plaques a été étouffée de nombreux résultats expérimentaux significatifs. En fait, il a été observé que des virus induisent des maladies démyélinisantes chez les animaux et que la plupart de ces maladies sont causées par une infection virale persistante (Brahic et Jewell, 1989). De plus, parmi les nouveaux traitements disponibles pour la SEP, on retrouve les traitements immunorégulateurs tels que les interférons  $\beta$  qui diminuent la progression de la maladie (Cossette *et al.*, 1998).

Plusieurs virus neurotropes ont été suggérés comme agent étiologique de la SEP grâce à trois méthodes de détection soit: des taux d'anticorps anti-virus plus élevés chez les donneurs SEP que chez les donneurs témoins, l'isolement de virus à partir de tissus de personnes atteintes de SEP et finalement, la détection de virus au niveau du SNC d'individus atteints de SEP (Talbot, 1995).

Tout d'abord, des travaux de recherche ont démontré que des titres plus élevés d'anticorps anti-viraux sont présents chez les personnes atteintes de SEP que chez les donneurs témoins pour la majorité des virus mais plus particulièrement pour le virus d'Epstein-Barr (Martyn *et al.*, 1993), le virus HTLV-1 (Koprowski *et al.*, 1985), les coronavirus humains (Salmi *et al.*, 1982) le virus de l'influenza de type C, le virus de la rougeole, le virus de la rubéole, le virus de la varicelle-zona, le virus *herpes simplex*, (Conrad *et al.*, 1994; Panelius *et al.*, 1973; Brody *et al.*, 1971) ainsi que le virus herpès 6 humain (HHV-6 (Willborn *et al.*, 1994; Sola *et al.*, 1993). De plus hauts titres d'anticorps ont également été retrouvés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients SEP que chez des témoins pour différents virus tels que le virus de la rougeole, le virus herplex simplex, le virus de la varicelle, le virus de la rubéole, le virus d'Epstein-Barr, le virus de l'influenza

de type C, certaines souches de virus parainfluenza, le paramyxovirus SV5 et même le HHV-6 (Hauser et Goodkin, 1998; Goswami *et al.*, 1987). La présence d'anticorps anti-viraux dans le LCR laisse supposer la présence d'une infection locale au niveau du SNC.

D'autres recherches ont réussi à isoler des virus provenant de tissus de donneurs SEP. Le virus *herpes simplex*, le virus de la rougeole, le virus de la rage, le paramyxovirus SV5, les coronavirus, le parainfluenzavirus ainsi que le cytomégalovirus ont été obtenus à partir de tissus de donneurs SEP (Johnson, 1985). De plus, le HHV-6 a été détecté par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et par immunohistochimie dans le SNC d'une patiente atteinte de SEP (Carrigan *et al.*, 1996). Il a aussi été observé que l'expression de HHV-6 dans le SNC est plus élevée chez les patients atteints de SEP que chez les témoins (Challoner *et al.*, 1995). Finalement, il a été démontré que ce virus a la capacité d'infecter des astrocytes en culture cellulaire (He *et al.*, 1996).

En dernier lieu, la présence de certains virus au niveau du SNC a été démontrée via des techniques d'hybridation *in situ*, par immunohistochimie et par PCR. Ainsi, le virus de la rougeole a été détecté au niveau du SNC de quelques patients par immunohistochimie (Cosby *et al.*, 1989; Haase *et al.*, 1981). Dans le cas du virus HHV-6, des antigènes de ce virus ont été détectés dans des neurones ainsi que des cellules gliales de cerveaux d'adultes (Challoner *et al.*, 1995). De plus, des antigènes de ce virus ont même été retrouvés dans le noyau d'oligodendrocytes associés à des plaques de patients atteints de SEP (Challoner *et al.*, 1995). Par hybridation *in situ* et par immunohistochimie, des coronavirus ont été détectés dans le cerveau de patients de donneurs SEP (Murray *et al.*, 1992). De plus, des coronavirus humains ont été détectés par PCR dans le cerveau de 4 donneurs SEP sur 11 alors qu'aucun coronavirus n'a été détecté dans le cerveau des témoins (Stewart *et al.*, 1992). Une étude similaire a aussi démontré par PCR, la présence de coronavirus humains dans le cerveau de malades SEP (Murray *et al.*, 1992). Finalement, il a été démontré que les coronavirus humains ont aussi la capacité de se répliquer dans des cellules neurales humaines (Bonavia *et al.*, 1997; Talbot *et al.*, 1994; Pearson et Mims, 1985). Ainsi, l'étiologie de la SEP n'étant toujours pas encore connue,

il est clair après toutes ces recherches, que des facteurs génétiques en conjonction avec des facteurs environnementaux sont responsables du développement de la SEP.

#### **2.1.4 La gaine de myéline et ses protéines**

La myéline est une membrane protéolipidique retrouvée dans le SNC et le SNP, qui entoure les axones d'une grande partie des neurones des mammifères (Marieb, 1993; Deber et Reynolds, 1991). La gaine de myéline a pour rôle de protéger et isoler électriquement les axones des neurones ainsi que de contrôler et accroître la vitesse de transmission de l'influx nerveux. Elle provient de l'empilement de feuillets de membranes cytoplasmiques spécialisées, fournies par des cellules gliales qui s'enroulent autour de l'axone des neurones (figure 1). Au niveau du SNP ce sont les cellules de Schwann qui sont responsables de la formation de la myéline alors que dans le SNC, ce sont les oligodendrocytes (Marieb, 1993).

Une fois que la myéline a été déshydratée, sa composition est de 75-80% de lipides et de 20-25% de protéines (Boggs *et al.*, 1982; Rumsby, 1978; Norton, 1977). Parmi les différentes protéines qui constituent la myéline, deux d'entre elles sont prédominantes, soit: la protéine basique de la myéline (PBM) et la protéine protéolipidique (PPL) (Deber et Reynolds, 1991). La PBM est une protéine hydrosoluble retrouvée au niveau des couches cytoplasmiques de la myéline, entre les couches lipidiques (figure 1). Cette protéine compte pour approximativement 25 à 30% du poids total des protéines de la myéline. Il existe trois isoformes de la PBM humaine: 17,2 kDa, 18,5 kDa et 21,5 kDa (Deber et Reynolds, 1991). Il y a quelques années, il a été découvert que le principal peptide immunodominant de la PBM se situait au niveau des résidus 84-102 ainsi qu'un second peptide immunodominant situé au niveau des résidus 143-168 (Wucherpfennig et Strominger, 1995; Wucherpfennig *et al.*, 1991).

Figure 1: Structure de la myéline (Tiré de Darnell *et al.*, 1993).

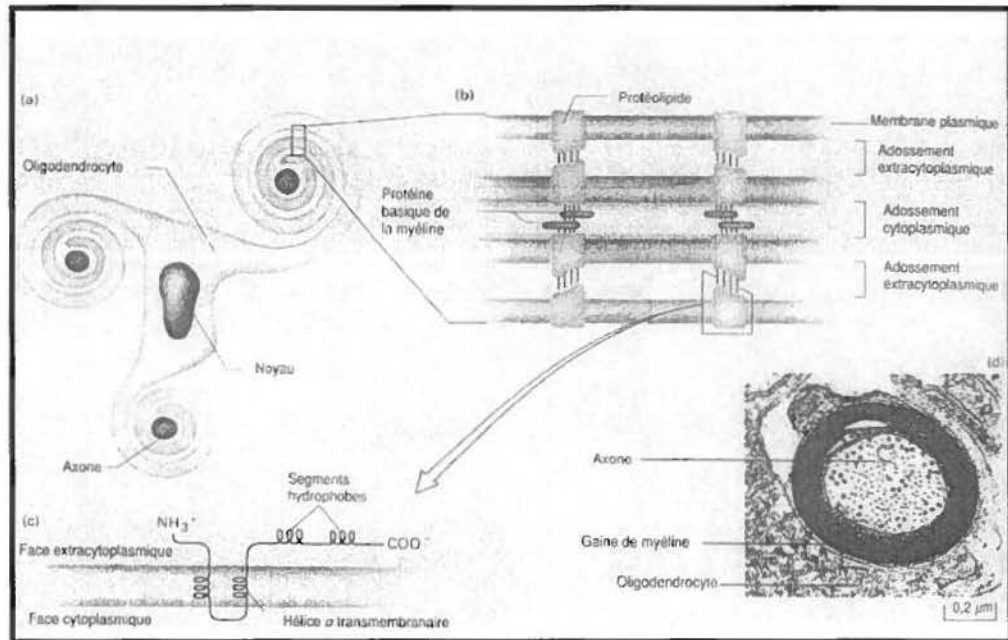
a) Un oligodendrocyte s'enroule autour de plusieurs axones du système nerveux central pour élaborer leur gaine de myéline qui est formée par l'empilement compact de la membrane de l'oligodendrocyte autour de l'axone.

b) Structure compacte de la myéline. La protéine basique de la myéline qui est une protéine hydrophile est située entre deux couches de la membrane plasmique et contribue avec la protéine protéolipidique (protéolipide) à l'empilement compact de la myéline. La protéine protéolipidique quant à elle, est retrouvée à l'intérieur de la bicouche lipidique à cause de son hydrophobicité.

c) Structure de la protéine protéolipidique. Elle est constituée de deux hélices  $\alpha$  transmembranaires et de deux segments hydrophobes, retrouvés à la face cytoplasmique, contribuant à l'interaction entre les protéines protéolipidiques.

d) Micrographie électronique d'une coupe transversale d'un axone myélinisé de la moelle épinière.





La PPL est la protéine la plus abondante de la myéline et compte pour environ 50% de l'ensemble des protéines (Wucherpfennig, 1994). La PPL est une protéine intégrale et hydrophobe retrouvée à l'intérieur des couches de lipides de la myéline (figure 1). Son poids moléculaire se situe aux environs de 30 kDa (Deber et Reynolds, 1991).

D'autres protéines moins abondantes sont retrouvées dans la myéline. Tout d'abord, il y a la nucléotide phosphodiesterase cyclique (CNPase) qui représente environ 5% des protéines de la myéline, la glycoprotéine associée à la myéline (GAM) ainsi que la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (GOM). Seules la GOM et la PPL sont spécifiques au SNC. La PBM et la GAM sont retrouvées à la fois dans le SNC et dans le SNP (Wucherpfennig, 1994). Finalement, l' $\alpha\beta$ -crystalline est une protéine de choc thermique de la famille des hsp27 (heat shock protein 27) (Ito *et al.*, 1997). Une grande variété de cellules du corps dont les astrocytes et les oligodendrocytes qui font parti des cellules gliales du SNC, la synthétisent lorsqu'elles sont soumises à un stress provenant de leur environnement (Bajramovic *et al.*, 1997).

Les résultats obtenus lors d'études antérieures laissent supposer que l' $\alpha\beta$ -crystalline pourrait être impliquée dans le développement de la SEP (van Noort, 1997). En effet son expression serait plus élevée dans les astrocytes et les oligodendrocytes situés dans les régions de démyélinisation du SNC alors qu'elle serait nulle au niveau de la myéline non affectée (Bajramovic *et al.*, 1997; van Noort *et al.*, 1995). Finalement, il a été observé que lorsqu'injectés à des animaux de laboratoire, la PBM, la PPL ainsi que leurs peptides immunodominants, provoquent une maladie démyélinisante nommée encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) dont les manifestations cliniques ressemblent à celles de la SEP (Deber et Reynolds, 1991; Zamvil et Steinman, 1990; Maugh, 1977).

### 2.1.5 Le modèle animal de la sclérose en plaques

L'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) est un modèle animal de la SEP. C'est une maladie auto-immunitaire médiée par des lymphocytes T (Wucherpfennig, 1994). Elle débute par une inflammation et est suivie par une démyélinisation du SNC. Elle provoque donc chez l'animal une maladie chronique avec des cycles de rechute-rémission (Zamvil et Steinman, 1990). Cette maladie peut être induite chez la souris, le rat ou le singe en injectant aux animaux des constituants de la myéline (protéines complètes ou peptides immunodominants de la PPL ou de la PBM) (Zamvil et Steinman, 1990). Il est aussi possible de provoquer la EAE chez l'animal en transférant adoptivement des lymphocytes spécifiques aux antigènes de la myéline et activés *in vitro* ou *in vivo* chez un autre animal (Pettinelli et McFarlin, 1981).

De plus, de nombreux virus peuvent induire chez leur hôte naturel une démyélinisation ressemblant à celle observée dans la SEP. Parmi ceux-ci, on retrouve le coronavirus murin, le virus de l'encéphalite murine de Theiler et le "canine distemper virus" (Dal Canto et Rabinowitz, 1982).

Les espèces et souches animales les plus couramment utilisées pour induire la EAE sont le rat de Lewis et les souris SJL/J femelles (Zamvil et Steinman, 1990). De plus, le type de réponse inflammatoire obtenu dépend de l'espèce utilisée (Wucherpfennig, 1994). En effet, il semblerait que des gènes spécifiques de certains haplotypes du CMH de classe II ainsi que certains gènes du récepteur des cellules T (TCR) seraient nécessaires pour qu'il y ait formation de lésions (Acha-Orbea *et al.*, 1988).

La EAE possède de nombreux points communs avec la SEP, tels qu'une démyélinisation du SNC, des lymphocytes T périvasculaires de phénotype CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, une restriction de l'utilisation du TCR (Zamvil et Steinman, 1990) et une susceptibilité à la maladie définie par l'haplotype des antigènes du CMH de classe II (Fritz *et al.*, 1985). Ainsi, le modèle animal de la EAE induit soit par des protéines de la myéline ou par une infection virale,

permet ainsi de mieux comprendre les processus impliqués dans le développement des maladies démyélinisantes.

### **2.1.6 Hypothèses sur la pathogenèse de la sclérose en plaques**

De nombreuses théories ont été proposées afin d'expliquer les causes et les processus de démyélinisation dans la SEP. Parmi celles-ci, deux hypothèses principales ont été proposées. La première suggère que la SEP serait une maladie auto-immunitaire dans laquelle des lymphocytes T infiltrants reconnaissent des antigènes du soi et attaquent des tissus normaux du SNC. La seconde propose que la SEP serait due à une infection virale du SNC où l'inflammation observée est le résultat d'une réponse immunitaire anti-virale (Wucherpfennig *et al.*, 1991). Toutefois ces deux théories ne sont pas mutuellement exclusives car une infection virale pourrait induire une réponse auto-immunitaire.

### **2.1.7 Mécanismes d'activation des lymphocytes T périphériques auto-réactifs**

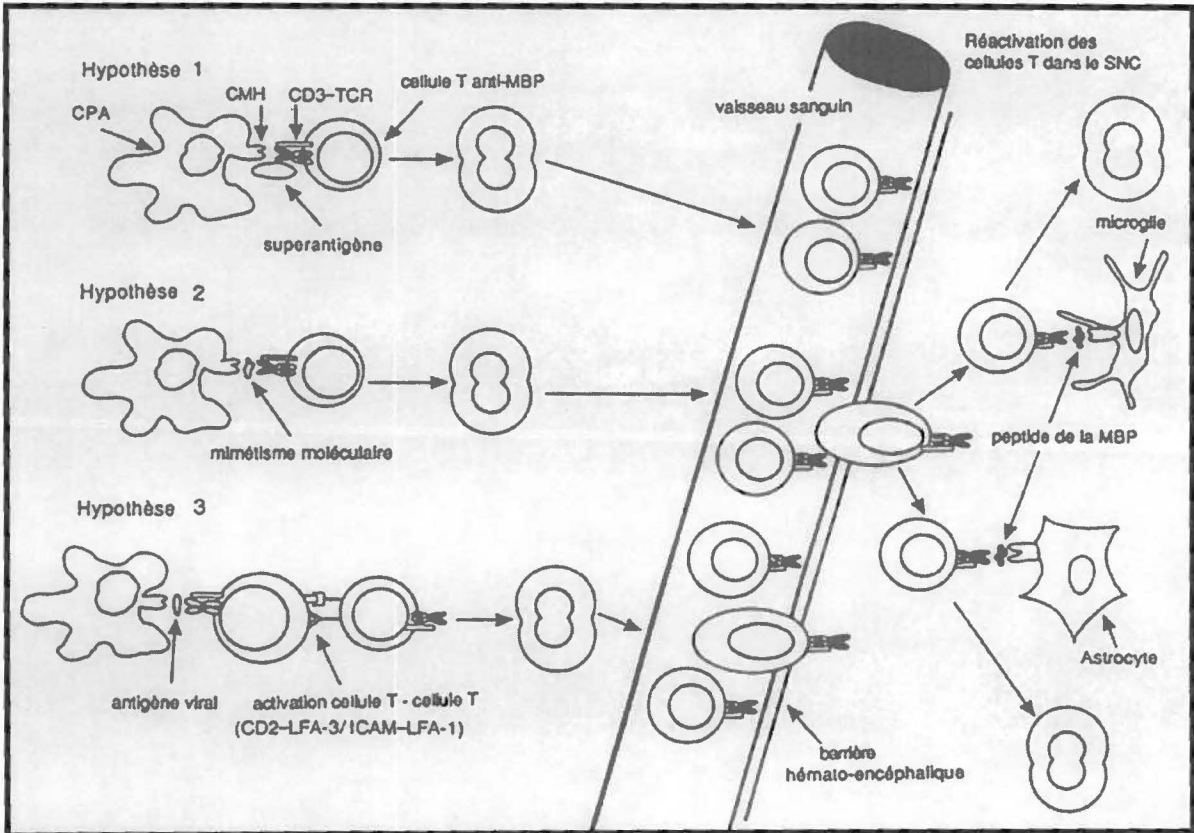
En supposant que la SEP serait une maladie où les lymphocytes T seraient responsables d'une réponse immunitaire aberrante causant la démyélinisation du SNC, quel serait le mécanisme d'activation des lymphocytes T périphériques auto-réactifs? Tout d'abord, il est important de savoir que les lymphocytes T spécifiques aux antigènes de la myéline sont à l'état de repos et ne peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique pour atteindre ces antigènes séquestrés dans le SNC. Alors par quel moyen un lymphocyte T auto-réactif peut s'activer en absence de tout contact avec son antigène? En fait, trois mécanismes ont été proposés (figure 2) (Wucherpfennig *et al.*, 1991).

Tout d'abord la première hypothèse propose que les lymphocytes T auto-réactifs (tel que les lymphocytes T anti-PBM) de la périphérie seraient stimulés par des superantigènes liant le CMH de classe II au segment  $V\beta$  de certains récepteurs de cellules T.

La seconde hypothèse suggère que l'activation des lymphocytes T auto-réactifs se ferait par mimétisme moléculaire entre un antigène de la myéline et un micro-organisme. Ainsi un épitope linéaire ou conformationnel serait partagé à la fois par le micro-organisme (bactérie ou virus) et une protéine de la myéline. Lors d'une infection par ce micro-organisme, les lymphocytes T auto-réactifs pourraient être activés en périphérie par cet épitope porté par le microorganisme (Wucherpfennig *et al.*, 1991). En effet, on a trouvé des homologies de séquence entre des protéines virales et des protéines de la myéline (Fujinami et Oldstone, 1985). De plus, les homologies de séquence peuvent comprendre de 4 - 5 à une douzaine d'acides aminés (Horsfall, 1992). Une homologie de séquence de 5 acides aminés (LSLSR) a été trouvée entre une protéine non structurale du coronavirus humain HCV-229E et une région située tout près du peptide immunodominant de la PBM (84-102) (Jouvenne *et al.*, 1992). De plus, cette région de la PBM est connue pour être encéphalitogène chez les animaux (Talbot *et al.*, 1996). Finalement, une étude récente sur le mimétisme moléculaire a permis de déterminer l'arrangement tridimensionnel du peptide immunodominant (85-99) de la PBM. Des peptides viraux et bactériens correspondant aux critères de sélection ont été synthétisés et utilisés pour stimuler des lymphocytes T spécifiques au peptide immunodominant de la PBM. Ainsi, 7 peptides viraux provenant du virus Epstein-Barr, du virus de l'influenza de type A, du papillomavirus humain, du réovirus, de l'*herpes simplex* et de l'adénovirus 12 ainsi qu'un peptide bactérien provenant de *Pseudomonas aeruginosa* ont réussi à activer ces clones de lymphocytes T. Ainsi, le mimétisme moléculaire ne se limite pas à une ressemblance séquentielle mais aussi à un arrangement spatial similaire des acides aminés (Wucherpfennig et Strominger, 1995).

Finalement, le troisième mécanisme possible d'activation des lymphocytes T auto-réactifs de la périphérie suggère une interaction lymphocyte T-lymphocyte T comme moyen d'activation. Les lymphocytes T auto-réactifs pourraient être activés par un autre lymphocyte T déjà activé par un antigène, via l'interaction des molécules CD<sub>2</sub> - LFA-3 ou l'interaction de la molécule LFA-1 avec une molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM) (Wucherpfennig *et al.*, 1991).

Figure 2: Mécanismes d'activation des lymphocytes T périphériques auto-réactifs. Les lymphocytes T spécifiques aux antigènes de la myéline à l'état de repos, ne peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique pour se rendre dans le SNC que s'ils sont activés. Ainsi, ces cellules T peuvent être activées en périphérie, en absence d'antigène de la myéline, par des superantigènes, par mimétisme moléculaire ou par interaction lymphocytes T-lymphocytes T. Une fois ces cellules activées, elles traversent la barrière hémato-encéphalique et sont à nouveau activées par la présentation des antigènes de la myéline par les cellules de la microglie et les astrocytes. Ainsi, les lymphocytes T auto-réactifs activés induisent au niveau du SNC une réponse inflammatoire qui détruit la myéline (adapté de Wucherpfennig *et al.*, 1991).



Ainsi, lorsque les lymphocytes T auto-réactifs seraient activés au niveau de la périphérie, ils pourraient alors traverser la barrière hémato-encéphalique et être réactivés au niveau du SNC une fois en contact avec des peptides des antigènes de la myéline présentés par des cellules du SNC tels que les astrocytes et les cellules de la microglie. Ces lymphocytes T activés induisent par la suite une réaction inflammatoire au niveau du SNC qui détruit graduellement la myéline et qui provoque l'apparition de plaques de démyélinisation.

## **2.2 Les coronavirus**

### **2.2.1 Classification**

Le genre *coronavirus* regroupe des virus faisant partie de la grande famille des *Coronaviridae* qui comprend également les genres *torovirus* et *arterivirus*. Les coronavirus sont divisés en trois groupes antigéniques déterminés par la similitude de leurs hôtes, de leur réactivité antigénique et de leur séquence génomique. Ces trois groupes antigéniques sont présentés au tableau 1. Dans la majorité des cas, ces virus n'infectent qu'une seule espèce et dans le cas où plusieurs espèces servent d'hôte, ces dernières sont voisines (Holmes et Lai, 1996).

### **2.2.2 Structure**

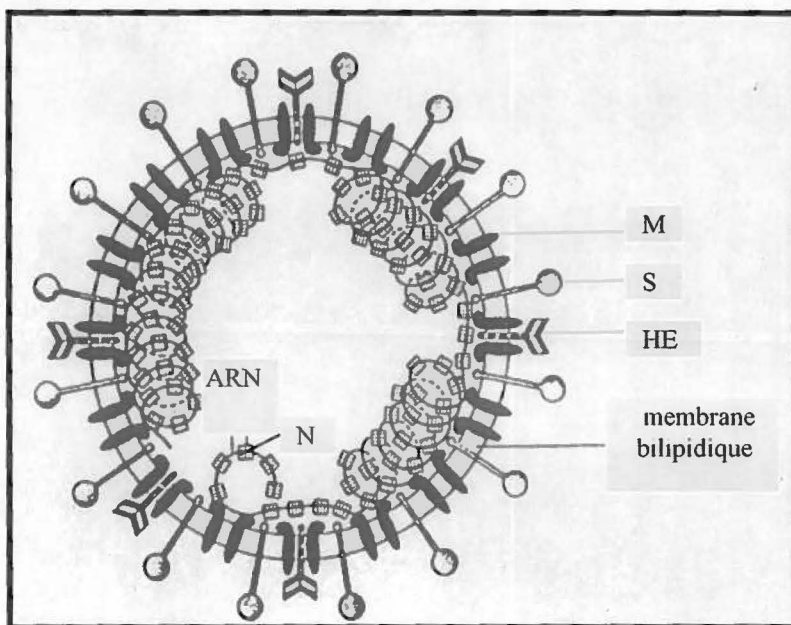
Les coronavirus sont de forme sphérique et recouverts d'une enveloppe bilipidique de lipoprotéines provenant de membranes intracellulaires (Dubois-Dalcq *et al.*, 1984; Griffiths et Rottier, 1992) (Figure 3). Ces virus possèdent un génome formé d'un ARN positif monocaténaire dont la taille est d'environ 27 à 32 kb et représente le plus gros génome des virus à ARN (Lee *et al.*, 1991; Lai, 1990; Siddell *et al.*, 1983). La nucléocapside hélicoïdale est formée par l'association du RNA positif avec la phosphoprotéine de la nucléocapside (N) (Sturman *et al.*, 1980; Macnaughton *et al.*, 1978). L'enveloppe du virion qui recouvre la nucléocapside est constituée de deux



Tableau 1: Les coronavirus, leur groupe antigénique, leur hôte naturel ainsi que les pathologies provoquées par leur infection. Signification des abréviations: HCV-229E, souche du coronavirus respiratoire humain; TGEV, virus porcin de la gastroentérite transmissible; CCV, coronavirus canin; FEPV, coronavirus entérique félin; FIPV, virus de la péritonite infectieuse féline; RbCV, coronavirus du lapin; HCV-OC43 souche OC43 du coronavirus respiratoire humain; MHV, virus de l'hépatite murine; SDAV, virus de la sialodacryadénite; HEV, virus porcin de l'encéphalomyélite hémagglutinante; BCV, coronavirus entérique bovin; RbEVC, coronavirus entérique du lapin; TCV, coronavirus de la dinde; IBV, virus de la bronchite infectieuse aviaire (adapté de Holmes et Lai, 1996).

Groupe antigénique	Virus	Hôte	Infection respiratoire	Infection Entérique	Hépatite	Infection neurologique	Autres
I	HCV-229E	Humain	X			?	
	TGEV	Porc	X	X			X
	CCV	Chien		X			
	FECV	Chat		X			
	FIPV	Chat	X	X	X	X	X
	RbCV	Lapin					X
II	HCV-OC43	Humain	X	?		?	
	MHV	Souris	X	X	X	X	
	SDAV	Rat				X	
	HEV	Porc	X	X		X	
	BCV	Vache		X			
	RbEVC	Lapin		X			
	TCV	Dinde		X	X		
III	IBV	Poulet	X		X		X

Figure 3: Schéma de la structure d'un coronavirus. La nucléocapside hélicoïdale est formée par l'association de l'ARN positif monocaténaire et de la phosphoprotéine de la nucléocapside (N). L'enveloppe bilipidique recouvrant la nucléocapside provient de membranes intracellulaires et est constituée de deux glycoprotéines, la protéine de la membrane (M) et la protéine de surface (S). Les domaines cytoplasmiques de la protéine M interagissent probablement avec la nucléocapside. Une troisième glycoprotéine, l'hémagglutinine-estérase (HE) est retrouvée dans l'enveloppe de certains virions du groupe antigénique II et forme de petits spicules. Finalement, la petite protéine de la membrane (E) qui n'est pas illustrée sur la figure est une petite protéine hydrophobe trouvée récemment chez de nombreux coronavirus (adapté de Holmes et Lai, 1996).



glycoprotéines virales, la protéine de la membrane (M) et la protéine de surface (S) (Sturman et Holmes, 1985; Cavanagh *et al.*, 1990). Dans le cas de certains coronavirus du groupe antigénique II tel que le coronavirus respiratoire humain HCV-OC43, une troisième glycoprotéine est retrouvée au niveau de l'enveloppe des virions, l'hémagglutinine-estérase (HE) (Holmes et Lai, 1996; Künkel et Herrler, 1993). Finalement, une petite protéine hydrophobe qui a récemment été découverte, la petite protéine de la membrane (E) qui n'est pas illustrée sur la figure 3, est retrouvée chez de nombreux coronavirus (Godet *et al.*, 1992; Liu et Inglis, 1991).

### **2.2.3 Les protéines structurales**

La protéine N est une phosphoprotéine de 50 à 60 kDa (Holmes et Lai, 1996) qui peut se lier à L'ARN (Stohlman *et al.*, 1988). Cette phosphoprotéine a pour fonction de se lier avec l'ARN viral, constituant ainsi la nucléocapside (Sturman *et al.*, 1980; Macnaughton *et al.*, 1978). De plus, il semblerait qu'elle soit impliquée dans la réplication de l'ARN viral (Compton *et al.*, 1987). Finalement, elle serait capable d'induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Wege *et al.*, 1993; Boots *et al.*, 1991).

La glycoprotéine S est une large protéine de 190-200 kDa pour HCV-229E et de 180 kDa pour HCV-OC43 et forme les spicules viraux (Mounir et Talbot, 1992; Arpin et Talbot, 1990). Elle est constituée de 4 domaines: un premier domaine cytoplasmique court, un domaine transmembranaire et deux domaines externes dénommés S1 et S2 (Holmes et Lai, 1996). Selon les connaissances actuelles, chaque spicule serait formé de trois monomères de glycoprotéines S (Delmas et Laude, 1990). Cette protéine exerce de nombreuses fonctions telles que la capacité d'induire la fusion de certaines cellules susceptibles (Taguchi, 1993; Stauber *et al.*, 1993; Sturman *et al.*, 1985), d'induire une réponse immunitaire cytotoxique lorsque cette protéine est retrouvée en surface des cellules infectées (Holmes *et al.*, 1986), de lier les immunoglobulines au niveau de leur portion Fc via un domaine récepteur de type III pouvant lier la portion Fc d'IgG chez le

virus MHV (Oleszak *et al.*, 1992). En dernier lieu, elle a aussi la capacité d'induire la production d'anticorps neutralisants (Daniel et Talbot, 1990).

La glycoprotéine M est une particule hydrophobe qui, selon le coronavirus impliqué, peut induire la production d'interféron (Charley et Laude, 1988). De plus, cette protéine semble déterminer le site de bourgeonnement au niveau des membranes intracellulaires puisque cette protéine cible l'appareil de Golgi et non la membrane plasmique (Machamer et Rose, 1987). Également, la protéine M du MHV a la capacité de se lier *in vitro* à la nucléocapside (Sturman *et al.*, 1980) et il est probable qu'elle relie la nucléocapside à l'enveloppe virale lors du bourgeonnement du virus (Dubois-Dalcq *et al.*, 1984). En terminant, cette protéine a un poids moléculaire de 20 à 35 kDa (McIntosh, 1996).

Pour sa part, la glycoprotéine hémagglutinine-estérase (HE) est un dimère de 130 à 140 kDa formé de deux sous-unités de 65 à 70 kDa liées par un pont disulfure (Künkel et Herrler, 1993; Kienzle *et al.*, 1990). Elle est retrouvée chez certains coronavirus du groupe antigénique II (Holmes et Lai, 1996). Cette glycoprotéine peut permettre au virus de se lier aux résidus d'acide neuraminique 9-O acétylés (Schultze et Herrler, 1992; Vlasak *et al.*, 1988) et de causer de l'hémagglutination ainsi que de l'hémadsorption (Holmes et Lai, 1996).

En dernier lieu, la petite protéine de la membrane (E), dont la fonction est encore inconnue, est une protéine d'environ 9 à 12 kDa, encodée par un gène retrouvé chez un bon nombre de coronavirus. Elle est située au niveau de l'enveloppe du virus. (Godet *et al.*, 1992; Liu et Inglis, 1991).

## **2.3 Les coronavirus humains**

### **2.3.1 Morphologie et structure**

Tel que mentionné précédemment, les coronavirus humains font partie du genre *Coronavirus*. Ce sont des particules de forme ronde dont le diamètre est d'environ 100 à 150 nm avec des spicules recouvrant la surface des virus (McIntosh, 1974). Comme les autres coronavirus, le génome est constitué d'un ARN monocaténaire positif lié à la protéine N, formant ainsi la nucléocapside. De même, les protéines S et M sont présentes chez les deux souches du coronavirus humain soit HCV-229E et HCV-OC43. La glycoprotéine HE en forme de petits spicules, est présente chez le coronavirus humain de la souche HCV-OC43 seulement, qui fait partie du groupe antigénique II (tableau 1).

### **2.3.2 Épidémiologie**

Via des tests sérologiques, des anticorps anti-coronavirus respiratoire ont été détectés à tous les endroits où ils ont été mesurés incluant ainsi l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud et l'Europe. En Angleterre, des anticorps anti-OC43 et anti-229E avaient été retrouvés à une fréquence de 100% et 94% respectivement, durant l'année 1976 (McIntosh, 1996). De plus, les anticorps spécifiques aux deux souches du coronavirus respiratoire humain apparaissent tôt chez les enfants et leur fréquence augmente de façon très importante avec l'âge (McIntosh *et al.*, 1970).

Les virus des deux souches du coronavirus respiratoire humain sont des virus épidémiques. Les épidémies d'infection par ces virus culminent durant l'hiver et le printemps (McIntosh, 1996). Les virus de la souche 229E causent des épidémies aux deux ans, répandues partout aux États-Unis. Dans le cas des virus de la souche OC43, les épidémies sont plus localisées (Monto, 1974).

### 2.3.3 Pathologie

Les infections causées par les coronavirus se retrouvent surtout au niveau du tractus respiratoire supérieur. Leurs symptômes s'apparentent à ceux du rhume (McIntosh, 1996; Larson *et al.*, 1980). Ainsi, ces virus sont impliqués dans près du tiers des rhumes (Myint, 1994). Il semblerait que les coronavirus peuvent infecter les cellules ciliées de l'épithélium du tractus respiratoire et induisent une destruction progressive de ces cellules (Tyrrell et Bynoe, 1965). Par conséquent, en éliminant les cils du tractus respiratoire, l'accumulation du mucus produit par les glandes endoépithéliales de cet épithélium, produit une congestion chez l'individu infecté. L'infection causée par le coronavirus 229E produit chez l'individu de la rhinorrhée, une faible fièvre, des maux de tête, une irritation de la gorge et une faible toux (Reed, 1984; Bradburne *et al.*, 1967). De plus, les virus de la souche OC43 occasionnent une irritation de la gorge, de la toux et de la rhinorrhée (Hendley, 1972). Finalement, il est possible que dans certains cas, les coronavirus respiratoires humains infectent le tractus respiratoire inférieur (McIntosh, 1996).

### 2.3.4 Immunologie

La spécificité fine des anticorps sériques anti-coronavirus isolés a été déterminé et il a été démontré que ceux-ci étaient spécifiques à la protéine de surface, à la protéine de la nucléocapside (N) et à la protéine de membrane (M) (Macnaughton *et al.*, 1981; Schmidt et Kenny, 1981). Toutefois, lors d'une infection par un coronavirus respiratoire humain, la hausse de la quantité d'anticorps anti-coronavirus sériques est plus importante au niveau des anticorps anti-protéine de surface (S) (Macnaughton *et al.*, 1981). Également, l'immunité à long terme envers les coronavirus a été évaluée. Ainsi, il a été observé que les anticorps anti-229E diminuent rapidement comparés à ceux spécifiques aux rhinovirus. Un an après une première infection, des virus de la même souche ont été utilisés pour réinfecter les patients et ceux-ci ont développé la maladie (Callow *et al.*, 1991).



Finalement, très peu de données ont été obtenues jusqu'à ce jour sur l'immunité cellulaire anti-coronavirale. Toutefois, il a été démontré qu'il était possible d'obtenir des lignées de lymphocytes T spécifiques aux coronavirus 229E et OC43 chez des personnes atteintes de SEP et des témoins en santé (Talbot *et al.*, 1996). De plus, chez le coronavirus murin (MHV), le phénotype des lymphocytes T responsables de la guérison des souris est majoritairement du phénotype CD8<sup>+</sup>. La cible de ces lymphocytes cytotoxiques est principalement la protéine N (Stohlman *et al.*, 1993).

### **2.3.5 Indices de l'implication des coronavirus humains dans le développement de la sclérose en plaques**

La SEP est une maladie dont l'étiologie n'est pas encore très bien définie. Parmi les différentes hypothèses émises pour expliquer les causes de cette maladie, deux ont été retenues dans le cas des coronavirus humains, *i.e.* la SEP serait causée par une infection du SNC par un coronavirus ou par mimétisme moléculaire entre le coronavirus humain et un des antigènes de la myéline.

Plusieurs indices semblent indiquer une implication possible des coronavirus respiratoires humains dans le développement de la sclérose en plaques. Celles qui soutiennent l'hypothèse de l'infection du SNC sont les suivantes. En effet, il a été démontré que des coronavirus murins, causent une démyélinisation chronique ou cyclique du SNC, dépendante du système immunitaire, chez des rongeurs et des primates (Talbot *et al.*, 1996; Murray, *et al.*, 1992b) et que des particules coronaviriformes ont été détectées par microscopie électronique dans les citernes du réticulum endoplasmique rugueux provenant de cellules d'une région de démyélinisation active du cerveau d'un patient atteint de SEP (Tanaka *et al.*, 1976). Également, des coronavirus murins ont été retrouvés dans le cerveau de deux patients atteints de SEP (Burks *et al.*, 1980). Par la suite, il a été démontré que les coronavirus humains ont aussi la capacité de se répliquer dans des cellules neurales humaines (Bonavia *et al.*, 1997; Talbot *et al.*, 1994; Pearson *et al.*, 1985) et qu'il y a une expression plus élevée de gènes d'origine coronavirale dans le cerveau de

personnes atteintes de SEP qu'à l'intérieur de celui des personnes témoins (Stewart *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1992a). Des résultats similaires à ces derniers ont aussi été obtenus par Nathalie Arbour de l'Institut Armand-Frappier (communication personnelle). Finalement, il a été observé que le taux d'anticorps anti-coronavirus retrouvés dans le liquide céphalo-rachidien est plus élevé chez les donneurs SEP que chez les donneurs témoins (Salmi *et al.*, 1982).

Trois observations principales soutiennent l'hypothèse du mimétisme moléculaire entre des antigènes de la myéline et des virus dont deux impliquent les coronavirus humains. Tout d'abord, en déterminant les exigences structurales d'un peptide immunodominant de la PBM (résidus 85-99), des peptides provenant de différents virus et de bactéries dont les caractéristiques structurales étaient similaires à ces exigences, ont été reconnus par des clones de lymphocytes T spécifiques au peptide immunodominant de la PBM (Wucherpfennig et Strominger, 1995). De plus, une séquence de 5 acides aminés (LSLSR) a été retrouvée à la fois sur une protéine non structurale du coronavirus HCV-229E et sur la PBM (Jouvenne *et al.*, 1992). Et finalement, des lignées de lymphocytes T présentant une réaction croisée entre le coronavirus HCV-229E et la PBM ont été obtenus chez des donneurs SEP (Talbot *et al.*, 1996).

De ces observations ont découlé l'hypothèse de ce projet qui postulait que la SEP serait une maladie auto-immunitaire, qui se développerait chez des individus génétiquement prédisposés, où des lymphocytes T auto-réactifs seraient activés suite au mimétisme moléculaire entre des antigènes de la myéline et des antigènes viraux. De cette hypothèse, les objectifs suivants ont été déterminés. Ce projet visait donc à vérifier si l'hypothèse du mimétisme moléculaire peut s'appliquer au HCV-OC43 et la PBM ou la PPL et par la suite, de caractériser les lignées de lymphocytes T spécifiques au virus. Pour se faire, des lignées de lymphocytes T spécifiques au virus OC43, à la PBM et à la PPL ont été sélectionnés chez des donneurs SEP et des donneurs témoins. Par la suite, la réaction croisée entre le virus et les protéines de la myéline (PBM, PPL) a été vérifié chez les lignées de lymphocytes T obtenues. Finalement, la spécificité envers les protéines

structurales et non structurales, la restriction HLA de la reconnaissance des antigènes ainsi que le phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$  et  $CD_8^+ CD_3^+$  ont été évalués chez les lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus HCV-OC43.

**APPROCHE EXPÉRIMENTALE**

## **3.1 Culture cellulaire et production de virus**

### **3.1.1 Souche du virus**

Pour ces travaux, le coronavirus humain HCV-OC43 (souche VR-759) a été utilisé. Il a été obtenu de l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD). La répllication du virus a été faite avec la lignée cellulaire HRT-18.

### **3.1.2 Cellules**

La lignée cellulaire HRT-18 est composée de cellules humaines provenant d'une tumeur rectale. Ces cellules ont été données par le Dr Jean Vautherot (INRA, Laboratoire de virologie-immunologie moléculaire, France). Elles ont été maintenues en culture à 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> (étuve de marque Forma Scientific) dans des flacons pour culture de tissus (Corning) dans un milieu composé de Earle's minimum essential medium et de Hank's M199 dans une proportion de 1:1 (v/v) (Gibco, Canada, Burlington, Ontario) et auquel a été ajouté 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF), 1,7% (v/v) de bicarbonate de sodium (Gibco) et 2 mM de L-glutamine (Gibco). Lorsqu'elles ont été confluentes, elles ont été soumises à un traitement à la trypsine 0,05% (p/v) avec de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) dilué dans du tampon PBS (Dubelco's Phosphate-buffered Saline). La trypsine a eu pour action de cliver les protéines retrouvées à la surface cellulaire, liées entre elles et au plastique. La trypsine-EDTA a donc été utilisée pour accélérer la dispersion cellulaire. Les cellules ont ensuite été lavées avec le milieu de culture pour enlever toute la trypsine présente et ont été resuspendues dans le milieu de culture à une concentration située entre 50 000 à 200 000 cellules/mL selon les besoins. Elles ont finalement été remises à 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>.

### 3.1.3 Production de virus

Les cellules HRT-18 ont étéensemencées dans le milieu de culture décrit précédemment (section 3.1.2) à une concentration de 60 000 cellules/mL. De cette suspension cellulaire, 50 mL ont été versés par pétri stérile (Gibco) pour un total de 60 pétris. Les cultures ont ensuite été mises à 37°C, 7% (v/v) CO<sub>2</sub>, pendant 72 heures *i.e.* jusqu'à l'obtention d'une confluence cellulaire dans le pétri d'environ 70%.

Le virus OC43 (HCV-OC43) a été dilué avec du milieu de culture contenant une concentration de SVF réduit à 1% (v/v) pour ralentir la prolifération cellulaire. La trypsine-TPCK (Gibco) a été ajoutée à la suspension virale diluée pour obtenir une concentration de 10 unités/mL de trypsine. Une fois que les cellules ont été confluentes à 70%, le milieu de culture a été retiré et 3 mL de la suspension virale a été ajoutée à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,004. Les pétris ont été incubés à 33°C, 7% (v/v) CO<sub>2</sub> et agités aux 15 minutes pendant 2 heures. Ensuite, le milieu de culture contenant le SVF à 1% (v/v) et la trypsine-TPCK a été ajoutée à raison de 12 mL par pétri. Ces derniers ont finalement été incubés à 33°C, 7% (v/v) CO<sub>2</sub> pendant 72 heures. Pour obtenir une suspension virale non purifiée, il a été nécessaire de congeler à -90°C et de décongeler les pétris successivement trois fois pour faire éclater les cellules. Finalement, cette suspension a été centrifugée à 1200 rpm (329 x g) (centrifugeuse Beckman modèle GS-6R) pendant 10 minutes à 4°C pour se débarrasser des débris cellulaires et n'obtenir qu'une suspension de virus comprenant aussi des protéines cellulaires et des protéines virales intracellulaires et extracellulaires nommée intra/extra (i/e). Cette suspension a été utilisée pour stimuler des lymphocytes T dans le but d'obtenir des lignées spécifiques aux différentes protéines virales structurales et non-structurales du coronavirus OC43.

### 3.1.4 Purification partielle du virus

Pour obtenir une suspension virale purifiée, le surnageant des pétris contenant le virus a été récolté et ensuite centrifugé à  $10\ 000 \times g_{moy}$  pendant 20 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  (centrifugeuse Beckman J-2-21M). Après la centrifugation, le surnageant a été conservé et le culot contenant des cellules et les débris cellulaires a été jeté. Ensuite, ce surnageant a été amené à une concentration de 0,5% (p/v) NaCl et de 10% (p/v) de polyéthylène glycol 8000 (PEG) (Sigma) pour provoquer la précipitation du virus. La suspension a ensuite été mise sous agitation à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant toute la nuit.

Cette suspension a par la suite été centrifugée à  $10\ 000 \times g_{moy}$  pendant 30 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  dans la même centrifugeuse. Le surnageant a été jeté et le culot a été resuspendu dans environ 1-2 mL de tampon TMEN pH 6,2 (à  $4^{\circ}\text{C}$ ). Le tampon TMEN a été utilisé pour augmenter la stabilité du virus qui est meilleure à un pH de 6,0. Ce tampon a été composé de 1mM EDTA, 0,1M NaCl et 0,05M Tris-maléate pH 6,2. Ce dernier tampon a quant à lui été composé de 0,05M Tris-maléate et ajusté à pH 6,2 avec du 5N NaOH.

Pour effectuer la purification partielle du virus, la suspension virale obtenue en 3.1.3 a été déposée sur un gradient discontinu de Nycodenz composé de Nycodenz 50% (p/v) et 10% (p/v) dans des tubes Ultra-Clear (Beckman Canada, Mississauga, Ontario). Le Nycodenz utilisé a été dissout dans le tampon TMEN pH 6,2. Par la suite, le gradient a été centrifugé dans une ultracentrifugeuse (Beckman modèle L5-65) à  $148\ 000 \times g_{moy}$  à une température de  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 2 heures ou  $110\ 000 \times g_{moy}$  pendant 3 heures avec le rotor SW41 ou bien à  $83\ 000 \times g_{moy}$  pendant 3,5 à 4 heures avec le rotor SW28.

La bande plus opaque à l'interface 10%/50% contient le virus. Les gradients ont été par la suite fractionnés en fractions d'environ 0,5 mL grâce à un collecteur de fractions. Cet appareil comprenant un tube collecteur permet de percer le tube du gradient à son extrémité inférieure. Le gradient s'écoule ainsi dans les éprouvettes, par le tube collecteur pour former les fractions à raison de 50 gouttes par éprouvette (environ 0,5 mL). A partir

des fractions turbides (contenant le virus), des grilles pour le microscope électronique ont été préparées et envoyées au service de microscopie électronique pour l'identification visuelle du virus et déterminer le niveau de contamination cellulaire. Une fois l'identification du virus faite, la suspension virale a été dialysée contre du TMEN pH 6,2 pour enlever le Nycodenz qui est nocif pour le virus. Le volume de TMEN utilisé a été de 500 à 1000 fois celui de la suspension virale. La suspension a été dialysée pendant toute la nuit à 4°C contre le TMEN. Cette étape a été répétée deux autres fois. Le dialysat obtenu a finalement été conservé pour la purification totale du virus.

### **3.1.5 Purification totale du virus**

Le virus semi-purifié obtenu en 3.1.4 a été déposé sur un gradient continu de Nycodenz de 10% à 50% (p/v) dissout dans le tampon TMEN pH 6,2. Le gradient préparé dans des tubes Ultra-clear (Beckman Canada, Mississauga, Ontario) a ensuite été centrifugé dans l'ultracentrifugeuse à 4 °C aux mêmes vitesses que décrite en 3.1.4 au moins 4-5 heures ou le plus souvent pendant toute la nuit. Comme mentionné en 3.1.4, le gradient a par la suite été divisé en fractions d'environ 0,5 mL. Les fractions turbides ont été sélectionnées visuellement pour préparer les grilles pour le microscope électronique. Une fois que le virus a été identifié, celui-ci a été dialysé à 4°C contre du PBS au lieu du TMEN pH 6,2 (section 3.1.4) puis inactivé 20 minutes sous les UV (Ultra-Lum dual Light Transilluminator) et finalement congelé à -70°C ou -90°C.

### **3.1.6 Préparation des grilles pour la microscopie électronique (Airfuge)**

Ce protocole a été obtenu de Robert Alain (communication personnelle et Payment et Trudel, 1989). Pour chaque échantillon à analyser, 50 µl de la suspension virale ont été prélevés et mis dans un tube correspondant au rotor A-100, 30° de Beckman (microcentrifugeuse Airfuge). Une grille de cuivre recouverte d'une membrane de Formvar préparée par le technicien a été prélevée et déposée au fond du tube. Les tubes ont été mis dans la centrifugeuse et la micro-ultracentrifugation a duré 5 minutes à 20



psi. Les grilles ont été prélevées et ont chacune été trempées dans une goutte de solution contenant de l'acide phosphotungstique 3% (p/v), pH 6. Elles ont été asséchées et confiées au service de microscopie électronique pour analyses ultérieures.

### **3.1.7 Technique de quantification des protéines virales en suspension**

Afin d'évaluer la quantité de protéines virales présentes dans la suspension de virus purifié, la trousse Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Hercules, CA, USA) (technique de Bradford, 1976) a été utilisée. Tout d'abord, avec la préparation d'albumine sérique bovine fournie dans la trousse (témoin positif) et du tampon PBS, des dilutions sérielles (5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml; 100 µl/puits) ont été effectuées en duplicata dans un plateau à 96 puits à fond plat (ICN Biomedicals inc.). La suspension virale à évaluer a subi la même procédure de dilution sérielle que l'albumine. Finalement, quatre puits contenant 100 µl de PBS seulement ont servi comme témoin négatif. Une fois les dilutions terminées, 10 µl du réactif de la trousse (dye reagent concentrate) a été ajouté à chaque puits. La réaction s'est déroulée pendant 20 minutes à la température de la pièce. Finalement, la concentration en protéines de chaque puits a été évaluée dans un lecteur Elisa (modèle EAR 400 AT; SLT-Labinstruments, Autriche) à une longueur d'onde de 600 nm.

### **3.1.8 Détermination du titre infectieux de HCV-OC43**

Afin d'évaluer le titre infectieux des suspensions virales de OC43, les techniques suivantes ont été utilisées.

#### **3.1.8.1 Immunoperoxydase indirecte**

Tout d'abord, des plateaux à 96 puits pour culture de tissus (ICN Biomedicals inc.) ont étéensemencés avec des cellules HRT-18 dans un milieu composé de Earle's minimum essential medium et de Hank's M199 dans une proportion de 1:1 (v/v) (Gibco, Canada,

Burlington, Ontario) et auquel a été ajouté 10% (v/v) de SVF, 1,7% (v/v) de bicarbonate de sodium (Gibco) et 2 mM de L-glutamine (Gibco), puis mis dans une étuve (Forma Scientific) à 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Une fois que la confluence des cellules dans les puits a atteint 70%, le virus OC43 à titrer ainsi que les témoins positif (OC43 P4; 12/1991) et négatif (même milieu de culture que celui décrit précédemment avec 2% [v/v] de SVF et de la trypsine TPCK à 10 U/ml) ont été préparés. Les virus ont d'abord été soniqués puis dilués de façon décimale (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, etc.) dans le même milieu de culture que celui décrit précédemment avec 2% (v/v) de SVF et 10 U/ml de trypsine TPCK. Le milieu de culture contenu dans les plateaux contenant les cellules HRT-18 a été enlevé puis remplacé par 100 µl de chacune des différentes dilutions de virus à raison de 4 puits par dilution tant pour l'inconnu que pour le témoin positif. Finalement un des puits a été conservé pour ajouter 100 µl de témoin négatif (milieu de culture seulement). Les plateaux ont ensuite été incubés à 33°C, 5% CO<sub>2</sub> (étuve Forma Scientific) pendant 2 heures. Une fois l'incubation terminée, 100 µl de milieu de culture contenant 2% de SVF et de la trypsine TPCK à 10 U/ml ont été ajoutés à tous les puits des plateaux. Ces derniers ont finalement été incubés à 33°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 4 jours.

Après l'incubation de 4 jours, les plateaux ont été vidangés de leur milieu de culture et ont ensuite été lavés une fois avec du tapon PBS. Par la suite, les cellules ont été fixées 15 à 30 minutes grâce à une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% dans du méthanol 100%. Les plateaux ont été vidangés de la solution et séchés à l'air libre. Une fois secs, les plateaux ont été lavés une fois au PBS et le test de détection du virus a pu être effectué. Il est possible de conserver les plateaux à 4°C pendant quelques jours une fois qu'ils sont complètement séchés, toutefois avant de faire le test de détection du virus, il faut les laver une fois avec du PBS.

### **3.1.8.2 Détection du virus**

Une fois les plateaux de l'immunoperoxydase indirecte prêts, les antisérums nécessaires à la détection du virus OC43 ont été dilués dans du PBS. L'antisérum hyperimmun de

souris NIH anti-OC43 dilué 1/2000 a été utilisé pour détecter le virus OC43. Comme témoin isotypique négatif, de l'ascite 653 a été utilisée. Par la suite, 100 µl par puits d'anticorps dilués ont été ajoutés. Par la suite, les plateaux ont été incubés à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (étuve Forma Scientific) pendant 2 heures. Les plateaux ont été lavés trois fois avec du PBS et 100 µl d'antisérum anti-IgG conjugué à la peroxydase (Kirkegaard & Perry Laboratories distribué par Canadian Life Technologies Inc.) et dilué 1/500 avec du PBS ont été ajoutés à chaque puits. Les plateaux ont été ensuite incubés 2 heures à 37°C en chambre humide sans CO<sub>2</sub>. La réaction a été révélée à l'aide d'une solution composée de 0,025% de tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine (DAB), dissout dans du PBS et filtré, et de 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction a été arrêtée avec 2 bains de H<sub>2</sub>O distillée après 5 à 20 minutes en laissant l'eau dans les puits.

Pour calculer le titre infectieux à 50% (dose infectieuse à 50% en culture de tissus ou DICT<sub>50</sub>), la formule de Karber a été utilisée i.e.  $DICT_{50} = \Delta - [\delta \times (S - 0,5)]$  où  $\Delta = -\log_{10}$  de la dernière dilution décimale montrant 100% de présence virale,  $\delta = -\log_{10}$  du facteur de dilution (ex:  $-\log_{10} 10 = -1,0$ ) et S = somme des cupules où il y a présence de virus, incluant celles de la dilution montrant 100% de présence virale; cette dernière a pour valeur l'unité et chaque autre dilution une fraction de l'unité (nombre de cupules positives sur le nombre de cupules totales utilisées pour chaque dilution ex: dilution  $10^{-1} = 8/8$  cupules positives;  $10^{-2} = 8/8 = 1,0$ ;  $10^{-3} = 5/8 = 0,625$ ;  $10^{-4} = 1/8 = 0,125$ ;  $10^{-5} = 0/8$  donc  $S = 1,0 + 0,625 + 0,125 = 1,75$  ).

## **3.2 Immunofluorescence indirecte**

### **3.2.1 Préparation des lames d'immunofluorescence**

Les cellules HRT-18 ont d'abord été traitées à la trypsine-EDTA tel que décrit à la section 3.1.2. Elles ont ensuite été resuspendues à  $1,5 \times 10^6$  cellules/mL dans le milieu de culture mentionné à la section 3.1.2 auquel de la trypsine-TPCK 10 U/mL et 10% (v/v) de SVF ont été ajoutés. Ensuite, les cellules ont été divisées en deux fractions, la première pour

les cellules témoins et la seconde pour les cellules infectées. Pour les cellules témoins, une partie (1:1) de la suspension cellulaire a été mélangée avec une partie de milieu de culture contenant 10% (v/v) SVF et de la trypsine-TPCK à 10 U/mL. Pour les cellules infectées, le virus HCV-OC43 (P4, 12.1991) a d'abord été dilué de moitié dans le milieu de culture contenant le SVF et la trypsine-TPCK et il a ensuite été mélangé dans une proportion de 1:1 avec la suspension cellulaire. De ces deux préparations, 25 µl par puits ont été déposés sur une lame Flow de 12 puits stérile. Les lames ont ensuite été incubées à 33°C pour une période de 48 à 66 heures. Après l'incubation, les lames ont été lavées avec du tampon PBS et fixées à l'acétone prérefroidie à -20°C. Les lames ont ensuite été séchées et congelées à -90°C jusqu'au moment de l'utilisation.

### **3.2.2 Vérification de la présence d'anticorps humains anti-coronavirus HCV-OC43 sériques chez les donneurs par immunofluorescence indirecte**

Le sérum des donneurs a d'abord été obtenu en utilisant un tube (10 mL) pour prélèvements sanguins sans héparine pour chaque donneur. Ce tube a été conservé à la température de la pièce pour au moins 30 minutes afin de permettre la coagulation. Il a ensuite été centrifugé à 1500 rpm (514 x g) pendant 15 minutes (centrifugeuse Beckman modèle GS-6R). Le sérum a ensuite été récupéré et décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. Le sérum a été conservé à 4°C ou à -70°C (pour une période plus longue) jusqu'à son utilisation pour l'immunofluorescence.

Les anticorps témoins positifs qui ont été utilisés pour l'immunofluorescence sont des immunoglobulines de type G (IgG) et sont les suivants: les anticorps anti-HEV 4-E11.3 (surnageant d'hybridomes) (13.5.94) dilués 1/100 et 1/400 dans le tampon PBS non stérile ont été utilisés pour les donneurs SEP1 et 2 et les donneurs témoins 1 et 2, les anticorps anti-HCV-OC43 1-10C.1 (surnageant d'hybridomes) purs et dilués 1/200 ont servi pour les donneurs SEP 3 et 4 et le donneur témoin 3, les anticorps anti-HCV-OC43 1-10C.1 (liquide d'ascite) (9.95) pour les donneurs SEP 5, 6, 7 et 8 et et les donneurs témoins 4, 5, 6, 7 et 8. Les anticorps témoins négatifs utilisés sont aussi des IgG et sont les suivants: les anticorps anti-cmyc 1-9E10.2 (surnageant d'hybridomes) (22.7.93) dilués

1/100 et 1/400 pour les donneurs SEP 1 et 2 et les donneurs témoins 1 et 2, les anticorps anti-TuMV purs et dilués 1/200 pour les donneurs SEP 3 et 4 et le donneur sain 3, les anticorps anti-TUMV 6D (pool de liquides d'ascite) dilués 1/2000 et 1/3000 pour les donneurs SEP 5, 6, 7 et 8 et les donneurs sains 4, 5, 6, 7 et 8. Le sérum et le plasma autologue des donneurs, contenant des anticorps, ont été utilisés sur les lames sous forme non diluée et diluée avec le tampon PBS non stérile 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/160.

Pour l'immunofluorescence indirecte dont le protocole a été obtenu du laboratoire du Dr Pierre Talbot (Lambert, F. 9.93; Institut Armand-Frappier, Canada), les lames préparées en 3.2.1 ont d'abord été décongelées. Une lame de cellules témoins et une de cellules infectées ont été utilisées par donneur. Par la suite, 25 µl des anticorps mentionnés plus haut et 25 µl du sérum ou du plasma ont été déposés sur chaque lame. Elles ont été incubées 1 heure à 37°C, 7% (v/v) CO<sub>2</sub>. Les lames ont ensuite été lavées au PBS trois fois puis asséchées délicatement. Un anticorps conjugué à la fluorescéine (FITC F(ab')<sub>2</sub> anti-humain anti-IgG #39832; Cappel/Organon, Teknica, Chester, PA, USA) a été dilué 1/100 et 25 µl de cet anticorps dilué ont été déposés sur chaque puits. L'incubation à 37°C, 7% (v/v) CO<sub>2</sub> a duré 30 minutes. Les lames ont par la suite été lavées dans le tampon PBS non stérile trois fois. Les lames ont finalement été montées en les recouvrant d'une lamelle puis regardées au microscope à fluorescence (Orthoplan TM Leitz, Wetzlar) avec le filtre à 492 nm utilisé pour la fluorescéine.

### **3.3 Obtention de lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43, anti-PBM et anti-PPL chez les donneurs atteints de sclérose en plaques et chez les témoins en santé**

#### **3.3.1 Les donneurs**

Les donneurs qui ont participé à cette étude ont été sélectionnés au hasard. Ils ont été divisés en deux groupes: huit donneurs atteints de SEP et huit donneurs témoins en santé. Les donneurs témoins étaient environ du même âge et du même sexe que les donneurs SEP et n'étaient pas atteints de maladies neurologiques connues. Le groupe des donneurs

était composé de 10 femmes et de 6 hommes. L'âge moyen des donneurs SEP était de 51 ans (42 à 68 ans) et celui du groupe des donneurs témoins était de 49 ans (36 ans à 59 ans). Parmi le groupe des donneurs SEP, 4 étaient atteints de la forme progressive et 4 de la forme cyclique de la SEP. Par immunofluorescence indirecte, la séropositivité des donneurs envers le coronavirus humain OC43 a été déterminée. De plus, leur profil d'histocompatibilité pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II de type HLA-DR (human leucocyte antigen-DR) a été établi grâce à des techniques sérologiques et moléculaires par le Laboratoire d'Histocompatibilité de l'Institut Armand-Frappier.

### **3.3.2 Les antigènes**

#### **3.3.2.1 Coronavirus humain HCV-OC43**

La souche du coronavirus utilisée a été présentée à la section 3.1.1. Deux types de suspensions virales ont été utilisées. La première, utilisée pour obtenir des lignées anti-HCV-OC43 ainsi que pour les tests de prolifération, est celle du virus non purifié (i/e), obtenue selon la technique décrite en 3.1.3. La seconde est une suspension de virus purifié selon la technique décrite en 3.1.3, 3.1.4 et 3.1.5.

#### **3.3.2.2 Protéine basique de la myéline**

Le protocole d'isolement de la PBM a été obtenu du laboratoire du Dr Jack Antel (Institut Neurologique de Montréal, Canada). La PBM a été isolée de cerveaux humains adultes exempts de maladies neurologiques. Ces cerveaux ont été obtenus de la Banque de Cerveaux du Centre de Recherche de l'Hôpital Douglas (Verdun, Québec, Canada). La méthode utilisée pour isoler la PBM a duré environ une semaine. Les solutions utilisées ont été les suivantes: chloroforme:méthanol 2:1 v:v (450 mL, 4°C), acétone (-20°C), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 N (182 mL, 4°C), fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) 10 µg/mL

ajouté dans de l'isopropanol (182 mL, -20°), éthanol 100% (Eastman Kodak Company, -20°), éthanol 90% (Eastman Kodak Company).

Le premier jour, toutes les manipulations ont été réalisées à 4°C. Tout d'abord, quarante grammes de matière blanche provenant d'un cerveau sain adulte ont été dégelés partiellement à 4°C puis coupés en gros morceaux dans un mixeur (Osterizer) pendant 15 secondes. Par la suite, 284 mL de la solution de chloroforme:méthanol a été ajoutée pour enlever les lipides de la matière blanche. Le tout a été mélangé dans le mixeur pendant 15 secondes. Finalement, la suspension a été transférée dans un bécher de verre couvert d'une feuille d'aluminium puis agitée pendant toute la nuit à 4°C.

Le deuxième jour, la suspension a été filtrée à la température de la pièce sur un filtre de papier Whatman #1 tout en évitant de laisser les résidus s'assécher sur le filtre. Les résidus ont été conservés et le filtrat, contenant les lipides et les protéines solubles dans le méthanol, a été jeté. Ces résidus ont ensuite été lavés avec 130 mL de la solution de chloroforme:méthanol puis, avec 172 mL d'acétone froide. Après ces lavages, les résidus ont été mélangés au mixeur avec 130 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 N contenant 130 µl de la solution de PMSF, qui est un inhibiteur de protéase, puis ont été agités toute la nuit à 4°C.

Le troisième jour, la suspension a été centrifugée (centrifugeuse Beckman J2-21M) à 8500 rpm (7000 x g), 60 minutes à 4°C et le surnageant a été conservé à 4°C. Le culot a été lavé avec 52 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 N contenant 130 µl de la solution de PMSF puis recentrifugé à 8500 rpm (7000 x g), 60 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu a été combiné avec le surnageant précédent (180 mL). Un volume égal d'éthanol 100% très froid a été ajouté au surnageant afin de provoquer la précipitation de la protéine. La solution a été maintenue à 4°C toute la nuit pour permettre la précipitation de la protéine.

Le quatrième jour, la suspension a été centrifugée à 8500 rpm (7000 x g), durant 60 minutes et à -10°C. Le surnageant a été jeté et le culot blanc a été conservé. Le culot a ensuite été lavé trois fois cinq minutes avec 20 mL d'éthanol 90% (v/v) et resuspendu

dans 35 mL d'éthanol 90% (v/v). La suspension a été centrifugée à -10°C durant 30 minutes à 8500 rpm (7000 x g). Le culot obtenu a ensuite été resuspendu avec 20 mL H<sub>2</sub>O distillée contenant 20 µl de la solution de PMSF. La suspension a été laissée sous agitation à 4°C toute la nuit pour permettre la solubilisation de la protéine.

Le cinquième jour, la PBM qui s'est solubilisé dans l'eau a été centrifugée à 8500 rpm (7000 x g), pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été conservé pour la dialyse contre de l'eau distillée avec trois changements d'eau aux douze heures. Finalement, le dialysat a été congelé pour permettre la lyophilisation de la PBM (lyophilisateur Labconco, modèle 77510, Kansas City, MO). Finalement, en utilisant la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et de tricine, la pureté de la protéine isolée a été vérifiée (section 3.5).

### **3.3.2.3 Protéine protéolipidique**

La protéine protéolipidique (PPL) purifiée nous a été gracieusement donnée par le Dr Mario Moscarello du Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario.

### **3.3.3 Milieu de culture des lymphocytes T humains**

Le milieu de culture des lymphocytes T a été constitué de 500 mL de RPMI 1640 (Gibco BRL, Canada, Burlington, Ontario) contenant de la L-glutamine 2 mM auquel a été ajouté 10 mM de tampon HEPES, 100 unités/mL de pénicilline, 100 unités/mL de streptomycine et 1,25 µg/mL d'amphotéricine B (Fungizone) (tous de chez Gibco). A ce milieu, 10% (v/v) de sérum humain commercial (Pel-Freeze) ou 5% (v/v) de sérum humain commercial et 5% (v/v) de sérum humain autologue ou 10% (v/v) de sérum humain autologue ainsi que 50 µM de β-mercaptoéthanol (β-Me) ont été ajoutés. Le mécanisme n'est pas encore connu, mais il semblerait que le β-Me augmente la survie des lymphocytes T. Cette préparation a constitué le milieu de culture complet (RPMI complet).



### 3.3.4 Isolement des leucocytes mononucléaires

Tout d'abord, 60 mL de sang ont été prélevés chez le donneur dans des tubes héparinés pour les prises de sang. Le sang obtenu a été dilué 1:1 avec du milieu RPMI 1640 puis déposé dans des tubes de polypropylène de 50 mL (Corning) contenant chacun 15 mL de Ficoll-Paque research grade (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède) (gradient discontinu). Ces tubes ont été centrifugés à 1800 rpm (740 x g) pendant 30 minutes à la température de la pièce (centrifugeuse Beckman modèle GS-6R utilisée pour toutes les centrifugations) (Figure 4).

A l'interface du plasma et du Ficoll se retrouve la couche de cellules mononucléaires du sang périphérique. Cette couche a été prélevée et diluée à environ 40 mL dans un tube de polypropylène de 50 mL avec le RPMI. La suspension cellulaire a été par la suite centrifugée à 1500 rpm (514 x g) pendant 15 minutes à la température de la pièce pour se débarrasser du Ficoll-Paque. Le culot a été conservé et resuspendu dans 20 mL de RPMI. La suspension cellulaire a été recentrifugée à 1200 rpm (329 x g) pendant 10 minutes. Le culot final a été resuspendu dans 10 mL de RPMI complet. La concentration cellulaire de la suspension a été déterminée à l'aide d'un hématimètre et du bleu de trypan à 0,1% (p/v) dans du tampon PBS comme colorant d'exclusion des cellules mortes. La suspension cellulaire a été ajustée à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL.

Cette technique a été utilisée pour les donneurs SEP 1 et 2 ainsi que les donneurs témoins 1 et 2. Pour les donneurs suivants, la technique qui a été utilisée et dénommée "buffy coat" a été la suivante. Lorsque les 60 mL de sang ont été prélevés dans des tubes héparinés pour les prises de sang, les tubes ont été centrifugés à 1800 rpm (740 x g) pendant 10 minutes à la température de la pièce (centrifugeuse Beckman modèle GS-6R utilisée pour toutes les centrifugations) (figure 5).

Figure 4: Gradient de Ficoll-Paque avant et après centrifugation. Le sang humain qui a été dilué 1:1 avec du RPMI 1640 a été déposé sur 15 mL de Ficoll-Paque et centrifugé à la température de la pièce à 1800 rpm (740 x g) pendant 30 minutes. La couche de cellules mononucléaires a été prélevée et conservée pour les manipulations suivantes.

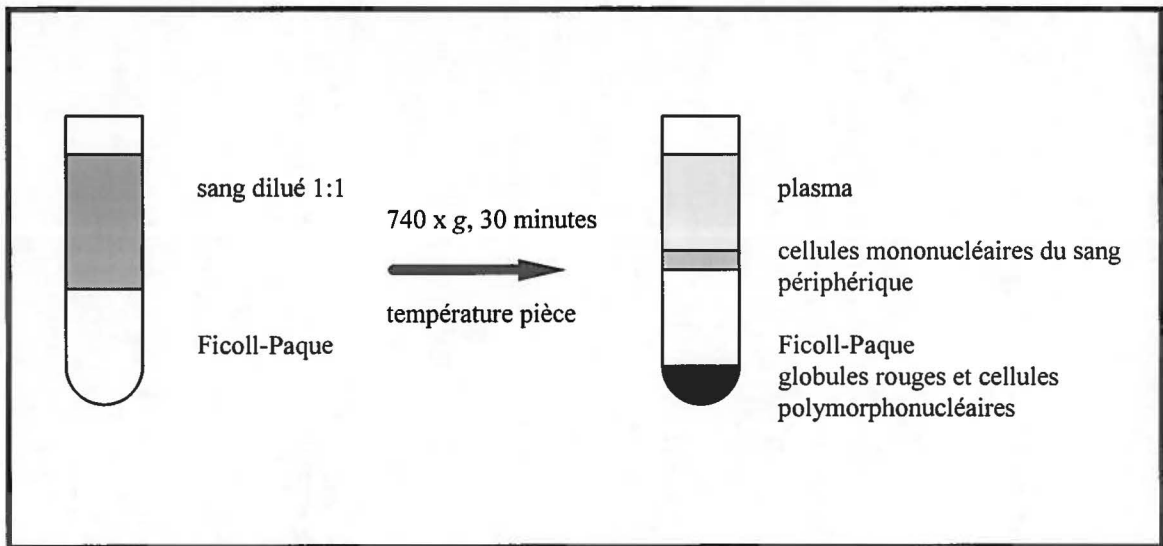
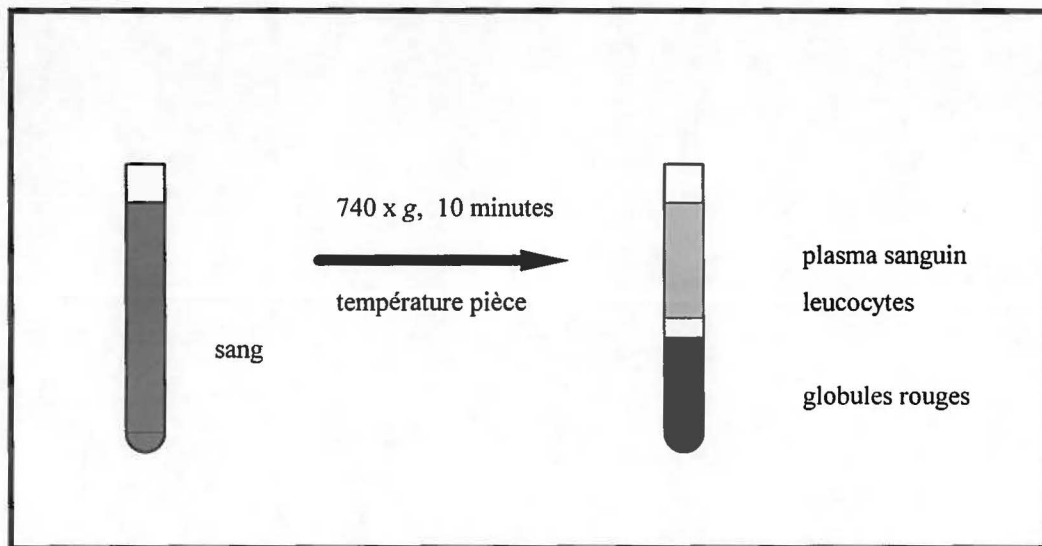


Figure 5: Centrifugation des tubes de sang avant de le diluer pour le déposer sur le Ficoll-Paque. Les tubes de sang prélevé ont été centrifugés à 1800 rpm (740 x g) pendant 10 minutes à la température de la pièce (centrifugeuse Beckman modèle GS-6R). La couche de plasma sanguin et celle des leucocytes ont été récupérées pour les manipulations ultérieures. Le reste du contenu du tube a été jeté.



Après la centrifugation, le plasma sanguin et l'anneau de leucocytes ont été récupérés. Le plasma a été décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. Les leucocytes ont été dilués 1:1 avec le milieu RPMI 1640 puis déposé dans des tubes de propylène de 50 mL contenant chacun 15 mL de Ficoll-Paque research grade (gradient discontinu). Ces tubes ont été centrifugés à 1800 rpm (740 x g) pendant 30 minutes à la température de la pièce (Figure 4). Le reste de la technique utilisée a été la même que celle employée pour les donneurs SEP 1 et 2 ainsi que pour les donneurs témoins 1 et 2.

### **3.3.5 Première stimulation antigénique des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection**

Une fois que la suspension de leucocytes a été ajustée à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL, 100 µl de cette suspension cellulaire ont été déposés par puits d'un plateau à 96 puits à fond rond (ICN Biomedicals inc., pour culture de tissus). Par la suite, les antigènes utilisés pour la sélection des lignées de lymphocytes T qui leur sont spécifiques ont été ajoutés à raison de 10 µl d'antigène par puits. Les antigènes utilisés ont été les suivants: PBM à 3 µg par puits (concentration finale de 27µg/ml), PPL à 3 µg par puits (concentration finale de 27µg/ml) et la suspension de coronavirus HCV-OC43 i/e (24.09.94) à une dose infectieuse à 50% en culture de tissus [DITC<sub>50</sub>] de  $10^6$  DICT<sub>50</sub>/mL à une dilution finale de 1/22. Les plateaux ont été incubés pendant deux semaines à 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Au cours de ces deux semaines, lorsque le milieu de culture dans les puits a commencé à jaunir, 100 µl de milieu de culture RPMI complet contenant 20 U/mL d'interleukine-2 (IL-2) (Boehringer Mannheim et Hoffmann-La Roche inc., Nutley, NJ) ont été ajoutés à chaque puits contenant les leucocytes mononucléaires pour un volume total de 200 µl par puits. Par la suite, lorsque le milieu des puits a commencé à devenir jaune, 100 µl de milieu a été prélevé des puits et remplacé par 100 µl de RPMI complet contenant 20 U/mL IL-2 pour un volume final dans chaque puits de 200 µl.

### **3.3.6 Deuxième stimulation antigénique des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection**

Pour chaque donneur, 4 à 5 stimulations antigéniques des lymphocytes T obtenus à la première stimulation ont été effectuées dans le but d'éliminer les lymphocytes T réactifs à d'autres antigènes que ceux utilisés pour la sélection. Pour la deuxième stimulation antigénique, la méthode utilisée a été la suivante. Tout d'abord, de nouveaux leucocytes mononucléaires ont été isolés à partir du sang périphérique selon la technique décrite en 3.3.4. Avant l'étape de la centrifugation de 1200 rpm (329 x g) pendant 10 minutes, les leucocytes mononucléaires ont été préalablement irradiés au cobalt à 2500 rads (Gamma cell 220). Par la suite, la centrifugation à 1200 rpm (329 x g) pendant 10 minutes a été effectuée pour laver les cellules. Le culot de cellules ainsi obtenues a été resuspendu à une concentration finale de  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans du RPMI complet. Ces cellules ont été utilisées comme cellules de présentation de l'antigène (CPA).

Le milieu de culture contenu dans les plateaux à 96 puits de la stimulation précédente a été remplacé complètement par 110  $\mu$ l de RPMI complet, tout en conservant les lymphocytes T présents dans les puits. La suspension cellulaire de chaque puits a ensuite été divisée en deux volumes de 50  $\mu$ l et mis dans deux puits d'un nouveau plateau à 96 puits. Un des deux puits a servi pour la stimulation antigénique avec le même antigène de sélection utilisé lors de la première stimulation antigénique. Le second puits, a servi à la stimulation antigénique des lymphocytes T par le témoin négatif de l'antigène de sélection (figure 6).

Par la suite, les CPA ont été ajoutées aux lymphocytes T dans une proportion de 5 à 10 CPA par lymphocyte T pour un volume final de 100  $\mu$ l par puits (i.e une concentration finale des CPA de  $1 \times 10^6$  cellules/mL) du plateau à 96 puits à fond rond. Finalement, les antigènes ont été ajoutés selon les mêmes quantités indiquées en 3.3.5. Les antigènes utilisés ont été: la PBM, la suspension de coronavirus HCV-OC43 i/e, la PPL et leurs témoins négatifs respectifs, RPMI, lysat de cellules HRT-18 non infectées i/e (préparé de

la même façon que le coronavirus non purifié à la section 3.1.3), et le RPMI. Les plateaux de 96 puits ont été incubés à 37°C , 5% (v/v) CO<sub>2</sub>.

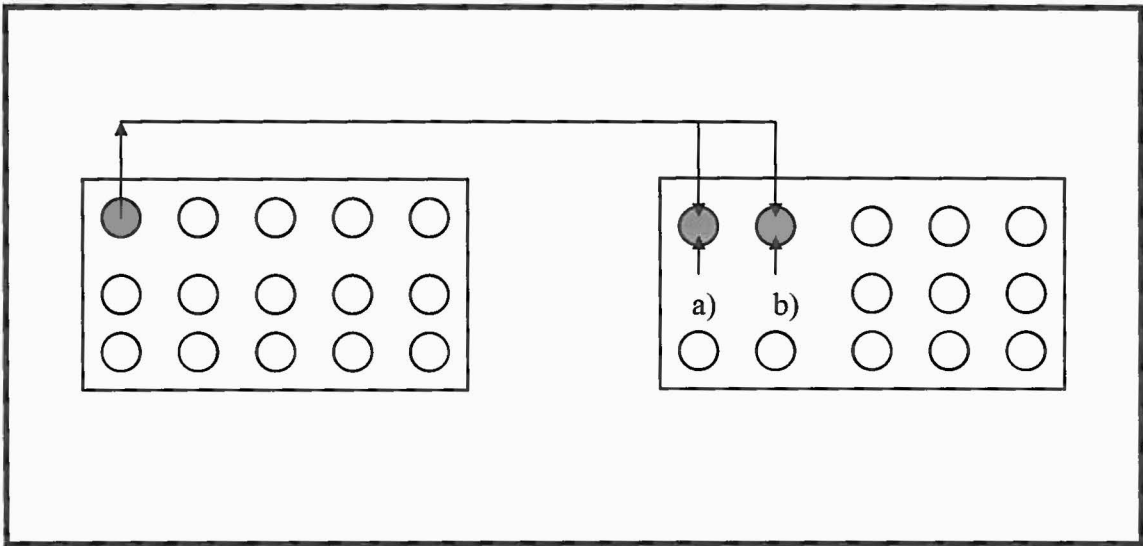
Au bout d'environ 3 jours d'incubation, la sélection des puits contenant des lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection a été faite. Par comparaison visuelle de la taille des culots obtenus dans les puits contenant l'antigène de sélection par rapport à la taille de celui du puits du témoin négatif ainsi que de la couleur du milieu de culture, il a été possible de sélectionner des puits contenant des lymphocytes T spécifiques à l'antigène de sélection. Lorsque le culot de cellules du puits dans lequel avait été mis l'antigène de sélection était plus gros que celui du puits du témoin négatif correspondant et que le milieu de culture était plus jaune que celui du témoin négatif, il était conservé pour la troisième stimulation antigénique. Les puits sélectionnés ont été transférés dans de nouveaux plateaux à 96 puits et 100 µl de RPMI complet contenant 20 U/mL IL-2 ont été ajoutés à chaque puits pour un volume final dans chaque puits de 200 µl. Le milieu de culture a été changé aux trois à quatre jours. Par puits, 100 µl du vieux milieu de culture a été enlevé et remplacé par 100 µl de RPMI complet contenant 20 U/mL d'IL-2. Si la prolifération cellulaire devenait trop importante et les culots trop gros pour le puits, Le contenu du puits était divisé en deux puits et du RPMI complet contenant 20 U/mL d'IL-2 a été ajouté pour un volume final de 200 µl par puits.

### **3.3.7 Troisième, quatrième et cinquième stimulations antigéniques des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection**

La procédure a été la même pour les troisième, quatrième et cinquième stimulations antigéniques. La technique d'isolement et la préparation des CPA a été la même que celle décrite pour la deuxième stimulation à la section 3.3.6. Les CPA ont été isolées, irradiées et ensuite resuspendues dans du RPMI complet à 1 ou 2 x 10<sup>6</sup> cellules/mL selon les besoins. Tout d'abord, un plateau par antigène de sélection a été préparé pour conserver les lignées de lymphocytes T spécifiques à l'antigène de sélection pour la prochaine stimulation antigénique. Ces lymphocytes T ont été stimulés avec le même antigène de sélection que celui utilisé pour les stimulations précédentes. Les autres plateaux de 96



Figure 6: Deuxième stimulation antigénique des lymphocytes T provenant de la première stimulation antigénique. Après avoir échangé le vieux milieu de culture pour 110 µl de RPMI complet par puits, le contenu de chaque puits de la première stimulation a été divisé en deux volumes égaux et mis dans deux puits différents sur le nouveau plateau à 96 puits à fond rond. Le puits a) est celui auquel des cellules de présentation de l'antigène (CPA) et l'antigène de sélection (PBM, suspension de coronavirus HCV-OC43 i/e et PPL) ont été ajoutés aux lymphocytes T. Le puits b) est celui auquel des cellules de présentation de l'antigène (CPA) et le témoin négatif (RPMI, lysat de cellules HRT-18 non infecté i/e préparé de la même façon que le coronavirus non purifié décrit à la section 3.1.3 et RPMI respectivement) ont été ajoutés. Par comparaison visuelle de la taille des culots obtenus dans les puits contenant l'antigène de sélection par rapport à la taille de celui du puits du témoin négatif ainsi que de la couleur du milieu de culture, il a été possible de sélectionner des puits contenant des lymphocytes T spécifiques à l'antigène de sélection.



puits utilisées ont servi au test de prolifération avec incorporation de thymidine tritiée ( $[^3\text{H}]\text{TTP}$ ).

Le milieu de culture contenu dans les plateaux à 96 puits de la stimulation précédente a été remplacé par du RPMI complet. Un plateau à 96 puits à fond rond a été utilisé afin de conserver des lignées de lymphocytes T pour la stimulation antigénique suivante. Ainsi, les CPA ont été ajoutées aux lymphocytes T dans une proportion de 5 à 10 CPA pour un lymphocyte T, pour un volume final de 100  $\mu\text{l}$  par puits. Finalement, les antigènes de sélection ont été ajoutés selon les mêmes quantités indiquées en 3.3.5. Le test de prolifération avec incorporation de thymidine tritiée ( $[^3\text{H}]\text{TTP}$ ) est décrit à la section 3.3.8.

### **3.3.8 Test de prolifération avec incorporation de thymidine tritiée**

Ce test a été utilisé dans le but de déterminer la spécificité des lignées de lymphocytes T en comparant la quantité de  $[^3\text{H}]\text{TTP}$  incorporée dans les lymphocytes T stimulés par l'antigène de sélection à celle de son témoin négatif. Ce test de prolifération avec incorporation de  $[^3\text{H}]\text{TTP}$  a été fait aux troisièmes, quatrièmes et cinquièmes stimulations. Dans des plateaux à 96 puits,  $1 \times 10^4$  cellules/puits de chacune des lignées de lymphocytes T conservées de la stimulation antigénique précédente ont été mises en présence de CPA dans un ratio de 5 à 10 CPA pour un lymphocyte T. Chaque lignée a été testée en triplicata pour chaque antigène et témoin négatif utilisé. Le volume final dans le puits a été de 110  $\mu\text{l}$ . Les antigènes qui ont été utilisés sont: la PBM (3  $\mu\text{g}$ /puits), la PPL (3  $\mu\text{g}$ /puits), la suspension de coronavirus HCV-OC43 i/e ( $10^6$  DICT<sub>50</sub>/mL) à une dilution finale de 1/22 dans le puits, le HCV-OC43 purifié (335  $\mu\text{g}$ /mL de protéines virales) produit selon la technique décrite en 3.1.3, 3.1.4 et 3.1.5 (3,35  $\mu\text{g}$ /puits). Leurs témoins négatifs ont été le RPMI pour la PBM et la PPL, le lysat de cellules HRT-18 non infectées i/e préparé selon la technique décrite à la section 3.1.3 et le RPMI pour le virus purifié. Finalement, un témoin négatif a été utilisé pour toutes les lignées testées, la toxine tétanique à 3  $\mu\text{g}$  /puits. En effet, tous les donneurs ont été vaccinés contre le

tétanos. Tous possèdent donc des lymphocytes T spécifiques à cet antigène. Le test de prolifération avec la toxine tétanique a donc permis de vérifier si le processus de sélection antigénique a bien fonctionné et qu'il n'y reste que des lymphocytes T spécifiques à l'antigène de sélection dans le puits.

Afin de vérifier la restriction HLA de certaines lignées de lymphocytes T anti-OC43 et ce, pour certains donneurs, des test supplémentaires ont été effectués en ajoutant un anticorps monoclonal IgG 2a anti-HLA-DR (surnageant d'hybridomes anti-HLA-DR, D1.12 pool 11 et 12.94) au milieu de culture contenant de la suspension virale i/e. Ces anticorps ont servi à déterminer si la reconnaissance de l'antigène était restreinte par le HLA-DR. Son témoin isotypique a été l'anticorps AD 1-9F.6 qui est aussi un IgG 2a (11/11/93 T+, IFA). Chaque anticorps a été testé en triplicata en présence de 10 µl de la suspension virale de OC43 i/e diluée 1:1 avec du RPMI. Pour chaque anticorps, 0,125 µg a été ajouté par puits pour un volume final de 110 µl. Pour vérifier si les CPA ajoutées ont bien été irradiées et qu'elles ne proliféraient pas en présence d'antigènes, elles ont été mises dans des puits (triplicata) en présence des mêmes quantités d'antigènes de sélection (PBM, PPL et suspension virale de OC43 i/e) que pour les stimulations antigéniques précédentes et cela, pour un volume final de 110 µl.

Un fois les lymphocytes T, les CPA et les antigènes ou témoins négatifs déposés dans les puits pour le test de prolifération, les plateaux ont été par la suite incubés à 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> pendant 72 heures. Dix-huit heures avant la fin de l'incubation à 37°C, 0,5 µCi/puits de [<sup>3</sup>H]TTP (ICN) a été ajouté à chaque puits et les plateaux ont été remis à 37°C jusqu'à la fin des 72 heures.

Après les 72 heures d'incubation, les plateaux ont été sortis de l'incubateur et les cellules ont ensuite été récupérées sur un filtre de fibres de verre (Skatron) à l'aide d'un appareil pour plateaux à 96 puits (Skatron modèle 11050 micro cell harvester). Les filtres ont été par la suite séchés et chaque rondelle de filtre correspondant à un puits sur lequel les cellules ont été récupérées a été mise dans des contenants pour appareil à scintillation

(Sarsted). À ces échantillons, 5 mL de liquide à scintillation Écolite (ICN) ont été ajoutés. Finalement, la quantité de [<sup>3</sup>H]TTP incorporée dans les lymphocytes T stimulés a été évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation β (Canberra Packard modèle Tri-Carb 2200A). Chaque contenant à scintillation a été compté pendant 1 minute. Pour qu'une lignée soit considérée comme positive, *i.e.* spécifique à l'antigène testé, son coefficient de stimulation devait être supérieure à 3,0. Cet indice a été déterminé en divisant la quantité de [<sup>3</sup>H]TTP incorporée par les lymphocytes T stimulés par l'antigène (count per minute [cpm]) par celle incorporée dans les lymphocytes T stimulés en présence du témoin négatif de l'antigène. Lorsque cette division était supérieure à 3 et que l'incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP était supérieure à 1000 cpm, les lymphocytes T de cette lignée étaient considérés comme spécifiques à l'antigène.

En dernier lieu, pour revenir sur la terminologie des lignées de lymphocytes T, une lignée qui a été sélectionnée est une lignée qui a été conservée lors de la deuxième stimulation antigénique pour subir les stimulations suivantes. A ce moment, sa spécificité envers l'antigène de sélection n'a pas encore été déterminée. Elle le sera lors des tests de prolifération avec incorporation de thymidine tritiée effectués aux troisième, quatrième et cinquième stimulations antigéniques. Pour que la lignée soit considérée comme spécifique à l'antigène utilisé lors du test de prolifération, il faut que son coefficient de stimulation soit supérieur à 3 et que l'incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP par la lignée de lymphocytes T soit supérieure à 1000 cpm.

### **3.4 Congélation des CPA**

Lorsqu'il y avait trop de CPA pour la stimulation à effectuer, ces cellules supplémentaires ont été congelées au cas où il y en aurait pas assez lors d'une stimulation ultérieure. Si nécessaire, les CPA irradiées ont été tout d'abord diluées à 20 mL avec du RPMI puis centrifugées à 1200 rpm (329 x g) pendant 10 minutes à la température de la pièce (centrifugeuse Beckman modèle GS-6R). Au cours de la centrifugation, le milieu de culture pour la congélation a été préparé *i.e.* RPMI complet contenant du sérum autologue

ou un mélange de sérum autologue et de sérum humain commercial (Pel-Freez) pour un total de 20% (v/v) au lieu de 10% (v/v) et contenant aussi 10% (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO). Ce milieu a été conservé sur la glace pour augmenter la survie des cellules congelées car le DMSO est un produit toxique pour les cellules. Une fois la centrifugation terminée, le surnageant a été jeté et le culot conservé sur la glace. Les cellules à congeler ont été resuspendues dans le milieu de congélation froid sur la glace et réparti dans des tubes à congélation (Gibco, Nunc). Les tubes à congélation ont été mis dans un récipient à congélation (Pharmacia) contenant de l'isopropanol froid (4°C) permettant la diminution de la température du milieu ambiant de 1°C par minute, puis dans le congélateur à -90°C jusqu'à congélation complète des cellules.

### **3.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS et Tricine**

Cette méthode qui a été obtenue de Fanny Chagnon (Institut Armand-Frappier, Québec) et provenant de Schäger et von Jagow (1987) et de Ausubel, *et al.* (1994-98), est une variante de la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Elle est indiquée dans le cas d'électrophorèse de protéines de petit poids moléculaire. Le gel de séparation de polyacrylamide qui est composé de 10% (p/v) d'acrylamide, de 30 mM de Tris-HCl pH 8,45, de 0,3% (p/v) de SDS, de 10% (v/v) de glycérol, de 0,05% (p/v) de persulfate d'ammonium et de 0,05% (v/v) de N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) a été coulé entre deux plaques de verre de l'appareil Mini-Protean II (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada). Après la polymérisation du gel (45 minutes) le gel d'entassement composé de 4% (p/v) d'acrylamide, de 9,3 mM de Tris-HCl pH 8,45, de 0,01% (p/v) de SDS, de 0,05% (p/v) de persulfate d'ammonium et de 0,05% (v/v) de TEMED a été coulé par-dessus le gel de séparation. Un peigne a été inséré entre les plaques de verre, dans le gel d'entassement avant sa polymérisation pour obtenir le nombre de puits appropriés au nombre d'échantillons. Après la polymérisation du gel d'entassement, le peigne a été enlevé et l'appareil Mini-Protean II a été monté.

Afin d'évaluer la taille des protéines présentes dans le gel, des marqueurs de taille en kDa (97, 66, 45, 31, 21, 14,5 et 6,5) de chez Bio-Rad ont été utilisés. Les échantillons ont été dilués dans le tampon d'échantillon Tricine 2x (2 mL de 4x Tris-HCl/SDS pH 6,8 [6,05 g de tris base, 40 mL dH<sub>2</sub>O, ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 1N, filtrer et ajouter 0,4 g de SDS], 2,4 mL [3,0g] de glycérol, 0,8 g de SDS, 2 mg de bleu de Coomassie G-250, 0,31 g de dithiothréitol [DTT], compléter à 10 mL avec dH<sub>2</sub>O). Ensuite, les échantillons ont été portés à ébullition 3 minutes et déposés dans les puits du gel d'entassement. Dans la chambre du haut de l'appareil, environ 200 mL de tampon de cathode ont été versés (0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1% (p/v) SDS; ne pas ajuster le pH) et environ 200 mL de tampon d'anode (0,2 M Tris-HCl pH 8,9) dans la chambre du bas. La migration a duré environ 1 heure 15 minutes à 720 V. Le gel a été mis sous agitation environ une heure dans le colorant (0,1% bleu de Coomassie, 40% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique glacial) permettant de colorer les protéines. Par la suite, le gel a été mis dans le décolorant de gel (40% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique glacial) sous agitation. Le décolorant est changé jusqu'à ce que les bandes de protéines soient visibles à l'oeil nu.

### **3.6 Cytofluorométrie**

Cette technique a été obtenue de Marcel Desrosiers (Institut Armand-Frappier, Québec). Les cellules utilisées pour la cytofluorométrie ont été des lignées spécifiques au virus OC43. Tout d'abord, les cellules d'une même lignée ont été rassemblées dans un tube de polypropylène de 15 mL (Corning) et le volume de cellules a été complété à 6,5 mL avec du RPMI. La suspension de cellules a ensuite été déposée sur 4,5 mL de Ficoll-Paque research grade (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède) (gradient discontinu) contenu dans un tube de polypropylène de 15 mL. Ces tubes ont été centrifugés pendant 30 minutes à 1800 rpm (740 x g) à la température de la pièce (centrifugeuse Beckman modèle GS-6R) (Figure 3). Cette centrifugation a été effectuée afin de se débarrasser du plus grand nombre possible de cellules mortes et de débris cellulaires. Une fois la centrifugation terminée, l'anneau de lymphocytes T a ensuite été prélevé et dilué dans un tube de propylène de 15 mL à 10 mL avec du tampon PBS. La suspension cellulaire a été

centrifugée à 1500 rpm (514 x g) pendant 15 minutes à la température de la pièce pour se débarrasser du Ficoll-Paque. Le culot cellulaire obtenu a ensuite été resuspendu à 10 mL avec du tampon PBS et centrifugé à 1200 rpm (329 x g) pendant 10 minutes à la température de la pièce.

Le surnageant a été jeté et le culot resuspendu dans 1 mL de tampon PBS et la concentration en cellules de la suspension cellulaire a été déterminée avec un hématimètre et du bleu de trypan à 0,1% (p/v) dans du tampon PBS comme colorant d'exclusion des cellules mortes. Les cellules ont été diluées à  $1 \times 10^6$  cellules/mL.

Pour chaque lignée de lymphocytes T testée, 5 tubes Falcon 2054 pour le cytofluoromètre ont été nécessaires. Tout d'abord il y a eu les cellules non marquées pour mesurer l'autofluorescence cellulaire, les cellules marquées au bromure d'éthidium (Etbr) comme colorant d'exclusion des cellules mortes, les cellules mises en présence de l'anticorps anti-CD4 marqué à la phycoérythrine (PE) et de l'anticorps anti-CD3 marqué au FITC, les cellules mises en présence de l'anticorps anti-CD8 marqué au FITC et de l'anticorps anti-CD3 marqué à la PE et finalement les cellules qui ont été mises en présence des témoins isotypiques marqués au FITC et à la PE. Tous les anticorps utilisés pour la cytofluorométrie provenaient de chez Immunotech (Marseille, France).

Une fois que les cellules ont été diluées à  $1 \times 10^6$  cellules/mL, 1 mL de cette suspension a été distribué par tube Falcon 2054 pour le cytofluoromètre. Les tubes ont été par la suite centrifugés à 1200 rpm (329 x g) pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été jeté et les culots cellulaires ont été resuspendus dans 100 µl de PBS froid et mis sur la glace. Les anticorps ont été ajoutés à leurs tubes respectifs à raison de 3 µl de chaque anticorps par tube. Les cellules ont été incubées avec les anticorps, sur la glace et à la noirceur, pendant 40 minutes. À la fin de l'incubation, deux millilitres de tampon PBS froid (4°C) ont été ajoutés à chaque tube pour resuspendre les cellules. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 1200 rpm (329 x g) pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été jeté et les culots cellulaires ont été resuspendus dans 1 mL de PBS froid. Juste avant de partir pour le



cytofluoromètre, 20 µl de bromure d'éthidium à 10 µg/mL (200 µg) ont été ajoutés au tube destiné au Etbr. Les tubes ont été conservés sur la glace et à la noirceur jusqu'à l'analyse avec le cytofluoromètre Coulter XL (Hialeah, FL).

## RÉSULTATS

#### 4.1. Production de virus HCV-OC43 purifié

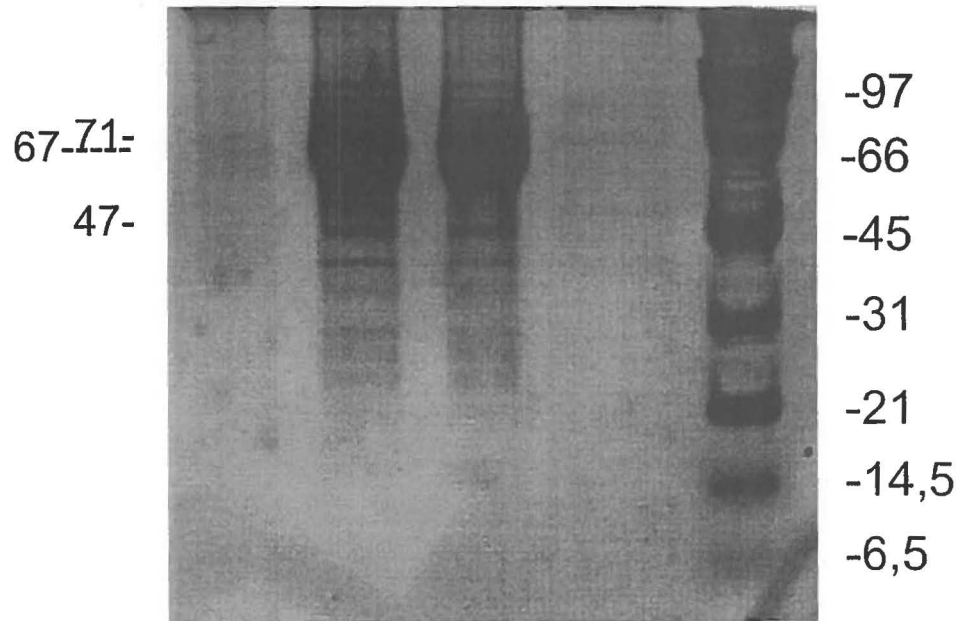
Le coronavirus HCV-OC43 a été purifié dans le but de déterminer la spécificité des lignées de lymphocytes T anti-OC43 envers les protéines structurales du virus via le test de prolifération par incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP. Le virus a été propagé et multiplié dans les cellules HRT-18 et purifié selon la méthode décrite en 3.1.3, 3.1.4 et 3.1.5. Par la suite, les grilles à microscopie électronique ont été préparées pour identifier le virus et pour déterminer les fractions les plus pures contenant le moins de protéines cellulaires. Par la suite la suspension virale obtenue a été filtrée avec un filtre de 0,45 µm pour éliminer les quelques bactéries pouvant être présentes. Les résultats obtenus de la microscopie électronique ont indiqué que le virus présent était bien du coronavirus.

La concentration en protéines virales de la suspension a été évaluée à 335 µg/mL. Finalement, un échantillon de cette suspension virale a été déposée sur un gel de polyacrylamide avec SDS et tricine pour en caractériser les protéines. Étant donné la faible concentration en protéines virales de la suspension, les bandes étaient difficiles à discerner (figure 7). L'immunobuvardage est une technique qui aurait pu être envisagée pour améliorer la résolution des bandes car les réactifs nécessaires pour effectuer cette technique sont disponibles. Toutefois, elle n'a pas été utilisée à cause de son manque de fiabilité et de reproductibilité. La technique d'immunobuvardage avec le virus HCV-OC43 doit être améliorée avant de pouvoir être employée de routine.

Il a été possible d'observer à la figure 7 que dans le puits 1, contenant 16,75 µg de virus OC43 purifié, une bande à 71 kDa et une autre à 67 kDa ainsi qu'une dernière à 47 kDa. La première bande à 71 kDa pourrait correspondre à de l'albumine sérique bovine (ASB) résiduelle qui était contenue dans le milieu de culture des cellules HRT-18. La seconde bande correspond aux monomères de la protéine HE (situés entre 65 et 70 kDa [Künkel et Herrler, 1993; Kienzle *et al.*, 1990]) et la dernière à la protéine N (située de 50 à 60 kDa [Holmes et Lai, 1996]). Dans le cas de la protéine S, son poids moléculaire étant trop élevé (180 kDa) (Mounir et Talbot, 1992), elle n'est pas visible sur le gel. Finalement,

Figure 7: Électrophorèse du virus HCV-OC43 purifié, sur gel de polyacrylamide avec SDS et Tricine. Les échantillons ont été chauffés avant d'être déposés sur le gel. Puits numéro 1: HCV-OC43 purifié (16,75 µg de protéine virale) où on voit trois bandes à 71, 67 et 47 kDa correspondant respectivement à l'albumine sérique bovine (ASB), aux monomères de la protéine HE et à la protéine N du virus HCV-OC43; 2: HCV-OC43 i/e; 3: HRT-18 seules i/e; 4: HCV-229E purifié (20 µg de protéines virales); M: marqueurs de taille en kDa (97, 66, 45, 31, 21, 14,5 et 6,5 kDa).

1 2 3 4 M



par immunofluorescence indirecte, il a été possible de confirmer ce qui a été observé précédemment, *i.e.* que le virus purifié est bel et bien du HCV-OC43. Toutefois, la présence d'ASB dans la préparation de virus purifié laisse penser que la purification pourrait ne pas être parfaite.

## **4.2. Isolement de la PBM humaine**

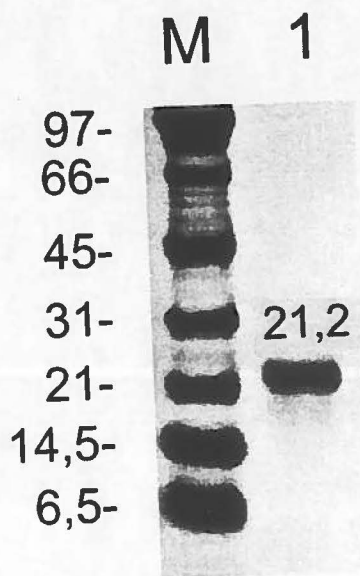
La PBM humaine a été isolée à partir de tranches d'un cerveau d'un adulte humain d'environ 80 ans sans aucune maladie neurologique déclarée, dans le but de l'utiliser pour sélectionner des lignées de lymphocytes T spécifiques à cette protéine tant chez les donneurs témoins que chez les personnes atteintes de SEP. De plus, elle a servi à vérifier la spécificité des lignées anti-PBM et anti-OC43 envers la PBM grâce au test de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP et ainsi tenter de démontrer la présence de réactions croisées envers les deux antigènes chez les personnes atteintes de SEP. Cette protéine a été isolée selon le protocole décrit dans la section 3.3.2.2. Afin de vérifier le contenu de ce qui a été extrait et dissout dans le milieu de culture RPMI, un gel de polyacrylamide avec SDS et Tricine a été préparé (voir section 3.5) et 75 µg de la préparation de PBM ont été déposés dans un puits suivant celui des marqueurs de taille en kDa (figure 8). La coloration au bleu de Coomassie n'a révélé qu'une seule bande située à 21,2 kDa dans le puits. Étant donné que la PBM possède trois isoformes hydrophiles de 21,5, 18,5 et de 17,2 kDa (Deber et Reynolds, 1991), c'est bien la PBM hydrophile de 21,5 kDa qui a été isolée du cerveau.

## **4.3. Les donneurs**

### **4.3.1 Profil d'histocompatibilité des donneurs**

En tout, huit donneurs atteints de sclérose en plaques et huit donneurs témoins sans aucune maladie neurologique déclarée, du même âge et du même sexe ont été volontaires pour cette étude. Tous ont été choisis au hasard. Les donneurs atteints de la SEP sont des

Figure 8: Électrophorèse de la protéine basique de la myéline isolée, sur gel de polyacrylamide avec SDS et Tricine. Les échantillons ont été chauffés avant d'être déposés sur le gel. Puits numéro 1: PBM isolée (75 µg de protéine) où une seule bande à 21,2 kDa est visible; M: marqueurs de taille en kDa (97, 66, 45, 31, 21, 14,5 et 6,5).





patients du Dr Pierre Duquette et du Dr Jack Antel. Puisque certains antigènes de classe II du CMH tel que le HLA-DR2 semblent prédisposer à la SEP, le profil d'histocompatibilité de chaque donneur a été déterminé par le service d'Histocompatibilité de l'Institut Armand-Frappier par le biais de techniques sérologiques ainsi que moléculaires.

Les deux groupes de donneurs étaient composés de 5 femmes et de 3 hommes (tableaux 2 et 3). L'âge moyen était de  $51,1 \pm 9,1$  ans pour les donneurs SEP et de  $48,6 \pm 8,4$  ans pour les donneurs témoins. Dans le groupe SEP les deux formes de la maladie étaient présentes soit: 50% pour la forme progressive-chronique et 50% pour la forme cyclique. Finalement, il a été observé que la proportion de personnes du groupe SEP possédant l'haplotype HLA-DR2 était plus importante (57%) que celle du groupe témoin (25%). Ainsi, cette observation est compatible avec les observations antérieures mentionnées dans la littérature soulignant une incidence plus importante de la SEP chez les personnes possédant l'haplotype HLA-DR2 (Oksenberg, 1996).

#### **4.3.2 Evaluation de la séropositivité des donneurs envers le virus HCV-OC43 par immunofluorescence**

La technique d'immunofluorescence (section 3.2) a été utilisée pour vérifier si des anticorps anti-HCV-OC43 étaient présents dans le sang des donneurs SEP et des témoins prouvant ainsi que chacun a déjà été en contact avec le virus. Les anticorps spécifiques aux deux souches de coronavirus humain (HCV-229E et -OC43) apparaissent très tôt chez l'enfant et leur fréquence augmente de façon très importante avec l'âge (McIntosh et *al.*, 1970). En utilisant le plasma décomplémenté de chaque donneur, l'immunofluorescence a démontré que des anticorps sériques anti-HCV-OC43 étaient présents dans le sang de tous les donneurs de l'étude. Ainsi, si des lymphocytes B sécréteurs d'anticorps anti-OC43 étaient présents chez chaque donneur, il était plausible de supposer qu'un antigène thymo-dépendant comme le virus OC43 devrait nécessairement stimuler aussi des lymphocytes T anti-HCV-OC43. Cette expérience a donc permis d'estimer la possibilité de retrouver des lymphocytes T spécifiques au coronavirus OC43 chez les donneurs.

Donneur	Sexe	Age	Diagnostic	HLA-DR
1	F	60	C	7, 2 (16)
2	F	42	P	1, 8
3	F	46	P	3 (17), 6 (14)
4	F	44	C	-
5	F	49	C	2 (15), -
6	H	45	C	3 (17), 5 (11)
7	H	68	P	2 (15), 3 (17)
8	H	55	P	2 (15), 6 (13)

Tableau 2: Profil d'histocompatibilité des donneurs SEP. Huit donneurs SEP ont participé à cette étude. Ce groupe était composé de 5 femmes et de 3 hommes d'âge moyen de  $51,1 \pm 9,1$  ans. De ces donneurs, quatre étaient atteints de la forme progressive-chronique (P) (50%) et les quatre autres étaient atteints de la forme cyclique (C) (50%). Le profil d'histocompatibilité de sept des donneurs a pu être réalisé et quatre d'entre eux (57%) possèdent le HLA-DR2. Les chiffres entre parenthèse représentent les subdivisions du HLA-DR selon la nouvelle nomenclature i.e. le HLA-DR2 est constitué des deux subdivisions HLA-DR15 et HLA-DR16.

Donneur	Sexe	Age	HLA-DR
1	F	43	<b>2 (15), 6 (13)</b>
2	F	59	1, -
3	F	46	7, 16
4	H	43	1, 7
5	F	47	1, 11
6	F	36	4, 13
7	H	58	1, 17
8	H	57	<b>6 (13), 2 (15)</b>

Tableau 3: Profil d'histocompatibilité des donneurs témoins. Huit donneurs témoins ont participé à cette étude. Ce groupe était aussi composé de 5 femmes et de 3 hommes d'âge moyen de  $48,6 \pm 8,4$  ans. Le profil d'histocompatibilité des donneurs témoins réalisé démontre que seulement 2 d'entre eux (25%) possèdent le HLA-DR2. Les chiffres entre parenthèse représentent les subdivisions du HLA-DR selon la nouvelle nomenclature i.e. le HLA-DR2 est constitué des deux subdivisions HLA-DR15 et HLA-DR16.

Par contre, le titre sérique de ces anticorps n'a pas été déterminé afin d'évaluer s'il y avait une différence de ces titres entre les témoins et les donneurs SEP. En effet, ces données ont déjà été mesurées par l'équipe de Salmi *et al.* (1982) qui a démontré que les titres d'anticorps anti-OC43 et anti-229E dans le sérum des patients atteints de SEP et des témoins, étaient similaires. Toutefois, dans cette même étude, une différence significative entre les donneurs SEP et les témoins en santé a été démontrée au niveau du LCR. En effet, des anticorps anti-OC43 et anti-229E ont été détectés dans le LCR plus fréquemment et à des titres plus élevés chez les patients que chez les témoins. De plus, la présence de synthèse des anticorps anti-OC43 et anti-229E dans le compartiment intrathécal a été démontrée chez les donneurs atteints de SEP alors que chez les donneurs du groupe de témoins neurologiques (maladies neurologiques autres que la sclérose en plaques), il n'y avait pas de synthèse d'anticorps anti-HCV-OC43 ou anti-HCV-229E. Ainsi, les titres d'anticorps anti-229E et anti-OC43 plus élevés chez les donneurs SEP que chez les témoins au niveau du SNC, laisse supposer que les coronavirus humains pourraient jouer un rôle dans l'étiologie de la SEP.

#### **4.4. Réactivité des lignées de lymphocytes T obtenues des donneurs atteints de sclérose en plaques et des donneurs témoins envers les antigènes PBM, HCV-OC43 et PPL**

Seize donneurs volontaires se sont prêtés à cette étude. Il s'agissait de huit donneurs SEP et de huit donneurs témoins sans aucune maladie neurologique déclarée, tous sélectionnés au hasard. Du sang périphérique de chaque donneur a été prélevé afin de sélectionner grâce à 4 ou 5 stimulations antigéniques *in vitro* des lignées de lymphocytes T spécifiques à la PBM, la PPL ou au HCV-OC43. Par le biais de tests de prolifération par incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP la spécificité antigénique des lignées conservées lors des troisième, quatrième et cinquième stimulations antigéniques a été déterminée. De plus, il a été possible d'évaluer si ces lignées de lymphocytes T pouvaient reconnaître à la fois d'une part la PBM ou la PPL, et d'autre part le coronavirus HCV-OC43 (réaction croisée).

Une lignée était considérée comme spécifique à l'antigène utilisé, avec un minimum de 1000 cpm de [<sup>3</sup>H]TTP incorporé par les lymphocytes T activés, lorsque le ratio de la radioactivité incorporée (cpm) en présence de l'antigène divisé par la radioactivité incorporée (cpm) en présence du témoin négatif était égal ou supérieur à 3,0. De plus, un témoin négatif a été utilisé pour toutes les lignées, la toxine tétanique, afin de vérifier si les lignées étaient pures et ne contenaient pas de lymphocytes T non spécifiques à l'antigène de sélection pouvant induire un bruit de fond lors des tests de prolifération. Ainsi, cet antigène n'a produit qu'un bruit de fond similaire à celui observé avec les CPA seules, les lymphocytes T seuls et les lymphocytes T en présence de CPA sans antigène et ce, pour toutes les lignées. Ces résultats ont confirmé que les lymphocytes activés des lignées sont bel et bien des lignées de lymphocytes T spécifiques à la PBM, à la PPL ou au HCV-OC43.

Les tableaux 4 et 5 présentent les résultats obtenus concernant la réactivité des lignées de lymphocytes T aux antigènes de sélection (PBM, PPL et HCV-OC43) pour les donneurs SEP (tableau 4) et les donneurs témoins (tableau 5). Ainsi, il a été possible d'obtenir des lignées de lymphocytes T spécifiques à la PBM, à la PPL et au HCV-OC43, tant pour les donneurs SEP que pour les donneurs témoins. Pour la PBM, 2,9% (17/576) des lignées sélectionnées *in vitro* avec cette protéine ont été spécifiques à la PBM chez les donneurs SEP avec une moyenne de 2,1 lignées spécifiques par donneur. Chez les donneurs témoins, la proportion *in vitro* a été de 4% (23/576) et une moyenne de lignées par donneur de 2,9. Malgré des résultats relativement similaires entre les deux groupes concernant la PBM, une variation plus importante a été observée entre les deux catégories de donneurs en ce qui concerne la PPL et le virus OC43. Il semblerait que chez les donneurs atteints de SEP, les lymphocytes T anti-PPL et anti-OC43 activés *in vitro*, ont été retrouvés plus fréquemment que chez les donneurs témoins. En effet, le nombre de lignées anti-OC43 et anti-PPL obtenues chez les donneurs SEP est le double de qui a été obtenu chez les donneurs témoins. Chez les donneurs SEP, 5,2% (15/288) des lignées testées ont été spécifiques à la PPL avec en moyenne 2,5 lignées spécifiques pour chaque

Tableau 4: Réactivité des lignées de lymphocytes T des donneurs SEP aux antigènes de sélection (PBM, PPL et HCV-OC43).

(1) Des lymphocytes T du sang périphérique des donneurs ont été stimulés *in vitro* aux deux semaines de 4 à 5 fois avec la PBM, la PPL ou le virus OC43 pour obtenir des lignées spécifiques à ces antigènes.

(2) À partir de la troisième stimulation, un test de prolifération par incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP a été effectué pour chaque lignée de lymphocytes T conservée afin de vérifier leur spécificité antigénique envers leur antigène de sélection ainsi qu'envers d'autres antigènes soupçonnés de produire une réaction croisée chez les lymphocytes T. La réactivité des lignées de lymphocytes T envers l'antigène est considérée comme positive avec un minimum de 1000 cpm de [<sup>3</sup>H]TTP incorporé lorsque le ratio de la radioactivité incorporée (cpm) par les lymphocytes T en présence de l'antigène sur la radioactivité incorporée (cpm) en présence du témoin négatif est égal ou supérieur à 3.

(3) Nombre de lignées de lymphocytes T dont la réactivité est considérée comme positive après un test de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP pour chaque antigène et chaque donneur SEP.

(4) Nombre de lignées de lymphocytes T spécifiques à l'antigène utilisé, sur le nombre total de puits où les cellules ont été mises en culture avec l'antigène de sélection lors de la première stimulation antigénique (pour chaque donneur, les cellules de la première stimulation ont été mises dans: 72 puits avec la PBM, 48 puits avec la PPL et 72 puits avec le virus OC43); pourcentage des lignées spécifiques à l'antigène utilisé par rapport au nombre total de puits utilisés pour l'antigène de sélection lors de la première stimulation antigénique.

(5) n.a.: non applicable.



Tableau 5: Réactivité des lignées de lymphocytes T des donneurs témoins aux antigènes de sélection (PBM, PPL et HCV-OC43).

(1) Des lymphocytes T du sang périphérique des donneurs ont été stimulés *in vitro* aux deux semaines de 4 à 5 fois avec la PBM, la PPL ou le virus OC43 pour obtenir des lignées spécifiques à ces antigènes.

(2) À partir de la troisième stimulation, un test de prolifération par incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP a été effectué pour chaque lignée de lymphocytes T conservée dans le but de vérifier leur spécificité antigénique envers leur antigène de sélection ainsi qu'envers d'autres antigènes soupçonnés de produire une réaction croisée chez les lymphocytes T. La réactivité des lignées de lymphocytes T envers l'antigène est considérée comme positive avec un minimum de 1000 cpm de [<sup>3</sup>H]TTP incorporé lorsque le ratio de la radioactivité incorporée (cpm) par les lymphocytes T en présence de l'antigène, sur la radioactivité incorporée (cpm) en présence du témoin négatif est égal ou supérieur à 3.

(3) Nombre de lignées de lymphocytes T dont la réactivité est considérée comme positive après un test de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP pour chaque antigène et chaque donneur témoin.

(4) Nombre de lignées de lymphocytes T spécifiques à l'antigène utilisé, sur le nombre total de puits où les cellules ont été mises en culture avec l'antigène de sélection lors de la première stimulation antigénique (pour chaque donneur, les cellules de la première stimulation ont été mises dans: 72 puits avec la PBM, 48 puits avec la PPL et 72 puits avec le virus OC43); pourcentage des lignées spécifiques à l'antigène utilisé par rapport au nombre total de puits utilisés pour l'antigène de sélection lors de la première stimulation antigénique.

(5) n.a.: non applicable.





donneur alors que ces lignées spécifiques ont été retrouvées à 2,4% (7/288) chez les témoins avec une moyenne de 0,9 lignée par donneur.

En utilisant des antigènes hétérologues à l'antigène de sélection pour chaque lignée de lymphocytes T lors des tests de prolifération, il a été possible de vérifier la présence de lignées à réaction croisée *i.e.* reconnaissant plus d'un antigène à la fois. Selon les résultats obtenus et présentés aux tableaux 4 et 5, il n'y a pas eu de réaction croisée observable entre la PBM et le virus OC43 ni entre la PPL et le coronavirus. Ceci confirme des résultats obtenus précédemment avec le coronavirus OC43 dans le laboratoire du Dr Pierre Talbot (Talbot *et al.*, 1996).

Le tableau 6 illustre la proportion *in vitro* des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection chez les donneurs SEP et les donneurs témoins selon les catégories sexe, HLA et forme de la SEP. Il a été observé que chez les donneurs féminins, la proportion de lignées spécifiques aux deux antigènes de la myéline est plus élevée que chez les hommes (13/17 contre 4/17) avec une moyenne de lignées par donneur plus élevée chez la femme que chez l'homme (2,6 contre 1,3). En effet, il a été observé que les femmes sont plus fréquemment touchées par la SEP que les hommes (Duquette, 1992). Toutefois, cette tendance ne s'est pas maintenue pour les lignées virales (F: 30/57, M: 27/57) où la fréquence est similaire entre les hommes et les femmes. De plus, il a été observé qu'il y avait un plus grand nombre de lignées virales obtenues par donneur masculin que par donneur féminin. Finalement, en ce qui concerne les donneurs témoins, la proportion *in vitro* plus élevée de lignées anti-protéine de la myéline chez les femmes ne s'est retrouvée que pour la PBM (21/23 contre 2/23 pour les hommes) avec une moyenne de 4,2 lignées positives pour les femmes et 0,7 lignée positive pour les hommes. Les lignées anti-PPL et anti-OC43 ont été retrouvées plus fréquemment chez les hommes que chez les femmes avec, pour la PPL, une lignée positive sur 7 pour les femmes et 6 lignées positives sur 7 pour les hommes. En moyenne, chez les hommes 2,0 lignées ont été obtenues par donneur alors que chez les femmes, une moyenne de 0,2 lignée par donneur a été obtenue. Pour les lignées anti-OC43, chez les hommes, il y a eu 17 lignées

Tableau 6: Proportion *in vitro* des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection selon les catégories sexe, restriction HLA et forme de la SEP chez les donneurs SEP et les donneurs témoins. Chaque proportion a été exprimée en nombre de lignées spécifiques à l'antigène de la sous-division de la catégorie en question (ex: sexe féminin) sur le nombre de lignées positives de la catégorie au total (ex: sexe féminin et masculin). La moyenne par donneur a été calculée en divisant le nombre de lignées spécifiques à l'antigène pour la sous-division concernée (ex: sexe féminin [SEP et PBM] = 13 lignées) par le nombre de donneurs contenus dans la sous-division (ex: sexe féminin = 5 donneurs). Forme de la maladie: C = cyclique, P = progressive-chronique.

Nombre de lignées de lymphocytes T obtenues par catégorie						
antigène	Sexe		HLA- DR2	autres HLA	Forme de la SEP	
	F	M			C	P
<b>Donneurs SEP</b>						
PBM	13/17	4/17	5/13	8/13	5/17	12/17
moyenne par donneur	2,6	1,3	1,3	2,7	1,3	3,0
PPL	14/15	1/15	4/11	7/11	7/15	8/15
moyenne par donneur	2,8	0,1	1,0	2,3	1,8	2,0
OC43	30/57	27/57	28/57	29/57	32/57	25/57
moyenne par donneur	6,0	9,0	7,0	9,7	8,0	6,3
<b>Donneurs témoins</b>						
PBM	21/23	2/23	10/23	12/23	—	—
moyenne par donneur	4,2	0,7	5,0	2,0	—	—
PPL	1/7	6/7	2/7	5/7	—	—
moyenne par donneur	0,2	2,0	1,0	0,8	—	—
OC43	11/28	17/28	9/28	19/28	—	—
moyenne par donneur	2,2	5,7	4,5	3,2	—	—

positives sur 28 avec 5,7 lignées par donneur et chez les les femmes il y a eu 11 lignées sur 28 avec une moyenne de 2,2 lignées par donneur.

Par ailleurs, la proportion *in vitro* des lignées spécifiques aux antigènes de sélection associés à l'haplotype HLA-DR2 des antigènes d'histocompatibilité de classe II a été comparée aux autres haplotypes des donneurs. Sur le plan génétique, l'association génétique la plus forte de la SEP, est retrouvée sur l'allèle HLA-DR2 plus précisément sur l'allèle HLA-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Oksenberg, 1996). Toutefois, Il n'y a pas eu de différences notables dans la proportion des lignées obtenues *in vitro* chez les donneurs SEP en fonction de l'haplotype HLA-DR2. Selon les résultats obtenus, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la forme de la maladie, et la proportion *in vitro* des lignées spécifiques à l'antigène de sélection.

#### **4.5. Caractérisation des lignées anti-HCV-OC43**

##### **4.5.1. Spécificité des lignées envers les protéines structurales du HCV-OC43**

Après avoir obtenu des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus humain (confirmé lors des tests de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP), il a été intéressant d'évaluer la fine spécificité de ces lymphocytes T *i.e.* envers les protéines structurales et non structurales. Pour se faire, lors de la cinquième stimulation antigénique (excepté pour les donneurs SEP 6 et 7 où ce test a été réalisé à la quatrième stimulation) le virus OC43 purifié a été ajouté comme antigène avec comme témoin négatif correspondant, les lymphocytes T avec les CPA sans antigène, lors du test de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP. Le virus purifié a été ajouté au test en parallèle avec le virus non purifié *i.e.* Ainsi, une lignée spécifique au virus purifié pourrait signifier que l'épitope reconnu par les lymphocytes est retrouvé sur une protéine structurale du virus. Comme le montre le tableau 7, un peu plus de la moitié des lignées testées (28/48 [58%]) ont été spécifiques au virus purifié *i.e.* qu'elles sont probablement

spécifiques aux protéines structurales du virus. Cette proportion *in vitro* est sensiblement la même chez les personnes atteintes de SEP (20/35 [57%]) et chez les témoins (8/13 [62%]). Il a été observé que la proportion des lignées anti-HCV-OC43 *in vitro* chez les donneurs SEP est le double de celle des donneurs témoins (voir tableaux 4 et 5). De plus, grâce au virus purifié il a été possible d'observer qu'il n'y a pas de différence sensible au niveau de la proportion *in vitro* des lignées spécifiques aux protéines structurales du virus entre les donneurs SEP et les donneurs témoins. Ainsi, la variation de la proportion observée entre les donneurs SEP et les donneurs témoins ne se situerait pas au niveau des protéines structurales du virus mais probablement au niveau des protéines non structurales du virus.

En effet, la préparation de virus OC43 i/e contient des protéines structurales virales, des protéines non structurales du virus, des protéines cellulaires de la lignée HRT-18 ainsi que des protéines provenant du sérum de veau fœtal. Lors des tests de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP, un témoin négatif préparé de la même façon que la suspension de virus i/e mais ne contenant que des cellules HRT-18 lysées, suspendues dans du milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal, a été utilisé pour permettre la discrimination entre une prolifération due au virus ou bien due aux protéines cellulaires ou aux protéines provenant du sérum. Ainsi, une incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP supérieure à trois fois celle du témoin négatif (coefficient de stimulation) permet de déduire que la prolifération n'est pas due aux protéines cellulaires ni aux protéines du sérum mais plutôt aux protéines virales. Donc, pour des lignées stimulées avec le virus i/e ayant un coefficient de stimulation supérieur à 3,0 sont considérées spécifiques aux protéines virales. Dans le cas des lignées spécifiques au virus de la suspension i/e (donc non spécifiques aux protéines cellulaires et aux protéines du sérum) et qui ne sont pas spécifiques au virus purifié, sont probablement spécifiques aux protéines non structurales du virus OC43.

Donneurs	3	4	5	6	7	8	Total
SEP	4/5	3/3	0/2	8/8	5/13	0/4	20/35 (57%)
Témoins	4/4	1/2	0/0	1/2	0/0	2/5	8/13 (62%)
Tous les donneurs							28/48 (58%)

Tableau 7: Caractérisation des lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43: spécificité envers les protéines structurales du virus. Lors du test de prolifération de la cinquième stimulation antigénique (excepté pour les donneurs SEP 6 et 7 qui ont été testés à la quatrième stimulation) le coronavirus HCV-OC43 purifié a été utilisé comme antigène de stimulation avec comme témoin négatif, aucun antigène pour les lignées anti-HCV-OC43. Cette évaluation de la spécificité des lignées anti-HCV-OC43 a permis de déterminer si ces lignées étaient spécifiques aux protéines structurales du virus (*i.e.* spécifiques au virus purifié) ou possiblement spécifiques aux protéines non structurales (*i.e.* spécifiques au virus non purifié *i/e* et en même temps non spécifique au virus purifié). Ce test n'a pas été réalisé pour les donneurs SEP 1 et 2 et donneurs témoins 1 et 2.

#### **4.5.2. Restriction HLA-DR de la reconnaissance de HCV-OC43 par les lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43**

Après avoir obtenu des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus HCV-OC43, il a été intéressant de déterminer la restriction HLA de la reconnaissance du virus par les lymphocytes T. Ainsi, lors des tests de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP un anticorps anti-HLA-DR et un anticorps témoin isotypique en présence du coronavirus HCV-OC43 ont été utilisés pour vérifier cette restriction. Ainsi grâce à 5 donneurs (témoins 4, 6, 8 et SEP 7 et 8), 25 lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43 ont été obtenues (Tableau 8). De ces lignées, 18 ont été spécifiques au virus non purifié *i.e.* (protéines non structurales) dont 17 étaient HLA-DR restreintes et 7 ont été spécifiques au virus purifié (protéines structurales) dont 5 étaient HLA-DR restreintes. Ainsi, au total, 22/25 (88%) des lignées ont été HLA-DR *i.e.* CMH de classe II restreinte. De plus, l'anticorps anti-HLA-DR a inhibé la prolifération lymphocytaire HLA-DR restreinte en moyenne par un facteur de 10.

Considérant que les lignées de lymphocytes T ont été stimulés avec un antigène exogène, il est plausible d'obtenir une majorité de lignées HLA-DR restreintes. Toutefois, pour les 3 lignées qui ne sont pas HLA-DR restreintes, il n'y avait pas suffisamment de lymphocytes pour ajouter d'autres anticorps tels que ceux spécifiques au CMH de classe II (anticorps anti-HLA-DP, DQ, DR) ou de classe I. Il aurait été intéressant de déterminer si ces lignées étaient restreintes par le CMH de classe I ou II.

#### **4.5.3. Evaluation du phénotype de lignées anti-OC43 par cytofluorométrie**

Finalement, le phénotype CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup> ou CD<sub>8</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup> de lignées anti-HCV-OC43 a été déterminé par cytofluorométrie. Tout d'abord, pour chaque lignée, 5 échantillons ont été réalisés. Un tube pour l'autofluorescence, un tube pour éliminer les cellules mortes avec le Etbr, un tube contenant un anticorps anti-CD<sub>8</sub> marqué au FITC et un anticorps anti-CD<sub>3</sub>



Antigène	HLA-DR +	HLA-DR -
OC43 i/e	17/18 (94,4%)	1/18 (5,6%)
OC43 purifié	5/7 (71,4%)	2/5 (28,6%)
Total	22/25 (88%)	3/25 (12%)

Tableau 8: Restriction HLA-DR des lignées de lymphocytes T spécifiques au virus HCV-OC43. Lors des tests de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP, en présence de virus OC43, un anticorps anti-HLA-DR ainsi qu'un anticorps témoin isotypique ont été utilisés pour déterminer la restriction HLA de la reconnaissance du virus HCV-OC43 par les lymphocytes T. En tout, 25 lignées anti-OC43 ont été obtenues de 5 donneurs (témoins 4, 6, 8 et SEP 7 et 8).

marqué à la PE, un tube contenant un anticorps anti-CD<sub>4</sub> marqué à la PE et un anticorps anti-CD<sub>3</sub> marqué au FITC et finalement un dernier tube dans lequel un anticorps témoin isotypique marqué au FITC et un autre marqué à la PE ont été ajoutés. L'utilisation d'un gradient de Ficoll-Paque pour éliminer les cellules mortes et les débris cellulaires, a grandement amélioré la qualité de la suspension cellulaire. Un exemple de résultat obtenu est présenté à la figure 9.

En tout, 11 lignées ont été testées et 8 d'entre elles se sont avérées être des lignées de lymphocytes T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup> (tableau 9). Trois d'entre elles étaient CD<sub>8</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup>; toutes des lignées provenant de deux donneurs témoins. Tel qu'illustré au tableau 8, toutes les lignées de lymphocytes T provenant des donneurs SEP étaient CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup>. Etant donné que la sélection *in vitro* s'est faite grâce à des antigènes exogènes, il est plausible d'obtenir des lymphocytes T de phénotype CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup>. Toutefois, il faut mentionner que toutes les lignées contenaient un faible pourcentage résiduel de lymphocytes T de l'autre phénotype témoignant de la non clonalité de ces lignées, et ce, particulièrement dans le cas des lignées CD<sub>8</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup> (voir figure 9). La présence d'une faible quantité de lymphocytes T de phénotype CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup> est probablement responsable de la présence des lignées CD<sub>8</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup>. En utilisant une technique qui stimule les lymphocytes T avec des antigènes exogènes, il est nécessaire qu'un stimulus supplémentaire soit présent pour permettre aux cellules CD<sub>8</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup> de se multiplier et de survivre. Les lymphocytes T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup> seraient responsables de ce stimulus supplémentaire i.e. la production d'IL-2 suite à leur stimulation par le virus exogène.

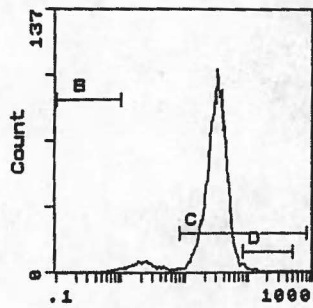
De plus, le parallèle a été fait entre le phénotype des lignées de lymphocytes T anti-OC43 et leur restriction HLA, de quatre lignées obtenues d'un donneur témoin, dont deux spécifiques aux protéines non structurales et deux spécifiques aux protéines structurales du virus. Ainsi, pour les deux lignées spécifiques aux protéines non structurales, une était HLA-DR restreinte avec un phénotype CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup> et l'autre, qui n'a pas été restreinte par le HLA-DR, était de phénotype CD<sub>8</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup>. Finalement, les deux lignées de lymphocytes T spécifiques aux protéines structurales du virus qui n'étaient pas restreintes par le HLA-

DR étaient de phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$ . Il ne semble pas y avoir de corrélation spécifique qui ressort de ces résultats pour l'instant, à cause du faible échantillonnage. Toutefois, la piste donnée par les lignées de lymphocytes T de phénotype  $CD_8^+ CD_3^+$  serait intéressante à explorer davantage.

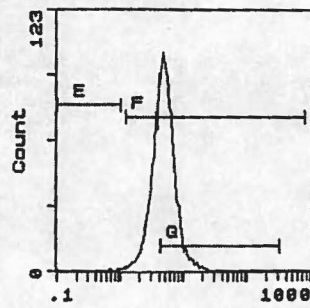
Donneurs	Phénotype	Nombre de lymphocytes T CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> CD <sub>3</sub> <sup>+</sup> ou CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>
SEP	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	4/4
	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0/4
Témoins	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	4/7
	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	3/7
Total	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	8/11
	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	3/11

Tableau 9: Évaluation du phénotype de lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43 par cytofluorométrie. Des lymphocytes T de différentes lignées anti-HCV-OC43 provenant de donneurs SEP et de donneurs témoins ont été mis en contact avec des anticorps anti-CD<sub>8</sub><sup>+</sup> marqués au FITC, des anticorps anti-CD<sub>4</sub><sup>+</sup> marqués à la PE, des anticorps anti-CD<sub>3</sub><sup>+</sup> marqués soit au FITC soit à la PE et des anticorps témoins isotypiques marqués soit au FITC ou à la PE pour en déterminer leur phénotype par cytofluorométrie.

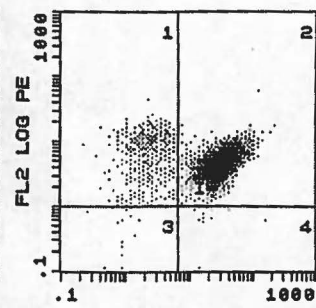
Figure 9: Exemple de résultat obtenu en cytofluorométrie pour une lignée  $CD_8^+ CD_3^+$  d'un donneur témoin. Les résultats des anticorps anti- $CD_8$  marqués au FITC et anti- $CD_3$  marqués à la PE sont montrés à la première rangée. A la deuxième rangée, les cellules ont été mises en présence d'anticorps anti- $CD_4$  marqués à la PE et anti- $CD_3$  marqués au FITC. Finalement, les anticorps témoins isotypiques marqués au FITC et à la PE sont retrouvés à la troisième rangée. L'intensité de la fluorescence avec le marqueur FITC ou PE, est retrouvé sur l'axe des x de chacune des figures (échelle logarythmique). Le nombre d'événements comptés par l'appareil (nombre de cellules) est représenté sur l'axe des y des figures de gauche et du milieu. Sur les figures de droite, les axes des x et des y représentent l'intensité de la fluorescence en présence du marqueur FITC en x et du marqueur PE en y (échelle logarythmique).



FL1 LOG FITC

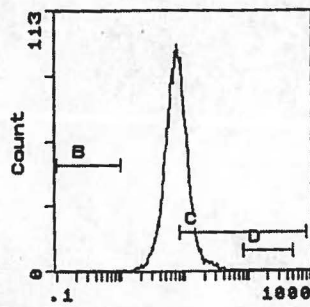


FL2 LOG PE

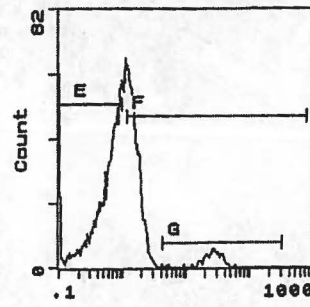


FL1 LOG FITC

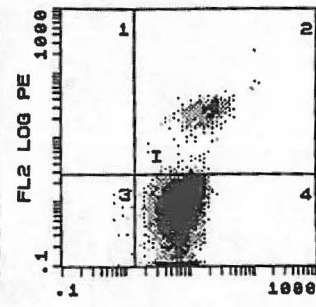
CD8 CD3



FL1 LOG FITC

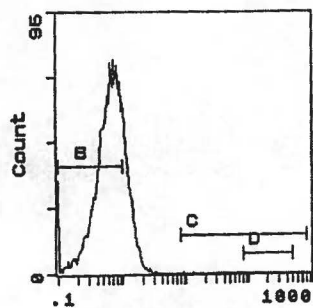


FL2 LOG PE

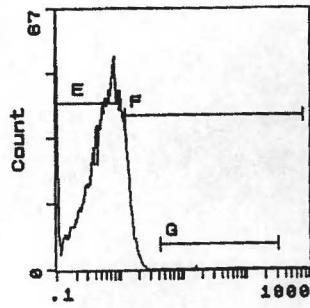


FL1 LOG FITC

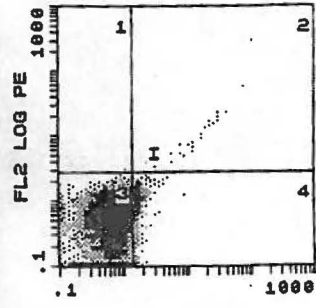
CD4 CD3



FL1 LOG FITC



FL2 LOG PE



FL1 LOG FITC

Témoins isotypiques

**DISCUSSION**

La sclérose en plaques est une maladie dont l'étiologie n'est pas encore très bien connue. En effet, elle serait en partie due à des facteurs environnementaux mais aussi à des facteurs génétiques. Tel que mentionné dans la littérature (Oksenberg, 1996; Haegert et Marrosu, 1994; Hillert et Olerup, 1993) l'association génétique la plus forte avec la sclérose en plaques est retrouvée dans la sous-région HLA-DR2 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. De plus, des études ont démontré que l'incidence de l'haplotype HLA-DR2 était d'environ 20% chez les personnes n'étant pas atteintes de SEP alors qu'elle était de 50-60% chez les patients atteints de SEP (Wucherpfennig, 1994). Puisque les études antérieures ont observé une association génétique entre l'haplotype HLA-DR2 et la SEP, il était normal de prévoir un plus grand nombre de donneurs possédant cet haplotype chez les donneurs SEP que chez les témoins. Ainsi, les 16 donneurs qui ont participé à cette étude ont été sélectionnés au hasard et il a été constaté que la proportion de personnes dans le groupe SEP possédant l'haplotype HLA-DR2 était plus élevée (57%) que celle du groupe témoin (25%). De plus, l'incidence de cet allèle est la même dans le sous-groupe SEP cyclique que dans le sous-groupe SEP progressif-chronique. Ainsi, les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus dans les études antérieures.

Par la suite, la séropositivité de chaque donneur envers le coronavirus HCV-OC43 a été déterminée par immunofluorescence pour vérifier s'ils ont bel et bien été en contact avec ce virus. Il a ainsi été démontré que tous les donneurs possédaient des anticorps sériques anti-HCV-OC43. Ces résultats supportent ce qui a été rapporté dans la littérature concernant l'épidémiologie de ce virus. En effet, selon Myint (1994), les coronavirus sont des pathogènes du tractus respiratoire responsables de près de 30% des rhumes. De plus, des anticorps anti-coronavirus apparaissent de façon précoce durant l'enfance et leur fréquence augmente de façon significative avec l'âge (Mcintosh, 1970). Ainsi il était réaliste de prévoir une fréquence élevée des anticorps sériques anti-OC43 chez les donneurs. Toutefois, aucun des donneurs n'a semblé souffrir d'un rhume récemment. C'est peut-être pourquoi, pour certains, la fluorescence n'était pas aussi démarquée que pour d'autres donneurs.



La sélection *in vitro* de lignées de lymphocytes T accompagnée de tests de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP a été réalisée chez tous les donneurs. Les résultats obtenus indiquent qu'il est possible d'obtenir des lignées de lymphocytes T spécifiques à la PBM, la PPL et le coronavirus HCV-OC43 chez les donneurs témoins ainsi que chez les donneurs SEP. Malgré le fait que la PBM et la PPL soient des antigènes séquestrés dans le système nerveux, il a été possible d'obtenir des lymphocytes T spécifiques à ces antigènes. Ces résultats sont compatibles avec diverses études montrant des lignées de lymphocytes T anti-PBM, anti-PPL et autres antigènes de la myéline établies tant chez des donneurs SEP que chez des donneurs témoins (Correale *et al.*, 1997; Talbot *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1993).

Toutefois, la proportion *in vitro* des lignées anti-PBM et anti-PPL obtenues n'est pas très élevée. De plus, ces lignées sont de faible réactivité en comparaison aux lignées anti-HCV-OC43 i.e. que les cellules anti-PBM et anti-PPL prolifèrent moins en présence de leur antigène de sélection (coefficient de stimulation plus faible pour ces lignées que pour les lignées anti-OC43) que dans le cas des lignées anti-OC43. Ceci pourrait être dû à la sélection thymique qui peut laisser mûrir des lymphocytes T auto-réactifs de faible avidité et spécifiques aux antigènes du soi (Targoni et Lehmann, 1998). De plus, la PPL est une protéine difficile à étudier, et ce, depuis le début des études à son sujet. Ainsi, il a été rapporté que des lignées obtenues à partir de cette protéine réagissaient faiblement à la PPL (prolifération faible) alors que celles obtenues à partir de peptides synthétiques de la protéine étaient de forte réactivité (Pelfrey *et al.*, 1993). En effet, une faible réponse des lignées de lymphocytes T anti-PPL a été obtenue dans de nombreux laboratoires (Pelfrey *et al.*, 1993). Ce phénomène n'a pas encore été élucidé mais il serait possible que ce soit relié aux propriétés propres à cet antigène. En effet, La PPL est une protéine très hydrophobe dont la conformation native se modifie lorsqu'elle est suspendue dans un milieu aqueux. La PPL est retrouvée sous forme de monomères composés de nombreux segments d'hélices alpha lorsque mise dans un solvant organique. Dans le cas d'un solvant aqueux, la viscosité de la suspension ainsi que le nombre d'hélices alpha de la

protéine diminue. De plus, malgré l'usage de détergents qui rendent la PPL soluble dans un milieu aqueux, cette dernière s'aggrège dans l'eau. Comme mentionné plus haut, les peptides de la PPL, qui échappent au processus de transformation de l'antigène pour leur présentation avec les protéines du CMH, ont pour leur part, fortement stimulé des lymphocytes T anti-PPL lors de tests de prolifération *in vitro*. Finalement, des tests de cytotoxicité utilisant la PPL native ont démontré que les lymphocytes T cytotoxiques anti-PPL étaient incapables de lyser les cellules cibles (Pelfrey *et al.*, 1993). A partir de ces observations, Pelfrey et coll. (1993) ont proposé que la PPL native serait faiblement internalisée et/ou transformée en peptides par les CPA contrairement aux peptides de cette protéine.

Malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons pas obtenu de lignées de lymphocytes T pouvant reconnaître plus d'un antigène à la fois. Il n'y a donc pas eu de réaction croisée observée entre le coronavirus HCV-OC43 et la PBM ni entre le virus OC43 et la PPL. Ceci confirme les résultats préliminaires obtenus par Talbot *et al.* (1996) concernant le virus HCV-OC43 où la technique de sélection antigénique des lignées était la même que celle employée pour ce projet. Ces résultats ont été réfutés dernièrement dans le même laboratoire, où des lignées de lymphocytes T qui reconnaissent à la fois le coronavirus HCV-OC43 et la PBM ont été obtenues (Pierre Talbot, communication personnelle). Toutefois, la divergence des résultats pourrait résider au niveau de la technique utilisée. En effet, pour ce nouveau projet, les lymphocytes T anti-PBM, anti-HCV-OC43 et anti-PPL ont été obtenus de donneurs SEP et de témoins par clonage par dilution limite. En fait, les lignées de lymphocytes T anti-PBM et anti-PPL obtenus dans cette étude, sont de faible réactivité. De plus, lors de la sélection antigénique avec la méthode utilisée pour ce projet, chaque puits contient plusieurs milliers de lymphocytes T de spécificités différentes et à des stades d'activation différents. Les lymphocytes T dont la réactivité envers l'antigène de sélection est élevée et les lymphocytes T qui sont déjà activés lors de la mise en culture, pourraient avoir plus de chances de prendre le dessus sur les lignées à faible réactivité, laissant ces dernières avec très peu de nutriments et de cytokines. Dans de telles conditions, les lignées à réaction croisée, dont la réactivité est faible (faible

coefficient de stimulation), n'auraient pu survivre longtemps passant ainsi sous silence le phénomène de réaction croisée entre le virus OC43 et les protéines de la myéline.

Dans le cas de la dilution limite, il y a très peu de lymphocytes T présents dans les puits, donc beaucoup de nutriments et de cytokines disponibles pour chacune des cellules. Ces conditions pourraient favoriser la multiplication des lignées spécifiques à faible réactivité telles que les lymphocytes T anti-PBM ou anti-PPL permettant ainsi d'observer les clones à réaction croisée. Il serait donc possible que dans le projet de recherche présent, les conditions de culture n'étaient pas optimales pour les lignées à réaction croisée entre le virus OC43, et les protéines de la myéline. Cela pourrait expliquer pourquoi il n'y a pas eu de réaction croisée observée ni chez les témoins, ni chez les donneurs SEP.

De plus, dans une étude antérieure (Talbot *et al.*, 1996) des lignées à réaction croisée entre la PBM et le coronavirus humain HCV-229E ont été obtenues en utilisant la même méthode que celle retenue pour ce projet de recherche. Alors pourquoi cela n'a pas fonctionné pour le coronavirus HCV-OC43? Il est possible que les deux peptides responsables de la réaction croisée et provenant de protéines de la myéline et du virus OC43 ne stimulent pas aussi efficacement les lignées anti-protéine de la myéline et anti-OC43, que les deux peptides responsables de la réaction croisée entre les lignées anti-PBM et anti-HCV- 229E. Cette stimulation plus faible pourrait être la conséquence d'une homologie structurale moins parfaite entre le peptide à réaction croisée retrouvé sur une protéine de la myéline et celui sur une protéine virale de OC43 qu'entre celui de la PBM et celui de 229E. Ainsi, une homologie structurale moins parfaite entre deux peptides pourrait entraîner une stimulation plus faible d'une lignée de lymphocytes T qui reconnaissent les deux peptides. Cette hypothèse en plus de celle des conditions de culture sub-optimales pourraient expliquer la raison pour laquelle des lignées à réaction croisée ont été obtenues entre la PBM et le HCV-229E alors qu'il n'y en a pas eu entre la PBM ou la PPL et le HCV-OC43 lors de ce projet de recherche.

En comparant la proportion des lignées de lymphocytes T (i.e. le nombre de lignées spécifiques à l'antigène de sélection lors des tests de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP sur le nombre total de lignées utilisées pour les test d'incorporation de la [<sup>3</sup>H]TTP) obtenues chez les donneurs SEP et les donneurs témoins, il n'y avait pas de différence significative ( $p = 0,57$  méthode du  $X^2$ ) entre les donneurs SEP et les donneurs témoins en ce qui concerne les lignées anti-PBM. Cette observation a aussi été faite lors de travaux antérieurs (Talbot *et al.*, 1996).

Contrairement à ce qui a été obtenu avec le coronavirus HCV-229E (Talbot *et al.*, 1996), la proportion *in vitro* des lignées de lymphocytes T spécifiques au virus est significativement plus élevée pour les donneurs SEP que pour les donneurs témoins. Cette différence est statistiquement significative où  $p < 0,0001$  (méthode du  $X^2$ ). Ces résultats sont renforcés par ceux obtenus récemment au laboratoire de Pierre Talbot qui a détecté par PCR, davantage de virus HCV-OC43 dans le cerveau de patients atteints de SEP que dans celui de donneurs sains (Nathalie Arbour *et al.*, manuscrit en préparation).

Finalement, malgré le fait qu'il y ait une différence importante dans le nombre de lignées anti-PPL retrouvées chez les donneurs ainsi que dans leur proportion *in vitro* (proportion chez les donneurs SEP deux fois plus élevée que chez les donneurs témoins), selon la méthode du  $X^2$ , cette variation n'est pas statistiquement significative ( $p = 0,13$ ). Toutefois, le nombre de donneurs étant restreint, il serait intéressant d'obtenir davantage de résultats pour corroborer ou réfuter ces résultats. En effet, il a déjà été remarqué que la fréquence de lymphocytes T activés anti-myéline retrouvés dans le sang et dans le compartiment intrathécal, est plus élevée chez des personnes atteintes de SEP que chez des personnes en santé (Zhang *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1993). Ainsi, il serait plausible de prévoir une plus grande proportion *in vitro* de lignées de lymphocytes T anti-protéines de la myéline chez les donneurs SEP que chez les témoins.

Par la suite, les proportions *in vitro* des lignées de lymphocytes T spécifiques aux antigènes de sélection obtenus selon les catégories sexe, HLA et forme de la SEP chez les

donneurs SEP et les donneurs témoins ont été comparées. Lorsque la proportion des lignées est étudiée en fonction du sexe, elle est plus élevée chez les lignées anti-protéines de la myéline pour les femmes SEP que pour les hommes SEP. Il a été observé que les femmes sont plus fréquemment touchées par la SEP que les hommes (Duquette *et al.*, 1992). Pour les autres antigènes de sélection ainsi que les donneurs témoins, aucune différence significative n'a été observée.

Ensuite la proportion *in vitro* des lignées obtenues a été calculée en fonction de l'haplotype HLA-DR2. Il ne semble pas y avoir de différence notable, entre les donneurs HLA-DR2+ et les autres puisque les résultats obtenus sont similaires. Toutefois, les autres donneurs représentent un mélange de plusieurs allèles de la sous-région HLA. Comme les donneurs HLA-DR2+ ne représentent qu'un allèle et que les autres en représentent plusieurs, et comme les résultats sont similaires entre les deux groupes, il est possible que l'allèle HLA-DR2 influence la proportion des lignées obtenues. Ainsi, il serait plausible de croire qu'il y a davantage de lignées spécifiques à la PBM, à la PPL et au HCV-OC43 obtenues pour l'haplotype HLA-DR2+ que pour chacun des autres haplotypes du sous-groupe HLA chez les donneurs SEP.

Finalement, la comparaison de la proportion *in vitro* des lignées, calculée en fonction de la forme de la SEP ne semble pas faire ressortir un fil directeur. Il n'y a pas de différence significative dans le nombre de lignées obtenues pour les antigènes de sélection entre les donneurs SEP cycliques (C) et les donneurs SEP progressifs-chroniques (P) excepté pour la PBM où un peu plus du double de lignées ont été obtenues chez les donneurs progressifs-chroniques. Toutefois, il serait nécessaire d'obtenir davantage de résultats pour pouvoir conclure définitivement.

Pour la première fois, la spécificité des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus HCV-OC43 envers les protéines structurales et non structurales du virus a été étudiée. En fait un peu plus de la moitié des lignées obtenues *in vitro* de tous les donneurs étaient spécifiques aux protéines structurales. Très peu de renseignements sont

disponibles au sujet de l'immunité cellulaire spécifique aux coronavirus humains. Toutefois, les recherches de Stohlman *et al.* (1993) ont démontré que des lignées de lymphocytes T cytotoxiques anti-coronavirus murin JHMV étaient spécifiques en majorité à la protéine structurale N dans une proportion de 85%. Si ces observations s'avèrent un bon modèle pour le coronavirus humain, il est plausible d'obtenir davantage de lignées spécifiques aux protéines structurales.

Ainsi, davantage de lignées spécifiques aux protéines structurales ont été obtenues chez les donneurs SEP, mais le pourcentage de ces lignées positives par rapport aux lignées spécifiques au virus, était sensiblement le même pour les donneurs témoins que pour les donneurs SEP. Puisque la proportion *in vitro* des lignées spécifiques envers les protéines structurales est similaire entre les deux groupes et puisque la fréquence des lignées anti-HCV-OC43 (spécifiques au virus OC43 *i/e*) est plus élevée chez les donneurs SEP que chez les donneurs témoins, il serait possible que cette variation de la proportion des lignées anti-HCV-OC43 entre les donneurs SEP et les donneurs témoins soit due aux protéines non structurales du virus. En effet, l'utilisation de témoins négatifs lors des tests de prolifération avec incorporation de [<sup>3</sup>H]TTP élimine l'hypothèse que les lignées de lymphocytes T dits spécifiques à OC43 (suspension virale *i/e*) soient spécifiques aux protéines cellulaires ou aux protéines du sérum de veau fœtal. Donc les lignées spécifiques au virus *i/e* et non au virus purifié pourraient en fait, être spécifiques aux protéines non structurales de OC43. Ainsi, il serait peut-être possible que les protéines non structurales aient un rôle à jouer dans le développement de la SEP. Toutefois, ces résultats nécessitent des investigations plus poussées pour être corroborée en partie à cause du nombre de résultats obtenus mais aussi à cause de la possibilité d'une purification imparfaite du virus OC43.

Par la suite, la restriction HLA de la reconnaissance antigénique des lignées de lymphocytes T a été évaluée. Selon les résultats obtenus, la presque totalité des lignées anti-HCV-OC43 étudiées ont été restreintes par le HLA-DR tant au niveau des lignées spécifiques aux protéines structurales qu'aux protéines non structurales. Seulement 3

lignées sur 25 ne l'étaient pas. De plus, parmi les donneurs des lignées étudiées, 3 sur 5 étaient HLA-DR2+ dont deux étaient des donneurs SEP. Aussi, il a été intéressant d'observer que toutes les lignées obtenues des deux donneurs SEP étaient HLA-DR2 restreintes.

Cette restriction de la reconnaissance du virus par le CMH de classe II (HLA-DR2) peut être expliquée par la méthode de stimulation utilisée. En effet, les stimulations antigéniques des lymphocytes T ont été effectuées via des antigènes exogènes (PBM, PPL, HCV-OC43) i.e. ajoutés au milieu de culture. Les antigènes exogènes sont internalisés (phagocytose, endocytose) par les cellules de présentation de l'antigène (CPA), dégradés par la voie endogène et les peptides résultants se lient aux molécules du CMH de classe II pour être présentés à la surface des CPA. Dans le cas des antigènes endogènes, ceux-ci sont dégradés via la voie cytosolique et les peptides résultants sont présentés à la surface des CPA en association avec le CMH de classe I (Kuby, 1994). En utilisant des antigènes exogènes, les peptides résultants seront associés au CMH de classe II et ces CPA stimuleront des lymphocytes T spécifiques à l'antigène et restreints par le CMH de classe II. Il n'est donc pas impossible que les résultats obtenus aient été biaisés par la méthode de stimulation antigénique utilisée, en faveur d'une restriction par le CMH de classe II. Finalement, il n'a malheureusement pas été possible d'évaluer la restriction spécifique des trois lignées qui n'étaient pas HLA-DR2 restreintes. Il aurait été intéressant de déterminer si elles étaient restreintes par le CMH de classe II ou de classe I.

Pour stimuler les lymphocytes T spécifiques à l'antigène de sélection et restreints par le CMH de classe I et ce, afin d'éviter de ne favoriser que les lymphocytes restreints par le CMH de classe II, il aurait été nécessaire d'utiliser des antigènes endogènes lors des stimulations antigéniques. Puisque les antigènes utilisés (PBM, PPL et OC43) ne pouvaient pas se retrouver à l'intérieur des monocytes et des macrophages (CPA) par eux-même, il aurait fallu les faire pénétrer à l'intérieur des CPA. Ceci pourrait être réalisé en utilisant la technique d'électroporation ou en utilisant des antigènes encapsulés à l'intérieur de liposomes qui une fois mis en présence de cellules, fusionneraient avec la

couche bilipidique et déverseraient leur contenu dans le cytoplasme cellulaire (Alving et Wassef, 1994; Harding, 1992; Nair *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 1992). Des études futures pourraient donc ajouter des CPA au milieu de culture qui auraient subi une électroporation ou une incubation avec des antigènes encapsulés dans des liposomes afin de stimuler également les lymphocytes T restreints par le CMH de classe I.

En dernier lieu, le phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$  ou  $CD_8^+ CD_3^+$  des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus HCV-OC43 a été déterminé par cytofluorométrie. La majorité des lignées évaluées étaient  $CD_4^+ CD_3^+$ . Trois lignées sur 11 provenant de donneurs témoins étaient  $CD_8^+ CD_3^+$ . De plus, toutes les lignées contenaient un petit pourcentage résiduel de cellules de l'autre phénotype, témoignant du fait que ce sont des lignées et non des clones. La majorité de lignées  $CD_4^+ CD_3^+$  soulève la même question que pour la restriction HLA. En fait, il serait important de déterminer si ces résultats ont été ou non, biaisés par la méthode de sélection antigénique utilisée. Pour ce faire il serait nécessaire de simuler l'environnement naturel des lymphocytes T lors d'une infection virale *i.e.* des antigènes exogènes (virus) ainsi que des cellules contenant le virus à l'intérieur du cytoplasme (antigène endogène), tous dans le même puits. Ainsi, les résultats obtenus *in vitro* reflèteraient davantage la réalité du processus *in vivo*.

Le cas des lignées  $CD_8^+ CD_3^+$  soulève beaucoup de questions. Comment une technique employant des antigènes exogènes qui favorisent la stimulation de lymphocytes T de phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$ , puisse être capable d'induire la prolifération de lymphocytes T de phénotype  $CD_8^+ CD_3^+$ ? L'hypothèse des doubles positifs  $CD_4^+ CD_8^+$  pourrait être une possibilité intéressante à envisager. Toutefois, les résultats obtenus réfutent cette hypothèse. En effet, pour chacune des trois lignées  $CD_8^+ CD_3^+$  obtenues, il y a un très faible pourcentage de lymphocytes T  $CD_4^+ CD_3^+$  qui a été observé en cytofluorométrie chez les cellules incubées avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD3. Ce faible pourcentage de cellules de phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$  correspond au pourcentage des cellules incubées avec les anticorps anti-CD8 et anti-CD3 qui ne possèdent pas le phénotype  $CD_8^+ CD_3^+$ . Selon ces résultats, les lignées  $CD_8^+ CD_3^+$  obtenues n'étaient pas constituées de



lymphocytes T doubles positifs ( $CD_4^+ CD_8^+$ ), mais plutôt de deux populations cellulaires différentes i.e. une population  $CD_8^+ CD_3^+$  qui constituait la presque totalité de la lignée et une population  $CD_4^+ CD_3^+$ , qui quant à elle, ne représentait qu'un très faible pourcentage de la lignée.

Une hypothèse qui pourrait expliquer la présence des lignées  $CD_8^+ CD_3^+$  serait que les donneurs étaient déjà infectés par le virus OC43 au moment du prélèvement sanguin effectué pour la première stimulation antigénique. En effet dans le cas d'un des deux donneurs chez qui les lignées  $CD_8^+ CD_3^+$  ont été obtenues, la première stimulation antigénique a été effectuée en hiver, là où le nombre d'infections causées par les coronavirus humains est à son maximum (McIntosh, 1996). Dans cette situation, des lymphocytes T  $CD_8^+ CD_3^+$  et  $CD_4^+ CD_3^+$  anti-HCV-OC43 déjà activés, seraient présents dans le sang du donneur au moment du prélèvement. Par la suite, lors de la première stimulation antigénique *in vitro*, le virus OC43 utilisé comme antigène exogène poursuivrait la stimulation des lymphocytes T  $CD_4^+ CD_3^+$  anti-HCV-OC43 déjà activés *in vivo*. Sous l'action de la stimulation *in vitro*, ces derniers proliféreraient et sécrèteraient alors davantage d'IL-2. Cette IL-2 sécrétée par les lymphocytes T  $CD_4^+ CD_3^+$  poursuivrait la stimulation des cellules  $CD_8^+ CD_3^+$  qui avait déjà été activés *in vivo*. Ainsi la prolifération des lymphocytes T  $CD_8^+ CD_3^+$  sous l'action de l'IL-2 pourrait mener à la présence de lignées de lymphocytes T anti-HCV-OC43 dont la majorité des cellules qui les constituent possèdent le phénotype  $CD_8^+ CD_3^+$ .

En faisant le parallèle entre la spécificité envers les protéines du virus, la restriction HLA de la reconnaissance antigénique et le phénotype des lignées, il est apparu que les lignées spécifiques aux protéines structurales étudiées n'étaient pas restreintes par le HLA-DR et possédaient le phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$ . Ces lignées étaient probablement restreintes par le HLA-DQ ou le HLA-DP (classe II), ce qui aurait pu être déterminé à l'aide d'un anticorps anti-HLA-DP, DQ, DR s'il y avait eu suffisamment de cellules pour le test de prolifération. Alors que dans le cas des protéines non structurales, la lignée HLA-DR restreinte était de phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$  et celle non restreinte par le HLA-DR était de

phénotype CD<sub>8</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup>. Cette dernière lignée était probablement restreinte par le CMH de classe I, ce qui aurait pu être déterminé par un anticorps anti-HLA DP, DQ, DR (classe II) ou un anticorps anti-HLA-A, B, C (classe I). Le nombre de lignées étudiées ne permet pas d'observer de tendance particulière ni de conclure quant à leur signification. Toutefois, une investigation plus approfondie de la relation HLA, de la spécificité aux protéines structurales et non structurales et du phénotype des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus OC43 aideront à comprendre davantage les processus immunitaires impliqués lors d'une infection par les coronavirus humains.

Cette étude se situe dans le cadre d'une vaste recherche de l'étiologie de la sclérose en plaques. De nombreuses hypothèses ont été postulées dont celle de l'implication des virus dans le développement de la SEP (Talbot, 1995; Wucherpfennig et Strominger, 1995). Plusieurs observations expérimentales semblent impliquer plus d'une quinzaine de virus dans la SEP, parmi lesquels figurent les coronavirus humains (Talbot, 1995). Il a déjà été démontré que des réactions croisées chez des lignées de lymphocytes T étaient possibles entre le coronavirus HCV-229E et la PBM chez des donneurs SEP (Talbot *et al.*, 1996). Cette étude a donc tenté de déterminer si l'autre souche du coronavirus humain HCV-OC43 pouvait aussi être impliquée dans le développement de la SEP par mimétisme moléculaire entre le virus et des antigènes de la myéline. De plus, elle a permis pour la première fois de caractériser les lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus humain HCV-OC43. Les résultats obtenus ont démontré que, selon l'approche utilisée, il n'y avait pas de réactions croisées entre le virus OC43 et la PBM ainsi qu'entre OC43 et la PPL. Par contre, grâce à la même technique, des réactions croisées chez des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus humain HCV-229E et à la PBM ont été obtenues (Talbot *et al.*, 1996). De plus, en utilisant une méthode différente *i.e.* le clonage par dilution limite, il a été plus tard possible d'obtenir des clones de lymphocytes T reconnaissant à la fois le virus OC43 et des protéines de la myéline (Pierre Talbot, communication personnelle). Ainsi, l'absence de réaction croisée entre OC43 et la PPL ou la PBM pourrait être attribuable à une similitude (de séquence ou structurale) moins parfaite entre le peptide viral impliqué dans la réaction croisée et un

peptide de la PBM ou la PPL que dans le cas de la PBM et du virus 229E. Ainsi, cette étude laisse supposer que la méthode expérimentale adoptée n'était pas appropriée pour stimuler des lymphocytes T à faible réactivité tels que les lymphocytes T auto-réactifs à réaction croisée entre les protéines de la méline et le coronavirus humain OC43. De plus, très peu de données concernant l'immunité cellulaire envers les coronavirus humains sont disponibles. Ainsi, pour la première fois, une étude a donc permis de caractériser les lignées de lymphocytes T spécifiques au HCV-OC43 tant au point de vue de la spécificité envers les protéines structurales et non structurales du virus, de la restriction HLA de la reconnaissance de l'antigène, que du phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$  ou  $CD_8^+ CD_3^+$  des lignées anti-HCV-OC43. Cette étude originale a donc permis d'initier des travaux de recherche visant une meilleure compréhension du comportement du système immunitaire au niveau de l'immunité cellulaire lors d'une infection par le coronavirus HCV-OC43.

## **CONCLUSION**

La sclérose en plaques est une maladie démyélinisante du SNC qui touche près de 50 000 Canadiens. Son étiologie est encore inconnue mais des études épidémiologiques ont démontré qu'elle serait due à des facteurs génétiques ainsi qu'à des facteurs environnementaux. De nombreuses hypothèses ont été formulées mais aucune n'a encore été prouvée hors de tout doute. Parmi ces hypothèses, se retrouve celle de l'implication des virus dans le développement de la SEP. Plus d'une quinzaine de virus ont été proposés comme agent déclencheur de la maladie, tels que le virus de la rougeole, le cytomégalovirus, le virus herpes simplex, etc..

Parmi ces virus se retrouvent les coronavirus humains. Plusieurs observations suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle dans le développement de la maladie. De plus, le coronavirus murin MHV sert de modèle expérimental pour la sclérose en plaques chez la souris. En effet, certaines souches de ce virus peuvent causer une encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) produisant une démyélinisation du SNC semblable à celle observée lors de la SEP (Houtman et Fleming, 1996).

De nombreuses théories ont été postulées pour décrire les mécanismes causant la démyélinisation du SNC, induits par les virus. Parmi celles-ci, l'hypothèse du mimétisme moléculaire entre un virus et une protéine de la myéline a été retenue pour ce projet. En effet, il serait possible que des lymphocytes T reconnaissent des épitopes retrouvés à la fois sur une protéine de la myéline et sur le virus, induisant ainsi une cascade de réactions qui provoquent la destruction progressive de la gaine de myéline. Il a déjà été prouvé que des lignées de lymphocytes T pouvaient reconnaître à la fois, la PBM et le coronavirus humain HCV-229E.

Ainsi l'hypothèse postulée pour ce projet était que la sclérose en plaques serait une maladie auto-immunitaire survenant chez des personnes génétiquement prédisposées, où des lymphocytes T auto-réactifs seraient activés suite au mimétisme moléculaire entre des antigènes de la myéline et des antigènes viraux. Puisque l'hypothèse du mimétisme moléculaire peut s'appliquer au coronavirus HCV-229E, ce projet a tenté de vérifier si

cette théorie s'appliquait aussi à l'autre coronavirus humain HCV-OC43. Pour ce faire, ce projet comportait 3 volets. Le premier consistait à sélectionner *in vitro*, des lignées de lymphocytes T spécifiques à deux protéines de la myéline soit la PBM et la PPL ainsi que des lignées spécifiques au coronavirus HCV-OC43. Ces lignées de lymphocytes T provenaient de donneurs SEP et de donneurs témoins ne souffrant d'aucune maladie neurologique connue et qui ont été sélectionnés au hasard. Par la suite, le deuxième volet consistait à déterminer la spécificité antigénique de ces lignées envers l'antigène autologue *i.e.* l'antigène de sélection et envers des antigènes hétérologues *i.e.* des antigènes autres que celui utilisé pour la sélection parmi le virus HCV-OC43, la PBM et la PPL. Ainsi, il était possible d'observer si une réaction lymphocytaire croisée existe entre le virus et les protéines de la myéline. Finalement, le troisième volet consistait en la caractérisation des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus HCV-OC43. Ainsi, la spécificité des lignées envers les protéines structurales et non structurales, la restriction HLA de la reconnaissance antigénique ainsi que le phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$  ou  $CD_8^+ CD_3^+$  des lignées anti-OC43 ont été évalués.

Cette étude a démontré qu'il était possible d'obtenir des lignées spécifiques à la PBM, à la PPL et au coronavirus HCV-OC43 tant chez les donneurs SEP que chez les donneurs témoins. De plus, la proportion *in vitro* plus élevée des lignées anti-HCV-OC43 chez les donneurs SEP par rapport aux donneurs témoins est statistiquement significative. Toutefois, il a été démontré qu'avec la méthode utilisée, il n'y avait pas de réactions croisées observables entre le virus et les protéines de la myéline. Par contre, dans une étude antérieure (Talbot *et al.*, 1996) des réactions croisées ont été observées entre le coronavirus HCV-229E et la PBM en utilisant la même technique que pour le projet de recherche présent. De plus, la réaction croisée tant recherchée entre le virus OC43 et une protéine de la myéline a par la suite été obtenue grâce à une méthode de clonage par dilution limite dans le laboratoire du Dr Pierre Talbot. L'absence de réaction croisée entre OC43 et une protéine de la myéline dans l'étude présente est possiblement attribuable à une homologie de séquence moins parfaite entre OC43 et la PPL ou la PBM, qu'entre 229E et la PBM rendant les lignées de lymphocytes T à réaction croisée entre

OC43 et une protéine de la myéline beaucoup moins réactive et nécessitant des conditions de culture idéales. Ainsi, grâce aux résultats obtenus par l'étude en cours dans le laboratoire du Dr Pierre Talbot, il est maintenant possible d'affirmer que des clones de lymphocytes T, reconnaissant à la fois le virus HCV-OC43 et les protéines de la myéline, existent bel et bien et que la méthode utilisée pour ce projet n'était probablement pas appropriée pour sélectionner des lymphocytes T à faible réactivité comme les lymphocytes T auto-réactifs reconnaissant à la fois le virus OC43 et les protéines de la myéline.

Finalement, pour la première fois, la caractérisation des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus HCV-OC43 a démontré qu'un peu plus de la moitié des lignées obtenues *in vitro* étaient spécifiques aux protéines structurales du virus. Egalement, la fréquence des lignées spécifiques aux protéines structurales du virus est similaire entre les donneurs SEP et témoins. En fait, la proportion significativement plus élevée des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus HCV-OC43 chez les donneurs SEP par rapport aux donneurs témoins, observée précédemment, ne serait pas associée aux protéines structurales mais probablement aux protéines non structurales du coronavirus. Ainsi, ces dernières pourraient possiblement jouer un rôle dans la SEP. De plus, la presque totalité des lignées spécifiques au coronavirus HCV-OC43 étaient restreintes par le HLA-DR. En dernier lieu, le phénotype de ces lignées s'est avéré être en majorité des lymphocytes T  $CD_4^+ CD_3^+$ . Trois lignées n'étaient pas restreintes par le HLA-DR. L'une d'entre elles était du phénotype  $CD_8^+ CD_3^+$ , probablement restreinte par le CMH de classe I et les deux autres étaient de phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$ , probablement HLA-DP ou -DQ restreintes. Une caractérisation plus poussée des lignées de lymphocytes T spécifiques au coronavirus HCV-OC43 permettrait de confirmer ou réfuter les résultats préliminaires obtenus durant ce projet.

L'ensemble de cette recherche a donc permis de faire avancer les connaissances au sujet du coronavirus humain HCV-OC43 tant au niveau de la SEP qu'au niveau des notions sur l'immunité cellulaire reliée à ce virus. L'avenir semble très prometteur pour les projets de

recherche sur les coronavirus. Toutefois il reste beaucoup à découvrir. Ce projet est donc une ébauche de travaux futurs qui poursuivront la recherche de clones de lymphocytes T à réaction croisée entre le coronavirus HCV-OC43 et les mêmes antigènes de la myéline utilisés pour cette étude ainsi que d'autres antigènes tels que la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (GOM), la glycoprotéine associée à la myéline (GAM), la nucléotide phosphodiesterase cyclique (CNPase), l' $\alpha\beta$ -cristalline, etc. De plus, ces travaux pourront déterminer la spécificité fine de ces clones à réaction croisée afin de définir les épitopes responsables du mimétisme moléculaire, caractériser davantage les lignées anti-HCV-OC43 spécifiques aux protéines non structurales du virus et évaluer leur implication potentielle dans la SEP. En dernier lieu, les lignées ou les clones de lymphocytes T anti-HCV-OC43 pourront être caractérisés davantage tant au niveau des épitopes reconnus, de la restriction HLA de la reconnaissance antigénique, du phénotype  $CD_4^+ CD_3^+$  ou  $CD_8^+ CD_3^+$ , de la cytotoxicité de ces lymphocytes que des patrons de cytokines sécrétées par ces cellules.



## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier sincèrement mon directeur de maîtrise, le Dr Pierre Talbot pour qui la persévérance, la curiosité, et l'espoir en l'avenir n'ont aucune limite. Ce sont à mon avis les premières qualités qu'un chercheur doit posséder pour atteindre les buts qu'il s'est fixé. Ainsi, il fut et demeurera pour moi un remarquable exemple à suivre.

Également, j'aimerais remercier le Dr Yufen Qin, qui fut une conseillère et une amie exceptionnelle tant au point de vue scientifique que personnel. Ces deux années de travail en étroite collaboration ont été des plus agréables et des plus enrichissantes.

J'aimerais ensuite remercier Francine Lambert pour son dévouement et sa gentillesse sans borne envers Pierre et les étudiants du laboratoire. Sans elle, que serions-nous devenus?

Également, j'aimerais remercier particulièrement Élyse Bégin pour sa patience et son dévouement envers les donneurs qui ont bien voulu se prêter à cette étude.

De plus, j'aimerais mentionner un merci tout spécial à France Ouellet pour sa patience et sa disponibilité pour toutes nos questions concernant ce projet.

J'aimerais également, remercier tous les étudiants du laboratoire qui ne sont pas avares de leur temps. Merci pour tout ce temps consacré à la discussion, à l'apprentissage de nouveaux concepts, de nouvelles techniques. Merci pour toutes ces attentions et cet esprit de camaraderie qui font de ce laboratoire un endroit agréable à fréquenter.

De plus, j'aimerais remercier tout spécialement Denise Cloutier qui fut une compagne de travail extraordinaire pendant ces deux années.

Enfin, je tiens également à remercier le Dr Yves-St-Pierre et Marcel Desrosiers pour leurs conseils judicieux concernant la cytofluorométrie ainsi que le Dr Pierre Duquette et le Dr Jack Antel pour leur précieuse collaboration.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Acha-Orbea, H., Mitchell, D.J., Timmermann, L., *et al.* 1988. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* **54**:263-273.
- Alving, C.R., Wassef, N.M. 1994. Cytotoxic T lymphocytes induced by liposomal antigens: mechanisms of immunological presentation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10 Suppl 2**:S91-94.
- Arpin, N., Talbot, P.J. 1990. Molecular characterization of the 229E strain of human coronavirus. *Adv Exp Med Biol* **276**:73-80.
- Ausubel, F.M., Brent, R., *et al.* 1994-98. *Current Protocols in Molecular Biology* par Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., John Wiley & Sons, Inc., Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School. pp.10.2.10-10.2.12.
- Bajramovic, J.J., Lassmann, H., van Noort, J.M. 1997. Expression of alphaB-crystallin in glia cells during lesional development in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **78**:143-151.
- Beall, S.S., Concannon, P., Charmley, P., McFarland, H.F., Gatti, R.A., Hood, L.E., McFarlin, D.E., Biddison, W.E. 1989. The germline repertoire of T cell receptor beta-chain genes in patients with chronic progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **21**: 59-66.
- Bonavia, A., Arbour, N., Yong, V.W., Talbot, P.J. 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *J Virol* **71**:800-806.
- Boggs, J.M., Moscarello, M.A., Papahadjopoulos, D. 1982. Structural organization of myelin - role of lipid protein interactions determined in model systems. *Lipid-protein interactions*, vol. 2. par Jost, P., Griffith, O.H. eds. J Wiley and Sons, New-York, 1-51.
- Boots, A.M., Kusters, J.G., van Noort, J.M., Zwaagstra, K.A., Rijke, E., van der Zeijst, B.A., Hensen, E.J. 1991. Localization of a T-cell epitope within the nucleocapsid protein of avian coronavirus. *Immunology* **74**:8-13.
- Bradburne, A.F., Bynoe, M.L., Tyrrell, D.A.J. 1967. Effects, of a "new" human respiratory virus in volunteers. *Br Med J* **3**:767-769.
- Brahic, M., Jewell, J. 1989. Multiple sclerosis as a viral disease. *Res Immunol* **140**:176-181.
- Brody, J.A., Sever, J.L., Henson, T.E. 1971. Virus antibody titers in multiple sclerosis patients, siblings and controls. *JAMA* **216**:1441-1446.

- Burks, J.S., DeVald, B.L., Jankovsky, L.D., Gerdes, J.C. 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science* **209**:933-934.
- Callow, K.A., Parry, H.F., Sergeant, M., Tyrrell, D.A. 1991. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection in man. *Epidemiol Infect* **105**:435-446.
- Carrigan, D.R., Harrington, D., Knox, K.K. 1996. Subacute leukoencephalitis caused by CNS with human herpesvirus-6 manifesting as acute multiple sclerosis. *Neurology* **47**: 145-148.
- Cavanagh, D., Brian, D.A., Enjuanes, L. Holmes, K.V., Lai, M.M., Laude, H., Siddell, S.G., Spaan, W., Tagushi, F., Talbot, P.J. 1990. Recommendations of the Coronavirus Study Group for the nomenclature of the structural proteins, mRNAs, and genes of coronaviruses. *Virology* **176**:306-307.
- Challoner, P.B., Smith, K.T., Parker, J.D., MacLeod, D.L., Coulter, S.N., Rose, T.M., Schultz, E.R., Bennett, J.L. Garber, R.L., Chang, M., Schad, P.A., Stewart, P.M., Nowinski, R.C., Brown, J.P., Burmer, G.C. 1995. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7440-7444.
- Charley, B., Laude, H. 1988. Induction of alpha interferon by transmissible gastroenteritis coronavirus: role of transmembrane glycoprotein E1. *J Virol* **62**:8-11.
- Compton, S.R., Rogers, D.B., Holmes, K.V., Fertsch, D., Remenick, J., McGowan, J.J. 1987. *In vitro* replication of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* **61**:1814-1820.
- Conrad, A.J., Chiang, E.Y., Andeen, L.E., Avolio, C., Walker, S.M., Baumhefner, R.W., Mirzayan, R., Tourtelotte, W.W. 1994. Quantitation of intrathecal measles virus IgG antibody synthesis rate: Subacute sclerosis panencephalitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **54**:99-108.
- Correale, J., Mcmillan, M., Li, S., McCarthy, K., Le, T., Weiner, L.P. 1997. Antigen presentation by autoreactive proteolipid protein peptide-specific T cell clones from chronic progressive multiple sclerosis patients: roles of co-stimulatory B7 molecules and IL-12. *J Neuroimmunol* **72**:27-43.
- Cosby, S.L., McQuaid, S., Taylor, M.J., Barley, M., Rima, B.K., Martin, S.J., Allen, I.V. 1989. Examination of 8 cases of multiple sclerosis and 56 neurological and nonneurological controls for genomic sequences of measles virus, canine distemper virus, simian virus-5 and rubella virus. *J Gen Virol* **70**:2027-2036.

- Cossette, P., Duquette, P., Antel, J.P. 1998. Le rôle des cytokines et des molécules d'adhérence cellulaire dans la formation des lésions de la sclérose en plaques. *Médecine/Sciences* **14**:37-43.
- Daniel, C., Talbot, P.J. 1990. Protection from lethal coronavirus infection by affinity-purified spike glycoprotein of murine hepatitis virus, strain A59. *Virology* **174**(1):87-94.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. 1993. Neurones et propriétés électriques des membranes cellulaires. *Biologie moléculaire de la cellule*. 2e éd. par Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. éd. De Boek-Université, Bruxelles, 763-814.
- Dal Canto, M.C., Rabinowitz, S.G. 1982. Experimental models of virus-induced demyelination of the central nervous system. *Ann Neurol* **11**:109-127.
- Deber, C.M., Reynolds, S.J. 1991. Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clin Biochem* **24**:113-134.
- Delmas, B., Laude, H. 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol* **64**:5367-5375.
- Dubois-Dalcq, M.E., Holmes, K.V., Rentier, B. 1984. *Assembly of RNA viruses*. New-York: Springer-Verlag, 7.
- Duquette, P., Pleines, J., Girard, M., Charest, L., Senecal-Quévillon, M., Masse, C. 1992. The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* **19**:466-471.
- Ebers, G.C., Sadovnick, A.D. 1994. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol* **54**:1-17.
- Fritz, R.B., Skeen, M.J., Chou, C.H., Garcia, M., Egorov, I.K. 1985. Major histocompatibility complex-linked control of the murine immune response to myelin basic protein. *J Immunol* **134**:2328-2332.
- Fujinami, R.S., Oldstone, M.B.A. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**: 1043-1045.
- Godet, M., L'Haridon, R., Vautherot, J.F., Laude, H. 1992. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology* **188**:666-675.

- Goswami, K.K., Randall, R.E., Lange, L.S., Russell, W.C. 1987. Antibodies against the paramyxovirus SV5 in the cerebrospinal fluids of some multiple sclerosis patients. *Nature* **327**:244-247.
- Griffiths, G., Rottier, P. 1992. Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway. *Semin Cell Biol* **3**:367-381.
- Haase, A.T., Ventura, P., Gibbs, C.J., Tourtelotte, W.W. 1981. Measles virus nucleotide sequences: detection by hybridization *in situ*. *Science* **212**:672-674.
- Haegert, D.G., Marrosu, M.G., 1994. Genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Ann Neurol* **36**(S2):S204-S210.
- Harding, C.V., 1992. Electroporation of exogenous antigen into the cytosol for antigen processing and class I major histocompatibility complex (MHC) presentation: weak base amines and hypothermia (18 degrees C) inhibit the class I MHC processing pathway. *Eur J Immunol* **22**:1865-1869.
- Hauser, S.L., Goodkin, D.E., 1998. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14<sup>e</sup> Ed. Par Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.I., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L. McGraw-Hill Health Professions Division, New-York. 1075-1093.
- He, J., McCarthy, M., Zhou, Y., Chandran, B., Wood, C. 1996. Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *J Virol* **70**: 1296-1300.
- Hemmer, B., Vergelli, M., Tranquill, L., Conlon, P., Ling, N., McFarland, H.F., Martin, R. 1997. Human T-cell response to myelin basic protein peptide (83-99): extensive heterogeneity in antigen recognition, function and phenotype. *Neurology* **49**: 1116-1126.
- Hendley, J.O., Fishburne, H.B., Gwaltney, J.M. Jr. 1972. Coronavirus infections in working adults: eight-year study with 229E and OC43. *Am Rev Respir Dis* **105**:805-811.
- Hillert, J., Olerup, O. 1993. Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DQ6,Dw2 haplotype. *Neurology* **43**: 163-168.
- Holmes, K.V., Lai, M.M.C., 1996. *Coronaviridae: The viruses and their replication*. *Fields Virology* par Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B. Raven Press 3<sup>e</sup> Ed. Philadelphie. 1075-1093.

- Holmes, K.V., Welsh, R.M., Haspel, M.V. 1986. Natural cytotoxicity against mouse hepatitis virus-infected target cells. I. Correlation of cytotoxicity with virus binding to leukocytes. *J Immunol* **136**:1446-1453.
- Horsfall, A.C. 1992. Molecular mimicry and autoantigens in connective tissue disease. *Mol Biol Rep* **16**:139-147.
- Houtman, J.J., Fleming, J.O. 1996. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J Neurovirol* **2(6)**:361-376.
- Ibsen, S.N., Clausen, J. 1995. Genetic susceptibility to multiple sclerosis may be linked to polymorphism of the myelin basic protein gene. *J Neurol Sci* **131**:96-98.
- Ito, H., Okamoto, K., Nakayama, H., Isobe, T., Kato, K. 1997. Phosphorylation of alphaB-crystallin in response to various types of stress. *J Biol Chem* **272**:29934-29941.
- Johnson, R.C. 1985. Viral aspects of multiple sclerosis. *Handbook of clinical Neurology: Demyelinating Diseases*. vol. 3 par Koetsier JC *et al.* ed. Elsevier, Amsterdam, 319-336.
- Jouvenne, P., Mounir, S., Stewart, J.N., Richardson, C.D., Talbot, P.J. 1992. Sequence analysis of human coronavirus 229E mRNAs 4 and 5: evidence for polymorphism and homology with myelin basic protein. *Virus Res* **22**:125-141.
- Kienzle, T.E., Abraham, S., Hogue, B.G., Brian, D.A. 1990. Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinine-esterase protein. *J Virol* **64**:1834-1838.
- Koprowski, H., DeFreitas, E.C., Harper, M.E., Sandberg-Wollheim, M., Sheremata, W.A., Robert-Guroff, M., Saxinger, C.W., Feinberg, M.B., Wong-Staal, F. Gallo, R.C. 1985. Multiple sclerosis and human T-lymphotropic retroviruses. *Nature* **318**:154-160.
- Kuby, J. 1994. Antigen processing and presentation. *Immunology par Kuby, J. W. H.* Freeman and Company 2<sup>e</sup> Ed. New-York. 239-250.
- Künkel, F., Herrler, G. 1993. Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* **195**:195-202.
- Kurtzke, J.F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* **6**:382-427.
- Kurtzke, J.F. 1980. The geographical distribution of multiple sclerosis: an update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand* **62**:65-80.



- Lai, M.M. 1990. Coronavirus: organization, replication and expression of genome. *Ann Rev Microbiol* **44**:303-333.
- Larson, H.E., Reed, S.E., Tyrrel, D.A.J. 1980. Isolation of rhinovirus and coronaviruses from 38 colds in adults. *J Med Virol* **5**:221-229.
- Lee, H.J., Shieh, C.K., Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., La Monica, N., Tuler, J., Bagdzhadzhyan, A., Lai, M.M. 1991. The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene I encoding the putative proteases and RNA polymerase. *Virology* **180**:567-582.
- Liu, D.X., Inglis, S.C. 1991. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* **185**:911-917.
- Lovett-Racke, A.E., Martin, R., McFarland, H.F., Racke, M.K., Utz, U. 1997. Longitudinal study of myelin basic protein-specific T-cell receptors during the course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **78**: 162-171.
- Luytjes, W., Geerts, D., Posthumus, W., Meloen, R., Spaan, W. 1989. Amino acid sequence of a conserved neutralizing epitope of murine coronaviruses. *J Virol* **63**:1408-1412.
- Machamer, C.E., Rose, J.K. 1987. A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J Cell Biol* **105**:1205-1214.
- Macnaughton, M.R., Hasony, H.J., Madge, M.H., Reed, S.E. 1981. Antibody to virus components in volunteers experimentally infected with human coronavirus 229E group viruses. *Infect Immun* **31**:845-849.
- Macnaughton, M.R., Davies, H.A., Nermut, M.V. 1978. Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. *J Gen Virol* **39**:545-549.
- Marieb, E.N. 1993. Structure et physiologie du système nerveux. Anatomie et physiologie humaine. 2e Éd. par Marieb, E.N. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Canada, 340-377.
- Martyn, C.N., Cruddas, M., Compston, D.A. 1993. Symptomatic Epstein-Barr virus infections and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psych* **56**:167-168.
- Maugh, T.H. 1977. The EAE model: a tentative connection to multiple sclerosis. *Science* **195**:969-971.

- McIntosh, K. 1996. *Coronaviruses*. Fields Virology par Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B.. Raven Press 3<sup>e</sup> Ed. Philadelphie. 1095-1103.
- McIntosh, K. 1974. Coronaviruses: a comparative review. *Curr Top Microbiol Immunol* **63**:85-129.
- McIntosh, K., Kapikian, A.Z., Turner, H.C., Hartley, J.W., Parrott, R.H., Chanock, R.M. 1970. Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am J epidemiol* **91**: 585-592.
- Monto, A.S. 1974. Coronaviruses. *Yale J Biol Med* **47**:234-251.
- Mounir, S., Talbot, P.J. 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. *J Gen Virol* **73**:2731-2736.
- Murray, R.S., Brown, B., Brian, D., Cabirac, G.F. 1992a. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Ann Neurol* **31**:525-533.
- Murray, R.S., Cai, G.Y., Hoel, K., Zhang, J.Y., Soike, K.F., Cabirac, G.F. 1992b. Coronavirus infects and cause demyelination in primate central nervous system. *Virology* **188**:274-284.
- Myint, S.H. 1994. Human coronaviruses - a brief review. *Rev Med Virol* **4**:35-46.
- Nair, S., Zhou, F., Reddy, R., Huang, L., Rouse, B.T. 1992. Soluble proteins delivered to dendritic cells via pH-sensitive liposomes induce primary cytotoxic T lymphocyte responses *in vitro*. *J Exp Med* **175**:609-612.
- Norton, W.T. 1977. Isolation and characterization of myelin. *Myelin* par Morell, P. éd. Plenum Press, New-York, 161-190.
- Oger, J., Sabouraud, O., Arnason, B. 1987. Génétique de la sclérose en plaques. *Médecine/Sciences* **3**:13-18.
- Oksenberg, J.R. 1996. Immunogenetics and heterogeneity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **40**: 557-558.
- Oksenberg, J.R., Sherritt, M., Begovich, A.B., Erlich, H.A., Bernard, C.C., Cavall-Sforza, L.L., Steinman, L. 1989. T-cell receptor alpha and C alpha alleles associated with multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:988-992.

- Olerup, O., Hillert, J., Frederickson, S., Olsson, T., Kam-Hansen, S., Moeller, E., Carlsson, B., Wallin, J. 1989. Primary chronic progressive and relapsing/remitting multiple sclerosis: Two immunogenetically distinct disease entities. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:7113-7117.
- Oleszak, E.L., Perlman, S., Leibowitz, J.L. 1992. MHV S peplomer protein expressed by a recombinant vaccinia virus vector exhibits IgG Fc-receptor activity. *Virology* **186**:122-132.
- Panelius, M., Salmi, A., Halonen, P.E., Kivalo, E., Rinne, U.K., Pettinen, K. 1973. Virus antibodies in serum specimens from patients with multiple sclerosis, from siblings, and matched controls. A final report. *Acta Neurol Scand* **49**:85-107.
- Payment, P., Trudel, M. 1989. Manuel de techniques virologiques. par Payment, P., Trudel, M., Alain, R., Arella, M., Belloncik, S., Berthiaume, L., Fossiez, F., Hamelin, C., Houde, M., Jouvence, P., Lecomte, J., Lussier, G., Talbot, P., Verbeek, J.A., Fafard, A., Garzon, S. éd. Presses de l'Université du Québec, Canada, 107-119.
- Pearson, J., Mims, C.A. 1985. Differential susceptibility of cultured neural cells to the human coronavirus OC43. *J Virol* **53**:1016-1019.
- Pelfrey, C.M., Trotter, J.L., Tranquill, L.R., McFarland, H.F. 1993. Identification of a novel T cell epitope of human proteolipid protein (residues 40-60) recognized by proliferative and cytolytic CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cells from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* **46**:33-42.
- Pettinelli, C.B., McFarlin, D.E. 1981. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after *in vitro* activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for LyT1+2- T lymphocytes. *J Immunol* **127**:1420-1423.
- Raine, C.S., 1994. The Dale E. McFarlin memorial lecture: The immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* **36**:S61-S72.
- Reddy, R., Nair, S., Brynestad, K., Rouse, B.T. 1992. Liposomes as antigen delivery systems in viral immunity. *Semin Immunol* **4**:91-96.
- Rumsby, M.G. 1978. Organization and structure in central-nerve myelin. *Biochem Soc Trans* **6**:448-462.
- Sadovnick, A.D., Ebers, G.C. 1993. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci* **20**:17-29.

- Sadovnick, A.D., Baird, P.A., Ward, R.H. 1988. Multiple sclerosis: updated risk for relatives. *Am J Med Genet* **29**:533-541.
- Salmi, A., Ziola, B., Hovi, T., Reunanen, M. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* **32**:292-295.
- Schäger, H., von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**:368-369.
- Schmidt, O.W., Kenny, G.E. 1982. Immunogenicity and antigenicity of human coronaviruses 229E and OC43. *Infect Immun* **32**:1000-1006.
- Schultze, B., Herrler, G. 1992. Bovine coronaviruses N-acetyl-9-O-acetyl-neuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. *J Gen Virol* **73**:901-906.
- Seboun, E., Robinson, M.A., Doolittle, T.H., Ciulla, T.A., Kindt, T.J., Hauser, S.L. 1989. A susceptibility locus for multiple sclerosis is linked to the T-cell receptor beta chain complex. *Cell* **57**:1095-1100.
- Siddell, S.G., Anderson, R., Cavanagh, D., Fujiwara, K., Klenk, H.D., Macnaughton, M.R., Pensaert, M., Stohlman, S.A., Sturman, L., van der Zeijst, B.A. 1983. Coronaviridae. *Intervirology* **20**:181-189.
- Skegg, D.C.G. 1991. Multiple sclerosis - Nature or nurture. *Brit Med J* **302**:247-248.
- Sola, P., Merelli, E., Marasca, R., Poggi, M., Luppi, M., Montorsi, M., Torelli, G. 1993. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction. *J Neurol Neurosurg Psych* **56**: 917-919.
- Spielman, R.S., Nathanson, N. 1982. The genetics of susceptibility to multiple sclerosis. *Epidemiol Rev* **4**:45-65.
- Stauber, R., Pfeleiderera, M., Siddell, S. 1993. Proteolytic cleavage of the murine coronavirus surface glycoproteins not required for fusion activity. *J Gen Virol* **13**:6931-6940.
- Steinman, L., Oksenberg, J.R., Bernard, C.C.A. 1992. Association of susceptibility to multiple sclerosis with TCR genes. *Immunol Today* **92**:49-51.
- Stewart, J.N., Mounir, S., Talbot, P.J. 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* **191**:502-505.

- Stohlman, S.A., Baric, R.S., Nelson, G.N., Soe, L.H., Welter, L.M., Deans, R.J. 1988. Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. *J Virol* **62**:4288-4295.
- Stohlman, S.A., Kyuwa, S., Polo, J.M., Brady, D., Lai, M.M., Bergmann, C.C. 1993. Characterization of mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T cells derived from the central nervous system of mice infected with the JHM strain. *J Virol* **67**:7050-7059.
- Sturman, L., Holmes, K.V. 1985. The novel glycoproteins of coronaviruses. *Trends Biochem Sci* **10**:17-20.
- Sturman, L.S., Ricard, C.S., Holmes, K.V. 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. *J Virol* **56**:904-911.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J. 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol* **33**:449-462.
- Taguchi, F. 1993. Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. *J Virol* **67**:1195-1202.
- Talbot, P. 1995. Implication des virus dans la sclérose en plaques. *Médecine/Sciences* **11**:837-843.
- Talbot, P.J., Paquette, J.-S., Ciurli, C., Antel, J.P., Ouellet, F. 1996. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **39**:233-240.
- Talbot, P.J., Ékandé, S., Cashman, N.R., Mounir, S., Stewart, J.N. 1993. Neurotropism of human coronavirus 229E. *Adv Exp Med Biol* **342**:339-346.
- Tanaka, R., Iwasaki, Y., Koprowski, H.J. 1976. Intracisternal virus-like particles in the brain of a multiple sclerosis patient. *J Neurosci Res* **28**:121-126.
- Targoni, O.S., Lehmann, P.V., 1998. Endogenous myelin basic protein inactivates the high avidity T cell repertoire. *J Exp Med* **187**: 2055-2063.
- Tortora, G.J., Grabowski, S.R. 1994. Le tissu nerveux. Principes d'anatomie et de physiologie, nouvelle édition par Tortora, G.J., Grabowski, S.R., Centre Éducatif et Culturel Inc. Anjou. 360-389.
- Tyrrell, D.A.J., Bynoe, M.L. 1965. Cultivation of a novel type of common cold virus in organ cultures. *Br Med J* **1**:1467-1470.

- Utz, U., Biddison, M.E., McFarland, H.F., McFarlin, D.E., Flerlage, M., Martin, R. 1993. Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identical twins correlate with multiple sclerosis. *Nature* **364**:243-247.
- van Noort, J.M. 1996. Multiple sclerosis: an altered immune response or an altered stress response? *J Mol Med* **74**:285-286.
- van Noort, J.M., van Sechel, A.C., Bajramovic, J.J., el Ouagmiri, M., Polman, C.H., Lassmann, H., Ravid, R. 1995. The small heat-shock protein alphaB-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* **375**:798-801.
- Vlazak, R., Luytjes, W., Spaan, W., Palese, P. 1988. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:4526-4529.
- Wege, H., Schliephake, A., Korner, H., Flory, E. 1993. An immunodominant CD4<sup>+</sup> T cell site on the nucleocapsid protein of murine coronavirus contributes to protection against encephalomyelitis **74**:1287-1294.
- Willborn, F., Schmidt, C.A., Brinkmann, V., Jendroska, K., Oettle, H., Siegert, W. 1994. A potential role for human herpesvirus type 6 in nervous system disease. *J Neuroimmunol* **49**: 213-214.
- Willis, W.D. Jr. 1996. Nervous system. Principles of physiology. 2nd Ed. par Berne, R.M., Levy, M.N., Mosby-Year Book, Inc. St-Louis. 77-174.
- Wucherpfennig, K.W., Strominger, J.L. 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**:695-705.
- Wucherpfennig, K.W. 1994. Autoimmunity in the central nervous system: mechanisms of antigen presentation and recognition. *Clin Immunol Immunopathol* **72**:293-306.
- Wucherpfennig, K.W., Weiner, H.L., Hafler, D.A. 1991. T-cell recognition of myelin basic protein. *Immunol Today* **12**:277-282.
- Zamvil, S.S., Steinman, L. 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis *Annu Rev Immunol* **8**:579-621.
- Zhang, J.W., Markovicplese, S., Lacet, B. *et al.* 1994. Increased frequency of interleukin-2-responsive T cells specific for myelin basin protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* **179**:973-984.

Zhang, Y., Burger, D., Saruhan, G. *et al.* 1993. The T lymphocyte response against myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 43:403-407.