

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Mimétisme moléculaire coronavirus-myéline
dans la sclérose en plaques**

Par
Annie Boucher

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

Directeur de recherche	Pierre Talbot, INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier
Président du jury de thèse	Mathieu Cellier, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Nathalie Labrecque, Hôpital Maisonneuve-Rosemont
Examineur externe	Walid Mourad, Université Laval

RÉSUMÉ

Une composante du système immunitaire acquis est l'habileté des lymphocytes T à répondre contre les antigènes étrangers tout en demeurant tolérants au soi. Pour établir cette tolérance, les lymphocytes utilisent leur récepteur T (RCT) afin de reconnaître spécifiquement des peptides antigéniques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH): les lymphocytes réagissant fortement contre des peptides du soi ont été déplétés par le processus de sélection négative. Une sélection positive régira la reconnaissance antigénique restreinte par le CMH. Cependant, il reste toujours en circulation dans l'organisme un mince pourcentage de cellules T autoréactives non-activées qu'un éventuel bris de tolérance pourrait stimuler. Différents mécanismes sont donc à considérer pour l'activation de lymphocytes autoréactifs. Ainsi, une activation non spécifique, tel un contexte inflammatoire, favoriserait la réactivité immunitaire. Des dommages tissulaires pourraient aussi être une nouvelle source de molécules antigéniques, la réponse immunitaire se trouvant finalement amplifiée suite à l'augmentation du répertoire de peptides endogènes rendus accessibles (propagation de déterminants). Les superantigènes pourraient aussi activer les lymphocytes de façon indépendante du complexe CMH-peptide. Le mimétisme moléculaire, c'est-à-dire lorsqu'un peptide étranger partage des déterminants antigéniques avec le soi, est un autre processus pouvant mener vers une reconnaissance antigénique croisée par le RCT et induire l'autoimmunité. C'est sur cette hypothèse que nous travaillons, mais par divers mécanismes, une réponse immunitaire pourrait donc déclencher, maintenir ou amplifier une réaction contre le soi et/ou un éventuel processus pathologique.

C'est dans ce contexte que nous nous intéressons à la sclérose en plaques (SEP). Cette maladie autoimmunitaire du système nerveux central (SNC), dont l'origine semble comporter des composantes génétiques et environnementales, implique des réactions immunitaires contre la myéline. La SEP est une pathologie aux multiples visages. Cependant une constante demeure: l'activation de lymphocytes T anti-myéline.

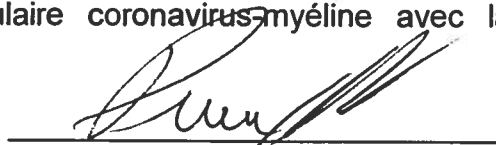
Les coronavirus sont des pathogènes respiratoires, mais également neurotropes et neuroinvasifs, des signes indubitables confirmant leur présence au SNC. Comme les coronavirus murins causent, chez un hôte susceptible, une maladie qui s'apparente beaucoup à la SEP, le coronavirus humain est étudié comme un des agents étiologiques potentiels dans la SEP. Le laboratoire du docteur Talbot a montré la présence hautement significative de réactions antigéniques croisées coronavirus-myéline chez les lymphocytes de patients atteints de SEP, lorsque comparés à ceux de témoins sains. Cette observation ayant été réalisée chez des lignées lymphocytaires, il importait de valider l'hypothèse avec des clones lymphocytaires pour montrer que ce phénomène de réaction croisée coronavirus-myéline était attribuable à un seul lymphocyte.

Mon projet de doctorat s'insérait donc dans cette problématique, par la vérification du caractère clonal des réactions croisées coronavirus-myéline. Ce mimétisme moléculaire décrit un élégant mécanisme pouvant potentiellement initier ou maintenir les attaques immunitaires contre la myéline. Brièvement, un total de 145 clones T monospécifiques pour les antigènes de la myéline et coronaviraux ont pu être produits du sang périphérique de 32 patients atteints de SEP. On note que 80% des clones monospécifiques reconnaissent un épitope viral. Un total de 10 clones lymphocytaires antigéniquement croisées pour ces même antigènes ont également été obtenus, avec six sélectionnés à partir des antigènes viraux, et quatre par les antigènes de la myéline. Puis, six clones T, disponibles pour analyse, furent étudiés au niveau moléculaire afin de caractériser la chaîne V β du RCT, suite à des amplifications par polymérisation en chaîne et du séquençage. La famille de la chaîne β ainsi que la portion hypervariable du récepteur de cellule T furent identifiés.

Les travaux présentés dans cette thèse suggèrent donc fortement le caractère clonal des réactions croisées coronavirus-myéline. Néanmoins, l'association pathologique du mimétisme moléculaire coronavirus-myéline avec la SEP demeure à valider.



Étudiant



Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	2
TABLE DES MATIÈRES	4
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
PRÉFACE	12
 CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	 13
 1.0 LA SCLÉROSE EN PLAQUES	 14
1.1 Description	14
1.2 Patron de distribution	16
1.3 Susceptibilité génétique	17
1.4 Facteurs environnementaux et association virale	19
1.5 Modèles animaux	20
1.5.1 Protéiques	21
1.5.2 Viraux	22
1.6 Cytokines associées à la pathologie	23
 2.0 LA RECONNAISSANCE IMMUNITAIRE PAR LE LYMPHOCYTE T	 24
2.1 Le lymphocyte T: maturation cellulaire et éducation du récepteur	24
2.2 Costimulation et signalisation	27
2.3 Culture long-terme de lymphocytes T primaires: clonage cellulaire	28
 3.0 L' AUTOIMMUNITÉ	 32
3.1 La tolérance et le bris de tolérance	32
3.2 Les autoantigènes	33
3.2.1 Protéine basique de la myéline (MBP)	33
3.2.2 Protéine protéolipidique (PLP)	34
3.2.3 Autres protéines du SNC	35
3.2.4 Protéines hétérogènes autoantigènes	36

3.3 Mécanismes proposés pour l'activation de lymphocytes autoréactifs	36
3.3.1 Superantigènes	36
3.3.2 Inflammation et propagation de déterminants	37
3.3.3 Mimétisme moléculaire	38
 4.0 LES CORONAVIRUS	 41
4.1 Nomenclature et propriétés structurales	41
4.2 Protéines structurales et non-structurales	42
4.3 Cycle réplcatif	43
4.4 Infection par le coronavirus murin (MHV)	44
4.5 Infection par le coronavirus humain (HCoV) et pathogenèse	45
 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	 47
 CHAPITRE 2: MÉTHODOLOGIE	 49
 1.0. PRODUCTION DE CLONES CELLULAIRES DE LYMPHOCYTES T (TCC) PRIMAIRES HUMAINS POUR CULTURE À LONG-TERME, À PARTIR DU SANG PÉRIPHÉRIQUE	 50
1.1 Sélection des participants	51
1.2 Antigènes utilisés	51
1.3 Production de clones lymphocytaires humains	51
1.4 Test d'incorporation de thymidine-tritiée:spécificité antigénique	54
1.5 Typage HLA-DR des participants	56
 2.0 CARACTÉRISATION DE PHÉNOTYPE ET DE RÉCEPTEUR T	 56
2.1 Préparation des échantillons d'ARN	56
2.2 Vérification du phénotype CD4 ⁺ ou CD8 ⁺ des TCC	57
2.3 Caractérisation moléculaire de la chaîne β du RCT	59
2.4 Validation de la clonalité	62

CHAPITRE 3: RÉSULTATS	65
1.0 DESCRIPTION DE LA COHORTE DE PARTICIPANTS	66
1.1 Présentation de la cohorte	66
1.1.1 Âge, genre, type de SEP et typage HLA	67
1.1.2 Total des clones obtenus selon les participants	67
2.0 PRODUCTION ET CULTURE DE CLONES LYMPHOCYTAIRES	68
2.1 Clones lymphocytaires monospécifiques	68
2.1.1 Clones monospécifiques	68
2.1.2 Phénotype CD4 ou CD8	68
3.0 CROISSANCE, PROLIFÉRATION ET CONSERVATION	69
3.1 Profils de croissance observés après trois et quatre stimulations	69
3.2 Patron de l'intensité de stimulation pour quatre clones lymphocytaires T	70
3.3 Profils de prolifération après congélation	70
4.0 OBTENTION DE CLONES LYMPHOCYTAIRES ANTIGÉNIQUEMENT CROISÉS POUR LES ANTIGÈNES CORONAVIRAUX ET CEUX DU SNC	71
4.1 Bilan des clones lymphocytaires T mono- et bi-spécifiques produits	71
4.2 Description des clones antigéniquement croisés obtenus	72
4.3 Caractérisation moléculaire des cinq clones lymphocytaires croisés étudiés	75
4.4 Analyses de diversité	77
CHAPITRE 4: DISCUSSION	105
1.0 SOMMAIRE	106
1.1 Retours sur les hypothèses de départ	107

1.2	Étapes expérimentales principales	108
2.0	PRODUCTION DE CLONES LYMPHOCYTAIRES T PRIMAIRES SPÉCIFIQUES POUR CULTURE À LONG-TERME	109
2.1	Protocole expérimental	110
2.2	Variabilité des cultures, problèmes inhérents de croissance cellulaire et de longévité des cultures <i>in vitro</i>	113
2.3	Nature des antigènes étudiés	116
2.4	Production de clones lymphocytaires T primaires croisés et mimétisme moléculaire	119
3.0	CONCLUSION GÉNÉRALE	124
	REMERCIEMENTS	126
	BIBLIOGRAPHIE	128
ANNEXE I:	LISTE DES PUBLICATIONS	156
	LISTE DES COMMUNICATIONS	156
ANNEXE II:	ARTICLES	158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Description des amorces utilisées lors de ce projet pour l'amplification de portions des gènes suivants: CD4 (humain), CD8 (humain), β -actine (humain), GAPDH (humain) et régions hypervariables de chaînes β du RCT (humain).	64
Tableau 2:	Description de la cohorte de patients atteints de SEP ayant permis la production de clones lymphocytaires T primaires à long-terme mono et bi spécifiques, au niveau de leur reconnaissance antigénique.	79
Tableau 3:	Bilan total de la production de clones lymphocytaires T primaires à long-terme monospécifiques obtenus.	81
Tableau 4:	Évolution de la cinétique de prolifération cellulaire dans le temps pour les troisième et quatrième stimulations antigéniques avec l'antigène de sélection.	85
Tableau 5:	Résultats de tests de prolifération obtenus pour trois clones lymphocytaires T monospécifiques du patient 7: ces clones ont été congelés puis remis en culture.	89
Tableau 6:	Bilan de tous les clones lymphocytaires T produits de patients atteints de SEP.	93
Tableau 7:	Résultats obtenus pour le test d'incorporation de thymidine-tritiée pour dix clones lymphocytaires T antigéniquement croisés.	94
Tableau 8:	Inhibition d'apoptose de lymphocytes T humains primaires issus du sang périphérique.	97

Tableau 9: Clones lymphocytaires T de spécificité antigénique croisée coronavirus-myéline étudiés au niveau moléculaire pour l'identification de la chaîne β de leur RCT.	99
Tableau 10: Démonstration de l'homogénéité des clones bactériens obtenus par amplification PCR diversité.	101

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Représentation de l'interaction RCT-peptide-CMH de classe II.	29
Figure 2:	Démonstration du phénotype CD4+ des clones lymphocytaires T monospécifiques étudiés par amplification PCR.	83
Figure 3:	Exemples typiques de prolifération antigène-spécifique de quatre clones lymphocytaires T monospécifiques de patients atteints de SEP.	87
Figure 4:	Réactivité antigénique pour le peptide MBP 84-102 chez un clone lymphocytaire croisé.	91
Figure 5:	Gel d'agarose typique de l'amplification PCR diversité.	103

LISTE DES ABRÉVIATIONS

C:	Celsius
C β :	Chaîne constante beta
CDR:	Région complémentaire (<i>Complementary determining region</i>)
CPA:	Cellule présentatrice d'antigène
D:	Portion diversité
DEPC:	Di-éthyle pyrocarbonate
HCoV:	Coronavirus humain
HCoV-229E:	Souche 229E du coronavirus humain
HCoV-OC43:	Souche OC43 du coronavirus humain
I.S.:	Indice de stimulation
IL:	Interleukine
J:	Portion de jonction
kDa:	Kilo Dalton
M:	Molaire
MBP:	Protéine basique de la myéline
Min:	Minute
mL:	Millilitre
μ L:	Microlitre
ND:	Non déterminé
nm:	Nanomètre
PBL:	Leucocytes du sang périphérique
PBMC:	Cellules mononuclées du sang périphérique
PCR:	Réaction de polymérisation en chaîne
PHA:	Phytohémagglutinine A
PLP:	Protéine protéolipidique
RACE:	Amplification d'extrémités de cDNA (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)
rad:	Unité d'irradiation
RCT:	Récepteur de cellule T
RT-PCR:	Transcription inverse couplée à la polymérisation en chaîne (<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>)
Sec:	Seconde
SEP:	Sclérose en plaques
SNC:	Système nerveux central
TCC:	Clone de lymphocytes T humains primaires
TCL:	Lignée de lymphocytes T humains primaires
U:	Unité
V:	Portion variable
V β :	Chaîne variable beta

PRÉFACE

Les travaux de cette thèse sont présentés sous forme de dissertation conventionnelle, les articles scientifiques en découlant étant présentement en rédaction. L'auteur de cette thèse a réalisé l'ensemble des expériences décrites. L'apprentissage des techniques de cultures cellulaires de même que la mise au point du protocole de clonage de lymphocytes T primaires du sang périphérique a été réalisé en collaboration avec Ginette Mercier. Les échantillons viraux ayant servis lors de ce protocole ont été produits par Francine Lambert. Les travaux ont été dirigés par le docteur Pierre Talbot à titre de directeur et sous la codirection du docteur François Denis. Le docteur Pierre Duquette dirige la Clinique de Sclérose en Plaques du CHUM, Montréal, Québec, Canada, et fut en étroite collaboration, servant de point de contact et de référence avec les patients atteints de SEP, pour la durée complète de ce projet.

Au cours de ses travaux de doctorat, l'auteur de cette thèse a aussi contribué à des publications à titre d'invitée; ces dernières sont également présentées sous forme de tirés-à-part, en annexe à cette thèse, avec la liste des communications orales dont les résultats présentés dans cette thèse ont fait l'objet.

CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 LA SCLÉROSE EN PLAQUES

1.1 Description

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie complexe du système nerveux central (SNC), d'étiologie encore inconnue. Elle apparaît d'abord très variable au niveau des symptômes cliniques et chez plusieurs patients des tremblements, engourdissements, anomalies visuelles et motrices, ainsi que de la faiblesse sont souvent observés (Paty et Ebers, 1998). Les régions du SNC atteintes par la démyélinisation reflètent souvent la sévérité des symptômes et les signes cliniques observés. La gaine de myéline, qui forme un isolant axonal permettant la transduction efficace de l'influx nerveux, est la cible de cette pathologie inflammatoire; la perte du signal nerveux consécutive aux dommages à la myéline signifie donc souvent l'apparition des symptômes cliniques.

La SEP est catégorisée sous différentes formes de la maladie, selon la sévérité des symptômes et leur évolution. Une forme caractérise les débuts de la maladie, pour environ 85% des cas, et est décrite comme une forme cyclique avec des phases de rechutes et remissions, où les attaques successives ne laissent d'une fois à l'autre que peu ou pas de déficit neurologique résiduel. Une autre forme de la maladie dite progressive, se traduit par l'évolution dans le temps de la forme de rechutes et remissions, lorsque les déficits se cumulent; il n'y a plus récupération complète entre les épisodes de SEP. La troisième forme, dite chronique, touche 15% des patients et montre une progression lente et constante de la gravité de la maladie, ce à partir des symptômes initiaux. Le dernier type de SEP est agressif et fulgurant, décrit comme aiguë. La gravité des signes cliniques conduira vers la mort en quelques mois (Coyle, 1996). À ce jour, aucune médication ne guérit aucun type de SEP. Dans certains cas, des traitements peuvent cependant diminuer la sévérité des symptômes ou retarder les rechutes.

Les changements pathologiques associés à la SEP ont été élucidés à travers des études sur le modèle de l'encéphalite allergique expérimentale (EAE; ce modèle sera décrit plus tard), mais aussi étudiés grâce aux biopsies et autopsies réalisées chez l'humain. La démyélinisation, l'inflammation et la gliose sont définies comme typiques de la SEP. De plus, des plaques de démyélinisation et de remyélinisation sont observées. La démyélinisation affecte la matière blanche du SNC, avec prédilection les régions périventriculaires, du tronc cérébral/moelle épinière et du nerf optique, mais peut affecter parfois la matière grise. Les lésions à la gaine de myéline pourront être de nature aiguë ou chronique. Une lésion aiguë met souvent en présence des lymphocytes T, B ainsi que des monocytes/macrophages exprimant les CMH-II et nettoyant les bris occasionnés à la myéline. La myéline étant formée par les replis cytoplasmiques des oligodendrocytes, ces derniers tendent à diminuer en nombre dans ce type de lésion, alors qu'une faible prolifération d'astrocytes (ces derniers exprimant B7-1 et B7-2) est notée. Il y a également production de cytokines, d'immunoglobulines, de lipases et de protéases (Martino, 2000). Par ailleurs, la lésion chronique semble non-inflammatoire, caractérisée par l'absence de myéline et une forte gliose. Les oligodendrocytes sont tous disparus de cette région et il ne reste que des axones démyélinisés entourés d'astrocytes qui leur servent de support. La remyélinisation limitée dans la SEP serait même reliée à la surexpression de la voie de signalisation de Notch, cette voie est augmentée suite à l'expression de TGF- β 1 qui induit la production de la molécule *Jagged1*, un inhibiteur de croissance chez les oligodendrocytes primaires (John *et al.* 2002). Les astrocytes présents aux lésions chroniques expriment des molécules du CMH de classe II (Zeinstra et al., 2003). Chez les patients atteints de SEP, des dommages sont aussi portés à la barrière hémato-encéphalique. Cette dernière ne régit donc plus aussi efficacement l'entrée des molécules dans le SNC (Hunter et Rodriguez, 1995; Moore, 1998).

Les modifications pathologiques les plus précoces, au niveau de l'infiltration cellulaire, impliquent la pénétration des lymphocytes du sang périphérique vers le SNC. Initialement, les lymphocytes CD4+ prédominent et enclenchent la

cascade immunitaire qui culminera vers la formation d'une plaque de démyélinisation (Coyle, 1996). Cette maladie du SNC est en effet la résultante des réponses autoimmunitaires de lymphocytes qui reconnaissent des antigènes de la myéline. Mais la conséquence directe des dommages tissulaires est associée au patron de cytokines sécrétées et à la présence de macrophages recrutés au SNC (Hartung et Rieckmann, 1997; Minohara *et al.*, 2001). Les cytokines associées à cette pathologie seront discutées à la section 1.6.

1.2 Patron de distribution

La prévalence de la SEP semble augmenter à mesure que l'on s'éloigne de l'Équateur, cependant le risque d'incidence de la maladie n'est pas associé au climat. Un gradient géographique nord-sud présente un patron de distribution de la maladie dans l'hémisphère sud, les populations du nord ayant une plus forte prévalence à la maladie. En effet, les zones industrialisées sont celles qui démontrent de plus forts taux de SEP (Willer et Ebers, 2000). Des études épidémiologiques de migration ont montré que le risque de développer la maladie est potentiellement établie avant l'âge de 15 ans (Kurtzke, 1993). En effet, les gens qui immigreront après l'adolescence montrent un pourcentage de SEP associé à leur pays d'origine, alors que les enfants d'immigrants auront une incidence à développer la maladie liée au pays hôte (Gale et Martyn, 1995). Ainsi, un pays à prévalence élevée de la SEP, tel le Canada ou le nord des Etats-Unis, par exemple, compte environ 30 personnes ou plus sur 100 000 résidents affectées par la maladie. Le sud des Etats-Unis et le nord des pays scandinaves sont des régions à titre de prévalence dite moyenne avec 5 à 29 cas par 100 000 habitants. Une faible prévalence de la maladie est observée, notamment en Afrique, en Asie et au Mexique, avec moins de 5 cas par 100 000 habitants (Kurtzke, 1993).

Les études épidémiologiques sont cependant formelles: des facteurs génétiques et environnementaux sont associés à la SEP, une pathologie complexe aux multiples visages.

1.3 Susceptibilité génétique

La SEP est une maladie qui touche avec prédilection les jeunes adultes. Les hormones femelles semblent conférer un degré limité de susceptibilité génétique, alors que la pathologie frappe particulièrement les femmes (Duquette, 1992; Whitacre, 1999). De plus, les études réalisées sur des jumeaux identiques ne montrent que 30% de concordance entre jumeaux, pour ce qui concerne les chances de développer la SEP (Sadovnick, 1993), ce qui indique une contribution génétique dans l'incidence de développer cette dernière, tout en suggérant également l'impact de l'environnement. Effectivement, la maladie est souvent définie comme polygénique et multifactorielle.

Les prédispositions génétiques impliquent notamment les gènes candidats suivants: les antigènes leucocytaires humains (HLA), le facteur nécrosant des tumeurs (TNF), le récepteur de cellules T (RCT) ainsi que le répertoire personnel de lymphocytes T par la surexpression de certaines familles chez un individu, le facteur transformant de croissance (TGF), la protéine basique de la myéline (MBP), la protéine 4 associée au lymphocyte cytotoxique (CTLA-4) et les chimiokines et cytokines (Utz *et al.*, 1993; Dyment *et al.*, 1997; Sawcer *et al.*, 1998; Haegert *et al.*, 1999; Schmidt 1999). Cependant, à l'exception des gène HLA-DRB1*1501 pour lesquels les études de liaison génétique ont montré la plus grande association à la pathologie, la reproductibilité des analyses est peu constante en ce qui a trait à la liaison des autres gènes candidats avec la SEP (Ebers *et al.*, 1996; Sadovnick *et al.*, 1996; Haines *et al.*, 1996; Ridgway *et al.*, 1999; Willer et Ebers, 2000).

Ainsi, un composant du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), l'haplotype de HLA-DR2 (DRB1*1501) est plus fréquemment retrouvé chez les patients atteints de SEP, particulièrement chez les caucasiens (Ebers, 1982; Hillert, 1994). D'autres haplotypes ont ponctuellement aussi été associés ou liés à la SEP (Marrosu *et al.*, 1998; Weinshenker *et al.*, 1998). Il importe cependant de noter que le facteur génétique DRB1*1501 ne confère pas automatiquement une prédisposition à la maladie. Il pourrait toutefois être en déséquilibre de liaison avec un autre gène candidat conférerait une susceptibilité génétique significative. Récemment, une souris transgénique pour le HLA classe II montrait que la réponse immunitaire envers la MOG (glycoprotéine des oligodendrocytes associés à la myéline) était restreinte par la présentation dans le CMH de classe II (Khare *et al.*, 2003). Le polymorphisme potentiel du TNF ne semble pas contribuer quant à lui à la susceptibilité ou à la sévérité de la SEP (Trojano *et al.*, 1999). Les gènes CTLA-4, IL-2RB et IL-1Ra pourraient être associés à la maladie, alors que les facteurs C6 et C7 du complément ne présentent aucune association préférentielle (Sciacca *et al.*, 1999; Chataway *et al.*, 1999; Reboul *et al.*, 2000). L'enzyme protéolytique calpaïne, une protéinase, serait régulée à la hausse autour de plaques de démyélinisation (Shields *et al.*, 1999). Un gène candidat récent est celui du Cbl-b. Il code un adaptateur moléculaire et son absence confère, chez la souris *knockout*, une plus grande susceptibilité à la EAE (Bachmaier *et al.*, 2000). Des études tentent aussi de montrer un lien entre la SEP et le récepteur de chimiokine 5 (CCR5); les patients atteints de SEP sembleraient avoir une plus forte présence de ce récepteur dans le sang périphérique (Strunk *et al.*, 2000). Dans la EAE, l'IL-12 stimule l'expression du récepteur CCR5 des lymphocytes T anti-myéline. (Bagaeva *et al.*, 2003).

Une contribution génétique dans la SEP apparaît évidente, malgré le fait que plusieurs gènes candidats reliés à la pathologie ne permettent pas de tirer des conclusions solides et universelles. Récemment, aux études de liaison génétique (*linkage*) s'ajoutaient des études analysant le polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide (SNP). Alors qu'un total de 10 millions de SNP seraient répertoriés dans le génome humain, 71 000 patrons sont étudiés comme étant autant

d'haplotypes différents pouvant indiquer une susceptibilité génétique dans le cas d'une maladie complexe comme la SEP (Daly *et al.*, 2001).

1.4 Facteurs environnementaux et association virale

Des épidémiologistes ont démontré qu'une exposition à certains pathogènes viraux avant la puberté pouvait augmenter le risque de développer la SEP et que des infections du tractus respiratoire précèdent souvent les rechutes/attaques de la maladie (Sibley *et al.*, 1985; Andersen *et al.*, 1993; Panitch *et al.*, 1994; Marrie *et al.*, 2000). Le virus epstein-barr pourrait conférer une certaine susceptibilité à développer la SEP (Levin *et al.*, 2003). De plus, comme des virus ont été impliqués dans l'induction d'autres maladies neurologiques humaines, notamment l'encéphalopathie induite par le VIH (Spencer et Price, 1992), la myélopathie induite par le rétrovirus T-lymphotrope humain-1 (HTLV-1) (Osame *et al.*, 1986; Olson *et al.*, 2002), la SEP est grandement soupçonnée, elle aussi, de comporter une implication virale.

À ce jour, plusieurs virus ont été associés à la SEP à un moment ou un autre, mais il demeure difficile de tirer des conclusions sur des infections déclenchant potentiellement la pathologie. Une réponse élevée en IgM contre une protéine précoce du virus herpès humain de type 6 (HHV-6) de même que la détection de l'ADN de ce virus dans le sérum de patients touchés par la SEP (Soldan *et al.*, 1997; Tejada-Simon *et al.*, 2002), l'activation polyclonale de la famille lymphocytaire T V β 16, par des particules rétrovirales (Perron, *et al.*, 2001), la présence de coronavirus humain dans le SNC et l'activation de lignées de lymphocytes T antigéniquement croisées coronavirus-myéline (Talbot *et al.*, 1996, Arbour *et al.*, 2000) et l'expression de l'antigène T du virus JC chez les patients (Del Valle *et al.*, 2002) ne sont que tant d'exemples typiques de virus candidats qui ponctuent la littérature. Plusieurs associations sont parfois confirmées, puis ensuite contredites par d'autres équipes, comme fut le cas pour HTLV-1 qui est responsable d'une myélopatie qui s'apparente à la SEP (Ehrlich *et al.*, 1991). De plus, la présence d'un virus dans le SNC ne témoigne pas

indubitablement de son association à un quelconque processus pathologique. Les virus ayant un potentiel neurotrope demeurent cependant des candidats de choix dans les recherches étiologiques sur la SEP, pour des raisons évidentes.

La rigueur des conditions expérimentales et le choix des individus composant la cohorte à l'étude sont deux facteurs pouvant faire varier les résultats obtenus dans des études impliquant des patients. L'association d'un virus en particulier comme agent initiateur de la SEP n'a en effet pas encore été démontrée. Les virus pourraient jouer un rôle à différents moments, soit dans le déclenchement, soit dans le maintien de la maladie ou soit par l'activation de lymphocytes T autoréactifs et le bris de tolérance. Cependant, il est à considérer que les résultantes immunopathologiques observées au SNC apparaissent parfois longtemps après le déclenchement de la maladie (Oldstone, 1998). Une infection virale peut également amorcer une réaction autoimmunitaire dirigée contre le SNC, chez des animaux, longtemps après que l'infection soit éradiquée (Theil *et al.*, 2001). Une réponse immunitaire rapide et efficace, semble aussi limiter l'infection et ainsi protéger de l'autoimmunité (Stebbins et Galan, 2001). Cependant, il importe aussi de considérer, qu'en fonction de la susceptibilité génétique impliquée, différents virus aient le potentiel d'initier, chez l'individu, une réponse immunopathologique.

1.5 Modèles animaux

Afin d'élucider la pathogenèse de maladies humaines démyélinisantes du SNC, les modèles animaux sont essentiels. Bien que la SEP ne soit observée et définie comme telle que chez l'humain, différents modèles animaux serviront entre autre à étudier en détail l'autoimmunité en permettant, par exemple, la caractérisation cellulaire ou/et moléculaire des cellules associées et des molécules impliquées. Alors que certains modèles protéiques, provoquant la démyélinisation, pourront stimuler l'action de lymphocytes CD4+, un modèle viral déclenchera une réponse CD8+ (Sriram et Rodriguez, 1997; Miller *et al.*, 1998).

Comme l'étiologie de la SEP demeure inconnue à ce jour, il est important de considérer tous les mécanismes d'action potentiellement impliqués afin de montrer l'origine de la maladie, mais aussi pour développer éventuellement une approche thérapeutique. La SEP étant complexe, plusieurs candidats pourraient être impliqués dans l'initiation de la pathologie, selon des mécanismes d'action individuels ou combinés. Plusieurs modèles animaux sont disponibles pour l'étude de la démyélinisation.

1.5.1 Protéiques

L'injection de protéines du SNC, telles la MBP (Pettinelli *et al.*, 1982), la protéine protéolipidique (PLP) (Tuohy *et al.*, 1988), la protéine de la myéline associée aux oligodendrocytes (MOG) (Mendel *et al.*, 1995), une émulsion de membrane de cellules endothéliales cérébrales (Tsukada *et al.*, 1987) ou la protéine de la myéline associée aux astrocytes (MAG) (Morris-Downes *et al.*, 2002), émulsionnées individuellement ou en combinaison dans l'adjuvant complet de Freund (supplémenté de mycobactéries tuées), peut provoquer une autoimmunité anti-myéline chez l'hôte susceptible. Ces protéines sont décrites comme encéphalitogéniques chez un animal génétiquement sensible. En effet, la génétique de l'hôte joue un rôle important dans le développement de l'immunopathologie (Encinas *et al.*, 1997). Le type de démyélinisation induite par l'injection de protéines du SNC est la EAE; cette encéphalite est la résultante de l'activation de la microglie, de la production de cytokines proinflammatoires et de l'activation de lymphocytes CD4⁺ (Sriram et Rodriguez, 1997). Il est aussi possible de provoquer la EAE en utilisant des extraits de ganglions d'un animal immunisé, stimulés *in vitro*, puis finalement réinjectés dans l'hôte.

Les symptômes obtenus suite à l'induction de EAE chez l'animal s'apparentent avec ceux observés dans la SEP. Une paralysie frappe les membres supérieurs et se propage vers la tête. Les signes aiguës de la maladie peuvent s'étendre sur 3-4 jours, puis s'ensuit une rémission graduelle complète. La maladie sera chronique, ponctuée de rechutes et de rémissions (Encinas *et al.*, 1996). La

démyélinisation induite dans la EAE n'implique pas directement les lymphocytes T CD4⁺ dans une atteinte à la myéline, car les oligodendrocytes n'expriment pas le CMH-II, ligands naturels du RCT. Cependant, les CD4⁺ contribuent au maintien de la réponse inflammatoire, la EAE étant une maladie médiée par les T auxiliaires de type-1 (Kuchroo *et al.*, 1993). Ce modèle est de plus étudié en ce qui concerne la réponse immunitaire dans le cas d'une autoimmunité démyélinisante, mais aussi dans des études de génétique; il est proposé que les gènes impliqués dans la possibilité de conférer la EAE pourraient aussi être impliqués dans la SEP. Ainsi, des modèles génétiques animaux sont souvent étudiés, la technologie transgénique utilisée pour inhiber ou surexprimer l'expression d'un gène. Les maladies démyélinisantes du SNC et l'impact des molécules inflammatoires sont largement étudiés à travers l'expression ou la répression de gènes de cytokines inflammatoires ou de chimiokines par exemple (Owens *et al.*, 2001).

1.5.2 Viraux

Bien que plusieurs modèles viraux existent pour l'étude de pathologies démyélinisantes humaines du SNC, ils partagent souvent entre eux des caractéristiques, tels le neurotropisme, la neurovirulence et la neuroinvasion virale. Les virus les plus étudiés pour leur capacité d'induire, à des degrés variables, la démyélinisation au SNC sont le virus Theiler, les virus de l'hépatite de la souris (MHV), le virus Visna Maedi, le virus de la forêt de Semliki et le virus du distemper canin (Kastrukoff et Rice, 1998). Alors que des déterminants de l'hôte contribuent à la pathogenèse, des facteurs viraux semblent conférer également un potentiel plus ou moins marqué quant à la capacité d'induction de démyélinisation. Une phase aiguë de la maladie est souvent suivi d'une période désignée comme chronique, telle que définie ci-haut dans les modèles protéines-induits; la réponse immunitaire orchestre la perpétuation de la pathologie.

Finalement, la persistance virale ainsi que la latence caractérisent souvent les modèles viraux. La latence est définie par l'absence de la traduction des gènes

qui seraient habituellement produits lors d'une infection virale productive; il n'y a pas d'expression virale significative, mais plutôt l'activation de mécanismes de transcription associés à la latence (Flint *et al.*, 2000). Lors de la période de latence, aucun virus extra-cellulaire ne peut être détecté. La production de virus, souvent sur de longues périodes et sans qu'il y ait cytolysse, est propre à l'infection persistente (Flint *et al.*, 2000). Ainsi, différents virus induiront ces différentes stratégies de latence ou persistance afin d'éviter les défenses de l'hôte. Ainsi, des virus en latence ou en persistance une fois réactivés pourront déclencher ou maintenir une éventuelle réponse autoimmunitaire, longtemps après l'infection initiale.

1.6 Cytokines associées à la pathologie

La présence d'inflammation aux plaques de démyélinisation dans le SNC de patients souffrant de SEP se traduit par la présence de lymphocytes T anti-myéline, de lymphocytes B sécrétant des anticorps anti-myéline, ainsi que par un grand nombre d'effecteurs mononucléés non-spécifiques (surtout des macrophages) (Lucchinetti *et al.*, 1996; Marino et Hartung, 1999). Le patron des cytokines proinflammatoires retrouvé (protéines et ARNm) au niveau des plaques de démyélinisation actives est caractérisé par la présence de TNF- α , IL-1 β et IL-6 (Esiri et Gray, 1997). Les médiateurs inflammatoires secondaires identifiés à ces plaques et dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de SEP sont surtout des chimiokines et le facteur stimulant des colonies (CSF) (Sorensen *et al.*, 1999). Maintes études élaborent aussi sur des patrons précis de sécrétion de certains clones lymphocytaires T spécifiques à une des composantes de la myéline. Chez un individu sain, la somme des sécrétions de cytokines de type inflammatoire pourrait être contrebalancée par une grande production de cytokines anti-inflammatoires, mais aussi par une augmentation de la production de TGF- β , un immunosuppresseur naturel (Rohowsky-Kochan *et al.*, 2000). Bref, un patient atteint de SEP exprimera surtout des cytokines inflammatoires de type 1 qui à leur tour enclencheront des cascades

réactionnelles stimulant l'amplification ou le maintien du contexte inflammatoire, par exemple par le recrutement de macrophages et de neutrophiles.

2.0 LA RECONNAISSANCE IMMUNITAIRE CHEZ LE LYMPHOCYTE T

2.1 Le lymphocyte T: maturation cellulaire et éducation du récepteur

Le lymphocyte T reconnaît le peptide antigénique lorsque celui-ci est niché dans la molécule du CMH. Cette reconnaissance joue un rôle primordial pour la sélection de thymocytes immatures qui deviendront des lymphocytes T immunocompétents (von Boehmer, 1994; Nossal, 1994). Les lymphocytes matures CD4 ou CD8 positifs sont produits à partir d'un large bassin de cellules double positives pour ces mêmes marqueurs. La sélection des cellules simple positives s'élabore sur la réactivité de leur RCT $\alpha\beta$. Une population plus restreinte de lymphocytes exprime des chaînes $\gamma\delta$; nous nous concentrerons ici sur l'étude de RCT exprimant l'hétérodimère $\alpha\beta$.

Durant le développement des thymocytes dans le thymus, les gènes codant la portion variable (V) du RCT sont assemblés via une série de recombinaisons de l'ADN. La portion V de la chaîne β du RCT est formée de l'assemblage de trois familles distinctes de segments de gènes: variable β ($V\beta$), diversité β ($D\beta$) et jonction β ($J\beta$). Pour la chaîne α , on compte respectivement une portion variable et jonction, $V\alpha$ et $J\alpha$. Lors des réarrangements V et J, V et D, ou D et J, des bases seront enlevées ou ajoutées aux séquences originales, ce qui donnera lieu à une diversification de la séquence codante (Gellert, 1992). Les régions de souche CDR1 et CDR2, des régions $V\beta$ et $V\alpha$ du RCT, font contact avec les segments d'hélice exposés de la zone du CMH liant le peptide antigénique. La

portion CDR3 du RCT, composée des portion D, J et N (hypervariable) après réarrangement, est responsable des premiers liens avec les résidus peptidiques exposés lorsque le peptide est niché dans le CMH. Ainsi, la séquence peptidique, une fois nichée dans le CMH offre au RCT des résidus donnés, ces résidus initient la réponse immunitaire en activant le récepteur. La séquence en acides aminés d'un peptide n'est donc pas autant déterminante que les projections du peptide antigénique dans le CMH. Il est également très important de considérer une grande qualité du RCT, sa plasticité ou sa dégénérescence dans la reconnaissance peptidique, alors que plusieurs peptides (séquences variables), avec affinités variables, peuvent activer le même RCT. Ces derniers éléments seront discutés plus bas.

Alors que les thymocytes immatures expriment CD4, leur processus de différenciation nécessite le passage vers le stade double négatif pour les molécules CD4 et CD8. Ces précurseurs migrent au thymus de la moelle osseuse et peuvent même envahir un thymus irradié (Fowlkes *et al.* 1985). L'expression des réarrangements de la chaîne β du RCT a lieu entre les phases CD44+CD25+ et CD44-CD25+ de différenciation chez les cellules triple négatives CD4-/CD8-/CD3- (Godfrey *et al.*, 1993). La chaîne α connaît ses réarrangements au stade de transition des thymocytes double positifs. Brièvement, des cellules triple négatives CD4-/CD8-/CD3- se différencieront en CD4+/CD8+ pour finalement exprimer, à la fin des sélections thymiques, un phénotype CD4+ ou CD8+. Des cellules dites triple négative immatures expriment le marqueur CD44, un récepteur pour l'acide hyaluronique, mais n'expriment pas encore le marqueur CD25, la chaîne p55 de faible affinité du récepteur de l'IL-2 (Aruffo *et al.*, 1990; Shimonkevitz *et al.*, 1987). Une fois passées au stade intermédiaire, les thymocytes triple négatifs n'expriment plus le CD44, mais sont positifs pour CD25; ils ne possèdent plus la capacité de migrer vers le thymus. Le rôle de CD25 dans le développement des thymocytes est encore inconnu, mais des anticorps dirigés contre cette molécule inhibent leur développement (Zuniga-Pflucker and Kruisbeek, 1990). Les cellules triples négatives mûrent vers les stades doubles négatives, en exprimant de faibles

niveaux de CD3 (Petrie *et al.*, 1990). L'expression des composantes du RCT chez les thymocytes en transition de triple négatifs vers double positifs est controversée. Un pourcentage total de 70-80% des thymocytes double positifs occupent le cortex, et pour 30% d'entre eux les niveaux de CD3 et RCT $\alpha\beta$ exprimés demeurent indétectables. Les cellules triples négatives matures ainsi que les TCR négatives simples positives ne semblent pas être des populations si distinctes, elles expriment à des niveaux variables les gènes CD4 et CD8.

Les lymphocytes CD4+ sont généralement CMH-II-restreints et fonctionnent surtout comme T auxiliaires. Le phénotype CD8+, CMH-I-restreint, montre des fonctions T cytotoxiques (Shortman *et al.*, 1992). Notons ici un contexte particulier où des molécules glycolipidiques liées à une molécule apparentée au CMH, CD1, peut également lier le RCT (Beckman *et al.*, 1994). De plus, les lymphocytes étant diploïdes, la recombinaison produit idéalement une cellule T exprimant aux moins deux réarrangements productifs au loci α et/ou β , par conséquent, plus d'une combinaison des chaînes $\alpha\beta$ du RCT. Chez la souris, le réarrangement de la chaîne β prévient les recombinaisons V-DJ des segments β endogènes. (Uematsu *et al.*, 1988). Suivant cette importante observation, le concept d'exclusion allélique β fut défini, ce dernier permettant l'expression d'une seule chaîne β en surface. Cette hypothèse n'est pas valide pour la chaîne α du RCT, mais comme l'association fructueuse $\alpha\beta$ est nécessaire pour l'expression de surface d'un RCT, l'exclusion allélique chez un partenaire semble suffisante (von Boehmer, 1990).

L'éducation d'un lymphocyte au niveau immunitaire est réalisée dans le thymus par la combinaison de sélection positive et négative qui permettront la mise en place d'un répertoire T. Une sélection thymique positive sélectionne les précurseurs CD4+/CD8+ s'ils reconnaissent faiblement le CMH-I ou CMH-II. Au niveau des cellules stromales, l'incapacité de reconnaître le soi ou le CMH, ainsi qu'une trop grande affinité pour ces derniers conduira à la mort du précurseur lymphoïde (von Boehmer, 1994; Nossal, 1994). En effet, pour être efficace, le récepteur doit reconnaître avec une affinité suffisante le complexe peptide-CMH,

mais en se gardant de répondre contre les peptides du soi. Les cellules T réagissant fortement contre des peptides du soi ont été déplétées durant leur développement par le processus de sélection négative qui a aussi lieu dans le thymus. De la combinaison des sélections positive et négative résulte un répertoire de thymocytes matures apte à générer une réponse immunitaire contre des antigènes étrangers dans le contexte du CMH, tout en ayant éliminé la majorité des cellules T potentiellement autoréactives. La structure du RCT est composée de deux chaînes $\alpha\beta$ (la population mineure $\gamma\delta$ ne sera pas considérée dans cette introduction), associées dans le membrane cellulaire avec les chaînes polypeptides γ , δ , ϵ et ζ formant le complexe TCR-CD3.

2.2 Costimulation et signalisation

Les modèles actuels d'activation du lymphocyte T énoncent deux signaux de stimulation. Un premier signal, spécifique, engage le RCT dans la reconnaissance et la liaison avec le complexe peptide-CMH, présent sur la cellule présentatrice d'antigène (CPA). Le deuxième signal résulte d'une interaction non-spécifique à l'antigène, impliquant le récepteur CD29 et son ligand B7, en surface de la CPA ou d'autre molécules de co-stimulation. La présence simultanée des deux signaux est requise pour la prolifération lymphocytaire et sécrétion de cytokines.

La molécule CTLA-4 (ou CD152), un autre récepteur pour B7, est régulée à la hausse suite à l'activation par le RCT et la liaison B7-CD28; elle peut aussi agir comme un inhibiteur de prolifération. La famille B7 compte deux ligands, B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) qui lient CD28 et CTLA-4 avec affinité et cinétique différentes. Les voies de signalisation impliquant la famille B7 sont donc capables de réguler de façon positive ou négative la réponse immunitaire (Linsley *et al.*, 1992; Edward *et al.*, 1998). En absence de costimulation adéquate, les lymphocytes T subissent une anergie antigène-dépendante (Miller

et Bastien, 1996). La Figure 1 montre la représentation schématique de l'interaction RCT-peptide-CMH de classe II.

Ce modèle des deux signaux implique donc le RCT et la CPA dans une interaction qui mène vers de multiples cascades de signalisation. Les RCT seraient présents regroupés en hétérodimères, combinés avec des dimères de CD3, en microdomaines, à la membrane plasmique (Alarcon *et al.*, 2003). Ainsi, le premier changement biochimique relevé suite à l'engagement du RCT par le complexe CMH-peptide implique l'activation des familles src kinases, par Lck et Fyn (Straus *et al.*, 1992; Iwashima *et al.*, 1994). La kinase Lck phosphoryle les motifs ITAM des tyrosines présentes sur la chaîne ϵ , γ , δ et ζ du CD3 associé au RCT. Les motifs ITAM phosphorylés recrutent ZAP-70, membre de la famille des syk kinases (Zenner *et al.*, 1996). Ensuite, ZAP-70 phosphoryle LAT, un adaptateur important pour Grb2, phosphatidylinositol-3-kinase, phospholipase C et d'autres éléments dans la transduction du signal pour permettre l'expression et la sécrétion de cytokines et la prolifération cellulaire.

Des boucles de rétroaction permettant des régulations négatives et positives sont présentes à ce niveau pour moduler, amplifier ou diminuer le signal passant par le RCT. Elles impliquent des molécules de signalisation. L'engagement du RCT provoque l'activation de Lck, celle-ci recrutant à son tour Csk qui inhibe Lck, produisant un effet inhibiteur classique (Bougreret *et al.*, 1996). Ainsi, d'autres molécules telles CD45, CTLA-4 et Cb1 régulent l'activation du lymphocyte T à travers différentes boucles de rétroaction (Thompson *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 1998). Un exemple d'inhibiteur de régulation négative est ERK-1, une sérine/thréonine kinase activée par la voie de Ras, qui amplifie l'efficacité du signal, le promouvant (Robbins *et al.*, 1994).

2.3 Culture à long-terme de lymphocytes T primaires: clonage cellulaire

L'étude *in vitro* de population de lymphocytes T et de leurs spécificités est nécessaire afin de lever le voile sur les origines de maintes pathologies.

Lymphocyte T

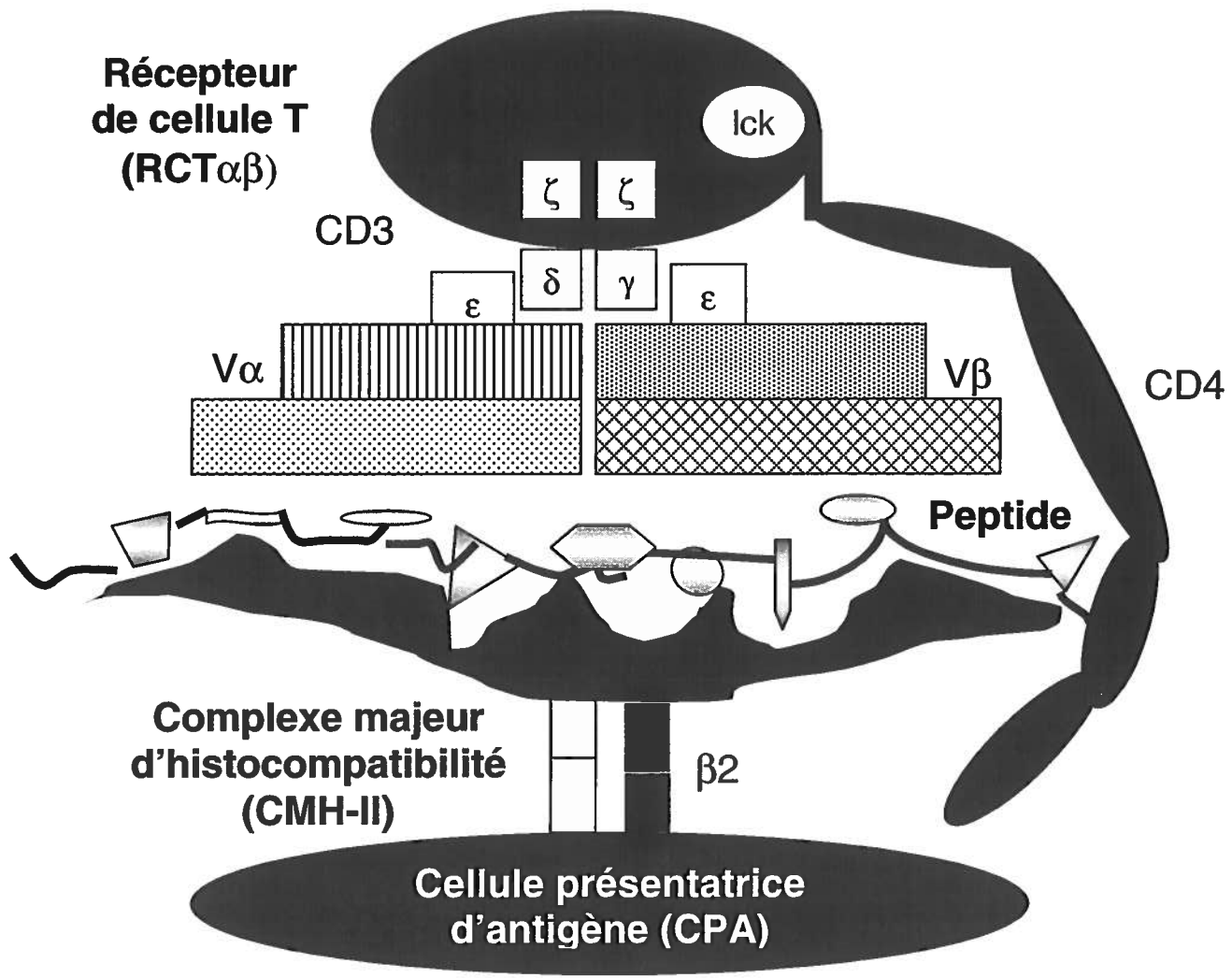


Figure 1. Schéma représentant l'interaction entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène exposant en surface le CMH de classe II. Le peptide niché dans le CMH est présenté au RCT. Le complexe CD3 est décrit, ainsi que le co-récepteur CD4, impliqué ici stabilisant l'interaction en liant le domaine $\beta 2$ du CMH-II. La molécule Ick s'approche des chaînes du complexe CD3. Notons que dans le cas où le CMH de classe I, la molécule CD8 interagit de façon similaire à CD4, favorisant le contact cellule-cellule.

Cependant, le clonage cellulaire de lymphocytes T humains primaires pour des études à long-terme demeure une technique suffisamment délicate qui ne sera employée que lorsqu'une population monoclonale est essentielle, ce qui est le cas pour les études moléculaires en général. Étonnamment, malgré des protocoles établis, le clonage de cellules lymphocytaires humaines est beaucoup moins prévisible que celui de cellules murines, par exemple (Spits et Yssel, 1996).

La culture *in vitro* à long-terme de clones de lymphocytes T primaires requiert des stimulations antigéniques à intervalles réguliers. Cependant, peu importe la qualité de la culture initiale et les soins apportés lors de maintenance des cultures, ces dernières se caractérisent par une instabilité marquée (Spits et Yssel, 1996). En effet, la mort par anergie ou exhaustion clonale est à anticiper (Beverley et Maini, 2000; Pawelec *et al.*, 2000), un clone primaire n'ayant qu'un nombre maximal de divisions cellulaires, par définition. La concentration en IL-2 est un des facteurs principaux pour tenter de conserver l'intégrité de la prolifération cellulaire. L'addition de cytokines est aussi à considérer pour augmenter l'efficacité de culture, de même que l'utilisation d'agents mitogènes non-spécifiques tel la phytohémagglutinine A (PHA) (Spits et Yssel, 1996). De plus, la présence de facteurs de costimulation est essentielle. Ils sont obtenus par l'utilisation de CPA appropriées. En effet, en fonction du protocole utilisé, il sera possible ou non d'utiliser des CPA autologues, des cellules dendritiques, CPA professionnelles, ou des fibroblastes exprimant le CMH désiré en relation avec le RCT étudié.

Les besoins de notre étude ont demandé la mise au point d'un protocole élaboré de clonage cellulaire à long-terme de lymphocytes T humains en culture primaire. Comme le protocole expérimental sera décrit en détail durant cette dissertation et largement discuté, nous concluons ce sous-chapitre ici, pour revenir plus tard au clonage de lymphocytes T humains, une technique largement utilisée dans la réalisation de ce projet de recherche.

3.0 L'AUTOIMMUNITÉ

L'autoimmunité c'est la perte de tolérance au soi, lorsque des autoantigènes sont reconnus par le système immunitaire.

3.1 La tolérance et le bris de tolérance

La tolérance est décrite comme un des mécanismes développés par le système immunitaire pour prévenir une réponse contre les autoantigènes. La tolérance des lymphocytes T est surtout assurée lors des sélections thymiques, telles que décrites ci-haut. Cependant, il est possible que la tolérance absolue ne soit pas obtenue. En effet, tous les autoantigènes peuvent ne pas être présents au thymus durant la sélection négative, ou peuvent être présents mais en quantité ou en concentration insuffisantes ou présent non sous l'isoforme requis (par exemple la MBP Golli versus un des isoformes possibles de la MBP) (Aichele *et al.*, 1996; Fritz et Zhao, 1996). En effet, les autoantigènes exprimés exclusivement dans les organes périphériques induiront une délétion clonale seulement s'ils sont transportés au thymus en quantité suffisante ou s'ils sont exprimés sur des cellules mobiles des tissus lymphoïdes périphériques. Cependant, aucune tolérance n'est réalisée contre les autoantigènes localisés dans des sites séquestrés ou exprimés en deçà d'une concentration minimale; l'affinité et l'avidité du RCT pourrait aussi ne pas être suffisante pour induire une réponse T (Barker et Billingham, 1972; Ferber *et al.*, 1994; Barnaba, 1996). Cependant, lorsque les autoantigènes entrent dans les tissus lymphoïdes pour une raison ou une autre, ils seront traités de façon similaire aux antigènes étrangers (Olstone *et al.*, 1991).

Les lymphocytes autoréactifs spécifiques réagissant à des autoantigènes cryptiques sont en circulation dans l'organisme. En dépit de ces zones grises de sélection négative, un pourcentage relativement faible de maladies autoimmunitaires est rapporté: 5-10% de la population (Aichele *et al.*, 1996). En

fait, ces cellules autoréactives demeurent inoffensives tant que l'autoantigène est caché du système immunitaire et demeure non présenté par une CPA professionnelle. La détection de cet autoantigène brisera le statut d'ignorance du lymphocyte. Chez un individu, un lymphocyte potentiellement autoréactif peut demeurer silencieux, la vie durant. Il est à noter en effet que dans un organisme sain, les lymphocytes T CD4+ joueront un rôle clef dans la régulation de la tolérance périphérique en modulant la délétion de cellules immunes, particulièrement les lymphocytes CD8+ (Frasca *et al.*, 1998; Shevach, 2000). Ce qui peut contribuer à briser la tolérance sera décrit en plusieurs hypothèses qui seront présentées suite à l'énumération d'autoantigènes potentiels.

3.2 Les autoantigènes

Les autoantigènes se définissent comme des éléments du soi qui sont reconnus par le système immunitaire.

3.2.1 Protéine basique de la myéline (MBP)

Une protéine parmi les plus étudiées comme autoantigène dans la SEP est la MBP. Elle est un constituant majeur de la myéline, avec 30% du poids sec de cette dernière. La MBP existe sous trois isoformes produits d'épissage(s) alternatif(s): un isoforme de 21,5 kDa, l'isoforme majeur de 18,5 kDa et un troisième de 17,2 kDa. L'isoforme 18,5 kDa est retrouvé plus abondamment dans la myéline mature, l'isoforme 21,5 kDa est davantage présent aux étapes précoces de formation de la myéline, de même que dans les plaques de démyélinisation (Schmidt, 1999).

Un autre isoforme de la MBP est un isomère chargé qui apparaît durant les modifications traductionnelles, la MBP-Golli (gène exprimé dans les oligodendrocytes). Cet isoforme est également exprimé au thymus et aux tissus lymphoïdes (Campagnoli *et al.*, 1993; Pribyl *et al.*, 1993). La MBP possède un

fort potentiel encéphalitogène. On la retrouve dans plusieurs modèles de type EAE.

L'activation de lymphocytes T anti-myéline dans la SEP suggère l'importance de cet autoantigène dans la pathogénèse. De tels lymphocytes peuvent être isolés du sang périphérique de patients atteints de SEP et aussi de témoins sains. Cependant, la présence de lymphocytes T anti-myéline chez les patients s'observe avec une plus grande fréquence ce, dans le sang périphérique et dans le liquide céphalo-rachidien (Olsson *et al.*, 1990; Chou *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994). Certaines régions de la myéline semblent en effet reconnues avec prédilection par les lymphocytes de patients, telle les portions 84-102 et 141-165 de la MBP (Wucherpfennig *et al.*, 1994; Kozovska *et al.*, 1998). De plus, l'haplotype HLA-DR2, conférant une susceptibilité génétique à la SEP, lie la portion 84-102 de cette protéine avec une grande affinité (Vogt *et al.*, 1994; Wucherpfennig *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000).

3.2.2 Protéine protéolipidique (PLP)

La protéine retrouvée en majorité dans la myéline est la PLP, c'est une protéine hautement hydrophobe d'environ 30 kDa. Une protéine apparentée à la PLP est la DM-20, une forme résultante de l'épissage de l'ARNm codant pour la PLP. La PLP, contrairement à la MBP est exprimée dans le SNC exclusivement. La PLP est encéphalitogène.

En effet, on retrouve des lymphocytes anti-PLP dans le sang et le liquide céphalo-rachidien de patients souffrants de SEP (Zhang *et al.*, 1994). De fortes réponses lymphocytaires contre diverses régions de la PLP sont notées dans la littérature. Ainsi, les portions comprenant les résidus 40-60 et 89-106 de la PLP semblent fortement activatrices de lymphocytes T chez les patients SEP (Pelfrey *et al.*, 1994). Une réponse anti-PLP contre la portion 95-116, restreinte par le HLA-DR2, est aussi observée chez les patients (Ohashi *et al.*, 1995). Les régions

30-49 et 180-199 (Markovic-Plese *et al.*, 1995) ainsi que 184-199 et 190-209 (Greer *et al.*, 1997) sont aussi étudiées car elles contiennent un épitope immunodominant.

3.2.3 Autres protéines du SNC

Les autoantigènes dans la SEP sont nombreux, et on les observe à un moment ou un autre comme candidats dans l'induction de modèle de type EAE, comme induisant une réponse lymphocytaire T et/ou B. Outre la MBP et PLP, ces autoantigènes potentiels du SNC sont la MAG (Glycoprotéine associée à la myéline: exprimée au SNC et périphérique, représente 1% de la myéline totale), la MOG (Myéline oligodendrocyte glycoprotéine: localisée au SNC, composant mineur de la myéline, avec moins de 0.05% de cette dernière), la CNPase (2',3'-cyclique nucléotide 3'-phosphodiesterase: exprimée dans les oligodendrocytes, les cellules de Schwann et les tissus lymphoïdes), la transaldolase (localisée dans les oligodendrocytes, une enzyme de la voie du pentose phosphate), la s100 β (exprimée dans les astrocytes et la microglie du SNC) et l' α -B-crystalline (une protéine de stress potentiellement surexprimée au niveau de la myéline) (Schmidt *et al.*, 1998). Un autre autoantigène potentiel, la troisième protéine la plus abondante de la myéline du SNC, est la protéine basique de la myéline associée aux oligodendrocytes (MOBP) (Holz *et al.*, 2000). Cette protéine, exprimée dans les oligodendrocytes est impliquée dans la structure de la myéline.

Pour les protéines MOG, MAG, CNPase et s100 β , des lymphocytes T autoréactifs ont été observés chez les patients atteints de SEP (Zhang *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1997). Un fait intéressant est que la réponse proliférative des lymphocytes contre la transaldolase semble même plus prononcée chez les patients que celle obtenue suite à une stimulation antigénique avec la MBP (Colombo *et al.*, 1997). Pour l' α -B-crystalline une réponse T peut être obtenue chez les patients atteints de SEP et chez les témoins sains. On note la présence

de cette dernière en plus forte expression au niveau des plaques de démyélinisation (Van Noort *et al.*, 1995).

3.2.4 Protéines hétérogènes autoantigènes

Des protéines associées au choc thermique (hsp) sont très conservées dans l'évolution. Une plus grande expression de ces protéines pourrait être pathologique dans la SEP. Ainsi, des oligodendrocytes présents à la limite de plaques chroniques de démyélinisation expriment la hsp65. Il est possible que cette dernière soit impliquée dans l'expansion des lésions à la gaine de myéline (Selmaj *et al.*, 1992). On note de plus la présence de lymphocytes exprimant le RCT $\gamma\delta$ (ces cellules comptent pour 5% seulement du répertoire T) semblent préférentiellement activées par les hsp et seraient retrouvés en forte concentration dans les lésions actives de SEP, c'est-à-dire autour des oligodendrocytes exprimant hsp65 (Brosman *et al.*, 1996).

3.3 Mécanismes proposés pour l'activation de lymphocytes autoréactifs.

Le bris de tolérance des lymphocytes potentiellement autoréactifs implique l'activation primaire de ces derniers. Différents mécanismes inducteurs peuvent intervenir dans le bris du silence immunitaire de ces cellules pour éventuellement déclencher l'autoimmunité.

3.3.1 Superantigènes

Les bactéries telles *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia* et *Mycoplasma*, produisent des exotoxines identifiées comme superantigènes. Les virus également, par exemple les cytomégalovirus et les rétrovirus, génèrent aussi de tels agents, respectivement comme composante de la particule virale initiale ou comme résultante de l'intégration du génome dans l'hôte (Acha-Orchea et MacDonald, 1995). Ces superantigènes sont de puissants activateurs lymphocytaires non-spécifiques, car ils lient une famille donnée de chaîne β du

RCT de façon extérieure à la niche peptidique. La prolifération cellulaire observée chez une même famille de RCT est décrite comme polyclonale (Zhang *et al.*, 1995; Renno et Acha-Orbea, 1997). Les superantigènes lient fortement le CMH-II et sont donc présentés par des CPA classiques (Held *et al.*, 1994; Labrecque *et al.*, 1993).

L'activation lymphocytaire par un superantigène n'est pas différente de celle obtenue pour un lymphocyte régulier ou un lymphocyte potentiellement autoréactif. Brisant la délicate balance de la tolérance, ce mécanisme peut même mener vers la production d'autoanticorps (Beutner *et al.*, 1995). Ainsi, un lymphocyte autoréactif activé en périphérie par le superantigène peut migrer au site de reconnaissance de l'autoantigène et induire l'autoimmunité. Alternativement, un superantigène présenté par un organe cible initiera une cascade de réactions inflammatoires. Les cellules T présentes au site produisent donc des cytokines et sont impliquées dans le recrutement des leukocytes. Éventuellement, s'il y a activation des lymphocytes autoréactifs, ces derniers entraîneront la destruction du tissu ciblé, provoquant le relargage d'autres autoantigènes tissulaires. Ces derniers seront repris puis présentés à leur tour par les CPA, le tout amplifiant ou maintenant le processus autoimmunitaire (Renno et Acha-Orbea, 1997).

En général, une fois le superantigène rencontré, la population cellulaire stimulée suite à cette activation polyclonale est éliminée du répertoire par apoptose. Les quelques lymphocytes non-éliminés sont observés comme ne répondant plus à l'action du superantigène (Kawabe et Ochi, 1991; Baschieri *et al.*, 1993).

3.3.2 Inflammation et propagation de déterminants

Le contexte inflammatoire, résultant d'une infection virale par exemple, est propice à l'établissement de processus autoimmunitaires, car il favorise la réponse immunitaire de l'organisme. Ainsi, l'augmentation de l'expression des molécules du CMH en surface des CPA, suite à la sécrétion de cytokines IFN- γ

et TNF- α , privilégie les interactions cellule-cellule (Barnaba, 1996). De plus, la quantité de cytokines et de chimiokines sécrétées au site d'inflammation, en plus de recruter des effecteurs immunitaires, augmente l'expression de protéases cellulaires qui provoquent des dommages tissulaires (Barnaba, 1996). Il importe ensuite de considérer les infections virales qui induisent une réponse immunitaire chronique et inefficace et qui peuvent produire une forte destruction tissulaire due à la lyse cellulaire viro-induite ou à l'immunopathologie résultante de l'action des lymphocytes cytotoxiques (Aichele *et al.*, 1996). Les débris tissulaires résultants seront ensuite présentés aux CPA professionnelles. Ces nouveaux antigènes peuvent potentiellement activer d'autres cellules T et B, peut-être même des cellules autoréactives.

La propagation de déterminants ou d'épitopes est un autre phénomène permettant d'amplifier ou de maintenir l'état d'activation cellulaire en permettant l'élargissement du bassin d'autoantigènes disponibles. Ces derniers qui sont habituellement séquestrés, pourront à leur tour activer une cellule autoréactive (Oldstone, 1998).

3.3.3 Mimétisme moléculaire

Le mimétisme moléculaire représente un autre processus pouvant induire le bris de la tolérance et déclencher l'autoimmunité (Oldstone, 1987; Oldstone, 1998). Dans ce processus, l'agent microbien partage des déterminants antigéniques avec des antigènes du soi. Même si la réponse du système immunitaire contre un antigène du soi est parfois décrite comme étant moins puissante que lorsque la réponse est dirigée contre un antigène étranger, elle peut toutefois conduire vers un processus pathologique (Hemmer *et al.*, 1997). Nous nous concentrerons ici sur le potentiel des virus à activer des lymphocytes T par mimétisme moléculaire. En répondant contre l'infection virale, les lymphocytes ainsi impliqués enclenchent également une réaction autoimmunitaire contre le soi. La réponse lymphocytaire peut être maintenue longtemps après que le virus soit éradiqué. En effet, dans certains cas d'infections aiguës, malgré une

réponse immunitaire efficace et rapide contre l'agent viral, des réactions autoimmunitaires seront observées plus tardivement (Oldstone, 1998).

Un large spectre de peptides permet l'activation d'un même RCT, tel que démontré par des études réalisées avec des bibliothèques peptidiques combinatoires (Hemmer *et al.*, 1997). La confirmation de ce phénomène fut obtenue chez la souris modifiée génétiquement pour placer l'emphase sur la variabilité des RCT et non sur la dissemblance peptidique. En effet, des souris qui n'expriment qu'un complexe peptide-CHM-II (ou un répertoire CMH hautement restreint), produisent un grand nombre de clones de lymphocytes T CD4⁺ qui représente entre 20-50% du répertoire d'une souris sauvage (Ignatowicz *et al.*, 1996; Surh *et al.*, 1997). Le degré de flexibilité dans la reconnaissance par le RCT permet donc aussi la reconnaissance d'un même complexe peptide-CMH par plus d'un RCT.

Une homologie de séquence ou plus souvent une analogie conformationnelle, décrite par la structure tridimensionnelle du peptide ancré dans le CMH, peut être à l'origine d'une reconnaissance antigénique croisée. Par exemple, des clones lymphocytaires T, obtenus de patients atteints de SEP qui sont dirigés contre la MBP, sont aussi stimulés par divers peptides viraux (Wucherpfennig et Strominger, 1995). De plus, dans le cas du diabète sucré insulino-dépendant, la réponse autoimmunitaire des lymphocytes T semble aussi dirigée contre la glutamyl acide décarboxylase (GAD) suite à l'infection par le virus Coxsackie B (Oldstone, 1998). Cette enzyme partagerait des déterminants antigéniques avec la protéine P2 de ce dernier (Saruger *et al.*, 2001).

Le laboratoire du docteur Pierre Talbot a aussi montré en 1996 la présence hautement significative de lymphocytes T ayant une spécificité antigénique croisée coronavirus-myéline chez les patients souffrant de SEP, lorsque comparée à celle obtenue chez les témoins sains (Talbot *et al.*, 1996). Cette expérience sert grandement d'assise à ce projet de doctorat. Dans cette étude, utilisant des lignées lymphocytaires T issues du sang périphérique, un

phénomène de réactions croisées a été observé avec prédilection chez les 16 patients atteints de SEP, comparés avec 14 témoins sains étudiés. Ces résultats sont très significatifs avec 29% des lignées produites chez les patients, versus seulement 1,3% chez les témoins, montrant une double spécificité antigénique. Les antigènes à l'étude pour cette expérience étaient le coronavirus humain 229E (HCoV-229E) et la protéine basique de la myéline (MBP).

C'est par la contribution de modèles animaux que fut observée l'implication potentielle d'infections dans le déclenchement de maladies autoimmunitaires par le processus de mimétisme moléculaire, suite à l'observation d'anticorps et de lymphocytes T montrant des réactions antigéniquement croisées virus-protéines/peptides du soi (Fujinami et Oldstone, 1985). Par l'utilisation de cellules données, exprimant un transgène désiré qui partage des déterminants avec les composantes virales, on arrive à déclencher, suite à l'infection, un diabète sucré insulino-dépendant si le transgène est exprimé par les cellules β des îlots de Langerhans (Evans *et al.*, 1996). Lorsque des oligodendrocytes sont porteurs du transgène d'intérêt, une maladie démyélinisante peut survenir (Ohashi *et al.*, 1991). Le virus herpes simplex de type 1 chez la souris provoque la kératite stromale, une maladie autoimmunitaire de l'œil, où des lymphocytes CD4⁺ sont activés contre une protéine virale et un antigène de la cornée (Zhao *et al.*, 1998). Le virus de Theiler (TMEV) peut également déclencher une démyélinisation induite par une réponse lymphocytaire CD4⁺ ; ce virus modifié pour l'expression d'un épitope 139-151 de la protéine PLP induit une autoimmunité également initiée par les lymphocytes CD4⁺ (Olson *et al.*, 2001). Récemment, il a été montré chez l'humain qu'une infection HTLV-1 peut provoquer par mimétisme moléculaire une réponse de type anticorps contre les neurones, et une maladie neurologique (Levin *et al.*, 2002). Toutes ces observations mettent bien en évidence l'importance potentielle du mimétisme moléculaire dans l'induction de pathologies autoimmunitaires. C'est à ce mécanisme de mimétisme moléculaire précisément que nous nous sommes intéressés dans le cadre de nos recherches. Il apparaît en effet comme un élégant mécanisme pour expliquer l'apparition de l'autoimmunité dans le cas

d'une pathologie comme la SEP. Ainsi, chez une personne prédisposée génétiquement, une infection virale pourrait induire un bris de tolérance et activer des lymphocytes T autoréactifs; l'organisme ne pouvant discerner le peptide viral de l'antigène du soi, une pathologie résultant de l'attaque immunitaire pourrait être observée.

4.0 LES CORONAVIRUS

Une attention plus particulière est accordée dans cette thèse aux coronavirus, car ils sont impliqués dans nos recherches sur l'étiologie potentielle de la SEP. Il est cependant à considérer que ce virus figure dans une longue liste de virus pouvant eux-aussi être possiblement associés à cette pathologie. En effet, plusieurs virus pourraient être impliqués dans des mécanismes comme le mimétisme moléculaire, causant ainsi un bris de tolérance pouvant mener à l'autoimmunité. Une possibilité est que différents virus pourraient être impliqués en fonction de la prédisposition génétique de l'individu. Le coronavirus est le virus candidat étudié dans le cadre de ce projet de recherche. Ce virus, neurotrope et neuroinvasif, a accès au SNC, la cible de la SEP. De plus, tel que décrit dans la section 4.4 de cette thèse, le coronavirus murin peut induire chez l'hôte susceptible une maladie qui ressemble à la SEP. Des études explorant un lien potentiel entre ce virus et une pathologie du CNS chez l'humain sont donc pertinentes.

4.1 Nomenclature et propriétés structurelles

De l'ordre des *Nidovirales* et de la famille des *Coronaviridae*, le genre Coronavirus est divisé en trois groupes antigéniques distincts (Lai et Cavanagh,

1997; Enjuanes *et al.*, 1999). Dans le premier groupe antigénique on retrouve le coronavirus de la gastro-entérite transmissible du porc (TGEV), le virus de la diarrhée porcine (PEDV) le coronavirus félin (FCoV), le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV), le coronavirus canin (CCoV) et le coronavirus humain 229E (HCoV-229E). Le deuxième groupe antigénique inclus le virus de l'hépatite murine (MHV), le coronavirus bovin (BCoV), le virus de l'encéphalite hémagglutinante porcine (HEV), le coronavirus de dinde (TCoV) et le coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43). Le dernier et troisième groupe comprends le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV). Ce sont des études à l'aide d'anticorps monoclonaux et de séquençage du matériel génétique qui permettent de conclure sur l'appartenance du virus à l'un des différents groupes antigéniques énumérés.

Le coronavirus est un virus ARN simple brin de polarité positive. Son génome, qui s'étend sur 27 à 32 kilobases (kb), est incorporé dans une nucléocapside. Le coronavirus expose des spicules (S) caractéristiques qui lui confèrent une architecture s'apparentant à une couronne. L'enveloppe de ces virus est également composée de protéines de membrane (M) et d'une petite protéine membranaire (E). Certains membres du groupe antigénique de type deux possèdent une protéine supplémentaire, l'hémagglutinine-estérase (HE) (Lai et Cavanagh, 1997).

4.2 Protéines structurales et non-structurales

La protéine S des coronavirus forme un complexe d'environ 180 kDa composé de deux régions, S1 et S2, situées en partie N et C-terminale respectivement, de la protéine. Cette protéine glycosylée est responsable de l'attachement au récepteur cellulaire (Yokomori et Lai, 1992; Mounir et Talbot, 1993; Lai et Cavanagh, 1997; Bonavia *et al.*, 2003). Plusieurs variations génétiques sont rapportées pour cette protéine, surtout pour la portion S1 qui serait importante pour la neurovirulence (Taguchi *et al.*, 1995; Lai et Cavanagh, 1997). La nucléocapside formée des protéines N protège le ARN génomique contre

l'attaque des protéases. La protéine M est impliquée dans l'assemblage et le bourgeonnement à la membrane intracellulaire pour la production de virions (Mounir et Talbot, 1992; Lai et Cavanagh, 1997). La protéine E est requise pour l'assemblage des virions (Vennema *et al.*, 1996).

Les fonctions de plusieurs protéines non-structurales des coronavirus demeurent encore à être élucidées. Par exemple, plusieurs cadres de lecture ouverts du gène de la polymérase (*pol*), gène qui couvre près des deux tiers en S1 du génome coronaviral, codent différentes protéines ayant des activités variées (Heusipp *et al.*, 1997; Lai et Cavanagh, 1997). De plus, plusieurs cadres de lecture codent des protéines dont les fonctions demeurent encore à identifier, tel le cadre de lecture situé entre le gène *pol* et celui codant pour la HE qui produirait une petite protéine retrouvée dans les cellules suite à une infection coronavirale (Labonté *et al.*, 1995). Un fait intéressant, une identité de séquence de cinq acides aminés (dans le cadre de lecture du gène 4b) est observée entre le sérotype 229E du coronavirus humain et la MBP (Jouvenne *et al.*, 1992; Chagnon *et al.*, 1998).

4.3 Cycle répliatif

L'attachement du coronavirus au récepteur de la cellule cible constitue la première étape de l'infection. Le récepteur utilisé par le HCoV-229E est l'aminopeptidase N ou le CD13 (Yeager *et al.*, 1992; Lachance *et al.*, 1998). Un récepteur précis pour HCoV-OC43 n'a pas encore été identifié, mais ce virus s'associe à des résidus d'acide sialique (Kunkel et Herrler, 1993). Ainsi, une fois attaché, le coronavirus pénètre la cellule cible par fusion ou endocytose, il y a ensuite décapsidation et le cycle répliatif du virus s'amorce (Lai et Cavanagh, 1997).

La réplication virale aurait surtout lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte. Le génome coronaviral possède de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', tout d'abord le

cadre de lecture de l'ARN polymérase, celui codant pour la protéine HE s'il y a lieu, puis pour S, ensuite pour E, M et enfin N. Les protéines non-structurales sont codées par des portions géniques incluses entre les cadres de lecture S et E, E et M, M et N, et par des régions présentes en portion 3' du génome. En tout début du cycle de réplication, une polymérase à ARN-ARN dépendante est traduite du premier gène. C'est grâce à cette enzyme qu'il y aura synthèse du brin négatif (souvent tenu comme caractéristique de la présence de réplication virale). Ce brin sert ensuite de gabarit pour la synthèse d'ARNm sous-génomiques. Ces ARN sont élaborés sous le modèle suivant, le plus petit d'entre eux contient le premier cadre de lecture en 3' du génome, le second ARNm est défini par un cadre de lecture supplémentaire en portion 5'. Il est aussi à souligner que des ARN sous-génomiques de polarités négatives servent de gabarits pour la synthèse des ARNm sous-génomiques (Sawicki et Sawicki, 1998). Finalement, les cadres de lecture s'additionnent un à un pour terminer par un ARNm de la taille du génome entier. Ainsi, le cadre de lecture de la protéine N se retrouve partie intégrante de tous les ARN sous-génomiques étant donné sa localisation en 3' du génome viral. La traduction de chaque ARNm se fera exclusivement à partir de la portion 5' du génome (Lai et Cavanagh, 1997).

4.4 Infection par le coronavirus murin (MHV)

Le coronavirus murin, en plus de causer des hépatites et des gastro-entérites chez la souris susceptible, peut induire une maladie démyélinisante du SNC qui s'apparente à la SEP. La susceptibilité d'une souris à l'infection par MHV est déterminée par un polymorphisme de la glycoprotéine biliaire, utilisée comme récepteur par ce dernier, qui traduit un tropisme accentué dans l'infection des neurones et macrophages (Chen *et al.*, 1995). Ainsi, le MHV utilise la voie sanguine ou lymphatique pour permettre à une infection primaire périphérique de se propager jusque dans le SNC de la souris sensible (Barthold et Smith, 1992). Cependant, les souches neurotropes de MHV peuvent aussi être transportées

rétrogradement le long du nerf olfactif et envahir le SNC de l'hôte grâce à leur caractère neuroinvasif (Lavi *et al.*, 1988, Barnett et Perlman, 1993).

Une infection aiguë de souris sensibles au MHV s'élabore sur quelques jours (Lampert *et al.*, 1973, Weiner, 1973; Knobler *et al.*, 1982; Dales et Anderson, 1995). Elle est caractérisée par une encéphalomyélite, l'infection de cellules neuronales et gliales, de même que par une forte production de virus infectieux. Alternativement, une maladie chronique peut aussi résulter de l'infection par MHV. Cette maladie qui se prolonge durant des semaines (et des mois) est décrite comme une démyélinisation inflammatoire ponctuée de cycles de remyélinisation et de démyélinisation. On note l'infection prédominante des cellules gliales, la persistance virale au SNC et des réactions autoimmunitaires. En effet, la maladie chronique est marquée par l'activation de lymphocytes T dirigés contre la myéline (Watanabe *et al.*, 1983). Cette maladie chronique est un modèle de démyélinisation étudié dans la SEP.

4.5 Infection par le coronavirus humain (HCoV) et pathogenèse

Il existe deux sérotypes de coronavirus humain, soit HCoV-229E et HCoV-OC43. Chez l'humain, ces derniers sont responsables d'infection du tractus respiratoire étant associés à environ 30% de rhumes et d'infection nosocomiales chez les nouveau-nés prématurés (Tyrrell *et al.*, 1993; Myint, 1994; Sizun *et al.*, 1993 et 1998). Les femmes seraient plus susceptibles aux infections de nature coronavirales que les hommes (Callow, 1995). De plus, la majorité de la population est séropositive pour la présence d'anticorps contre le coronavirus dès l'âge de 5 ans (Myint, 1994). Ces derniers sont souvent dirigés contre la protéine S et seuls les anticorps de type A confèrent une certaine protection contre l'infection (Callow, 1985). Une réponse lymphocytaire est aussi observée. Des lymphocytes T CD4⁺ activés par les protéines S et N de HCoV-229E ou simplement contre les deux sérotypes sont isolées du sang périphérique de témoins sains et de patients atteints de SEP (Spencer *et al.*, 1995; Talbot *et al.*, 1996; Boucher *et al.*, 1998). De plus, on a pu confirmer la présence d'anticorps

dirigés contre des protéines coronavirales. Ces derniers sont retrouvés dans le liquide céphalo-rachidien et en périphérie chez des témoins sains et/ou des patients souffrants de SEP (Salmi *et al.*, 1982; Johnson-Lussenburg et Zheng, 1987; Fleming *et al.*, 1988).

Les études réalisées chez MHV ont montré neurotropisme, neuroinvasion et neuropathologie. Des caractéristiques similaires chez l'humain pourraient avoir des implications déterminantes dans l'explication de pathologies du SNC, ce qui justifie grandement l'étude des coronavirus humains, malgré le fait qu'ils soient souvent décrits comme des pathogènes respiratoires bénins. Ainsi, le coronavirus humain semble aussi montrer un neurotropisme *in vitro*, comme le suggère l'infection de lignées cellulaires (Talbot *et al.*, 1994; Lachance *et al.*, 1998; Arbour *et al.*, 1999a,b) et de cellules en cultures primaires (Bonavia *et al.*, 1997; Cabirac *et al.*, 1995).

De plus, la présence de coronavirus humains a été observée au SNC, ce qui suggère également des potentiels neurotrope et/ou neurovirulent et/ou neuroinvasif. En effet, des particules de morphologie apparentée au coronavirus ont été pour la première fois observées en 1976 dans le cerveau d'un patient atteint de SEP (Tanaka *et al.*, 1976). Des particules coronavirales furent isolées du cerveau dès 1980 (Burks *et al.*, 1980). De plus, la présence de l'expression de l'ARN coronaviral des deux sérotypes est décrite au niveau du SNC (Stewart *et al.*, 1992, Murray *et al.*, 1992; Arbour *et al.*, 2000).

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

En prenant assise sur l'ensemble de la littérature et des différentes hypothèses proposées, plusieurs objectifs de recherche ont été avancés pour être validés dans le cadre de ce projet de recherche qui portait sur l'étude du mimétisme moléculaire coronavirus-myéline des lymphocytes T dans la SEP.

Ainsi:

1- L'étiologie de la SEP demeure inconnue à ce jour. Elle est décrite comme une maladie démyélinisante, inflammatoire, autoimmunitaire et une des caractéristiques importantes de la réponse immunitaire associée à la pathologie est l'activation de lymphocytes T CD4+ autoréactifs contre la MBP, une protéine de la myéline. Notre intérêt se porte sur l'exploration d'un mécanisme potentiel qui pourrait expliquer le processus d'activation de ces lymphocytes T autoréactifs anti-MBP.

2- Le coronavirus murin induit chez un hôte susceptible une maladie chronique démyélinisante qui s'apparente étrangement à la SEP. Les coronavirus humains seraient eux aussi neurotropes, neuroinvasifs et neurovirulents. Ainsi, le coronavirus, comme virus candidat, est à considérer dans les études sur l'étiologie et le développement de la SEP.

3- De plus, en 1996, le laboratoire du docteur Pierre Talbot a montré une présence hautement significative de lignées lymphocytaires périphériques antigéniquement croisées coronavirus-myéline (229E et MBP) chez les patients atteints de SEP, lorsque comparée à la présence de ces lignées obtenue chez le témoins sains. En effet, 29% des lignées antigéniquement croisées coronavirus-myéline obtenues chez les patients atteints de SEP montraient une spécificité croisée, contre seulement 1,3% des lignées obtenues chez le témoins sains. Ces derniers résultats servent d'assise à mon projet de doctorat réalisé chez l'humain.

Les objectifs qui s'inscrivaient dans ce projet de doctorat étaient donc de:

1- De produire des clones de lymphocytes T primaires périphériques chez des patients atteints de SEP afin de confirmer que le phénomène des réactions croisées coronavirus-myéline que l'on associe à la SEP est bien la résultante d'une seule cellule et non le produit de spécificités variées associées à une population lymphocytaire hétérogène. Ainsi, montrer le caractère clonal du mimétisme moléculaire coronavirus-myéline observé précédemment.

2- Ajouter le sérotype OC43 de coronavirus humain et la protéine protéolipidique PLP dans ces analyses de mimétisme moléculaire au niveau de lymphocytes périphériques de patients atteints de SEP. Ce sérotype, comme le sérotype 229E d'ailleurs, est neurotrope et neuroinvasif et pourrait lui aussi être impliqué dans des attaques autoimmunitaires au SNC.

3- Caractériser la chaîne β du RCT des clones antigéniquement croisés obtenus de patients atteints de SEP. Afin de voir si une famille de $V\beta$ particulier ou un patron donné de séquence hypervariable (CDR3) est associé au phénomène de réactions-croisées, il importe d'analyser au niveau moléculaire ces clones lymphocytaires T coronavirus-myéline obtenus.

4- Évaluer l'éventuelle pertinence pathologique des observations réalisées.

CHAPITRE 2: MÉTHODOLOGIE

1.0 PRODUCTION À LONG-TERME DE CLONES LYMPHOCYTAIRES T HUMAINS À PARTIR DU SANG PÉRIPHÉRIQUE

1.1 Sélection des participants

Toute participation à cette étude était volontaire et réalisée selon un consentement éclairé. Les participants ont été sélectionnés en accord avec les règles régissant un protocole expérimental. Ce dernier fut au préalable accepté par des comités institutionnels d'éthique et scientifique du CHUM, Montréal, Canada et de l'Institut National de la Recherche Scientifique, Québec, Canada. Les échantillons de sang périphérique nécessaires furent prélevés en clinique, par des infirmières certifiées. Un système codé d'échantillonnage et d'analyse a permis de conserver la confidentialité des analyses en tout temps.

De plus, chaque participant a témoigné ne pas avoir pris aucun médicament affectant le système immunitaire (de type immunosupresseur) pour une période d'au moins deux mois avant le début de cette étude. Aucun effet secondaire pouvant résulter de la participation à un tel protocole ne fut souligné en ce qui concerne l'état de santé général des participants.

1.2 Antigènes utilisés

La préparation des antigènes MBP et HCoV-229E entre autre utilisés pour les expériences décrites dans cette thèse est détaillée dans Talbot *et al.*, 1996. La PLP et l'antigène HCoV-OC43 ont également été étudiés dans le présent projet. La nature des antigènes est soit un lysat de cellules infectées ou une protéine de la myéline purifiée.

La préparation de la MBP humaine a été réalisée à partir d'un échantillon de cerveau humain normal (Banque de Cerveaux de Montréal, Hopital Douglas,

Québec, Canada). Brièvement, la protéine a été isolée de la matière blanche du cerveau par une extraction au phénol-chloroforme suivi d'une dialyse d'une nuit (Cheifetz et Moscarello, 1985). Purifiée par chromatographie, la PLP nous fut gracieusement fournie par le Dr. Mario Moscarello (Hospital for Sick Children, Toronto, Canada).

Des lysats de cellules infectées par l'un ou l'autre des deux sérotypes de coronavirus humains furent aussi purifiés afin de servir comme antigènes. La souche de coronavirus humain 229E (HCoV-229E), obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, É.-U.) a été cultivée sur la lignée cellulaire pulmonaire embryonnaire humaine L132. Des cellules L132 ont été infectées avec ce coronavirus à une multiplicité d'infection de 0.01, ce pour 43 heures à 33°C. L'antigène témoin utilisé a été préparé à partir d'une culture parallèle de cellules L132 non-infectées. Suite à l'incubation, les cellules ont subi trois cycles de gel/dégel, respectivement à -70° et 37 °C. L'extrait cellulaire a ensuite été clarifié par centrifugation à 9 600 x *g* pour 20 min, puis congelé à -70 °C jusqu'à utilisation. Tout juste avant usage, la charge infectieuse de ces lysats clarifiés (potentiellement 10⁶ TCID₅₀/mL), a été inactivée par une exposition de 20 min aux rayons ultra-violets.

Le HCoV-OC43 (ATCC; Rockville, MD, É.-U.) a été isolé d'une culture HRT-18 (lignée cellulaire de carcinome de colon), cultivée, infectée, puis récoltée comme décrit pour l'antigène HCoV-229E. Une culture parallèle de cellules HRT-18 non-infectées a servi d'antigène témoin.

1.3 Production de clones lymphocytaires humains du sang périphérique

Un prélèvement d'environ 400mL de sang périphérique humain a été réalisé dans des sacs stériles héparinés. Ce volume de sang génère en général assez de cellules leukocytaires (PBL) par patients pour l'étude et ses rondes de stimulations antigéniques nécessaires. Une concentration cellulaire raisonnable

peut-être estimée grossièrement à 1×10^6 cellules/mL de sang, mais ce chiffre peu fluctuer grandement entre les individus. Ainsi, les échantillons de sang humains ont été centrifugés sur un gradient de Ficoll/Hypaque™ (Pharmacia) afin d'isoler les PBMC. Toutes les centrifugations ont eu lieu à 4 °C et les échantillons cellulaires furent gardés sur glace jusqu'à leur mise en plateaux. Ces échantillons ont ensuite été resuspendus à une concentration de 1×10^6 cellules/mL dans du milieu de culture complet: RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté de 50U/mL d'un mélange pénicilline et streptomycine (Gibco), 5×10^{-5} M de β -mercaptoéthanol et 10% (v/v) de sérum autologue inactivé (30 min à 56 °C). Ce sérum constitue la couche supérieure obtenue après gradient de Ficoll/Hypaque™.

Les cellules ont ensuite étéensemencées à 1×10^6 cellules/mL, dans des plateaux 96 puits à fonds plats (ICN), pour un volume total de 200 μ l. Puis, l'antigène de sélection fut ajouté à chaque lignée, à raison d'un antigène par plateau. On a utilisé généralement un plateau par antigène, mais ce rapport du nombre de puits (lignée) par antigène a pu diminuer si moins de cellules avaient été isolées du sang périphérique au départ ou si un volume minimal de sang avait été prélevé. Les antigènes du SNC sont la MBP et la PLP; ils ont été ajoutés à raison d'une concentration finale de 6 μ g/puits. Les extraits inactivés de coronavirus sont présents dans chaque puits à une dilution finale de 1/20. Les dilutions, lorsque nécessaire, ont toujours été réalisées dans du RPMI 1640. Après la mise en culture, les cellules PMBC qui restaient ont été congelées afin de servir de CPA autologues dans les rondes de stimulations antigéniques à venir, ces activations cellulaires exigeaient une présentation antigénique restreinte dans le contexte du soi.

Afin que les PBMC puissent être congelés pour ensuite servir de CPA autologues efficaces, la quantité de DMSO (Gibco), un agent fréquemment utilisé en congélation pour préserver l'intégrité des membranes cellulaires, ne doit pas dépasser 15% (v/v) de la concentration finale. Le DMSO a donc été ajouté à la bonne concentration, à du RPMI complet de congélation. Ce milieu est similaire

au milieu RPMI complet, cependant la concentration finale de sérum autologue fut montée à 20% (v/v). Les concentrations cellulaires lors de la congélation variaient entre 2 et 10×10^6 cellules/mL. Les cellules ont été congelées rapidement, sur glace sèche, puis entreposées à -80 °C.

Après sept jours de culture, de l'IL-2 (Hoffman-La Roche) a été ajoutée aux lignées primaires lymphocytaires T humaines (TCL) à une concentration finale de 20 U/puits. Au jour 12 de mise en culture, un test d'incorporation de thymidine-tritiée permettait d'identifier la spécificité antigénique des TCL. Cet essai est décrit plus bas. Par la suite, les TCL montrant une spécificité antigénique relative à l'antigène utilisé pour la sélection antigénique initiale ont été clonées par dilution limite pour l'obtention de clones lymphocytaires T (TCC). Des dilutions sériées de 3, 1 et 0.1 cellules/mL ont été réalisées avec les TCL lavées précédemment par centrifugation à $800 \times g$ dans un tampon phosphate pH 7.0 standard. Dans un volume final de 10 μ l/puits, les dilutions furent mises en plateau Terazaki-60 puits (ICN). Puis, un autre 10 μ l fut ajouté à chacun des puits pour obtenir un volume final de 20 μ l. Ce dernier volume ajouté contient les APC autologues décongelées, puis lavées, resuspendues à 5×10^5 cellules/puits et irradiées à 2500 rad, ainsi que l'antigène de sélection en concentration semblable à celle utilisée lors de la mise en culture initiale. Une deuxième série parallèle de plateaux Terazaki a ensuite été montée afin que de la PHA soit également ajoutée à ces cultures cellulaires parallèles de TCC.

Afin de s'assurer d'une efficacité de prolifération cellulaire optimale, de l'IL-2 a été ajoutée périodiquement (3-4 jours selon la prolifération) aux cultures, à raison de 5 U/puits. La culture et l'expansion cellulaire des TCC fut surveillée de près, à chaque jour. Les TCC humains primaires exhibent parfois des particularités propres, telle la vitesse de croissance: certains prolifèrent rapidement, d'autres non. La distribution statistique de Poisson prévoit qu'un clone est obtenu lorsque moins de 33% des puits ensemencés montre une prolifération cellulaire positive (Chen *et al.*, 1982). La culture cellulaire des TCC a donc vérifiée chaque jour avec un microscope inversé à contraste de phase (Nikon); une population

lymphocytaire activée est caractérisée à ses tous débuts par la présence de blastes ronds et clairs formant une colonie serrée. Dans les puits qui présentaient peu ou pas de croissance cellulaire on pouvait observer une couche de CPA, possédant des structures cytoplasmiques marquées, qui s'étendait à l'ensemble du puits. Subséquemment, une population lymphocytaire en expansion sera marquée par la présence d'acidité dans le milieu, ce qui le fait varier en couleur. Les cellules en culture ont ainsi été changées vers un puits plus spacieux, selon leur vitesse de croissance, pour éviter l'inhibition de contact qui ralentirait l'expansion cellulaire.

Lorsque le nombre de cellules le permettait, des test standards d'incorporation de thymidine-tritiée ont été réalisés pour déterminer la spécificité antigénique des clones T. Ainsi, les TCC sélectionnés comme répondant respectivement aux antigènes de sélection, soit les lysats inactivés HCoV-229E et HCoV-OC43, et les protéines du SNC MBP et PLP, ont été maintenus en culture, restimulés antigéniquement à des intervalles de deux semaines (toujours avec des APC autologues irradiées). Après un maximum de quatre restimulations antigéniques post-clonage, la spécificité antigénique étant reconfirmée chaque fois, les TCC de spécificité antigénique connue furent congelés à -80 °C dans du milieu RPMI 1640 de congélation, tel que décrit précédemment. Certains TCC sont monospécifiques, reconnaissant l'antigène de sélection, et parfois un phénomène de réaction antigénique croisée est obtenu, un TCC reconnaissant l'antigène de sélection et un antigène d'intérêt donné. Ces clones, dits croisés, ont été, par exemple, sélectionnés par HCoV-229E, mais sont activés également lorsque la MBP leur est présentée. Ces TCC primaires à long-terme ont, par la suite, été étudiés au niveau moléculaire.

1.4 Test d'incorporation de thymidine-tritiée: spécificité antigénique

Afin de déterminer la spécificité antigénique des lymphocytes T, des tests d'incorporation de thymidine-tritiée ont été faits. Les cultures lymphocytaires ont

donc été, à chaque restimulation antigénique, divisées en deux, une partie servant à l'expansion cellulaire, l'autre utilisée pour la caractérisation antigénique. Dans un plateau à 96 puits ronds (ICN), un total de 1×10^4 lymphocytes T ont été placés en présence de 5×10^4 à 1×10^5 APC (en fonction du nombre de PBMC isolés au départ) et en présence de l'antigène de sélection en concentration standard, dans un volume total de 0.1mL/puits. En plus de tous les antigènes témoins relatifs aux antigènes de sélection, soit le milieu de culture complet pour les protéines du SNC et des lysats de cellules non-infectées pour les antigènes viraux, un antigène témoin supplémentaire fut utilisé dans le cadre de cet essai. Afin de surveiller la présence de cellules T mémoires ou toute prolifération cellulaire aspécifique, la toxine tétanique (Biochem Vaccins), à raison d'une concentration finale de 1 µg/puits, a été utilisée. Ainsi par exemple, un TCC sélectionné par un antigène du SNC fut testé pour la reconnaissance des antigènes viraux, des témoins appropriés et de la toxine tétanique témoin. Cette toxine est obtenue par purification sur charbon de bois (Biochem Vaccins). Le clone ne fut cependant pas mis en présence de l'autre antigène du SNC. Cette procédure aurait été intéressante, mais des restrictions quant la quantité de cellules clonales disponibles ne permettait pas de réaliser davantage d'analyses.

Après 72 heures de co-culture avec les antigènes (Ag), de la thymidine-tritiée (1µg/puits: Amersham) était ajoutée pour une période d'incubation de 18 heures. Les lymphocytes ont ensuite été récoltés sur filtre de microfibre (Skatron) par un récolteur de cellules de modèle Cell Harvester Micro 11050 de Skatron. Les comptes de radioactivité incorporée ont ensuite été réalisés dans 2 mL de fluide à scintillation Ultimagold™ (Packard) à l'aide d'un compteur à scintillation Canberra Packard Tri-Carb 2200a. Les indices de stimulation (I.S.) ont été calculés comme le ratio de radioactivité (coups par minute; CPM) incorporée en présence de l'antigène d'intérêt versus celui obtenu pour l'antigène témoin correspondant. Des I.S. supérieurs à 2.0 ainsi que des comptes de radioactivité incorporée supérieurs à 800 CPM ont été considérés significatifs lors de ce projet; cette limite est quelque peu inférieure aux seuils limites déterminés pour le travail

réalisé avec des lignées lymphocytaires humaines (Talbot *et al.*, 1996), mais est représentative de valeur utilisées chez la souris (Nitta *et al.*, 1989). En effet, le seuil significatif de CPM fut diminué à 800 en raison du nombre peu élevé de cellules impliquées durant ces test réalisés avec des clones lymphocytaires T primaires.

1.5 Typage HLA-DR des participants

La grande majorité des participants à cette étude ayant permis la production de TCC primaires à long-terme, ceux-ci furent typés pour leur HLA-DR. À partir de leukocytes du sang périphérique précédemment purifiés sur gradient de Ficoll Hypaque™, puis congelés, des réactions de polymérisation en chaîne avec des amorces correspondantes aux différents haplotypes ont permis d'identifier le HLA-DR des participants. Cette procédure fut effectuée au laboratoire d'Histocompatibilité de l'INRS-Institut-Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada.

2.0 CARACTÉRISATION DU RÉCEPTEUR T CROISÉ

2.1 Préparation des échantillons d'ARN

Les TCC primaires humains dits à long-terme ont été gardés congelés jusqu'à l'extraction d'ARN qui permettrait leur étude au niveau moléculaire. Comme le nombre de lymphocytes congelés après quatre rondes de restimulations antigéniques, pour expansion et la détermination de la spécificité antigénique (environ deux mois et demi de culture) était extrêmement limité, se situant plus souvent dans les centaines de mille et rarement proche des millions, la remise en culture pour procéder à une expansion clonale a été tentée lors d'expérience

préliminaires. Malgré le fait que les TCC répondent encore à leur antigène de sélection après remise en culture, un fort taux de mortalité cellulaire est survenu très rapidement. Les extractions d'ARN ont donc été réalisées sur les TCC congelés initialement.

Ainsi, les TCC congelés ont été rapidement décongelés et centrifugés rapidement à 1200 x g dans une centrifugeuse Minispin™ (Fisher) pour 10 min, à 4 °C. Les lymphocytes ne furent pas lavés à cette étape pour éviter toute dégradation de l'ARN cellulaire. Le culot cellulaire (environ de 10 000 à 50 000 cellules) a par la suite été lysé et resuspendu par pipettage et vortexage dans 750µl de Trizol™ (Invitrogen). Ce mélange a été incubé sur glace pour 5 min. Avant de vortexer pour 15 sec, 200 µl de chloroforme (Sigma) fut ajouté, puis ce mélange incubé 10 min sur glace. L'échantillon a alors été recentrifugé 15 min à vitesse maximale dans une centrifugeuse de table Eppendorf™ 5417C (environ 12 000 x g), toujours à 4 °C. La phase aqueuse fut par la suite prélevée dans un tube propre et 500µl d'isopropanol (Sigma) et 15µg de glycogène (Invitrogen) furent ajoutés; ce mélange a été incubé sur glace 10 min, puis centrifugé à vitesse maximum 10 min à 4 °C. Le culot d'ARN a ensuite été lavé dans de l'éthanol 75% (v/v) (dilution réalisée dans de l'eau traitée avec DEPC) à 7 500 x g, 5 min à 4 °C. Le culot fut finalement séché pour une minute à 55 °C puis dissout et solubilisé dans 10 ml d'eau DEPC, 10 min à 60 °C. La concentration d'ARN fut déterminée par spectroscopie à 260nm, sa qualité évaluée par le ratio des absorbances obtenues à 260nm et 280nm qui devraient se situer le plus prêt possible de 1,8.

2.2 Vérification du phénotype CD4+ ou CD8+ des TCC

Afin de confirmer le phénotype CD4+ ou CD8+ des TCC humains primaires obtenus, un ensemble de clones monospécifiques, montrant différentes spécificités antigéniques ont été sélectionnés. L'ARN de ces clones fut extrait tel que décrit ci-haut par une procédure au Trizol™. Par la suite, l'ARN (environ 0,1

à 0,3 µg d'ARN total) a été rétro-transcrit en ADNc avec la transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine (MuLV). L'amorce utilisée qui a été utilisé est un oligonucléotide d(T)₁₅ (Invitrogen), à raison de 1 µg par réaction. La transcription inverse fut d'abord précédée d'une étape permettant la relaxation de la structure de l'ARN: 5 min à 65 °C. La transcription inverse pour 90 min à 37°C a ensuite été complétée en un volume total de 50 µl, présence de 20mM d'un mélange dNTP (Roche) qui contient à part égale du dATP, dCTP, dGTP et dTTP et ajoutés 5 U d'inhibiteur de RNase (Roche) et 5 U de MuLV (Pharmacia).

Ensuite, une réaction d'amplification en chaîne (PCR) a été réalisée sur le cinquième de l'ADNc produit. À noter que toutes les réactions d'amplification relatives à ce projet ont eu lieu dans un appareil PCR Perkin Elmer Cetus. Dans un volume final de 50µl ont été mélangés 10µl d'ADNc, 20mM dNTP mix, l'enzyme *rTaq* DNA polymérase (Pharmacia) pour 2 U/réaction et 10mM de chacune des amorces désirées.

Les amorces utilisées étaient gène-spécifiques respectivement pour CD4 et CD8 (Pour détails sur ces amorces, voir Tableau 1):

5'→3'

CD4-1: TTC CCA CTC GCC TTT ACA GTT G

CD4-2: CAC CTG ACA CAG AAG AAG ATG CC

CD8-3: CAC CAA GAA GTC CAC CCT CAA G

CD8-4: GAA CTC CTA TCC TCA AAC CCG C

Les réactions PCR furent réalisées par une incubation à 95 °C pour 5 min, suivie d'un appariement à 55 °C pour 5 min. La séquence d'amplification qui fut maintenue pour 35 cycles est la suivante: 94°C pour 1 min, 55°C pour 2 min et 72°C pour 2 min.

Les amplicons ont ensuite été visualisés sur un gel d'agarose 1% (p/v) par une coloration au bromure d'éthidium et la taille attendue de ces derniers était, respectivement pour CD4 et CD8, 599 pb et 780 pb.

2.3 Caractérisation moléculaire de la chaîne β du RCT

Afin d'identifier la famille du RCT, en déterminant la nature de sa chaîne β , ainsi que sa portion hypervariable impliquée directement dans l'interaction avec le peptide qui est présenté par une molécule du CMH, nous avons choisi d'utiliser une technique commerciale: le GeneRacerTM (Invitrogen). Cette application technologique permet la transcription inverse, puis l'amplification de gènes pour laquelle la portion 5' est inconnue, en utilisant le principe de RACE (*Rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends*) (Schaefer, 1995). Comme les RCT étudiés étaient de familles variable β ($V\beta$) inconnues et que la portion constante β en 3' permettait l'élaboration d'amorce d'amplification, ce procédé apparaissait comme idéal. Brièvement, un système d'ancre qui fut lié en 5' de l'ARN permettrait l'utilisation d'amorces reconnaissant cette portion nouvellement liée en combinaison avec l'amorce 3' connue. Un des principaux avantages de cette technique fut l'amplification de toutes les familles de $V\beta$ possibles, l'amorce spécifique étant située dans la portion $C\beta$.

Ainsi, après extraction de l'ARN total par la méthode du TrizolTM, l'ARN du TCC étudié (entre 0,1 et 0,3 μ g) a été inversement transcrit selon le protocole standard du GeneRacerTM. Brièvement cette technique se déroule ainsi, une première étape de déphosphorylation est suivie de l'enlèvement de la coiffe 5' de l'ARN. Un oligonucléotide d'ARN GeneRacerTM est ensuite attaché à l'extrémité 5' des ARN décoiffés précédemment à la réaction de transcription inverse, réalisée par un oligonucléotide d(T) fourni. Cette stratégie permettait donc l'amplification par l'utilisation d'une amorce complémentaire à la portion 5' ajoutée (d'ARN GeneRacerTM) et d'une amorce 3' déterminée et connue. L'amorce 3' confère donc la spécificité à l'amplification. En effet, cette portion $C\beta$ étant constante chez les $V\beta$, une amorce désignée $C\beta$ fut synthétisée, puis utilisée comme amorce de sélection pour les amplifications par PCR; cette amorce est décrite au Tableau 1.

$C\beta$: 5' CCT CCT TCC CAT TCA CCC ACC 3'

L'amplification de la chaîne β du RCT fut l'étape suivante. Les conditions utilisées ont été deux incubations de 5 min, respectivement à 94 °C et 55 °C. Puis, 35 cycles de dénaturation, d'appariement et d'élongation selon: 94 °C pour 1 min, 55 °C pour 2 min et 72 °C pour 2 min, furent réalisées. Dans ce cas, la *Taq* DNA polymérase utilisée a été l'Expand™ haute fidélité (Roche) ou la *Taq* Platinum™ (Invitrogen).

Les amplicons obtenus ont ensuite été mis sur gel d'agarose 1% (p/v), et prélevés de ce gel matriciel. Ils ont été purifiés par passage sur une colonne S.N.A.P.™ (Invitrogen). La section de gel d'agarose contenant le produit de PCR a été placée sur une colonne et l'ADN élué par centrifugation à vitesse maximale avec une centrifugeuse de table, pour 10 sec. Avant le clonage les extrémités de produits d'amplification avec la *Taq* Expand™ ont été polies pour clonage; la *Taq* Platinum™ fournissant déjà des extrémités non-protubérantes, aucun polissage ne fut requis. Il est à noter que ces deux *Taq* DNA polymérases sont de haute fidélité, avec un taux d'erreur de $8,3 \times 10^{-6}$ (Frey et Suppman, 1995).

L'enzyme T4 DNA polymérase a été utilisée, lorsque le polissage des extrémités protubérantes, était nécessaire. Dans un volume final de 50 μ l, on comptait 1 à 5 μ g d'ADN (amplicon), une concentration finale de 2mM dNTP et l'enzyme, le tout dans un tampon enzymatique approprié, laissé pour 20 min à température pièce. Une incubation de 20 min à 70 °C était nécessaire à l'inactivation de l'enzyme. Le mélange fut ensuite précipité à l'éthanol (ajout de 1/10 sels et de 3 volumes d'éthanol), puis solubilisé dans 20 μ l d'eau et conservé.

Le clonage de ces amplicons, comme inserts, a été obtenu par la stratégie Zero Blunt™ TOPO PCR Cloning kit pour séquençage (Invitrogen). Le vecteur pCR4blunt™ fut utilisé. Ce vecteur est fourni déjà linéarisé, la topoisomérase I de *Vaccinia* liée à l'extrémité 3' de ce dernier. Cette enzyme reconnaît l'ADN double brin et le clive en un site précis après 5'-CCCTT. Puis, en utilisant l'énergie obtenu de ce clivage de phosphodiester l'enzyme se trouve liée au vecteur par

la tyrosine-274. Ce lien phospho-tyrosique est assez stable pour permettre le clonage rapide du complexe vecteur-insert nouvellement formé.

L'amplicon a ensuite été mis en présence du vecteur dans un tampon approprié pour 5 min, à température pièce et le produit de la ligation utilisé pour la transformation dans des cellules compétentes (Invitrogen). Brièvement, le tiers du mélange de ligation (total 6µl) fut mis en présence des 50µl de cellules compétentes *E.coli*, pour une incubation de 30 min sur glace. Un choc thermique de 30 sec à 42 °C a été effectué, puis le mélange a été remis sur glace. Un milieu de culture bactérien SOC, aussi fourni par Invitrogen, fut ensuite ajouté au mélange, à raison de 250 µl. Le mélange, encore en tube, fut ensuite agité à 37 °C pour une heure et étalé pour 12 à 16 heures sur Petri contenant de l'ampicilline 100 µg/mL (milieu LB, 1.0% (p/v) Tryptone, 0.5% (p/v) Extrait de levure, 1.0% (p/v), NaCl, pH 7.0, le tout préparé dans de l'eau distillée. Ajout de 15g/L d'agar). De plus, le vecteur pCR4blunt™ permettait la sélection directe des clones recombinants obtenus, car dans cette construction, l'insert intervient en bloquant l'expression d'un gène létal pour *E.coli*: *ccdB*. La sélection bleu/blanc n'est donc pas requise, les clones obtenus étaient pour la majorité positifs pour la présence de l'insert.

L'ADN plasmidique a ensuite été isolé de colonies bactériennes par la technologie de mini-préparation d'ADN Miniprep Concert™ haute pureté (Invitrogen), selon les instructions données par le manufacturier. Une digestion *EcoRI* (Pharmacia) standard permettait de sélectionner les ADN plasmidiques qui furent envoyés au séquençage. Cette enzyme de restriction flanquait tout insert présent dans le vecteur pCR4blunt™. Finalement, le séquençage des plasmides isolés a été effectué par BioS&T, Lachine, Québec, Canada.

Pour chaque TCC envoyé au séquençage, les amorces T3 et T7 permettaient le séquençage bidirectionnel (dans les sens 5' vers 3' et 3' vers 5') de l'ADN plasmidique et un total de 10 ADN plasmidiques, obtenus de 10 colonies bactériennes différentes, furent séquencés pour chaque TCC étudié.

2.4 Validation de la clonalité

Pour chaque TCC étudié au niveau moléculaire et cloné, des analyses additionnelles ont été réalisées dans le but de confirmer la clonalité cellulaire avec un plus grand pouvoir statistique. Donc, en plus d'un clonage cellulaire par dilution limite, l'obtention de TCC après quatre rondes de restimulation antigéniques et les analyses de séquençage de ces derniers pour la chaîne β de leur RCT, une étape de diversité PCR augmentait le nombre de colonies bactériennes analysées. Ainsi, un centaine de colonies bactériennes ont été testées par amplification confirmer l'uniformité de l'amplicon obtenu. En utilisant l'amorce C β en combinaison avec des amorces situées dans le portion CDR3 des TCC antigéniquement croisés, une amplification clone-spécifique fut donc réalisée.

Comme les résultats présentés plus loin le montrent, un total de 10 clones lymphocytaires T antigéniquement croisés ont été obtenus. Mais des études moléculaires furent possible pour seulement 5 clones. Cependant, des 5 TCC croisés obtenus, une transformation ayant donné un très faible taux de transformants ne permettait pas cette analyse de diversité sur la même transformation ayant servie à l'obtention des 10 colonies séquencées. Néanmoins, la présente étape fut effectuée pour les 4 autres clones lymphocytaires T à long-terme, soit: P7a, P8a, P12a et P13a.

Précédant les amplifications, le matériel a été préparé comme suit. Un petit aliquot de chacune des colonies bactériennes choisies fut resuspendu dans 50 μ l d'eau stérile. Ce mélange a ensuite été bouilli pour 5 min et centrifugé à vitesse maximale d'une centrifugeuse de table. Puis, un aliquot de 5 μ l du surnageant fut prélevé pour la réalisation de l'amplification par PCR.

Les amorces utilisées respectivement pour chaque clone en plus de l'amorce C β sont indiquées ci-bas, mais un tableau récapitulatif (Tableau 1) de toutes les amorces étudiées dans ce projet est disponible pour les détails.

Les amorces contenues dans la portion hypervariable β sont donc:

5' → 3'

TCR-7a-1: AGT CTA AAT CCA GCG AGT TAT GG

TCR-8a-1: AGC TTA AGC CTG TAT AGC GGT

TCR-12a-1: AGC AGC TTA AAT GGG AGC CCA

TCR-13a-1: AGC CTC AGC CTA TTA AGC CCA

Les amplifications ayant donné des résultats négatifs furent systématiquement testées pour la présence d'insert grâce aux amorces T7 et T3 standard qui flanquent ce dernier. Les colonies testées par ce PCR diversité et trouvées négatives furent éliminées et remplacées par d'autres.

Finalement, pour conclure la méthodologie, ci-joint, un tableau comportant une description détaillée de toutes les amorces utilisées lors de ce projet. Les amplifications témoins positifs pour la majorité des amplifications réalisées sont souvent des gènes β -actine ou GAPDH (glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase).

Tableau 1. Description des amorces utilisées lors de ce projet.

Amorce	Séquence 5'→ 3'	Gène humain	Positions d'appariement sur le gène	Longueur (mers)	%GC	Température d'appariement (°C)
CD4-1	TTC CCA CTC GCC TTT ACA GTT G	CD4 ¹	742-765	22	50	64
CD4-2	CAC CTG ACA CAG AAG AAG ATG CC	CD4 ¹	1317-1340	23	52	63
CD8-3	CAC CAA GAA GTC CAC CCT CAA G	CD8 ²	482-503	22	55	55
CD8-4	GAA CTC CTA TCC TCA AAC CCG C	CD8 ²	1261-1240	22	55	55
GAPDH-H	CAC CTG GTG CTC AGT GTA GC	GAPDH ³	10-68	19	55	56
GAPDH-I	GTG AAG GTC GAA TGC AAC G	GAPDH ³	824-843	20	54	55
β-actine-1*	GCT CAC CAT GGA TGA TGA TAT CGC	β-actine ⁴	GeneRacer™ Kit	24	--	55
β-actine-2*	GAC CTG GCC GTC AGG CAG CTC G	β-actine ⁴	GeneRacer™ Kit	22	--	55
Cβ	CCT CCT TCC CAT TCA CCC ACC	Chaîne β RCT ⁵	202904-202924	21	61	66
5' GeneRacer™*	CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA	--	Adaptateur	23	--	--
5'nGeneRacer™*	GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA	--	Adaptateur	26	--	--
TCR-7a-1	AGT CTA AAT CCA GCG AGT TAT GG	Hypervariable β	**	23	56	58
TCR-8a-1	AGC TTA AGC CTG TAT AGC GGT	Hypervariable β	**	21	48	57
TCR-12a-1	AGC AGC TTA AAT GGG AGC CCA	Hypervariable β	**	21	52	64
TCR-13a-1	AGC CTC AGC CTA TTA AGC CCA	Hypervariable β	**	22	52	62

*: Fourni avec la trousse GeneRacer™

1: Cell 42, 93-104 (1985); GI 10835166

2: J. Exp. Med. 168 (6), 1988; GI 4826666

3: Arbour *et al.*, 2000.

4: GeneRacer™ Kit (Version D), Invitrogen

5: Science 272 (5269), 1755-1762 (1996); GI 1552511

** : Les amorces 5' des clones P7a, P8a, P12a, P13a correspondent à la portion hypervariable β.

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

1.0 DESCRIPTION DE LA COHORTE DE PARTICIPANTS

1.1 Présentation de la cohorte

Au total, 32 patients atteints de SEP et 6 témoins sains ont participé à cette étude. Les patients ont servi directement à la vérification des objectifs, les témoins sains ont en quelques sorte servi de témoins techniques, utilisés surtout dans les mises au point et l'optimisation du protocole. Les participants, dont la confidentialité a été conservée à tout moment, sont identifiés de P1 à P32, pour les patients atteints de SEP. Les témoins sains sont désignés de T1 à T6. Notre dissertation portera surtout sur les patients atteints de SEP, ces derniers étant partie intégrante de ce projet. Tous les participants ont donné un échantillon de sang périphérique, de 200 à 400 mL, ce dernier volume étant grandement souhaité, car un plus grand nombre de cellules au départ assure une plus grande latitude lors de l'expérience, en assurant que le protocole complet pourra être appliqué à l'échantillon. Le protocole expérimental a été réalisé, mais en ajustant la production de TCL initiale ajustée au nombre de cellules disponibles, en fonction du volume de sang prélevé.

Une grande variabilité entre les patients fut observée, quant à la capacité de production de TCC. Les 32 patients étudiés ont permis la production de TCL contre tous les antigènes étudiés. Cependant, aucune production de TCC primaires long-terme, que ce soit pour la production de clones monospécifiques reconnaissant l'antigène de sélection ou des clones croisés antigéniquement, ne fut obtenue d'un certain nombre d'entre eux.

Le Tableau 2 présente uniquement les participants de groupe 'patient' de l'étude ayant permis la production de TCC d'une spécificité antigénique connue, ce qui ne fut pas le cas pour 10 patients ayant également participé à l'étude. Il indique genre, âge, type de SEP, typage HLA-DR, ainsi que le nombre de TCC produits en fonction des antigènes d'intérêt, ce pour chaque individu. Il est important ici

de noter qu'un TCC primaire est de spécificité antigénique connue et qu'il a été restimulé antigéniquement en culture *in vitro* au moins 4 fois.

1.1.1 Âge, genre, type de SEP, typage HLA

Le Tableau 2 montre que sur une cohorte de départ de 32 patients atteints de SEP, seulement 22 participants ont permis la production de TCC primaires à long-terme; de ce groupe, 18 individus sont des femmes. L'âge des participants s'échelonne entre 28 et 69 ans, avec un âge moyen de 43,9 ans pour les femmes et de 58 ans pour les hommes. Des formes de SEP de types rémission-rechute et chronique-progressive ont été décrites chez les participants et ces formes sont respectivement retrouvées chez 13 et 9 patients.

1.1.2 Total des clones obtenus selon les participants

Le Tableau 3 montre que 80 TCC primaires à long-terme furent produits au total avec l'antigène de sélection HCoV-229E, que 34 furent obtenus pour HCoV-OC43, 19 TCC générés avec la MBP et 12 avec la PLP. Ainsi 80% environ des clones obtenus ont été isolés et cultivés avec les antigènes coronaviraux. L'antigène HCoV-229E est donc celui ayant permis la plus grande production de clones T.

2.0 PRODUCTION ET CULTURE DE CLONES LYMPHOCYTAIRES

2.1 Clones lymphocytaires monospécifiques

Les clones monospécifiques ne reconnaissent par définition que l'antigène de sélection qui leur fut présenté à la mise en culture initiale.

2.1.1 Clones monospécifiques

Le Tableau 3 montre le sommaire des clones lymphocytaires T monospécifiques obtenus lors la réalisation de ce protocole. Pour les 32 patients atteints de SEP, un total de 145 TCC fut obtenu, alors que 35 clones lymphocytaires T ont été isolés à partir du sang périphérique de 6 témoins sains. Les antigènes de sélection viraux ont assuré la production de 114 des 145 clones pour le groupe patients. La même prévalence pour les TCC reconnaissant ces antigènes est observée durant les mises au point et optimisations, à raison de 28 sur 35 pour les témoins sains.

2.1.2 Phénotype CD4 ou CD8

La façon dont le protocole a été élaboré permettait d'anticiper que les clones lymphocytaires produits allaient être majoritairement de phénotype CD4+. Les clones antigéniquement croisés (décrits plus bas) furent consacrés à des études moléculaires, ce matériel étant très limité et des plus précieux. Cependant, un bassin de 28 clones monospécifiques sélectionnés (28 TCC sur 145 produits au total) à permis de confirmer le phénotype CD4+, du moins pour ce groupe. Ces résultats furent obtenus par amplification gène spécifique d'une portion du gène CD4. La Figure 2 présente ces résultats. Ainsi, l'ARN des clones sélectionnés a été extrait selon la méthode du Trizol™, tel que décrite ci-haut, et utilisé pour des amplifications gène-spécifiques avec les amorces respectives aux gènes CD4 et CD8, afin de déterminer le phénotype exprimé. Une réaction de séquençage a

permis de confirmer que la portion amplifiée par ces amorces comportait une portion de CD4 ou CD8, respectivement.

3.0 CROISSANCE, PROLIFÉRATION ET CONSERVATION

Des observations typiques ont été réalisées chez les clones lymphocytaires T primaires humains gardés en culture à long-terme. Ces résultats permettent de dresser un certain tableau quantitatif et qualitatif sur la dynamique de croissance cellulaire. Cependant, il est important de noter ici que nos observations ont aussi permis de conclure que chaque clone lymphocytaire T primaire semble proliférer selon un rythme de croissance bien à lui. En général, on arrivait à appliquer le protocole expérimental de production de clone d'une manière assez fidèle, mais on a souvent constaté une variabilité de croissance entre ces cellules primaires.

3.1 Profils de croissance observés après trois et quatre stimulations

Le Tableau 4 présente la distribution complète des 145 clones lymphocytaires T humains primaires à long-terme monospécifiques obtenus au cours de ce projet, à travers les profils de croissance après la troisième (avant-dernière) et la quatrième stimulation antigénique. Ce tableau permet de visualiser un peu les profils de croissance des clones lymphocytaires T primaires en fonction du temps. En effet, un nombre bien supérieur de TCC était présent à la troisième stimulation antigénique, ce nombre apparaît chuter dramatiquement après la quatrième stimulation antigénique. Le total des TCC monospécifiques a passé de 229 à 145 entre ces deux restimulations antigéniques. Qualitativement, les TCC reconnaissant les antigènes HCoV-229E et MBP sont ceux pour qui la chute en nombre semblait la plus drastique. Nos critères déterminent qu'un TCC primaire

à long-terme est défini après 4 stimulations antigéniques. Ainsi, pendant un période d'au moins 2 mois ces cellules furent en culture. Elles semblaient intègres et fidèles à leurs capacités cellulaires, car elles répondaient encore à l'antigène de sélection. En effet, une forte prolifération aspécifique non-antigène dépendante a pu être observée.

3.2 Patron de l'intensité de stimulation pour quatre clones lymphocytaires T

Un patron de prolifération typique, pour 4 TCC monospécifiques et pour chacun des antigènes étudiés (HCoV-229E, HCoV-OC43, MBP et PLP) est présenté à la Figure 3. Les comptes en radioactivité (CPM) sont ceux qui furent obtenus en lecture suite à la quatrième stimulation antigénique avec l'antigène de sélection initial (la première stimulation a été réalisée lors de la production de lignées) . On voit que les antigènes coronaviraux stimulaient les TCC correspondants permettant l'obtention de lectures supérieures à 7000 CPM. En effet, une prolifération claire quoique moins forte en CPM fut obtenue pour les stimulations avec les antigènes du soi issus du SNC. L'effet potentiel d'antigènes cellulaires, pour les stimulations effectuées avec les virus comme Ag est non considéré par soustraction, les cultures témoins étant des cultures parallèles de lysats cellulaires non-infectées. La valeur en CPM obtenue pour le témoin de l'antigène de sélection pouvait varier, mais c'est le ratio de ce dernier sur le témoin qui montrait si la stimulation était significative. En général les I.S. pour les clones lymphocytaires monospécifiques sont situés entre 5 et 12 et furent plutôt constants au long des 4 stimulations antigéniques.

3.3 Profils de prolifération après congélation

Le Tableau 5 illustre les profils de prolifération obtenus suite à la congélation et remise en culture de certains TCC. Trois clones lymphocytaires

monospécifiques obtenus du patient P7 furent congelés, puis remis en culture. Les TCC ont été décongelés rapidement et lavés dans du milieu RPMI 1640 complet; une stimulation antigénique avec l'antigène de sélection est concomittante à chaque remise en culture. Des tests pour vérifier la spécificité antigénique furent effectués deux semaines après cette stimulation. Deux des trois TCC qui reconnaissaient des antigènes viraux sont demeurés spécifiques, le troisième clone sélectionné avec la MBP n'était plus activé par cet antigène.

4.0 OBTENTION DE CLONES LYMPHOCYTAIRES ANTIGÉNIQUEMENT CROISÉS POUR LES ANTIGÈNES CORONAVIRAUX ET CEUX DU SNC

Après une longue période de mise au point, le protocole de clonage a permis la production de plusieurs clones lymphocytaires T primaires reconnaissant leur antigène initial de sélection. Cependant des clones lymphocytaires T antigéniquement croisés bispécifiques pour deux antigènes testés au cours de ce projet. Ainsi, un clone antigéniquement croisé, stimulé initialement avec un antigène coronaviral en plus d'être activé par le lysat cellulaire infecté correspondant, reconnaîtra également un antigène du SNC, et vice-versa. La pertinence pathologique d'un tel phénomène sera discutée plus loin, en discussion.

4.1 Bilan des clones lymphocytaires T mono- et bi-spécifiques produits

Le sommaire complet de tous les clones produits lors de cette étude est présenté au Tableau 6. Ce dernier permet de mettre en évidence que chez six des patients participant, un total de dix clones antigéniquement croisés est obtenus.

La fréquence et la proportion des clones T croisés versus les clones monospécifiques ne pourra être discutée comme telle, les clones lymphocytaires produits n'étant pas clonés directement du sang périphérique. Cette dernière approche technique a été tentée dans des tests préliminaires, mais elle ne permettait qu'une faible production de clones T. La production de lignées antigène-spécifiques permettait de générer davantage de clones, cependant, toutes les analyses de fréquences deviennent alors non-significatives dans ce contexte expérimental.

Cette étude a donc permis la production de dix clones antigéniquement croisés, six sont au départ sélectionnés avec des antigènes coronaviraux et quatre avec des protéines du SNC.

4.2 Description des dix clones antigéniquement croisés obtenus

L'obtention de clones lymphocytaires T antigéniquement croisés était un des objectifs principaux de ce protocole de recherche. Le Tableau 7 liste les I.S. et les comptes de radioactivité obtenus pour chacun des dix clones lymphocytaires T produits. L'I.S. est obtenu par le ratio des comptes en radioactivité incorporée après incubation avec l'antigène étudié et l'antigène témoin correspondant. Il est important de garder en tête que les antigènes viraux n'ont pas été étudiés entre eux. Ainsi par exemple, l'antigène HCoV-229E n'a pas été utilisé pour les tests réalisés sur les clones lymphocytaires sélectionnés avec HCoV-OC43. Également pour les antigènes du SNC, un clone sélectionné au départ avec l'antigène MBP ne serait pas mis en présence de PLP (un antigène du SNC) lors des analyses; les antigènes viraux furent ceux testés pour un tel clone.

Tous ces clones croisés ont maintenu leur double spécificité antigénique au cours de toutes les étapes de stimulations antigéniques qui permettent l'expansion cellulaire et les études de spécificité à long-terme. Si un clone lymphocytaire T perdait une réactivité, il était éliminé du lot. En effet, nous avons

observé pendant les tests de prolifération que certains clones semblaient avoir perdu la réactivité à leur antigène initial de sélection, pour acquérir une réactivité contre un autre antigène étudié. Ce phénomène était observé plus fréquemment chez les clones lymphocytaires sélectionnés avec un des antigènes du SNC. Ils avaient tendance à ne pas proliférer en contact avec l'antigène du SNC, mais montrait ce que l'on aurait appelé une réaction croisée avec un des antigènes coronaviraux. Ces clones furent rejetés des analyses et non considérés. Ce phénomène de mono-réactivité croisée sera discuté plus tard.

Tous les patients de qui les clones lymphocytaires T sont obtenus ont été typés pour déterminer leur HLA-DR, cet haplotype étant potentiellement lié à la SEP. La moitié des six patients (P8, P13, P22) qui ont permis la production des clones croisés sont positifs pour le HLA-DRB1*1501, et quatre des ces patients (P7, P12, P13, P24) sont des femmes.

Dans le Tableau 7, les données relatives aux antigènes de sélection, ceux utilisés pour les restimulations bimensuelles, apparaissent en caractère gras. Le symbole N.S. indique que l'antigène fut testé pour ce clone, sans que des résultats significatifs ne soient obtenus (non-spécifique). Il importe d'ajouter que les critères de sélection des clones lymphocytaires T antigéniquement croisés sont les mêmes que ceux pour les clones monospécifiques, au niveau des critères de sélection et d'exclusion. Ainsi, les I.S. ici sont tous supérieurs à 2.4, et les CPM incorporés dans les tests de prolifération, pour l'antigène de sélection ainsi que pour l'antigène hétérogène sont supérieurs à 800.

De ces dix clones, quatre ont été sélectionnés avec HCoV-229E, deux avec HCoV-OC43, deux avec la MBP et deux avec la PLP. En général, un clone lymphocytaire croisé reconnaît son antigène de sélection et un autre antigène parmi ceux testés. Par exemple, un clone croisé sélectionné avec HCoV-229E reconnaîtra cet antigène et un second antigène de nature non-virale, comme la MBP. Cependant, nous avons obtenu deux clones, des dix clones croisés, qui ayant été sélectionnés respectivement avec HCoV-OC43 et HCoV-229E

reconnaissent à la fois les deux antigènes du SNC, soit la MBP et la PLP. Un autre fait à souligner: quatre clones lymphocytaires antigéniquement croisés sélectionnés avec les antigènes du SNC reconnaissent tous quatre l'antigène HCoV-229E. Selon ces observations, les antigènes les plus souvent impliqués dans le phénomène des réactions croisées coronavirus-myéline parmi ceux étudiés sont HCoV-229E et MBP.

Aucune conclusion ne peut être tirée entre la sévérité des symptômes de SEP pour un patient donné et la production de clones lymphocytaires T antigéniquement croisés pour les antigènes à l'étude. Quatre patients sur six étaient atteints de la forme chronique-progressive de SEP, deux de la forme rémissions-rechutes. Les deux hommes qui ont permis la production de clones croisés souffraient de la forme chronique-progressive.

Finalement, les clones lymphocytaires T qui sont identifiés en caractères gras, soit P7a, P8a, P12a, P13a et P13b, sont ceux pour lesquels des études moléculaires furent réalisées pour l'analyse de leur chaîne V β du RCT.

Ce projet a été réalisé avec des protéines purifiées du SNC. Cependant, des résultats ont aussi été obtenus avec le peptide MBP 84-102 (1 μ g/puits). En effet, un clone lymphocytaire T sélectionné avec HCoV-229E reconnaît également le peptide MBP d'une façon significative. La Figure 4 présente les indices de stimulation et la valeur des comptes obtenus lors du test d'incorporation à la thymidine. Une réaction croisée coronavirus-myéline est observée avec un peptide MBP. Nous ne disposons pas d'assez de cellules en culture pour analyser la prolifération lorsque des peptides MBP, plutôt que la protéine complète, étaient utilisés pour la stimulation antigénique; cet essai s'est révélé positif.

Le Tableau 8 montre des résultats préliminaires obtenus lors d'une expérience d'inhibition d'apoptose réalisée sur des lignées et des clones de lymphocytes

sélectionnés avec HCoV-229E, afin de vérifier si un inhibiteur d'apoptose de type z-vad avait un impact positif sur la longévité des lymphocytes T en culture. Des concentrations de z-vad (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)), un inhibiteur ubiquitaire de caspases, furent ajoutées au milieu de culture à raison de 1 à 100 μ M, diluées dans du DMSO (Déas *et al.*, 1998), lors de la quatrième restimulation antigénique avec l'antigène de sélection. Ce tableau montre les résultats du test d'incorporation de thymidine tritiée lors de la prolifération précédant l'ajout d'agent anti-apoptotique ainsi que les comptes obtenus après l'ajout, soit 14 jours plus tard. Les concentrations de Z-vad utilisées dans le contexte expérimental étudié n'ont pas permis de prolonger le maintien des lymphocytes spécifiques en culture, au contraire, on remarque même une perte de prolifération suite à la stimulation antigénique.

4.3 Caractérisation moléculaire des cinq clones lymphocytaires T croisés étudiés

L'analyse de la chaîne β du RCT permet d'identifier la famille β du RCT, mais permet aussi de caractériser la portion hypervariable du récepteur. Cette portion appelée CDR3 est située respectivement entre la fin et le début des portions de segment variable (V) et celle de jonction (J). Pour cette raison, le segment hypervariable est défini comme N-D-N dans le Tableau 9. Ce dernier présente les résultats de séquençage obtenus suite à l'étude de la chaîne β du RCT des 5 clones T de spécificité antigénique croisée qui ont été analysés moléculairement.

Le séquençage s'est déroulé ainsi pour chaque clones lymphocytaires T. Suite à une amplification PCR de la chaîne β du RCT des clones croisés désirés, l'amplicon obtenu est récupéré sur gel puis cloné dans un vecteur. Une transformation bactérienne est réalisée avec ce dernier et des transformants contenant le vecteur porteur de l'amplicon sont produits. Un total de dix colonies bactériennes est sélectionné pour séquençage ce, pour chacun des clones

lymphocytaires T antigéniquement croisés coronavirus-myéline étudiés. L'insert (l'amplicon) est séquencé dans les deux orientations par des amorces appariant de chaque côté des segments de vecteurs flanquant l'insert. Ainsi, pour une même transformation, dix colonies ont été testées et séquencées dans les deux sens. Les mêmes séquences relatives aux chaînes β du RCT impliqué ont toujours été confirmées similaires entre elles par ces analyses de séquençage. À l'occasion, des séquences aberrantes ont été obtenues; elles représentaient des bouts d'ARN ribosomiaux et ont simplement été écartées des analyses, étant considérées comme des vestiges d'amplification.

Ainsi, la portion V β du RCT de cinq clones lymphocytaires T antigéniquement croisés coronavirus-myéline est illustrée au Tableau 9. Le typage HLA-DR est indiqué; trois des cinq clones ont été obtenus de deux patients exprimaient le HLA-DRB1*1501. Les antigènes de sélection lors de la mise en culture initiale sont indiqués en caractère gras. Trois de cinq clones lymphocytaires T antigéniquement croisés ont été sélectionnés avec les antigènes viraux. De plus, le clone P13b reconnaît les deux antigènes du SNC.

Il est intéressant de mentionner que tous les participants à cette étude sont caucasiens. En effet, les répertoires V β peuvent varier en fréquence (expression préférentielle) selon les origines ethniques. Les portions V β ont été identifiées suite aux analyses de PCR et séquençage, et ce pour chaque clone. La famille V β 6 est présente dans quatre des cinq cas, avec deux différents allèles, 6S7*2 et 6S5. Le cinquième clone exprime pour son RCT, la chaîne V β 8S2. Pour chacune des chaînes β , la jonction vers la partie hypervariable est facilement identifiable, caractérisée par les cystéines responsables du pont disulfure permettant une courbure de la structure du RCT. Ainsi, la portion de fin de région β est lue comme CASS, soit Cystéine-Alanine-Sérine-Sérine.

La portion hypervariable est désignée N-D-N. Bien qu'aucune des séquences ne montre une signature moléculaire commune, certaines analogies sont

observées. D'abord on remarque une certaine similitude au niveau de leur longueur respective: ces régions comptent entre 6-7 acides aminés. De plus, quatre des cinq séquences CDR3 débutent par une leucine. On pourrait qualitativement ajouter que la leucine, sérine puis glycine sont des acides aminés qui semblent dominer.

Le segment de jonction J β est également décrit. On remarque que P12a , P13a et P13b ont les mêmes segments de jonction. La séquence TRL, Thréonine-Arginine-Leucine, en plus d'être commune pour ces trois clones lymphocytaires T est aussi incluse dans la jonction décrite pour le clone P8a.

Finalement, malgré certaines similarités entre les séquences des chaînes β des RCT de ces cinq clones lymphocytaires T étudiés, toute association entre tout patron hypothétique de structure et l'autoimmunité est prématurée.

4.4 Analyses de diversité

Pour quatre clones lymphocytaires T de spécificité antigénique croisés, P7a, P8a, P12a et P13a, des test additionnels furent effectués pour donner plus de poids statistique au statut de clonalité. La clonalité apparaît comme un concept régit étroitement par le pouvoir statistique. Ainsi, pour suggérer davantage la clonalité de ces clones lymphocytaires T primaires à long-terme produits après clonage cellulaire par dilution limite, une centaine de colonies bactériennes obtenues de la même transformation que celle des clones T croisés précédemment séquencés, furent testées par PCR.

La Figure 5 présente un exemple sommaire des résultats obtenus. Un total de 118 colonies furent testées pour le clone P8a; cette figure montre les résultats de l'amplification après migration des amplicons obtenus sur gels d'agarose. En effet, en utilisant les amorces correspondant respectivement à la portion CDR3

du clone d'intérêt et à la partie constante C β , des colonies bouillies furent testées pour la présence de l'amplicon. La taille des amplicons obtenus, de même que les résultats compilés dans l'ensemble pour chacun des clones sont indiqués au Tableau 10. Sur les 100 colonies testées, certaines se sont avérées négatives au PCR. Les colonies bactériennes ont été bouillies et non vérifiées systématiquement pour la présence d'insert avant PCR. Ce dernier permettait de déterminer si les colonies négatives portaient un plasmide contenant un insert. Pour ce faire, des amorces commerciales standard utilisées pour se lier au vecteur (T3-T7) ont été utilisées. Ces colonies négatives, suite au PCR CDR3, après une amplification de vérification par T3-T7 ne comportaient bel et bien aucun insert.

Donneur SEP	Sexe	Âge	Type SEP	HLA-DR	Nombre de clones lymphocytaires T obtenus selon les antigènes utilisés				
					229E	OC43	MBP	PLP	Total
P4	F	35	RR	8, 15	1	0	0	0	1
P5	F	65	CP	7, 17	2	0	2	0	4
P6	F	45	RR	ND	3	0	0	0	3
P7	F	34	CP	11, 17	1	1	0	3	5
P8	H	58	CP	15, 17	3	2	0	0	5
P9	F	34	CP	15, -	1	0	1	0	2
P11	F	42	RR	ND	1	0	0	0	1
P12	F	38	RR	13, 13	8	0	0	0	8
P13	F	54	RR	15, -	8	6	5	1	20
P14	F	45	CP	ND	1	0	0	0	1
P16	F	28	RR	11, 15	3	3	0	0	6
P17	F	32	RR	13, 15	3	0	0	0	3
P18	H	47	RR	ND	1	0	0	0	1
P22	H	58	CP	15, 13	16	2	0	2	20
P23	F	45	RR	7, 16	6	0	0	0	6
P24	F	46	CP	7, 17	7	7	2	1	17
P25	F	38	RR	15, 11	2	3	2	2	9
P26	F	53	CP	15, -	4	3	0	0	7
P27	F	58	RR	ND	8	2	4	0	14
P29	H	69	RR	ND	1	0	0	2	3
P30	F	56	CP	ND	0	2	1	0	3
P31	F	43	RR	7, 13	0	6	2	1	9
Total des clones lymphocytaires T					80	34	19	12	145

Tableau 2. Description de la cohorte de patients atteints de SEP ayant permis la production de clones lymphocytaires T primaires à long-terme mono et bi-spécifiques au niveau de leur reconnaissance antigénique. Le genre, l'âge , le type de SEP (RR: rémissions-rechutes et CP: chronique-progressive) et le typage HLA sont indiqués pour ces participants qui sont désignés par des numéro pour souci de confidentialité. Le terme ND signifie non-déterminé. Le nombre total de clones lymphocytaires T obtenus est indiqué pour chaque patient, et pour tous les patients, fonction des antigènes de sélection utilisés lors de l'étude.

	Nombre de donneurs	Nombre de clones anti-coronaviraux		Nombre de clones anti- myéline	
		229E	OC43	MBP	PLP
SEP	32	80	34	19	12
Témoins sains	6	21	7	6	1
Total	38	101	41	25	13

Tableau 3. Bilan total de la production de clones lymphocytaires T primaires à long-terme monospécifiques obtenus de 38 participants, 32 patients souffrants de SEP et 6 témoins sains. Respectivement pour ces deux groupes, un total de 145 et 35 clones ont été produits, à partir du sang périphérique. Un groupe témoins sains apparaît ici, car une production de clones lymphocytaires T a été réalisée durant la mise au point de la technique de clonage cellulaire.

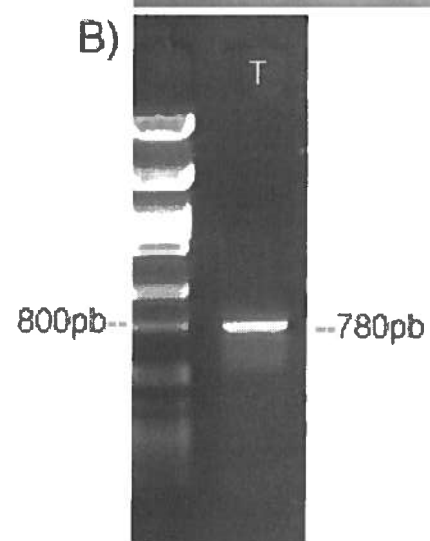
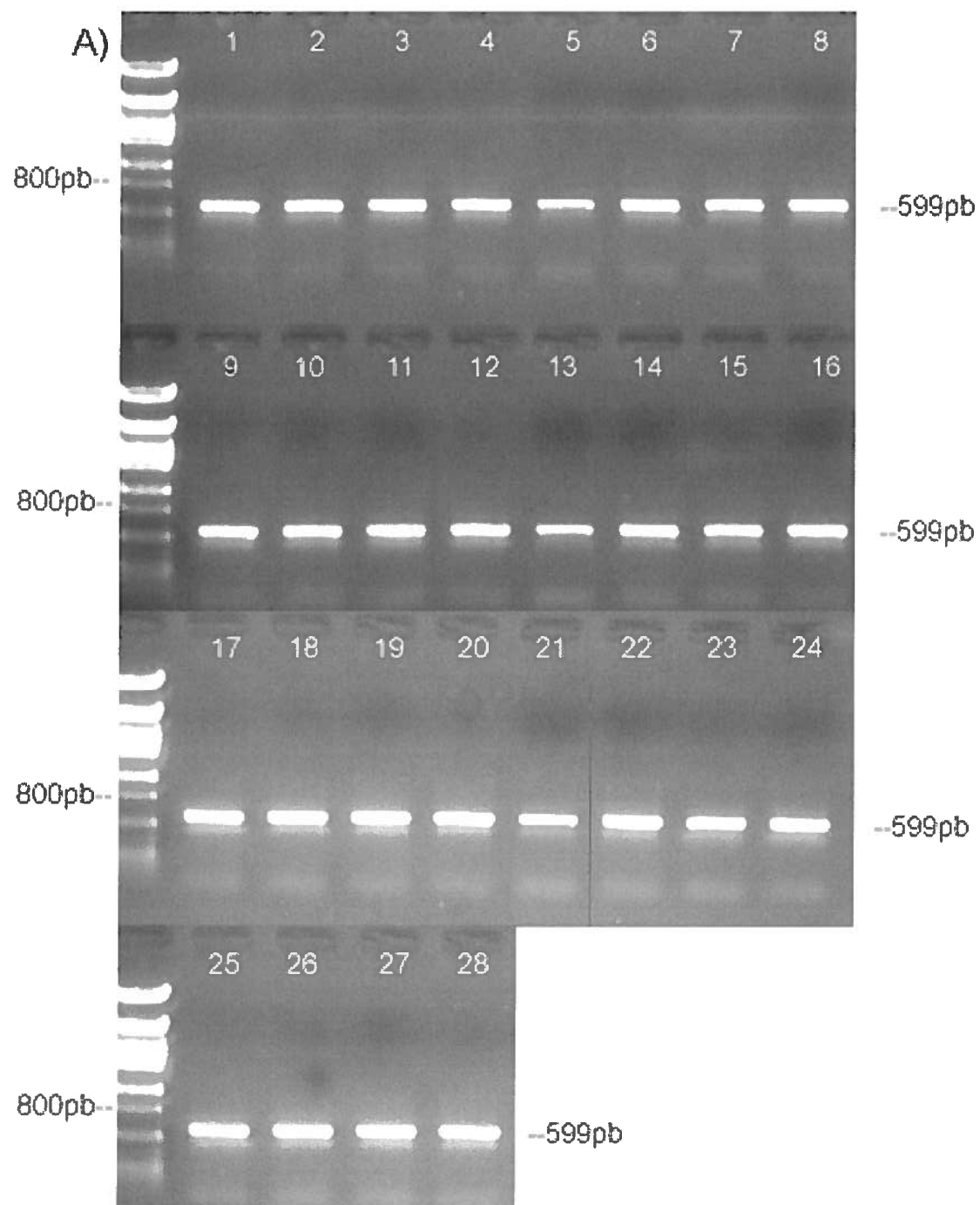


Figure 2. Démonstration du phénotype CD4⁺ des clones lymphocytaires T monospécifiques étudiés de patients atteints de SEP. A) Gels 1% agarose montrant les amplicons de 599pb obtenus, pour les 28 échantillons de clones lymphocytaires T monospécifiques étudiés par amplification PCR avec les amorces spécifiques au gène CD4 humain. B) Le témoin positif (T) pour le gène CD8 montre un amplicon à 780pb. Les ARN des 28 échantillons furent analysés avec les deux paires d'amorces pour déterminer le phénotype de ces clones lymphocytaires T; ces résultats confirment leur phénotype CD4.

Donneur SEP	3ième stimulation antigénique				4ième stimulation antigénique			
	229E	OC43	MBP	PLP	229E	OC43	MBP	PLP
P1	3	1						
P2	2		2					
P3								
P4	4	2			1			
P5	2		2		2		2	
P6	5				3			
P7	1	2		6	1	1		3
P8	5	2			3	2		
P9	1		1		1		1	
P10								
P11	6				1			
P12	14				8			
P13	8	8	5	1	8	6	5	1
P14	3	5			1			
P15			1					
P16	3	4			3	3		
P17	3		1	1	3			
P18	1				1			
P19								
P20								
P21		2	3					
P22	18	4	1	2	16	2		2
P23	6				6			
P24	7	7	2	2	7	7	2	1
P25	4	3	2	2	2	3	2	2
P26	4				4			
P27	8	3	4		8	2	4	
P28	2		1					
P29	1			2	1			2
P30		2	2			2	1	
P31		6	3	1		6	2	1
P32	1	1						
TOTAL	127	52	32	18	80	34	19	12
	229				145			

Tableau 4. Évolution de la cinétique de prolifération cellulaire dans le temps, pour les troisième et quatrième stimulations avec l'antigène de sélection. Les chiffres présents dans chaque colonne représentent le nombre de clones lymphocytaires T obtenus par patient après la stimulation avec l'antigène donné. Les cases vides signifient qu'aucun clone n'a survécu ou n'a été observé après la stimulation avec l'antigène. La première stimulation antigénique permettait de générer des lignées antigène-spécifiques, la seconde avait lieu au clonage par dilution limite. Au total, il restait 145 clones lymphocytaires T monospécifiques à la quatrième stimulation; à ce point, les cellules étaient en culture depuis environ deux mois.

I.S

9,6

6,6

9,1

7,2

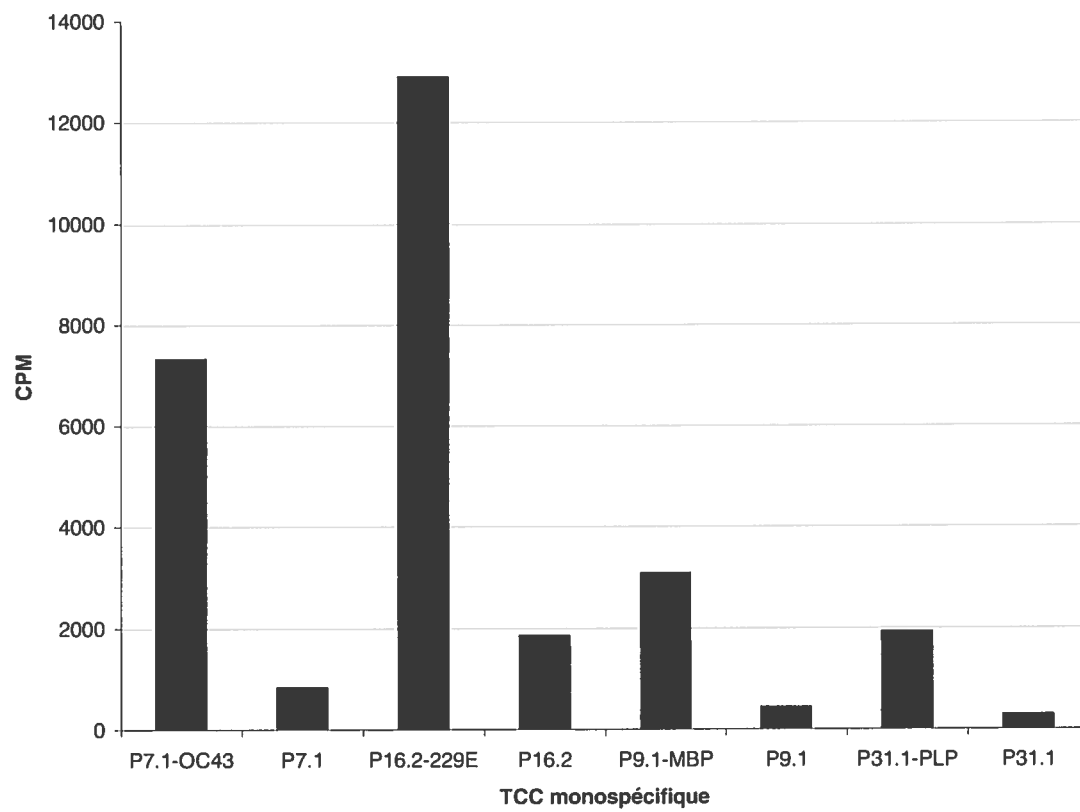


Figure 3. Exemples typiques de prolifération antigène-spécifique de quatre clones lymphocytaires T monospécifiques de patients atteints de SEP. Les lectures en CPM de la radioactivité incorporée, obtenues lors de la quatrième stimulation antigénique, pour l'antigène de sélection et l'antigène témoin sont indiquées pour chaque clone. Ainsi, la figure 2 fonctionne par colonne de deux et se lit: P-indiquant le numéro accordé au patient, suivi de l'antigène de sélection, s'il y a lieu. La seconde colonne indique la lecture obtenue avec l'antigène témoin. Les I.S. sont tous supérieurs à trois, seuil fixé, et indiqués au-dessus des colonnes respectives. Ces derniers correspondent à la valeur du ratio de la lecture en CPM obtenue lors du test de prolifération pour l'antigène de sélection sur celui de l'antigène témoin.

TCC	Antigène de sélection	Avant congélation		Après congélation	
		CPM	I.S.	CPM	I.S.
P7-4-46	OC43	17658	27	52114	19
P7-3-15	229E	3161	7	4930	3
P7-1-23	MBP	7927	8	1905	NS

Tableau 5. Résultats de tests de prolifération obtenus pour trois TCC monospécifiques du patient P7 qui ont été congelés puis remis en culture. Les résultats présentés montrent la réactivité antigénique des clones étudiés, avant et après la congélation. Le terme NS signifie non-spécifique. Le test d'incorporation de la thymidine-tritiée a été réalisé deux semaines après la remise en culture cellulaire.

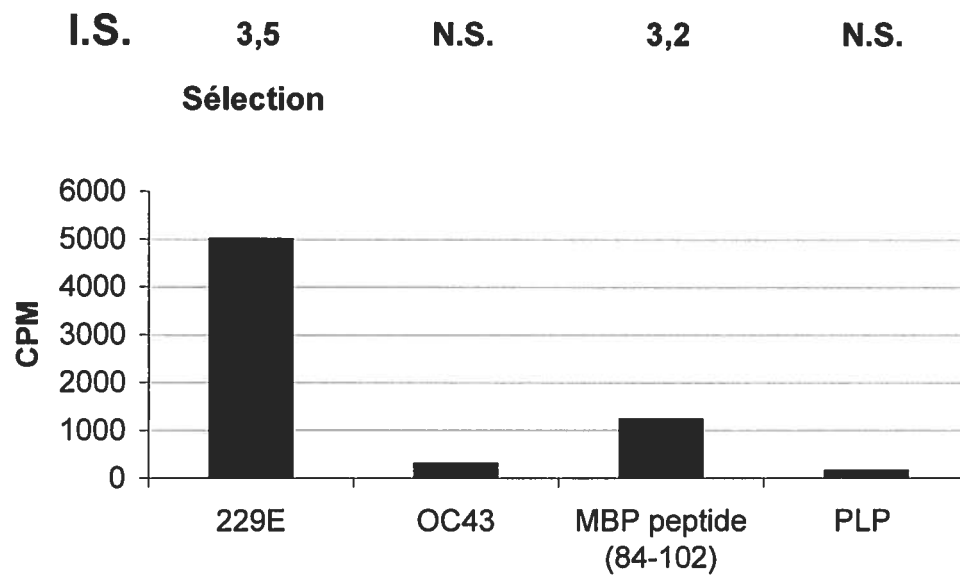


Figure 4. Réactivité antigénique pour le peptide MBP 84-102 chez un clone lymphocytaire croisé: résultats préliminaires. Pour un clone lymphocytaire sélectionné antigéniquement avec HCoV-229E, des tests d'incorporation à la thymidine tritiée démontrent une réaction-croisée avec le peptide MBP 84-102 (1µg/puits). Un clone sélectionné avec HCoV-229E reconnaît également le peptide MBP d'une façon significative. La Figure 3 présente les indices de stimulation et la valeur des comptes obtenus. Les indices de stimulation respectivement pour HCoV-229E et MBP 84-102 sont de 3,5 et 3,2. Les valeurs obtenues pour HCoV-OC43 et la PLP sont non significatives (N.S.).

Clones	Donneurs n	Antigènes Viraux		Antigènes Myéline		Total
		HCoV- 229E	HCoV- OC43	MBP	PLP	
Monospécifiques	22/32	80	34	19	12	145
Croisés	6/32	4	2	2	2	10

Tableau 6. Bilan de tous les clones lymphocytaires T produits de patients atteints de SEP. Les clones monospécifiques sont au nombre de 145, les clones antigéniquement croisés pour les antigènes coronavirus-myéline sont au nombre de 10. L'antigène de sélection est indiqué dans ce tableau, il s'agit de l'antigène utilisé pour la mise en culture initiale. Le nombre 'n' est décrit en fonction du nombre total de patients testés pour la production de clones. Ainsi, un total de 22 patients ont permis la production de clones lymphocytaires T monospécifiques, et des clones croisés ont été produits de 6 patients. Au total lors de ce projet, 32 patients furent testés pour la production de clones.

Clones	HCoV-229E	HCoV-OC43	MBP	PLP
P7a	N.S.	5,9 (4772)	2,4 (1584)	N.S.
P8a	2,7 (5000)	N.S.	3,5 (1231)	N.S.
P12a	3,1 (2300)	N.S.	N.S.	3,2 (1198)
P12b	4,5 (1542)	N.S.	N.S.	5,2 (985)
P12c	2,9 (1120)	N.S.	3,4 (898)	N.S.
P13a	11,3 (4293)	N.S.	4,2 (4233)	N.S.
P13b	N.S.	9,0 (10800)	8,4 (7365)	3,4 (2400)
P22a	18,3 (6284)	N.S.	3,8 (2628)	N.S.
P22b	9,0 (2322)	N.S.	4,9 (1014)	5,1 (1164)
P24a	18,0 (9020)	N.S.	3,4 (1205)	N.S.

Tableau 7. Résultats obtenus pour le test d'incorporation de thymidine-tritiée pour 10 clones lymphocytaires T antigéniquement croisés. Les I.S et les lectures obtenues en CPM pour l'incorporation de thymidine-tritiée (entre parenthèses) sont indiqués dans ce tableau. L'antigène de sélection est indiqué par des données en caractères gras placées sous l'antigène correspondant; le clone P7a fut sélectionné antigéniquement au départ avec HCoV-OC43, le clone P8a avec HCoV-229E, et ainsi de suite. Le terme N.S. signifie non-spécifique.

	Lignée P22		Lignée P27		Clone P22	
	CPM obtenu		CPM obtenus		CPM obtenus	
Concentration de z-vad	3 ^{ème}	4 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
Témoin	1670	643	3924	400	800	Nul
Ajout de 1µM	1670	Nul	3924	632	800	Nul
Ajout de 10µM	1670	982	3924	Nul	800	Nul
Ajout de 20µM	1670	410	3924	Nul	800	Nul
Ajout de 50µM	1670	Nul	3924	332	800	331
Ajout de 100µM	1670	Nul	3924	708	800	Nul

Tableau 8. Inhibition d'apoptose. Résultats préliminaires obtenus lors d'expériences d'inhibition d'apoptose réalisées sur deux lignées et un clone lymphocytaires sélectionnés avec HCoV-229E. Le z-vad fut ajouté en concentration de 1 à 100 μ M, lors de la quatrième restimulation antigénique avec l'antigène de sélection approprié. Le Tableau 8 montre les comptes (CPM) obtenus suite au test d'incorporation de thymidine-tritiée lors de la prolifération précédant l'ajout d'agent anti-apoptotique (quatrième stimulation) et les comptes obtenus 14 jours après l'ajout (cinquième stimulation). Pour les témoins respectifs, des cultures lymphocytaires parallèles, la stimulation antigénique a eu lieu sans aucun ajout de z-vad. En effet, une lignée ou un clone obtenu en troisième stimulation a été divisé en 6 puits différents et restimulé antigéniquement. Le terme 'nul' est inscrit lorsque les comptes offraient une valeur inférieure à 250 cpm incorporé. Le nombre de cellules est estimé avant la quatrième stimulation à environ 250 000 cellules pour les lignées et 50 000 cellules pour le clone.

TCC	HLA-DR	Spécificité antigénique		Vβ	V	N-D-N	J
P7a	11, 17	OC43	MBP	6S7*2	CASS	LNPASYG	EQYVGPGTM
P8a	15, 17	229E	MBO	6S5	CASS	LSLYSG	GNETRLGT
P12a	13	229E	PLP	6S7*2	CASS	SLNGSPL	GPGTRLTVT
P13a	15	229E	MBP	6S5	CASS	LGPASYE	GPGTRLTVT
P13b	15	OC43	MBP/PLP	8S2	CASS	LSLLSPH	GPGTRLTVT

Tableau 9. Résultats des réactions de séquençage effectuées sur cinq clones lymphocytaires T de spécificité antigénique croisée coronavirus-myéline, étudiés au niveau moléculaire pour l'identification de la chaîne β de leur RCT. Les résultats du typage HLA des patients desquels ont été isolés ces clones lymphocytaires T sont inscrits dans ce tableau. La spécificité antigénique de sélection lors de la mise en culture initiale est indiquée par des caractères gras. La séquence des segments D-J de la chaîne β identifiée sont aussi présents. La portion V signifie la section de jonction entre la fin de la $V\beta$ et le début de la portion hypervariable.

TCC	Nombre de colonies testées	Nombre de colonies positives	Amplicon attendu et obtenu (pb)	Nombre d'amplifications négatives obtenues
P7a	100	90	234	10
P8a	124	118	243	6
P12a	93	86	261	7
P13a	100	83	258	17

Tableau 10. Résultats de l'amplification PCR diversité. Afin d'augmenter le pouvoir statistique des résultats, des colonies bactériennes supplémentaires ont été vérifiées pour la présence de la chaîne β et portion hypervariable en complément aux dix colonies bactériennes précédemment séquencées. Ces colonies et les colonies séquencées sont toutes issues de la même transformation bactérienne. Un total d'environ 100 colonies bactériennes fut étudié par clone d'intérêt. La quantité de colonies à vérifier devait parfois être abaissée car les transformants n'étaient pas en assez grand nombre au départ. Ainsi, ce tableau fait le bilan des colonies analysées, du nombre de colonies confirmées positives suivant l'amplification ce, pour chaque clone et du nombre de colonies s'étant avérées négatives en amplification, car ne portant pas d'insert. La taille attendue et obtenue de l'amplicon, suite à l'amplification gène-spécifique par PCR des ADN plasmidiques contenus dans les colonies bactériennes correspondantes, est également présentée pour chaque clone lymphocytaire T analysé.

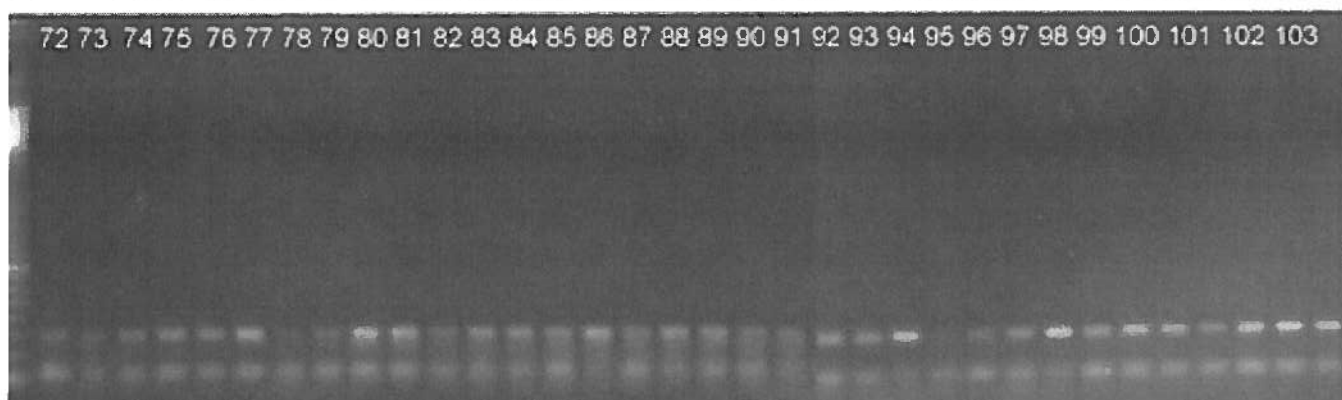
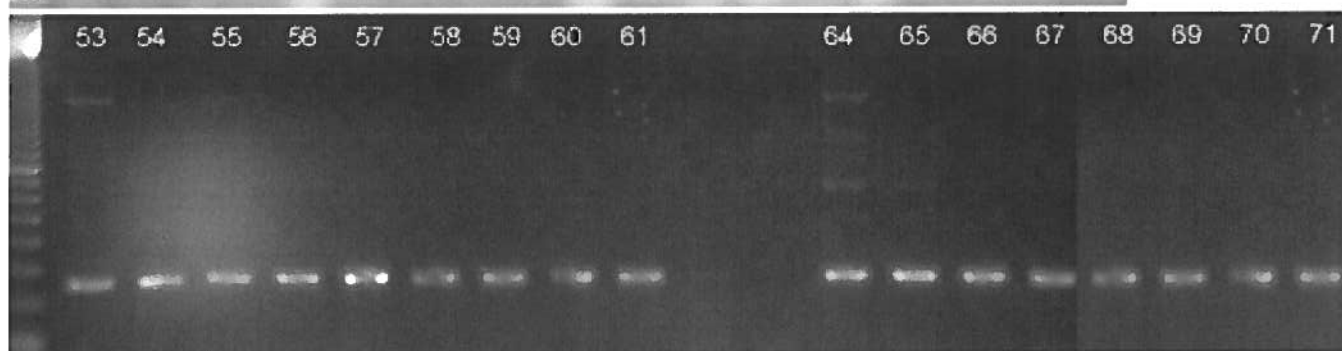
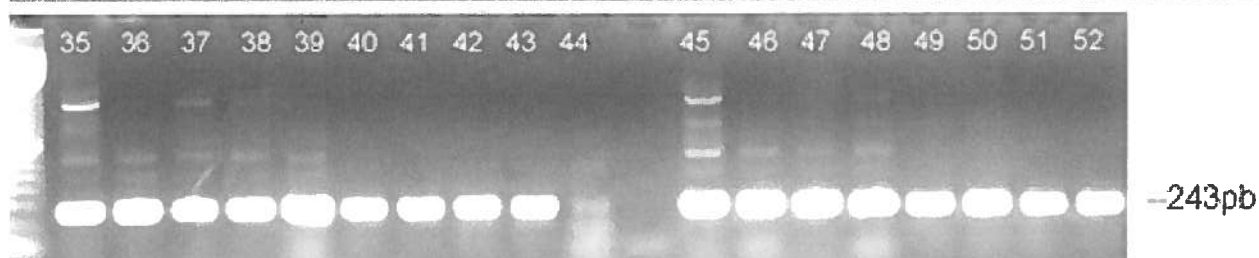


Figure 5. Gels d'agarose 1% typique de l'amplification PCR diversité. Données brutes d'un échantillons des gels produits suite à la migration des amplicons obtenus avec les amorces C β et P8a, donc pour le clone croisé P8. Le produit de PCR a une taille attendue de 243pb et le standard de poids moléculaire montre une échelle qui monte de 100 pb en 100 pb.

CHAPITRE 4: DISCUSSION

1.0 SOMMAIRE

Au cours de ce projet de recherche, des clones lymphocytaires T primaires monospécifiques ou doublement spécifiques ont été isolés à partir du sang périphérique de patients atteints de SEP et cultivés, à long-terme, *in vitro*. Ce projet visait l'étude de clones lymphocytaires T humains antigéniquement croisés coronavirus-myéline chez des patients affectés de SEP afin de confirmer et caractériser le mécanisme de mimétisme moléculaire en tant que processus possiblement pathologique.

Des lignées lymphocytaires T à long-terme avaient montré que des réactions croisées coronavirus-myéline été retrouvées d'une façon hautement significative chez des patients atteints de SEP lorsque comparés à des témoins sains (Talbot et al., 1996). Les travaux présentés dans cette thèse désiraient caractériser au niveau moléculaire les lymphocytes T impliqués dans une telle reconnaissance bi-spécifique. Les résultats obtenus avec les clones lymphocytaires T montrent le mimétisme moléculaire coronavirus-myéline. Ces derniers ne sont aucunement comparables aux résultats précédemment publiés avec les lignées, premièrement car le protocole expérimental utilisé est très rigoureux et car la nature des lymphocytes T primaires en culture à long-terme ne permettent aucun calcul de fréquence. En effet, l'apoptose et l'anergie caractérisant ce type de protocole, une seule cellule primaire antigène spécifique et sa progéniture prolifèrent jusqu'à épuisement. De plus, comme les cultures furent enrichies au départ pour l'antigène de sélection avant clonage, le calcul des fréquences est devenu non pertinent.

Le parallèle entre les témoins sains et les patients atteints de SEP ne fut pas établi au cours de ces travaux, car aucun nombre relatif à la fréquence de lymphocytes croisés circulant ou de lymphocytes proliférant n'eut pu être utilisé. Ces travaux se concentrent sur l'étude d'un phénomène précédemment démontré chez des patients souffrant de SEP. De plus, il est à considérer que l'impact pathologique de la réaction croisée coronavirus-myéline n'est pas

prouvé. Ce type de réaction peut être présent chez un individu sain et ne jamais induire de réponse pathologique. Une telle réaction croisée peut-elle contribuer au déclenchement/maintien/amplification de la SEP? Les travaux présentés approfondissent notre connaissance du lymphocyte T impliqué dans une telle réaction.

1.1 Retour sur les hypothèses de départ

L'étiologie de la SEP demeure inconnue à ce jour. Elle est décrite comme inflammatoire et autoimmunitaire. Une activation caractéristique de clones lymphocytaires T CD4+ dirigés contre la MBP et la PLP est observée. L'intérêt de ce projet de recherche portait sur le mimétisme moléculaire comme mécanisme potentiel expliquant le processus d'activation des lymphocytes autoréactifs dans la SEP. Des éléments de l'environnement, de même que certains facteurs génétiques, semblent impliqués dans la susceptibilité à développer la pathologie; le coronavirus apparait comme un des candidats potentiels à étudier. En effet, le coronavirus murin induit chez un hôte susceptible une maladie chronique qui s'apparente à la SEP. Puis, tel que cité dans l'introduction, les coronavirus humains semblent eux aussi avoir un potentiel neurotrope, neuroinvasif et neurovirulent.

L'activation de lymphocytes anti-MBP et anti-PLP est observée dans la SEP. Toutefois, le processus d'activation de ces lymphocytes T autoréactifs demeure inconnu. Les travaux de cette thèse ont voulu confirmer le caractère clonal de résultats précédemment publiés (Talbot *et al.*, 1996) qui indiquaient une présence hautement significative, chez les patients atteints de SEP, de lignées lymphocytaires T antigéniquement croisées pour les antigènes HCoV-229E et MBP, lorsque comparée à celles obtenues chez les témoins sains. Ainsi par exemple, une lignée lymphocytaire sélectionnée antigéniquement avec un antigène coronaviral est aussi stimulée par la protéine MBP. Ainsi, une infection

virale, chez un individu prédisposé génétiquement, pourrait-elle mener à l'activation de lymphocytes autoréactifs anti-MBP ou anti-PLP?

Comme des lignées constituent une population cellulaire hétérogène, deux cellules T de spécificité différente, présentes dans la population cellulaire étudiée, auraient pu être à la base de ce phénomène de réaction croisée. Ainsi, dans le but d'associer l'observation des réactions antigéniques croisées coronavirus-myéline à un seul RCT, donc à une population cellulaire de niveau clonal, nous avons dû en premier lieu élaborer un protocole de clonage. Ces études allaient permettre d'apprécier le caractère clonal du RCT, tant par l'observation d'une population cellulaire clonale que par des analyses indiquant la présence d'un seul RCT sur ces clones. Les travaux présentés dans cette thèse montrent donc au niveau clonal que deux antigènes hétérogènes sont reconnus par un même RCT, assumant par toutes nos analyses que les clones obtenus ne portent qu'un seul RCT.

1.2 Étapes expérimentales principales

Afin de valider le mimétisme moléculaire coronavirus-myéline au niveau d'une population homogène de lymphocytes, il a d'abord fallu produire des clones lymphocytaires T et un protocole de clonage par dilution limite a donc été mis au point. De plus, des antigènes d'intérêt ont été ajoutés à ceux utilisés dans l'étude réalisée en 1996 par l'équipe du docteur Pierre Talbot. Cette dernière impliquait les antigènes HCoV-229E et MBP. Ce projet de recherche inclut également les antigènes HCoV-OC43, donc l'autre sérotype de coronavirus humain également neurotrope, et la PLP, la protéine constituant majoritairement la myéline et potentiel autoantigène dans la SEP, tel que vu dans l'introduction.

Suite à l'élaboration et l'optimisation du protocole expérimental de clonage à long-terme de lymphocytes primaires obtenus du sang périphérique humain, le clonage cellulaire fut réalisé. Les étapes subséquentes de ce projet conduisirent

vers la caractérisation de la chaîne β du RCT des clones antigéniquement croisés obtenus. Finalement, un grand nombre de colonies bactériennes fut vérifié pour ajouter à la démonstration de la clonalité cellulaire.

Ainsi, à partir de 32 patients atteints de SEP enrolés dans ce projet, un total de 145 clones lymphocytaires T monospécifiques et 10 clones T croisés coronavirus-myéline, a été produit à partir du sang périphérique et le caractère clonal démontré au niveau moléculaire pour 4 populations.

2.0 PRODUCTION DE CLONES LYMPHOCYTAIRES T PRIMAIRES SPÉCIFIQUES POUR LA CULTURE À LONG-TERME.

Le protocole de production de clones lymphocytaires T primaires pour culture à long-terme permet des études plus approfondies sur la spécificité antigénique et l'identification des clones T monospécifiques ou doublement spécifique pour les antigènes étudiés. Le fait de travailler avec des patients atteints de SEP amenait certaines contraintes quant à l'accessibilité et la disponibilité de ces derniers. Pour un tel protocole, les besoins en restimulation antigénique sont bi-mensuels (aux deux semaines) et parfois un patient pouvait ne pas être disponible pour un prélèvement sanguin ou pouvait, par exemple, avoir débuté un traitement avec des immunomodulateurs. Une innovation dans notre protocole de clonage cellulaire fut avancée afin de contourner les désavantages d'un constant besoin de CPA autologues. La congélation de ces dernières dans 15% (v/v) DMSO et 20% sérum autologue procura beaucoup de latitude sur le plan expérimental.

Les problèmes anticipés avec la manipulation de lymphocytes T primaires et la grande variabilité retrouvée au niveau de la croissance cellulaire sont aussi discutés. La nature des antigènes étudiés ainsi que le degré de dégénérescence

dans la reconnaissance antigène-RCT sont également abordés dans cette section. Finalement, la pertinence pathologique des clones lymphocytaires T antigéniquement croisés est exposée.

2.1 Protocole expérimental

Le protocole expérimental fut optimisé en fonction de différentes données sur le clonage de lymphocytes T humains trouvées dans la littérature, telles qu'exposées en introduction. Pour l'obtention de clones lymphocytaires spécifiques primaires obtenus à long-terme ce type de protocole, fastidieux et périlleux, est sans alternative. Certaines variantes observées dans les conditions du culture sont cependant présentes, mais les étapes de production sont plutôt similaires.

Les restimulations bimensuelles avec des antigènes de sélection et l'utilisation d'IL-2 sont des constantes, cependant. pour des raisons qui demeurent encore mystérieuses, la manipulation de clones lymphocytaires T humains primaires à long-terme est encore, à ce jour, un défi technique. Alors que la culture de lymphocytes primaires murins semble bien mieux contrôlée (Sredi *et al.*, 1981; Brooks, 1986), la culture de clones T humains sur une longue période demeure périlleuse (Spits et Yssel, 1996). Cependant, pour des raisons évidentes, on peut penser que ces cellules ont une longévité et une action régies de manière très sévère, ce qui se reflète *in vitro*.

Les clonages cellulaires peuvent être réalisés directement du sang périphérique (Hafler *et al.*, 1985), mais nous avons choisi de procéder tout d'abord par la production de lignées antigène-spécifiques, qui furent ensuite clonées par dilution limite. La production de lignées fut réalisée pour favoriser un plus grand nombre de lymphocytes antigènes-spécifiques à l'étape du clonage. En effet, dans notre contexte expérimental, des clonages de lymphocytes T issus directement du sang périphérique menaient vers des taux très bas de production

de clones pour les antigènes coronaviraux et plus souvent qu'autrement, vers aucun clone dirigé contre une des protéines du SNC (données non-présentées). De plus, par un clonage directement du sang périphérique, les cellules déjà activées, en circulation, étaient également favorisées, mais le taux de production de clones *in vitro* était insuffisant. En effet, très peu de clones se rendait à la troisième stimulation antigénique. La production de lignées lymphocytaires primaires (cultures enrichies pour l'antigène de sélection) a donc permis de contourner ce problème et de permettre une culture de lymphocytes de spécificité antigénique bien définie, à long-terme. Cependant, cette technique, contrairement à un clonage réalisé directement du sang périphérique, ne permet pas le calcul de fréquence de lymphocytes autoréactifs activés en circulation (Vandevyver *et al.*, 1998).

Des lymphocytes autoréactifs non-activés sont donc présents dans la circulation sanguine (Kuchroo *et al.*, 2000), et la production de lignées lymphocytaires avant clonage cellulaire permet d'activer ces derniers. De l'IL-2 fut utilisée systématiquement lors de la prolifération cellulaire pour les lignées initiales et pour la production de clones; les concentration d'IL-2 furent diminués lentement suite à une stimulation antigénique, le récepteur de cet interleukine étant régulé à la baisse après stimulation. Les lymphocytes avaient donc une période de repos entre chaque stimulation antigénique. Certains protocoles de clonage utilisent également le PHA pour promouvoir la prolifération cellulaire (Fleisher *et al.*, 1998; Vandevyver *et al.*, 1998). Cependant, nous avons observé lors de la mise au point de notre protocole que les cultures lymphocytaires supplémentées avec cet agent mitogène perdaient rapidement leur spécificité antigénique. La prolifération de ces lymphocytes était certes rapide, mais comme nous recherchions une croissance cellulaire antigène-spécifique à long-terme, il fut décidé de ne pas additionner de PHA les cultures cellulaires.

Une originalité de ce protocole de clonage est retrouvée dans la manipulation des CPA autologues. En effet, alors que plusieurs stimulations antigéniques sont à venir, une seule ponction sanguine permet de recueillir le nombre de cellules

requis pour une expérience complète, incluant toutes les étapes de stimulations antigéniques et les analyses de spécificité par incorporation à la thymidine-tritiée. De même, le sérum autologue inactivé fut utilisé tout au long du protocole. Ainsi, après la mise en culture des cellules sous sélection antigénique pour la production de lignées lymphocytaires primaires, le reste de PBMC a été congelé pour être utilisés comme CPA ultérieurement. Cette méthode originale procure de l'autonomie et la congélation de CPA rend l'expérience indépendante de toutes fluctuations immunitaires qui pourraient éventuellement survenir entre les ponctions sanguines, puissent-elles avoir quelque implication sur le protocole et les résultats subséquents. De telles CPA autologues respectent aussi les conditions nécessaires pour une présentation antigénique efficace (costimulation B7 efficace qui supporte le contact CPA-CelluleT), ainsi que la restriction antigénique HLA de l'individu, une qualité recherchée lorsque les manipulations s'effectuent avec une cohorte de plusieurs participants (Greenfield *et al.*, 1998; Hemmer *et al.*, 2000).

L'étape de congélation des CPA a démontré que la concentration idéale de DMSO pour cette congélation était de 15 % (v/v) du volume final. En effet, l'utilisation de cet agent aux concentrations de 10% et 30% semblait diminuer l'efficacité de présentation des cellules, les récepteurs de surface ayant peut-être été affectés ou simplement été détachés de la surface cellulaire. Après congélation dans 10% ou 30% (v/v) de DMSO, les CPA ne présentent pas l'antigène de façon aussi efficace, et les CPM les plus hauts sont obtenus avec des CPA préalablement congelées dans 15% (v/v) DMSO. Ces résultats sont comparables aux valeurs obtenues en CPM suite à une stimulation antigénique réalisée avec des CPA fraîches (données non-présentées). Ainsi, les CPA ont été maintenues sans problème, tout au long du protocole de 2-3 mois, à -80°C. Elles étaient irradiées à 2500 rads (Vandevyver *et al.*, 1998) après décongélation rapide à 37°C, juste avant utilisation.

Finalement, le protocole expérimental a permis la production de clones lymphocytaires T CD4+, telle que le montre la Figure 2. Un bassin de 28 clones

monospécifiques ont été testés à l'aide d'amplification par PCR afin de vérifier le phénotype exprimé. Tous ces clones monospécifiques, choisis aléatoirement, étaient positifs pour le marqueur de surface CD4. Dans ce protocole, la présentation antigénique de protéines est effectuée par des CPA irradiées; le contexte de présentation favorisé est donc le CMH de classe II (Runnels *et al.*, 1997; Pieters, 2000). Les CPA irradiées peuvent processor un antigène, mais ce dernier peut aussi se placer directement dans la niche à peptide du CMH de classe II, cette dernière étant ouverte aux extrémités (Hilyard et Strominger, 1995). La présence de clones lymphocytaires T CD8+ était aussi possible (Talbot *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 2002), souvent responsables de dommages aux axones, mais ils ne furent pas observés dans le cadre de ces expériences. Tel que mentionné dans l'introduction, c'est le phénotype CD4+ qui est observé dans le modèle animal de EAE.

Notons que le patron de cytokines d'aucun clone T n'a été investigué. En effet, l'IL-2 ajoutée régulièrement et systématiquement aux cultures lymphocytaires conduit artificiellement vers un profil de type Th-1 (inflammatoire) (Seder, 1996; Raju *et al.*, 2001).

2.2 Variabilité des cultures, problèmes inhérents de croissance cellulaire et de longévité en culture *in vitro*

La variabilité en ce qui touche la capacité de prolifération des cultures cellulaires caractérise grandement la production de clones T. En effet, sur la grande quantité initiale de lignées T spécifiques un antigène de sélection respectif, une perte drastique de cellules a été observée à chaque stimulation antigénique, évidemment après le clonage cellulaire, mais surtout entre la troisième et la quatrième stimulation, lors de la production de clones lymphocytaires T spécifiques à long-terme. Ces pertes cellulaires sont anticipées, car il est question ici de clones lymphocytaires T primaires humains, en culture à long-terme, ayant une longévité prédéterminée. La littérature traite de clones T

spécifiques à la MBP, mais la recherche s'oriente surtout vers des clones en culture à court terme ou encore de lignées T (Hafler *et al.*, 1997). Ainsi, comme nous avons expérimenté en début de protocole, plusieurs clones sont obtenus, mais comme peu de protocole s'étale sur une période supérieure à 1 mois (2 stimulations antigéniques, le plus souvent une seule), la comparaison entre protocoles expérimentaux est difficile à établir. Des clones humains spécifiques à la MBP, en culture à long-terme, sont rapportés en 1988, MBP, avec des quantités de 18 clones lymphocytaires T pour 3 patients atteints de SEP (Weber et Buurman, 1988; Burns et Littlefield, 1989). En ce sens, la production rapportée dans la littérature peut être décrite comme similaire à la notre... Les clones lymphocytaires T doublement réactifs coronavirus-myéline ne sont pas exhaustivement étudiés chez l'humain.

Ainsi, hormis le fait que tous les participants ont permis la production de lignées lymphocytaires suite à la mise en culture initiale, aucune production de clones lymphocytaires T n'a pas été possible pour 10 des 32 patients étudiés, ce malgré une surveillance rigoureuse des cultures. Il semblerait que la facilité de production de clones lymphocytaires T varie même entre les participants.

La production de clones pourrait être influencée par l'état du participant lors de la ponction sanguine, la vitesse et la qualité de culture des lymphocytes influencées par l'activation initiale de ces derniers. En effet, un patient testé pendant rechute de SEP pourrait avoir un plus grand nombre de lymphocytes activés, prêts à proliférer, en circulation. Le patient en rémission tant qu'à lui, bénéficie peut-être d'un système immunitaire davantage 'au repos', donc moins apte à la production de clones. Il est démontré que la prolifération des lymphocytes contre la MOBP et la MBP, par exemple, de même que la production d'IFN- γ sont en corrélation avec l'activité des lésions observées dans la SEP et les rechutes (Arbour *et al.*, 2003). Ainsi, la croissance cellulaire varierait aussi pour les clones lymphocytaires autoréactifs. Chez 10 patients, la production de clones lymphocytaires T n'a pas été fructueuse. Des raisons liées à l'état d'activation du système immunitaire lors de la ponction sanguine pourraient effectivement

expliquer l'absence de clones T chez ces individus. Des agents immunomodulateurs pris par les patients pourraient aussi avoir un impact sur la prolifération cellulaire, mais aucun des participants à l'étude ne consommait ces derniers pour une période d'au moins deux mois avant le début du protocole.

Le Tableau 2, en plus de décrire la cohorte de patients SEP ayant conduit à l'obtention de clones lymphocytaires T, présente aussi la distribution de ces clones lymphocytaires T monospécifiques selon les antigènes d'intérêt respectifs. La majorité des 145 clones monospécifiques, obtenus de 22 patients atteints de SEP, reconnaissent les antigènes coronaviraux (Tableau 3). En effet, comme les réinfections avec le coronavirus sont possibles et la population est hautement séropositive pour les coronavirus, la présence de cellules mémoires reconnaissant ces antigènes peut expliquer la présence significative de lymphocytes T activés *in vitro* par ces antigènes (Myint, 1994). En effet, près de 80% des clones lymphocytaires monospécifiques obtenus reconnaissent un antigène coronaviral. Un grand nombre de femmes a participé à l'étude (18/22 participants), bien que la sélection ait été aléatoire selon la disponibilité de patients. La SEP touche plus fortement les femmes, et leur présence est majoritaire dans la cohorte étudiée (Withacre *et al.*, 1999).

Le Tableau 4 met en évidence les variabilités au niveau de la croissance cellulaire et de la capacité de prolifération démontrée par des tests d'incorporation à la thymidine-tritiée. Le nombre de clones lymphocytaires T monospécifiques étudié chute en effet drastiquement entre la troisième et la quatrième stimulation antigénique (Tableau 8). Outre la variabilité dans la production de clones T, la principale difficulté rencontrée lors de ce protocole est inhérente à la qualité des cellules lymphocytaires primaires humaines: apoptose, anergie et exhaustion clonale sont des processus qui arrivent tôt ou tard, les cellules primaires ayant un nombre de division limité et une longévité calculée (Beverley et Maini, 2000; Pawelec *et al.*, 2000). De plus, la culture de cellules lymphocytaires T s'appuierait sur une balance subtile durant la stimulation antigénique : la stimulation antigénique efficace et la concentration en IL-2 et la

besoin de période de repos, par exemple. Une stimulation non-efficace n'impliquant pas les signaux nécessaires de costimulation conduit vers l'anergie, alors qu'une stimulation excessive mène à l'apoptose par exhaustion clonale (LaSalle et Hafler, 1994; Greenfield *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2001). Des approches alternatives quant à l'utilisation d'interleukines ou d'agents anti-apoptotiques permettent parfois de maximiser la longévité cellulaire, cependant, la mort des lymphocytes T primaires est normale et doit être anticipée, surtout chez les clones lymphocytaires T mis en culture à long-terme (Kreisel *et al.*, 2002). On peut même penser que bien des clones T d'intérêt seront perdus dès les premières stimulations antigéniques; par exemple, un lymphocyte déjà activé en circulation et ayant connu un certain nombre de divisions cellulaires pourrait fort bien ne pas survivre à 4 rondes de stimulations antigéniques additionnelles. Quelques expériences préliminaires réalisées avec l'inhibiteur de caspases z-vad n'ont montré aucune différence significative quant à une survie accrue des clones lymphocytaires T; cette avenue n'a pas été explorée davantage.

2.3 Nature des antigènes étudiés

Le Tableau 3 présente le bilan complet des clones lymphocytaires T monospécifiques obtenus au cours de ce projet. Les clones T reconnaissant les antigènes coronaviraux apparaissent en plus grand nombre. La nature très variée des antigènes étudiés (protéines totales purifiées versus lysats cellulaires clarifiés), tout en augmentant le répertoire d'épitopes potentiellement reconnus peu aussi avoir eu un effet sur la croissance cellulaire. La facilité de présentation de peptides antigéniques versus celle obtenue suite à l'utilisation de protéines complètes peut jouer sur le niveau de stimulation antigénique, quoique les peptides antigéniques doivent être présents en quantité suffisante (Mauri, 1994; Runnels *et al.*, 1997). Il est aussi à souligner qu'une conformation structurale de la protéine pourrait avoir favorisé la présentation de certains épitopes et la présence de ligands optimaux pourrait ainsi ne pas avoir été suffisante, cette dernière diluée parmi les différents épitopes présents (Hemmer *et al.*, 1997).

Cependant, notre protocole se devait de promouvoir l'utilisation d'un large spectre d'antigènes, car les épitopes impliqués dans la reconnaissance antigénique croisée ne sont pas encore identifiés. Des études par chevauchement de peptides seraient possibles pour identifier la portion de MBP ou PLP reconnue par un clone croisé (Wucherpfennig et Strominger, 1995). Cependant cette approche ne peut- être envisagée pour ce qui est du virus qui fait entre 27 et 32 kb. Les protéines structurales virales pourraient être isolées puis testées séparément, mais cette approche n'incluerait pas les protéines non structurales. Les lysats cellulaires infectés et inactivés utilisés comme antigène comportent l'ensemble des protéines virales structurales et celles non structurales, mais d'autres protéines dans le milieu cellulaire pourraient avoir une influence sur la prolifération. En dépit de l'utilisation d'un lysat de cellules non infectées réalisés en parallèle qui indique lorsque la prolifération est supérieure avec l'antigène coronaviral, nous estimons négligeable mais ne pouvons conclure sur l'impact des autres molécules présentes dans le lysat.

On observe une plus forte incorporation de thymidine-tritiée pour les clones lymphocytaires T sélectionnés avec les antigènes coronaviraux. En plus de stimuler plus de 80% des clones produits, ces antigènes les stimulent davantage. Cette réactivité pourrait être expliquée par le fait que les ligands du soi sont souvent non-optimaux (Hemmer *et al.*, 1997). Une affinité plus faible peut se traduire en une plus faible prolifération (réponse en CPM) ou par une reconnaissance antigénique insuffisante (expliquant également la production modeste de clones sélectionnés avec un antigène du SNC). La Figure 3 présente l'activation de clones lymphocytaires T monospécifiques avec leur antigène de sélection et l'antigène témoin respectif. Les clones sélectionnés avec les antigènes coronaviraux répondent plus fortement, avec des I.S. plus hauts. Les ligands du soi apparaissent comme des ligands non-optimaux, ce qui pourrait sembler logique, l'évolution parant un peu contre un processus autoimmunitaire... De plus, les lymphocytes T étudiés ont dû, à un moment de leur développement, se conformer aux règles de la sélection thymique.

Tout est donc histoire de stimulation. Cette variabilité dans la capacité de prolifération suite à une sélection antigénique avec des antigènes du SNC peut possiblement être liée au phénomène démontré au Tableau 5. Les deux clones lymphocytaires T sélectionnés avec les antigènes viraux ont conservé leur spécificité antigénique lors de la remise en culture après congélation. Le clone sélectionné avec l'autoantigène a perdu sa réactivité à l'antigène suite à la décongélation. Le fait de n'avoir les résultats d'un seul clone qui reconnaît le soi ne permet pas de tirer des conclusions, mais cette observation permet d'énoncer des hypothèses comme le manque de stimulation adéquate (peptide non-optimal ou manque d'affinité), la perte éventuelle d'un marqueur comme CD28, lors de la remise en culture ou simplement la longévité cellulaire limitée (Chapman *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996). Différents processus pourrait donc avoir occasionné l'anergie et la non-réponse du clone P7-1-23 après décongélation.

Le désir d'explorer davantage le lien entre prolifération et nature de l'antigène a permis une observation préliminaire réalisée chez un patient souffrant de SEP exprimant le HLA-DRB1*1501 (Wucherpfennig, 1997). Une stimulation antigénique avec le peptide 84-102 immunodominant de la MBP a été réalisée pour un clone sélectionné avec HCoV-229E qui montrait également un certain degré prolifération envers la MBP sous forme de protéine entière (Figure 4). Ce clone reconnaît à la fois le lysat 229E et le peptide immunodominant de la MBP. Bien que ce résultat soit intéressant, il est cependant difficile de conclure davantage sur la signification de cette observation, à cause du manque de témoin négatif de nature peptidique. En effet, un peptide, de par sa nature (petit et déjà traité) pourrait avoir été favorisé lors de la présentation antigénique (Runnels *et al.*, 1997). Il importe donc de comparer des peptides d'intérêt avec le peptide témoin correspondant et non avec la protéine témoin correspondante. Tel que mentionné dans l'introduction, la prévalence de la reconnaissance, HLA-DR2 restreinte, de ce peptide MBP 84-102 chez les patients atteints de SEP a déjà été montrée, mais il serait pertinent de voir si de tels clones montrent une réaction croisée coronavirus-myéline. L'importance de l'haplotype HLA-DRB1*1501 dans la présentation de clones lymphocytaires T anti-MBP est

démontrée (Wucherpfennig *et al.*, 1997). De plus, cet haplotype est le seul génétiquement associé fortement à la SEP.

Un peptide est toujours reconnu présenté par le CMH, formant avec ce dernier un complexe tridimensionnel qui sera reconnu par le RCT. La présentation antigénique semble donc jouer un rôle important, car différents peptides présentés avec prédilection par certains CMH conduiraient au développement de différentes formes de SEP (Minohara *et al.*, 2001). La susceptibilité génétique d'un individu, par son répertoire CMH, pourrait favoriser l'autoimmunité lorsque les peptides clés sont disponibles.

2.4 Production de clones lymphocytaires T primaires croisés et mimétisme moléculaire

Un des points culminants de ce projet consiste ainsi en l'obtention de clones lymphocytaires T de spécificité antigénique croisée coronavirus-myéline. Suite à un clonage par dilution limite, plusieurs clones monospécifiques ont été produits, mais seulement dix clones ont montré une double réactivité coronavirus-myéline. Le Tableau 6 montre le bilan de clones lymphocytaires T cumulés après quatre rondes de stimulations antigéniques. Les fréquences des clones lymphocytaires croisés obtenus versus les quantités de clones monospécifiques obtenus ne peuvent être comparées, car les clones ne sont pas issus directement du sang périphérique (Hafler *et al.*, 1985; Vandevyver *et al.*, 1998). Effectivement, une activation *in vitro* de lymphocytes a permis l'activation de populations de lymphocytes avant clonage; cette population n'est pas comparable au nombre de cellules normalement activées présentes dans le sang. Les résultats montrant de façon hautement significative une plus grande proportion de réactions croisées coronavirus-myéline ayant déjà été démontrés par le laboratoire du docteur Pierre Talbot en 1996, l'objectif de ce projet était plutôt de caractériser au niveau clonal ce phénomène de mimétisme moléculaire coronavirus-myéline déjà observé.

Le Tableau 7 présente une description de ces dix clones lymphocytaires T antigéniquement croisés obtenus. Les I.S., de même que les lectures obtenues aux tests d'incorporation de thymidine-tritiée, sont indiqués. Une observation décollante exprime peut-être que plusieurs peptides peuvent possiblement être reconnu par le RCT. Une certaine dégénérescence, une flexibilité, dans la reconnaissance du peptide par le RCT fait que plus d'un peptide peut activer le même RCT, à des degrés variables (Chen *et al.*, 1996; Wucherpfennig, 1997). En effet, certains clones antigéniquement croisés sélectionnés avec un antigène coronaviral reconnaissent les deux antigènes étudiées du SNC, soit la MBP et la PLP. En effet, plusieurs RCT peuvent reconnaître, avec affinités différentes, plusieurs complexes peptide antigénique-CMH (Wucherpfennig *et al.*, 1997). Il a été démontré qu'un peptide contenant seulement 4 résidus de la MBP peut stimuler des lymphocytes T spécifiques à la MBP, et que cette séquence de 4 résidus est retrouvée également chez plusieurs virus, comme chez le coronavirus (Gautam *et al.*, 1992). De plus, plusieurs clones lymphocytaires spécifiques à la MBP obtenus de patients souffrants de SEP peuvent être activés par des peptides viraux contenant le motif prédit de liaison au HLA-DR2; ces peptides viraux n'auraient pas pu être déterminés par simple alignement de séquence (Wucherpfennig et Strominger, 1995). La reconnaissance par le RCT possède donc une certaine flexibilité, plusieurs peptides pouvant stimuler un même récepteur. Le fait de retrouver des réactions lymphocytaires antigéniquement croisées ne semblerait donc pas si rare, mais toute association potentielle d'une telle réaction croisée avec une pathologie constitue en elle-même une observation des plus intéressantes. L'analyse de réactions croisées chez des individus sains, précédemment réalisée par le laboratoire du docteur Talbot chez des lignées lymphocytaires T montrent que les témoins sains ont une fréquence inférieure TCI croisées, lorsque comparés aux patients souffrant de SEP. Les TCL, à cause du protocole expérimental utilisé, permettaient le calcul de fréquence. La production de clones lymphocytaires T est complexe et peut ne pas être représentative du nombre de lymphocytes potentiellement croisés en circulation.

De nombreuses hypothèses impliquent le mimétisme moléculaire et le déclenchement de réactions autoimmunitaires. Ce processus semble un moyen élégant pouvant expliquer, de façon simple, le bris de tolérance au soi, dans des maladies comme la SEP par exemple. Les peptides du non-soi reconnus par les lymphocytes pourraient, selon ce modèle, initier une réaction immunitaire contre le soi. Les peptides du soi, maintenant reconnus, perpétueraient la réponse immunitaire pouvant induire un potentiel processus pathologique. Une cascade immunitaire serait déployée initiant/maintenant l'autoimmunité par des mécanismes additionnels comme la propagation de déterminants par exemple.

La pertinence pathologique d'un clone lymphocytaire T reconnaissant à la fois un antigène viral et un antigène du soi combine des composantes génétiques et de l'environnement dans l'étiologie de la SEP. Ainsi, chez un individu génétiquement prédisposé (une susceptibilité génétique donnée se répercutant peut-être sur le répertoire génétique impliqué dans la présentation antigénique), une infection virale activant des lymphocytes anti-virus. Ces cellules se multipliant pour combattre l'infection, des réactions inflammatoires sont enclenchées, des cellules immunitaires sont recrutées, maximisant la présentation, l'activation des lymphocytes et l'état d'activation général (inflammation). Ces derniers peuvent aussi maintenant migrer dans les tissus. Les lymphocytes activés rencontrent un peptide du soi et des réactions autoimmunitaires sont initiées par mimétisme moléculaire. Alternativement, un lymphocyte autoréactif, demeuré jusqu'alors silencieux peut rencontrer un antigène étranger/séquestré, ce qui conduirait aussi vers le bris de tolérance. Des dommages tissulaires résultant de l'inflammation et de la réponse immunitaire pourraient effectivement permettre la libération de nouveaux autoantigènes, jouant ainsi un rôle dans le maintien de la réponse (Lane *et al.*, 2000).

Le coronavirus est un des candidats étudiés avec prédilection dans la SEP, mais il importe de réaliser que plusieurs autres virus pourraient être impliqués selon des processus immunitaires similaires (Gilden *et al.*, 1996; Talbot, 1997; Casetta

et Granieri, 2000; Cermelli et Jacobson, 2000). La prédisposition génétique avancée dans la SEP confère peut-être à certains virus une habileté particulière à initier des réactions autoimmunitaires, soit de part leur séquence et/ou leur capacité à former une structure tridimensionnelle appropriée. Les coronavirus sont des candidats d'intérêt, car ils permettent également d'expliquer le phénomène de rechutes associé à la SEP. Des études épidémiologiques ont montré que des infections respiratoires précèdent souvent des attaques de SEP (Marrie *et al.*, 2000). Le coronavirus humain est un pathogène respiratoire. Les infections coronavirales sont fréquentes, un individu sera séropositif dès l'âge de 5 ans et les réinfections par ces derniers sont possibles (Myint, 1994). De par ses qualités neurotropes et neuroinvasives, ainsi que sa capacité à activer des lymphocytes reconnaissant aussi des protéines du SNC, il pourrait donc être associé au déclenchement d'une neuropathologie.

Le RCT des clones lymphocytaires T croisés coronavirus-myéline a été étudié au niveau moléculaire, afin de déterminer l'identité de leur chaîne β respective et leur séquence hypervariable. Le Tableau 9 montre les résultats obtenus avec les cinq clones croisés. Les séquences hypervariables des clones lymphocytaires T ont présenté certaines similarités entre elles quant à leur longueur. Une longueur donnée de portion diversité serait-elle un indice de plus vers la nature d'un peptide autoimmunitaire? Le RCT pourrait favoriser la présentation de peptide d'une longueur donnée. Certains résidus semblaient aussi favorisés. Un motif structural pourrait être favorisé: certains résidus présents en certaines positions reconnu avec plus d'affinité par le RCT (Chen *et al.*, 1996). Ainsi, une structure tridimensionnelle RCT-peptide impliquant certains résidus pourrait fournir un cadre tridimensionnel défini favorisant l'autoimmunité. Il est cependant trop tôt pour conclure sur la nature de ces portions hypervariables et l'autoimmunité. Cependant, de la modélisation par ordinateur pourrait permettre d'observer si ces séquences constituent un squelette quelconque, peut-être commun, impliqué dans la stimulation du RCT.

Le Tableau 10 et la Figure 5 montrent le type d'étude réalisée par PCR diversité pour augmenter statistiquement la définition de clonalité. La dilution limite est une étape qui permet de conclure statistiquement à la clonalité des cultures obtenues, mais une plus grande exploration des clones lymphocytaires T renforce nos résultats. En effet, la présence d'aucune autre chaîne β de RCT a été détectée suite à l'analyse par PCR de plusieurs colonies bactériennes issues de la même transformation que les clones lymphocytaires T séquencés (dix séquences dans les deux orientations) présentés au Tableau 7. Alors que l'exclusion allélique de la chaîne α n'est pas complète, en général une seule chaîne β fonctionnelle dans le RCT est en surface du lymphocyte (Sieh et Chen, 2001; Khor et Sleckman, 2002). Cette étape de PCR diversité confirme que le phénomène de réaction croisée est clonal et non le produit de deux RCT en surface (un seul étant fonctionnel) ou de deux lymphocytes (donc deux RCT) avec des spécificités antigéniques différentes ayant permis l'observation de réaction croisée coronavirus-myéline. Selon les résultats cumulés tout au long des expériences présentées dans cette thèse, il est fort probable qu'un seul RCT par lymphocyte soit impliqué dans les réactions croisées coronavirus-myéline. Notre étude conclue donc sur le caractère clonal des réactions croisées coronavirus-myéline.

Tel que montré au Tableau 9, la famille V β 6 semble exprimée avec prédilection pour quatre des cinq clones étudiés. La chaîne V β 6*5 a en effet déjà été observée comme surexprimée chez les patients atteints de SEP (Gold *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 2001). Cette chaîne pourrait influencer le maintien d'un état pathologique, car le CDR2 de cette dernière favoriserait les interactions impliquant des peptides du soi ou des lymphocytes T autoréactifs (Vandenbart *et al.*, 2002). Un répertoire T favoriserait donc le maintien des réponses autoimmunitaires, en favorisant peut-être la présentation d'antigènes autoréactifs. Un autre fait intéressant est que la V β 8*2 ait déjà été associée à un clone lymphocytaire T autoréactif (Offner *et al.*, 1999). Ces données suggèrent des avenues intéressantes à explorer, permettant peut-être un jour d'établir un

lien avec la SEP. Certains complexes TCR-peptides peuvent se nicher dans le CMH d'intérêt pour élaborer une structure tridimensionnelle plus courante qu'on ne le croit. Ainsi, le complexe CMH-peptide du soi, s'ajustant selon un modèle donné avec le TCR pourrait provoquer une activation autoimmunitaire préférentielle. Des études d'affinité de liaison et de prédiction de structures peptidiques sont nécessaires pour valider tout le potentiel de ces séquences et toutes ces implications potentielles des complexes CMH-peptides. Le mimétisme moléculaire de structure permet d'expliquer comment un peptide étranger amènerait vers l'activation du soi (Hagerty *et al.*, 1995; Kersh et Allen, 1996).

3.0 CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étiologie de la SEP demeure inconnue. Plusieurs mécanismes sont avancés comme permettant de briser la tolérance pour ensuite initier ces réactions autoimmunitaires maintenant caractéristiques de la pathologie. L'équipe du docteur Pierre Talbot avait montré la présence hautement significative de lignées lymphocytaires croisées coronavirus-myéline chez les patients souffrant de SEP lorsque comparée à celle observée chez des témoins sains. Le protocole réalisé au cours de ce doctorat a permis de confirmer le caractère clonal de cette observation par la production de 10 clones de lymphocytes T issu du sang périphérique de patients atteints de SEP; ces clones reconnaissent à la fois des antigènes de coronavirus et de la myéline et sont soit sélectionnés antigéniquement au départ par un des sérotypes de coronavirus ou par un antigène de la myéline.

Afin de conclure sur la pertinence pathologique de ce mimétisme moléculaire coronavirus-myéline, les différentes portions hypervariables (CDR3) obtenues de clones lymphocytaires T antigéniquement croisés coronavirus-myéline pourraient

éventuellement servir de sonde moléculaire, chez les patients respectifs, pour vérifier la présence de ces clones au SNC, où la SEP frappe. Retrouver de tels clones lymphocytaires T dans le SNC, par l'utilisation de techniques d'hybridation par exemple, prendrait davantage de sens au niveau de leur implication potentielle avec la maladie. D'un autre côté, la validation de l'importance des réactions croisées coronavirus-myéline viendra peut-être de l'étude d'un modèle animal, car toute observation de cause à effet chez l'humain est presque impossible. Le laboratoire du docteur Pierre Talbot se dirige vers cette stratégie. Quoiqu'il en soit, le mimétisme moléculaire apparaît comme un mécanisme fort puissant permettant peut-être d'induire/maintenir/amplifier l'autoimmunité lorsqu'un contexte immunitaire favorable est sous-tendu par une susceptibilité génétique. À la lumière de ces résultats, il serait aussi fort intéressant de vérifier si ce phénomène de réactions croisées, que l'on pourrait potentiellement associer à la SEP, n'est pas retrouvé dans d'autres désordres pathologiques. Ces désordres pourraient être de nature neurologique et/ou autoimmunitaire inflammatoire ou non-inflammatoire. L'immortalisation de RCT est aussi une avenue qui permettrait des études plus soutenues du récepteur et de ses affinités peptidiques.

En perspective, des études futures sont requises pour caractériser le/les épitopes reconnus par les clones lymphocytaires T antigéniquement croisés. Des études d'affinité permettant de mieux cerner le ligand optimal pour le RCT croisé impliqué seraient aussi à prévoir. La reconstitution des RCT doublement spécifiques est aussi une avenue à considérer pour permettre des études du RCT. L'exploration du SNC, afin de trouver la marque d'une réaction croisée coronavirus-myéline, semble aussi pertinente. Enfin, une meilleure connaissance des éléments déclencheurs des réactions autoimmunitaires observées dans la SEP, favoriserait l'élaboration d'approches prophylactiques et thérapeutiques efficaces.

REMERCIEMENTS

Voilà enfin le moment privilégié me donnant l'occasion de remercier tous ces gens qui ont contribué de façon directe ou indirecte à l'avancement de mes travaux ainsi qu'à mon cheminement lors de ces années de doctorat. Il constitue une expérience marquante, intense et passionnante. Grâce à maintes personnes, mon doctorat fut aussi vibrant, excitant et agréable.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le docteur Pierre Talbot, pour son encadrement et son soutien. Capable de voir le bon côté de la médaille, son encouragement me fut toujours précieux! Je le remercie également pour toutes ces opportunités de congrès et pour son regard toujours neuf, posé sur la science en général.

Merci également à mon co-directeur, le docteur François Denis, pour ses idées et son aide précieuse dans la réalisation de certaines techniques. Je le remercie aussi pour son soutien et nos discussions toujours intéressantes.

L'équipe extraordinaire du docteur Pierre Duquette fut des plus efficaces; je souligne spécialement le dévouement et le professionnalisme de Mme Josée Poirier pour son aide dans la recherche de participants lors de cette étude.

Cette aventure n'aurait pas été la même sans l'amitié et le savoir-faire de Mme Francine Lambert, je la remercie pour toutes ces petites attentions et sa grande compétence. Mes plus sincères remerciements vont aussi à Mme Ginette Mercier qui m'a transmis ses connaissances et son amour de la culture cellulaire! Elle fut une des pierres angulaires de ce projet.

Je remercie le docteur Hélène Jacomy pour sa grande passion pour la science et son dynamisme. Par son sens critique et son habileté à flairer des bonnes pistes, elle a su m'aider au moment opportun. Son amitié m'est des plus précieuses.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude envers les membres présents et passés du laboratoire: travailler en équipe, épaulée par ses pairs est si important! Le

climat d'un laboratoire est déterminant à un état d'esprit propice au dialogue et à l'échange. Je remercie donc Marc, Julien et Mylène pour leur amitié et nos échanges scientifiques stimulants. Merci également à Edith, Julie, Tina et Fanny. Un remerciement bien spécial au docteur Nathalie Arbour: par sa fidèle amitié et ses grandes compétences scientifiques, elle a su être une main secourable au besoin, prodiguant des encouragements et des conseils toujours appréciés. Nos discussions à l'édifice 12, autour de la paillasse, sont de si bons souvenirs!

Mes remerciements s'étendent aussi aux organismes qui ont contribué à mon soutien financier, tout au long de ce doctorat. Je remercie chaleureusement la Fondation Armand-Frappier ainsi que la Société Canadienne de la Sclérose en Plaques pour leur aide financière grandement appréciée, et indispensable.

En dernier lieu, ma famille, mes amis(es). Et oui, ils furent toutes et tous comme autant de petits anges bienveillants, à un moment ou à un autre. Ma gratitude envers eux est profonde. Je remercie Philippe, mon mari et amour depuis si longtemps. Sans lui, je n'aurais peut-être pas persévéré, sans lui, tout aurait sûrement été plus difficile. Philippe, j'ai partagé avec toi les peines, les tracasseries et les grands moments de mes recherches... je partage maintenant avec toi la beauté de cette réalisation dont tu es un principal artisan! Merci d'avoir compris et supporté les longues heures! Merci aussi pour tout cet amour! Je tiens à exprimer également toute ma gratitude envers mes parents, pour leur amour inconditionnel, pour leur générosité sans borne, pour notre complicité, ainsi que pour une enfance bénie de grandes joies et de souvenirs impérissables. Leur soutien me fut toujours d'un grand réconfort. À ma mère que j'aime de tout mon cœur et à mon père chéri, parti trop vite, je dédis cette thèse.

Je remercie aussi mes beaux-parents Marie et Claude pour leur affection, leur attention et leur soutien. Finalement mes chers/chères amis (es): Les deux Annie... et leur Michel et Étienne respectif! Fany et Serge... ainsi que les sourires irrésistibles de ma filleule Eugénie-Rose! Marie-Lou et Frédéric! Nathalie! Votre présence dans ma vie est de plus précieuses. Merci!

BIBLIOGRAPHIE

Acha-Orbea, H. et H.R. MacDonald. 1995. Superantigens of mouse mammary tumor virus. Annu Rev Immunol 13:459

Aichele, P., M.F. Bachmann, H. Hengartner et R.M. Zinkernagel. 1996. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. Immunol Rev 152:21-45

Andersen, O., P.E. Lygner, T. Bergstrom, M. Andersson et A. Vahne. 1993. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses - A prospective seroepidemiological study. J. Neurol. 240: 417-422

Arbour, N., G. Côté, C. Lachance, F. Chagnon, N.R. Cashman, et P.J. Talbot. 1999. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. J Virol 73: 3338-3350.

Arbour, N., R. Day, J. Newcombe et P.J. Talbot. 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. J Virol 19: 8913-8921

Arbour, N., S. Ékandé, G. Côté C. Lachance, F. Chagnon, N.R. Cashman, et P.J. Talbot. 1999. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. J Virol 73: 3326-3337

Atkinson, M.A., M.A. Bowman, L. Campbell, B.L. Darrow, D.L. Kaufman et N.K. MacLaren. 1994. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. J Clin Invest 94:2125-2129

Bachmaier, K., J., Le et J.M. Penninger. 2000. "Catching heart disease": antigenic mimicry and bacterial infections. Nat Med Aug; 6(8):841-2

Barker, C.F. et R.E. Billingham. 1977. Immunologically privileged sites. Adv Immunol ;25:1-54

Barnaba, V. 1996. Viruses, hidden self-epitopes and autoimmunity. Immunol Rev 152:47-66.

Barnett, E.M. et S. Perlman. 1993. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. Virology 194:185-191

Barthold, S.W. et A.L. Smith. 1992. Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice. Arch Virol 122:35-44

Baschieri, S., Lees, R.K., Lussow, A.R. et H.R. MacDonald. 1993. Clonal anergy to staphylococcal enterotoxin B in vivo: selective effects on T cell subsets and lymphokines. Eur J Immunol Oct;23(10):2661-6

Beckman, E.M., S.A. Percelli, C.T. Morita, S.M. Behar, S.T. Furlong et M.B. Brenner. 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted ab⁺ T cells. Nature 372:691-694

Benoist, C. et D. Mathis. 2001. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? Nat Immunol 2(9): 797-801

Beutner, U., Kraus, E., Kitamura, D., Rajewsky, K. et B.T. Huber . 1994. B cells are essential for murine mammary tumor virus transmission, but not for presentation of endogenous superantigens. J Exp Med May 1;179(5):1457-66

Beverley, P.C. et M.K. Maini. 2000. Differences in regulation of CD4 and CD8 T-cell clones during immune response. Philos Trans R Soc Lond Biol Sci. 355,1395.

Bonavia, A., N. Arbour, V. Wee Yong et P.J. Talbot. 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. J Virol 71: 800-806.

Boucher, A., G. Mercier, P. Duquette et P.J. Talbot. 1998. Clonal T-cell cross-reactivity between myelin antigens MBP and PLP and human respiratory coronaviruses in multiple sclerosis. Dans: Fifth International Congress of the International Society of Neuroimmunology (Montréal, 23-27 août 1998). J Neuroimmunol 90:30.

Bougeret, M., T. Delaunay, F. Romero, P. Jullien, H. Sabe, H. Hanafusa, R. Benarous et S. Fisher. 1996. Detection of a physical and functional interaction between Csk and Lsk which involves the SH2 domain of Csk and is mediated by autophosphorylation of Lck on tyrosine 394. J Biol Chem 271:7465-7472

Brosnan, C.F et C.S. Raine. 1996. Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. Brain Pathol Jul;6(3):243-57

Buchmeier, M.J., H.A. Lewicki. P.J. Talbot et R.L. Knobler. 1984. Murine hepatitis virus-4 (strain JHM)-induced neurologic disease is modulated in vivo by monoclonal antibody. Virology 132:261-270.

Burks, J.L., B.L. deVald, L.D. Jankovsky et J.C. Gerdes. 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. Science 209:933-934

Burns J.B. et Littlefield K. (1999) Human T lymphocytes reactive with whole myelin recognize predominantly myelin basic protein. J Neuroimmunol. Sep;24(1-2):67-74

Cabirac, G.F., Murray, R.S., McLaughlin, L.B., Skolnick, D.M., Hogue, B., K., Dorovini-Zis. et P.J. Didier. 1995. In vitro interaction of coronaviruses with

primate and human brain microvascular endothelial cells. Adv Exp Med Biol; 380:79-88

Cabirac, G.F., K.F. Soike, J.-Y. Zhang, K. Hoel, C. Butunoi, G.-Y. Cai, S. Johnson et R.S. Murray. 1994. Entry of coronavirus into primate CNS following peripheral infection. Microb Pathog 16:349-357

Callow, K.A., 1985. Effect of specific humoral immunity and some non-specific factors on resistance of volunteers to respiratory coronavirus infection. J Hyg (Lond) 95:173-189

Callow, K.A., H.F. Parry, M. Sergeant et D.A. Tyrrell. 1990. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection in man. Epidemiol Infect 105:435-446

Campagnoni, A.T. 1993. Structure and developmental regulation of Golli-MBP, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain. J Biol Chem 268:4930-4938

Chagnon, F, A. Lamarre, C. Lachance, M. Krakowski, T. Owens, J.-F. Laliberté et P.J. Talbot. 1998. Characterization of the expression and immunogenicity of the ns4b protein of human coronavirus 229E. Can J Microbiol 44:1012-1017

Challoner, P.B., K.T. Smith, J.D., Parker, D.L. MacLeod, S.N. Coulter, T.M. Rose, E.R. Schultz, J.L. Bennett, R.L. Garber, M. Chang, P.A. Schad, P.M. Stewart, R.C. Nowinski, J.P. Brown et G.C. Burmer. 1995. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 92:7440-7444

Chapman, A., Stewart, S.J., Nepom, G.T., Green, W.F., Crowe, D., Thomas, J.W et G.G. Miller. 1996. CD11b+CD28-CD4+ human T cells: activation requirements and association with HLA-DR alleles. J Immunol. 157 (11); 4771-4780

Chataway, J., Sawcer, S., Feakes, R., Coraddu, F., Broadley, S., Gray, J. et A. Compston. 1999. More evidence that founder effects exist in the European population. Eur J Hum Genet Sep; 7(6):623-4

Cheifetz, S. et M.A. Moscarello. 1985. Effect of bovine basic protein charge microheterogeneity on protein-induced aggregation of unilamellar vesicles containing a mixture of acidic and neutral phospholipids. Biochemistry 24(8):1909-1914

Chen, W.F., Wilson, A., Scollay, R. et K. Shortman. 1982. Limit-dilution assay and clonal expansion of all cells capable of proliferation. J immunol

Colombo, E., Banki, K., Tatum, A.H., Daucher, J., Ferrante, P., Murray, R.S., Phillips, P.E. et A. Perl. 1997. Comparative analysis of antibody and cell-mediated autoimmunity to transaldolase and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. J Clin Invest Mar 15;99(6):1238-50

Coyle PK. 1996. The neuroimmunology of multiple sclerosis. Adv Neuroimmunol 6(2):143-54

Cristen, J., A. Willer, et G.C. Ebers. 2000. Susceptibility to multiple sclerosis: interplay between genes and environment. Current opinion in Neurology 13: 241-247.

Déas, O., Dumont, C., MacFarlane, M., Rouleau, M., Hebib, C., Harper, F., Hirsch, F., Charpentier, B., Cohen, G.M. et A. Senik. 1998. Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T. J immunol 161: 3375-3383.

Dales, S. et R. Anderson. 1995. Pathogenesis and diseases of the central nervous system caused by murine coronaviruses. Dans. S.G. Siddell (éd.). The Coronaviridae. New York, N.Y.: Plenum Press p.257-292

Daly, M.J., Rioux, J.D., Schaffner, S.F., Hudson, T.J. et E.S. Lander. 2001. High-resolution haplotype structure in the human genome. Nat Genet Oct;29(2):229-32

de Vries, H.E., J. Kuiper, A.G. de Boer, T.J.C. van Berkel et D.D. Breimer. 1997. The blood-brain barrier in neuroimmunology diseases. Pharmacol Rev 49:143-155

Del Valle L., S. Delbue , J. Gordon , S. Enam , S. Croul , P. Ferrante et K. Khalili. 2002. Expression of JC virus T-antigen in a patient with MS and glioblastoma multiforme. Neurology 58(6):895-900

Duquette, P., J. Pleines, M.Girard, L. Charest, M. Senecal-Quevillon et C. Masse. 1992. The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. Can. J. Neurol. Sci. 19:466-471

Dyment, D.A., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C. et A.D. Sadnovich. 1997. Genetics of multiple sclerosis. Hum Mol Genet 6(10):1693-8

Ebers, G.C. 1982. HLA typing in sibling pairs with multiple sclerosis. Lancet 2:1278

Ebers, G.C., K. Kukay, D.E. Bulman, A.D. Sadovnick, G. Rice, C. Anderson, H. Armstrong, K. Cousin, R.B. Bell, W. Hader, D.W. Paty, S. Hashimoto, J. Oger, P. Duquette, S. Warren, T. Gray, P. O'Connor, A. Nath, A. Auty, L. Metz, G. Francis, J.E. Paulseth, T.J. Murray, W. Pryse-Phillips, R.Nelson, M. Freedman, D. Brunet,

J.P. Bouchard, D. Hinds et N. Risch. 1996. A full genome search in multiple sclerosis. Nat. Genet. 13(4):472-476.

Edwards, J.A., Denis, F. et P.J. Talbot. 2000. Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. J Neuroimmunol 1;108(1-2):73-81

Ehrlich, G.D., J.B. Glaser, V. Bryz-Gornia, J. Maese, T.A. Waldmann, B.J. Poiesz, S.J. Greenberg et The HTLV-MS Working Group. 1991. Multiple sclerosis, retrovirus, and PCR. Neurology 41:335-343

Encinas, J.A., Weiner, H.L. et V.K. Kuchroo. 1997. Inheritance of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurosci Res. 15;45(6):655-69

Enjuanes, L., D.A. Brian, D. Cavanagh, K.V. Holmes, M.M.C. Lai, H. Laude, P. Masters, P. Rottier, S.G. Siddell, W.J.M. Spaan, F. Taguchi et P.J. Talbot. 1999. Coronaviridae. Dans: C.M. Fauquet, M.H.V. Van Regenmortel, D.H.L Bishop, et C.R. Pringle (éd.). Virus taxonomy. New York, N.Y. USA. : Academic Press

Evans, C.F., M.S. Horwitz, M.V. Hobbs et M.B.A. Oldstone, 1996. Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease. J Exp Med 184:2371-2384

Fazakerley, J.K. et M.J. Buchmeier. 1993. Pathogenesis of virus-induced demyelination. Adv Virus Res 42:249-324

Fazzini, E. J. Fleming et S. Fahn. 1992. Cerebrospinal fluid antibodies to coronavirus in patients with Parkinson's disease. Mov Disord 7:153-158

Fleming JO. 1988. Viral neurovirulence. Lab Invest 58(5):481-3

Fleming, J.O., F.A.K. El Zaatari, W. Gilmore, J.D. Berne, J.S. Burks, S.A. Stohlman, W.W. Tourtellotte et L.P. Weiner. 1998. Antigenic assesment of

coronaviruses isolated from patients with multiple sclerosis. Arch Neurol 45:629-633

Frasca, L., C. Piazza et E. Piccolella. 1998. CD4+ T cells orchestrate both amplification and deletion of CD8+ T cells. Crit Rev Immunol 18:569-594

Frey, B. et B. Suppmann. 1995. Demonstration of the Expand™ PCR system's greater fidelity and higher yields with a *lacI*-based PCR fidelity assay. Biochemica 2; 8-9

Fritz, R.B. et Zhao, M.L. 1996. Activation of MPB-specific T cells by thymic cells in the absence of exogenous MPB. J Immunol 157:5249-5253

Fujinami, R.S. et M.B. Oldstone. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. Science 230:1043-1045

Gale, C.R. et C.N. Martyn. 1995. Migrant studies in multiple sclerosis. Prog. Neurobiol. 47:425-448

Gagneur, A., Sizun, J., Vallet, S., Legr, M.C., Picard, B. et P.J. Talbot. 2002. Coronavirus-related nosocomial viral respiratory infections in a neonatal and paediatric intensive care unit: a prospective study. J Hosp Infect 51(1):59-64

Godfrey, D.I., J. Kennedy, T. Suda et A. Zlotnik. 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. J Immunol 150:4244-4252

Greenfield, E.A., K.A. Nguyen et V.K. Kuchroo. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. Critical Reviews in Immunology 18:389-418

Greer, J.M. et al. 1997. Increased immunoreactivity to two overlapping peptides of myelin proteolipid in multiple sclerosis. Brain 120:1447-1460

Greer, J.M., R.A. Sobel, A. Sette, S. Southwood, M.B. Lees et V.K. Kuchroo. 1996. Immunogenic and encephalitogenic epitope clusters of myelin proteolipid protein. J Immunol 156(1):371-9

Haegert, D.G., Cowan, T., Murray, T.J., Gadag, V. et P. O'Connor. 1999. Does a shift in the T-cell receptor repertoire precede the onset of MS? Neurology 11;53(3):485-90

Haines, J.L., M. Ter-Minassian, A. Bazyk, J.F. Gusella, D.J. Kim, H. Terwedow, M.A. Pericak-Vance, J.B. Rimmler, C.S. Haynes, A.D. Roses, A. Lee, B. Shaner, M. Menold, E. Seboun, R.P. Fitoussi, C. Gartioux, C. Reyes, F. Ribierre, G. Gyapay, J. Weissenbach, S.L. Hauser, D.E. Goodkin, R. Lincoln, K. Usuku, A. Garcia-Merino, N. Gatto, S. Young et J.R. Oksenberg. 1996. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. Nat. Genet. 13:469-471

Hafler D.A., Kent S.C., Pietrusewicz M.J., Khoury S.J., Weiner H.L. et Fukaura H. (1997) Oral administration of myelin induces antigen-specific TGF-beta 1 secreting T cells in patients with multiple sclerosis. Ann N Y Acad Sci. 1997 Dec 19;835:120-31

Hart, M.N. et Z. Fabry. 1995. CNS antigen presentation. Trends Neurosci 18:475-481

Hartung, H.P. et P. Rieckmann. 1997. Pathogenesis of immune-mediated demyelination in the CNS. J. Neural Transm. Suppl. 50:173-181

Held, W., H. Acha-Orbea, H.R. MacDonald et G.A. Waanders. 1994. Superantigens and retroviral infection: insights from mouse mammary tumor virus. Immunol Today 15:184

Hemmer, B., B.T. Fleckenstein, M. Vergelli, G. Jung, H. McFarland, R. Martin et K.H. Wiesmüller. 1997. Identifications of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. J Exp Med 185(9); 1651-1659.

Hemmer, B., C. Pinilla, B. Gran, M. Vergelli, N. Ling, P. Conlon, H.F. McFarland, R. Houghten et R. Martin. 2000. Contribution of individual amino acids within MHC molecule of antigenic peptide to TCR ligand potency. J Immunol. 164:2

Hemmer, B., I. Stefanova, M. Vergelli, R.N. Germain et R. Martin. 1998. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. J Immunol 160:5807-5814

Hemmer, B., M. Vergelli, C. Pinilla, R. Houghten et R. Martin. 1998. Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. Immunol Today 19:163-168

Heusipp, G., C. Grotzinger, J. Herold, S.G. Siddell et J. Ziebuhr. 1997. Identification and subcellular localization of a 41 kDA, polyprotein 1ab processing product in human coronavirus 229E-infected cells. J Gen Virol 78:2789-2794

Hillert, J., et O. Olerup. 1993. Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DQ6,Dw2 haplotype. Neurology 43:163-168

Hilyard, K. et J.L. Strominger. 1995. The immune recognition unit: the TCR-peptide-MHC complex. T Cell Receptors, Oxford University Press, Chapter 18: 403-424

Holmes, M.J., K.A. Callow, R.A. Childs, et D.A.J. Tyrrell. 1986. Antibody dependent cellular cytotoxicity against coronavirus 229E-infected cells. Br J Exp Pathol 67:581-586

Holz, A., Bielekova, B., Martin, R et M.B. Oldstone. 2000. Myelin-associated oligodendrocyte basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis. J Immunol 15; 164(2) :1103-1109

Hunter, S.F. et M. Rodriguez. 1995. Multiple sclerosis: a unique immunopathological syndrome of the central nervous system. Springer Semin. Immunopathol. 17:89-105

Ignatowicz, L., Kappler, J. et P. Marrack. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. Cell 3; 84(4):521-9

Iwashima, M., Irving, B.A., van Oers, N.S., Chan, A.C. et A. Weiss. 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. Science 25; 263(5150):1136-9

John, G.R., S.L. Shankar, B. Shafit-Zagardo, A. Massimi, S.C. Lee, C.S. Raine et C.F. Brosnan. 2002. Multiple sclerosis: Re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. Nat. Med. 8(10): 1115-1121

Johns, T.G., Kerlero de Rosbo, N., Menon, K.K., Abo, S., Gonzales, M.F. et C.C. Bernard. 1995. Myelin oligodendrocyte glyco-protein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. J Immunol 154:5536-5541

Johnson-Lussenburg, C.M. et Q. Zheng. 1987. Coronavirus and multiple sclerosis: results of a case/control longitudinal serological study. Adv Exp Med Biol 218:421-9

Jouvenne, P., S. Mounir, J.N. Stewart, C.D. Richardson et P.J. Talbot. 1992. Sequence analysis of human coronavirus 229E mRNAs 4 and 5: evidence for polymorphism and homology with myelin basic protein. Virus Res 22:125-141

Kastrukoff, L.F., et G.P.A. Rice. 1998. Virology. Dans: D.W. Paty et G.C. Ebers (éd.). Multiple Sclerosis. Philadelphia, PA. USA. : FA Davis Company p.370-402

Kawabe, Y. et A. Ochi. 1991. Programmed cell death and extrathymic reduction of Vb8'CD4' T celss in mice tolerant to Staphylococcus Aureus enterotoxin B. Nature 349:245

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

Kuchroo, V.K., Martin, C.A., Greer, J.M., Ju, S.T., Sobel, R.A. et M.E. Dorf. 1993. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol 151(8):4371-82

Kunkel, F. et G. Herrler. 1993. Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. Virology 195(1):195-202

Kurtzke, J.F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. Clin. Microbiol. Rev 6:382-427

Kyuwa, S., K. Yamaguchi, Y. Toyoda, et K. Fujiwara. 1991. Induction of self-reactive T cells after murine coronavirus infection. J Virol 65:1789-1795

Labonté, P., S. Mounir, et P.J. Talbot. 1995. Sequence and expression of the ns2 protein gene of human coronavirus OC43. J Gen Virol 76:431-435

Labrecque, N., Thibodeau, J. et R.P. Sekaly. 1993. T-cell receptor recognition of superantigens: another view. Res Immunol 144(3):175-80

Lachance, C., N. Arbour, N.R. Cashman et P.J. Talbot. 1998. Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by human coronavirus 229E. J Virol 72:6511-6519

Lai, M.M.C. et D. Cavanagh. 1997. The molecular biology of coronaviruses. Adv Virus Res 48:1-100

Lampert, P.W., Sims, J.K. et A.J. Kniazeff. 1973. Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies. Acta Neuropathol (Berl) 24(1):76-85

LaSalle, J.M. et D.A. Hafler. 1994. T cell anergy. FASEB J. 8:9

Lavi, E., P.S. Fishman, M.K. Highkin et S.R. Weiss. 1988. Limbic encephalitis after inhalation of a murine coronavirus. Lab Invest 58(1):31-6

Levin M.C., S.M. Lee, F. Kalume, Y. Morcos, F.C. Jr Dohan, K.A. Hasty, J.C. Callaway, J. Zunt, D. Desiderio et J.M. Stuart. 2002. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. Nat Med 8(5):509-13

Li, Y., H. Li, R. Martin et R.A. Mariuzza. 2000. Structural basis for the binding of an immunodominant peptide from myelin basic protein in different registers by two HLA-DR2 proteins. J. Mol. Biol. 304:177-188

Linsley, P.S., J.L. Greene, P. Tan, J. Bradshaw, J.A. Ledbetter, C. Anasetti et N.K. Damle. 1992. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated lymphocytes-T. J Exp Med 176:1595-1604

Linsley, P.S., P.M. Wallace, J. Johnson, M.G. Gibson, J.L. Greene, J.A. Ledbetter, C. Singh et M.A. Tepper. 1992. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CLTA-4 T cell activation molecule. Science 257:792-795

Lucchinetti, C.F., W. Brück, M. Rodriguez et H. Lassman. 1996. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. Brain Pathol 6:259-274

Madden, D.L., W.C. Wallen, S.A. Houff, I.C. Shekarki, P.O. Leinikki, G.A. Castellano et J.L. Sever. 1981b. Measles and canine distemper antibody. Presence in sera from patients with multiple sclerosis and matched control subjects. Arch Neurol 38:13-15

Markovic-Plese, S., Fukaura, H., Zhang, J., al-Sabbagh, A., Southwood, S., Sette, A., Kuchroo, V.K. et D.A. Hafler. 1995. T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans. J Immunol 155(2):982-92

Marrie, R.A., C. Wolfson, M.C. Sturkenboom, O. Gout, O. Heinzlef, E. Roullet et L. Abenham. 2000. Multiple sclerosis and antecedent infections: a case-control study. Neurology 54(12): 2307-10

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

Martino, G., Furlan, R., Brambilla, E., Bergami, A., Ruffini, F., Gironi, M., Poliani, P.L., Grimaldi, L.M. et G. Comi. 2000. Cytokines and immunity in multiple sclerosis: the dual signal hypothesis. J Neuroimmunol 109(1):3-9

Miller, J.F. et A. Bastien. 1996. Mechanisms of tolerance to self. Curr Opin Immunol 8:315-321

Minohara, M., H. Ochi, S. Matsushita, A. Irie, Y. Nishimura et J. Kira. 2001. Differences between T-cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls. Tissues Antigens 57(5): 447-456

Moore, G.R.W. 1998. Neuropathology and pathophysiology of the multiple sclerosis lesion. Dans: D.W. Paty et G.C. Ebers (éd.) Multiple sclerosis. Philadelphia, PA, USA. : FA Davis Company p.257-327

Morris-Downes, M.M., Smith, P.A., Rundle, J.L., Piddlesden, S.J., Baker, D., Pham-Dinh, D., Heijmans, N. et S. Amor. 2002. Pathological and regulatory effects of anti-myelin antibodies in experimental allergic encephalomyelitis in mice. J Neuroimmunol 125(1-2):114-24

Morris-Downes, M.M., McCormack, K., Baker, D., Sivaprasad, D., Natkunarajah, J. et S. Amor. 2002. Encephalitogenic and immunogenic potential of myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte-specific glycoprotein (OSP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in ABH and SJL mice. J Neuroimmunol 122(1-2):20-33

Moscarello, M.A., D.D. Wood, C.A. Ackerley et C.A. Boulias. 1994. Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. J Clin Invest 94:146-154

Mounir, S., et P.J. Talbot. 1992. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. J Gen Virol 73:2731-2736

Mounir, S. et P.J. Talbot. 1993. Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. J Gen Virol 74:1981-1987

Murphy, M.A., R.G. Schnall, D.J. Venter, L. Barnett, I. Bertoncello, C.B. Thien, W.Y. Langdon et D.D. Bowtell. 1998. Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. Mol Cell Biol 18:4872-4882

Murray, R.S., B. Brown, D. Brian, et G.F. Cabirac. 1992. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. Ann Neurol 31: 525-533

Murray, R.S., G.-Y. Cai, K. Hoel, J.-Y. Zhang, K.F. Soike et G.F. Cabirac. 1992. Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system. Virology 188:274-284

Murray, R.S., G.-Y. Cai, K.F. Soike et G.F. Cabirac. 1997. Further observations on coronavirus infection of primate CNS. J Neurovirol 3:71-75

Myint S.H. 1994 Human coronaviruses-a brief review. Rev Med Virol 4(35): 35-46

Nossal, G.J.V. 1994. Negative selection of lymphocytes. Cell 76:229-239

Ohashi, P.S., S. Oehen, K. Bürki, H.P. Pircher, C.T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R. Zinkernagel et H. Hengartner. 1991. Ablation of <tolerance> and induction of a diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. Cell 65:305-317

Oldstone, M.B., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J. et H. Lewicki. 1991. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. Cell 19;65(2):319-31

Oldstone, M.B.A. 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. Cell 50: 819-820

Oldstone, M.B.A. 1998. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. FASEB J 12:1255-1265

Olsen, J.K., J.I. Croxford, M.A. Calenoff, M.C. Dal Canto et S.D. Miller. 2001. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. J Clin Invest 108(2): 311-318

Olson, J.K., Eagar, T.N. et S.D. Miller. 2002. Functional activation of myelin-specific T cells by virus-induced molecular mimicry. J Immunol 1;169(5):2719-26

Olsson, T., Zhi, W.W., Hojberg, B., Kostulas, V., Jiang, Y.P., Anderson, G., Ekre, H.P. et H. Link. 1990. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. J Clin Invest 86(3):981-5

Osame, M., K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, A. Igata, M. Matsumoto et M. Tara. 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet 1:1031-1032

Owens, T. H. Wekerle et J. Antel. 2001. Genetics models for CNS inflammation. Nature Medicine 7 (2): 161-166

Panitch, H. S. 1994. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. Ann. Neurol. 36: S25-S28

Paty, D.W. et G.C. Ebers. 1998. Clinical features. Dans: D.W. Paty et G.C. Ebers (éd.). Multiple sclerosis. Philadelphia, PA, USA. :FA Davis Company p.135-191

Pawelec, G., E. Mariani, B. Bradley et R. Solana. 2000. Longevity in vitro of human CD4+ T helper cell clones derived from young donors and elderly donors, or from progenitors cells: age-associated differences in cell surface molecule expression and cytokine secretion. Biogerontology. 1:3

Pelfrey, C.M., J.L. Trotter, L.R. Tranquill and H.F. Mcfarland. 1994. Identification of a second T cell epitope of human proteolipid protein (residues 89-106)

recognized by proliferative and cytolytic CD4⁺ T cells from multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol 53:153-161

Perlman, S., G. Evans et A. Afifi. 1990. Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. J Exp Med 172:1127-1132

Perlman, S., G. Jacobsen et A. Afifi. 1989. Spread of a neurotropic murine coronavirus into the CNS via the trigeminal and olfactory nerves. Virology 170(2): 556-60

Perron, H., E. Jouvin-Marche, M. Michel, A. Ounanian-Paraz, S. Camelo, A. Dumon, C. Jolivet-Reynaud, F. Marcel, Y. Souillet, E. Borel, L. Gebuhrer, L. Santoro, S. Marcel, J.M. Seigneurin, P.N. Marche et M. Lafon. 2001. Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. 287(2): 321-32

Perron, H., J.A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P.W. Tuke, C. Voisset, J.L. Blond, B. Lalande, J.M. Seigneurin, B. Mandrand et the Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. 1997. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 94:7583-7588

Pettinelli, C.B., Fritz, R.B., Chou, C.H. et D.E. McFarlin. 1982. Encephalitogenic activity of guinea pig myelin basic protein in the SJL mouse. J Immunol 129(3):1209-11

Pribyl, T.M. et al. 1993. The human myelin basic protein gene is included within a 179-kilobase transcription unit: expression in the immune and central nervous system. Proc Natl Acad Sci 90:10695-10699

Pribyl, T.M., C. Campagnoni, K. Kampf, V.W. Handley et A.T. Campagnoni. 1996. The major myelin protein genes are expressed in the human thymus. J Neurosci Res 45:812-819

Raju, K., Rabinovich, B.A., Radvanyi, L.G., Spaner, D. et R.G. miller. 2001. a central role for Il-2 in fate determination of mature T cells: role in determining the Th1/Th2 profile in primary T cell cultures. Int. Immunol. 13 (2): 1453-1459

Reboul, J., Mertens, C., Levillayer, F., Eichenbaum-Voline, S., Vilkoren, T., Cournu, I., Babron, M.C., Lyon-Caen, O., Clerget-Darpoux, F., Edan, G., Clanet, M., Brahic, M., Bureau, J.F., Fontaine, B. et R. Liblau. 2000. Cytokines in genetic susceptibility to multiple sclerosis: a candidate gene approach. French Multiple Sclerosis Genetics Group. J Neuroimmunol 3;102(1):107-12

Renno, T. et H. Acha-Orbea. 1996. Superantigens in autoimmune diseases: still more shades of gray. Immunol Rev 154:175-191

Ridgway, W.M. et C.G Fathman. 1999. MHC structure and autoimmune T cell repertoire development. Curr Opin Immunol 11(6):638-42

Robbins D.J., Zhen, E., Cheng, M., Xu, S., Ebert, D. et M.H. Cobb. 1994. MAP kinases ERK1 and ERK2: pleiotropic enzymes in a ubiquitous signaling network. Adv Cancer Res.63:93-116

Rohowsky-Kochan, C., D. Molinaro, et S.D. Cook. 2000. Cytokines secretion profile of myelin basic protein-specific T cells in multiple sclerosis. Mult Scler 6(2): 69-77

Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., Dyment, D.A. et N.J. Risch. 1996. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. Lancet 22;347(9017):1728-30

Sadovnick, A.D., D. Dymment et G.C. Ebers, G.C. 1997. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. Epidemiol Rev 19:99-106

Sadovnick, A.D., H. Armstrong, G.P. Rice, D. Bulman, L. Hashimoto, D.W. Paty, S.A. Hashimoto, S. Warren, W. Hader et T.J. Murray 1993. A population-based study of multiple sclerosis in twins:update. Ann.Neurol. 33:281-285

Salmi, A., B. Ziola, T. Hovi et M. Reunanen. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. Neurology 32: 292-295

Saruger, E., Dozio, N., Meschi, F., Pastore, M.R. et R. Bonifacio. 2001. T cell responses to type 1 diabetes related peptid sharing homologous regions. J Mol Med 79 (4): 213-220

Sawcer, S. et P.N. Goodfellow. 1998. Inheritance of susceptibility to multiple sclerosis. Curr Opin Immunol 10(6):697-703

Sawcer, S., H.B. Jones, R. Feakes, J. Gray, N. Smaldon, J. Chataway, N. Robertson, D.Clayton, P.N. Goodfellow et A. Compston. 1996. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. Nat. Genet. 13:464-468

Sawicki, S. G. et Sawicki, D. L. 1998. A new model for coronavirus transcription. Adv Exp Med Biol 440, 215–219

Schaefer, B.C. 1995. Revolution in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full length cDNA ends. Anal. Biochem. 227;255-273

Schmidt, S., Linington, C., Zipp, F., Sotgiu, S., de Waal Malefyt, R., Wekerle, H. et R. Hohlfeld. 1997. Multiple sclerosis: comparison of the human T-cell response to S100 beta and myelin basic protein reveals parallels to rat experimental autoimmune panencephalitis. Brain 120 (Pt 8):1437-45

Schmidt, S. 1999. Candidate autoantigens in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis 5:147-160

Sciacca, F.L., Ferri, C., Vandenbroeck, K., Veglia, F., Gobbi, C., Martinelli, F., Franciotta, D., Zaffaroni, M., Marrosu, M., Martino, G., Martinelli, V., Comi, G., Canal, N. et L.M. Grimaldi. 1999. Relevance of interleukin 1 receptor antagonist intron 2 polymorphism in Italian MS patients. Neurology 10;52(9):1896-8

Seder R.A. 1996. High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naïve CD4+ T cells for IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-4. J Immunol. 156(7): 2413-2422

Selmaj, K., C.F. Brosnan et C.S. Raine. 1991. Colocalization of lymphocytes bearing gamma-delta T cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci 88:6452-6456

Selmaj, K., C.F. Brosnan, et C.S. Raine. 1992. Expression of heat shock protein hsp65 by oligodendrocytes in vivo and in vitro: implications for multiple sclerosis. Neurology 42:795-800

Selmaj, K., C.S. Raine et A.H. Cross. 1991. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. Ann Neurol 30:694

Shevach, E.M. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity. Annu Rev Immunol. 18:423-449

Shields, D.C., Schaecher, K.E., Saido, T.C. et N.L. Banik. 1999. A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain. Proc Natl Acad Sci U S A 96(20):11486-91

Shortman, K. 1992. Cellular aspects of early T-cell development. Curr Opinion Immunol 4:140-146

Sibley, W. A., C.R. Bamford et K. Clark. 1985. Clinical viral infections and multiple sclerosis. Lancet 1: 1313-1315

Simon, A.K., O. Williams, J. Mongkolsapaya, B. Jin, X.N. Xu, H. Walczak et G.R. Screaton. 2001. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development: sensitivity of human thymocytes. Proc Natl Acad Sci USA 98(9): 5158-5163

Sizun, J., Soupre, D., Giroux, J.D., Alix, D., De Parscau, Legrand, M.C., Demazure, M. et C. Chastel. Nasal colonization with coronavirus and apnea of the premature newborn. Acta Paediatr 82(3):238

Sizun, J., N. Arbour et P.J. Talbot. 1998. Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronaviruses 229E and OC43 in cell culture. J Virol Methods 72:145-152

Soldan, S.S., R. Berti, N. Salem, P. Secchiero, L. Flamand, P.A. Calabresi, M.B. Brennan, H.W. Maloni, H.F. McFarland, H.C. Lin, M. Patnaik et S. Jacobson. 1997. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. Nat Med 3(12): 1394-1407

Sorensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., Frederiksen, J.L. et R.M. Ransohoff. 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. J Clin Invest 103(6):807-15

Spits, H., et H. Yssel. 1996. Cloning of human T and natural killer cells. Methods: a Companion in Methods in Enzymology 8:416-421

Sriram, S. 1994. Longitudinal study of frequency of HRPT mutant T cells in patients with multiple sclerosis. Neurology 44:311-315

Sriram, S. et M. Rodriguez. 1997. Indictment of the microglia as the villain in multiple sclerosis. Neurology 48:464-470

Stebbins, C.E. et J.E. Galan. 2001 Structural mimicry in bacterial virulence. Nature immunol 412(6848): 701-705

Stewart, J.N., S. Mounir, et P.J. Talbot. 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. Virology 191: 502-505.

Straus et al 1992

Strunk, T., Bubel, S., Mascher, B., Schlenke, P., Kirchner, H. et K.P. Wandinger. 2000. Increased numbers of CCR5+ interferon-gamma- and tumor necrosis factor-alpha-secreting T lymphocytes in multiple sclerosis patients. Ann Neurol 47(2):269-73

Sun, N. et S. Perlman. 1995. Spread of a neurotropic coronavirus to spinal cord white matter via neurons and astrocytes. J Virol 69:633-641

Surh, C.D., Lee, D.S., Fung-Leung, W.P., Karlsson, L. et J. Sprent. 1997. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of CD4+ T cells. Immunity 7(2):209-19

Taguchi, F. H. Kubo, H. Takahashi, et H. Suzuki. 1995. Localization of neurovirulence determinant for rats on the S1 subunit of murine coronavirus JHMV. Virology 208:67-74

Talbot, P.J., J.S. Paquette, C. Ciurli, J.P. Antel et F. Ouellet. 1996. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. Ann Neurol 39: 233-240

Talbot, P.J., S. Ékandé, N.R. Cashman, S. Mounir et J.N. Stewart. 1994. Neurotropism of human coronavirus 229E. Adv Exp Med Biol 342:339-346

Tanaka, R., Y. Iwasaki et H. Koprowski. 1976. Intracisternal virus-like particules in brain of a multiple sclerosis patient. J Neurol Sci 28: 121-126

Tejada-Simon M.V., Y.C. Zang, J. Hong, V.M. Rivera, J.M. Killian et J.Z. Zhang. 2002. Detection of viral DNA and immune responses to the human herpesvirus 6 101-kilodalton virion protein in patients with multiple sclerosis and in controls. J Virol 76(12):6147-54

Theil, D.J., I.Tsunoda, F. Rodriguez, J.L. Whitton et R.S. Fujinami. 2001. Viruses can silently prime for and trigger central nervous system autoimmune disease. J Neurovirol 7(3): 220-227

Thompson, A.J., Polman, C.H., Miller, D.H., McDonald, W.I., Brochet, B., Filippi, M., Montalban, X. et J. De Sa. 1997. Primary progressive multiple sclerosis. Brain 120 (Pt 6):1085-96

Trojano, M., Liguori, M., De Robertis, F., Stella, A., Guanti, G., Avolio, C. et P. Livrea. 1999. Comparison of clinical and demographic features between affected pairs of Italian multiple sclerosis multiplex families; relation to tumour necrosis factor genomic polymorphisms. J Neurol Sci 15;162(2):194-200

Tsukada, N., Koh, C.S., Yanagisawa, N., Okano, A., Behan, W.M. et P.O. Behan. 1987. A new model for multiple sclerosis: chronic experimental allergic encephalomyelitis induced by immunization with cerebral endothelial cell membrane. Acta Neuropathol (Berl) 73(3):259-66

Tuohy, V.K., Sobel, R.A. et M.B. Lees. 1988. Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. J Immunol 15;140(6):1868-73

Tuohy, V.K., M. Yu, L. Yin, J.A. Kawczak, J.M. Johnson, P.M. Mathisen, B. Weinstock-Guttman et R.P. Kinkel. 1998. The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. Immunol Rev 164:93-100

Tyrrell, D.A., S. Cohen et J.E. Schlarb. 1993. Signs and symptoms in common colds. Epidemiol infect 111:143-156

Uematsu, Y., S. Ryser, Z. Dembic, P. Borgulya, P. Krimpenfort, A. Berns et al. 1988. In transgenic mice the introduced functional T cell receptor b gene prevents expression of endogenous b genes. Cell 52:831-841

Utz, U., Biddison, W.E., McFarland, H.F., McFarlin, D.E., Flerlage, M. et R. Martin. 1993. Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identical twins correlates with multiple sclerosis. Nature 364(6434):243-7

Van Noort, J.M. 1995. The small heat shock protein aB-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. Nature 375: 798-301

Vennema, H., G.J. Godeke, J.W.A. Rossen, W.F. Voorhout, M.C. Horzinek, D.J.E. Opstelten et P.J.M. Rottier. 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. EMBO J 15:2020-2028

Vincent, V.A.M, F.J.H. Tilders et A.M. Van Dam. 1998. Production, regulation and role of nitric oxide in glial cells. Mediators Inflamm 7:239-255

Vogt, A.B. 1994. Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. J Immunol 153:1665-1673

von Boehmer, H. 1990. Developmental biology of T cells in T-cell receptor transgenic mice. Annu Rev Immunol 8:531-556

von Boehmer, H. 1994. Positive selection of lymphocytes. Cell 76:219-228

von Herrath, M.G., C.F. Evans, M.S. Horwitz et M.B. Oldstone. 1996. Using transgenic mouse models to dissect the pathogenesis of virus-induced autoimmune disorders of the islets of Langerhans and the central nervous system. Immunol Rev 152:111-143

Watanabe, R., H. Wege et V. ter Meulen. 1983. Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. Nature 305:150-153

Weber W.E., Buurman W.A. (1988) Myelin basic protein-specific CD4⁺ cytolytic T-lymphocyte clones isolated from multiple sclerosis patients. Hum Immunol. Jun;22(2):97-109

Wei, S., P. Charmley, R.I. Birchfield, et P. Concannon. 1995. Human T-cell receptor V beta gene polymorphism and multiple sclerosis. Am J Hum Genet 56:963-969

Weiner LP. 1973. Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis. Arch Neurol 28(5):298-303

Weinshenker, B.G., Santrach, P., Bissonet, A.S., McDonnell, S.K., Schaid, D., Moore, S.B. et M. Rodriguez. 1998. Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-based study. Neurology 51(3):742-7

Whitacre, C.C., S.C. Reingold et P.A. O'Looney. 1999. A gender gap in autoimmunity. Science 283(5406):1277-8

Wucherpfennig, K.W. 1994. Clonal expression and persistence of human T cells specific for an immuno-dominant myelin basic protein peptide. J Immunol 152:5581-5592

Wucherpfennig, K.W. 1997. Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes. J Clin Invest 100:1114-1122

Wucherpfennig, K.W. et J.L. Strominger. 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. Cell 80: 695-705

Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellicchio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T, et K.V. Holmes. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. Nature 357(6377):420-2

Yokomori, K. et M.M Lai. 1992. The receptor for mouse hepatitis virus in the resistant mouse strain SJL is functional: implications for the requirement of a second factor for viral infection. J Virol 66(12):6931-8

Zenner, G., Vorherr, T., Mustelin, T. et P. Burn. 1996. Differential and multiple binding of signal transducing molecules to the ITAMs of the TCR-zeta chain. J Cell Biochem 63(1):94-103

Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L. et D.A Hafler. 1994. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. J Exp Med 179:973-984

Zhang, J., C. Vandevyver, P. Stinissen, et J. Raus. 1995. In vivo clonotypic regulation of human myelin basic protein-reactive T cells by T cell vaccination. J Immunol 155:5868-5877

Zhang, J., C. Vandevyver, P. Stinissen, N. Mertens, E. van den Berg-Loonen, et J. Raus. 1995. Activation and clonal expansion of human myelin basic protein-reactive T cells by bacterial superantigens. J Autoimmun 8(4):615-32

Zhao, H., et G.A. Koretzky. 1997. Regulation of signal transduction through the T cell antigen receptor. J Lab Clin Med 130:126-131

Zhao, Y., B. Gran, C. Pinilla, S. Markovic-Plese, B. Hemmer, A. Tzou, L.W. Whitney, W.E. Biddison, R. Martin, et R. Simon. 1995. Combinatorial peptides libraries and biometric score matrices permit the quantitative analysis of specific and degenerated interactions between clonotypic TCR and MHC peptides ligands. J Immunol 15: 167(4): 2130-2141

Zhao, Z.S., F. Granucci, L. Yeh, P.A. Schaffer, et H. Cantor. 1998. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. Science 279(5355): 1344-1347

ANNEXE I:

LISTE DES PUBLICATIONS

- **BOUCHER, A., F. DENIS, P. DUQUETTE et P.J. TALBOT** «Long-term coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients.» en préparation
- **BOUCHER, A., P. DUQUETTE et P.J. TALBOT** «Generation of antigen specific long term human primary T-cell clones.» en préparation
- **P.J. TALBOT, A., BOUCHER, P. DUQUETTE, et E. GRUSLIN (2003)** «Coronaviruses and neuroantigens: myelin Proteins, myelin genes» Dans: Experimental models of multiple sclerosis. Lavi, E., Constantinescu, C.S., eds., Kluwer Academic Publisher (sous presse)
- **BOUCHER, A. et P.J. TALBOT (2001)** «Generation from multiple sclerosis patients of long-term T-cell clones that are activated by both human coronavirus and myelin antigens.» Adv Exp Med Biol 494:355-62
- **BOUCHER, A., M. TREMBLAY, N. ARBOUR, J. EDWARDS, R. DAY, J. NEWCOMBE, P. DUQUETTE, F. DENIS, and P.J. TALBOT (2001)** «The role of neuroinvasive human coronaviruses in autoimmune processes associated with multiple sclerosis.» Dans: Genes and Viruses in Multiple Sclerosis, Hommes O.R., Wekerle, H., and Clanet, M., eds., Elviesier Science, pp209-220

LISTE DES COMMUNICATIONS

- **BOUCHER, A., F. OUELLET, N. ARBOUR, J. EDWARDS, M. TREMBLAY, F. DENIS, J.P. ANTEL, P. DUQUETTE and P.J. TALBOT (2000)** «Human respiratory coronaviruses infect human glial cells in vitro and in vivo and activate myelin-reactive T lymphocytes and glial cells.» Symposium on Conquering Multiple Sclerosis: Research in Canada in the New Millenium, Banff, Alberta, December 2-2, 2000 (invitée)
- **BOUCHER, A., F. DENIS, P. DUQUETTE, and P.J. TALBOT (2000)** «Molecular characterization of T cell cross-reactivity between human coronaviruses and myelin antigens in multiple sclerosis.» 8th International Symposium on Nidoviruses (Coronaviruses and Arteriviruses), The Resort at Split Rock in the Poconos, Lake

Harmony, Pennsylvania, U.S.A., May 20-25, 2000 (sélectionnée pour une présentation orale)

- **BOUCHER, A., F. DENIS, P. DUQUETTE, and P.J. TALBOT (2000)** «Activation of T lymphocyte clones from multiple sclerosis patients with both myelin and coronavirus antigens.» 14th Annual Spring Meeting of the Canadian Society of Immunology, Château Bromont, Bromont, Québec, March 17-21, 2000 (sélectionnée pour présentation orale)
- **TREMBLAY, M., A. BOUCHER, P. DUQUETTE et P.J. TALBOT (1999)** «Caractérisation de la réactivité croisée de lymphocytes T envers les antigènes de la myéline MBP et PLP et les coronavirus humains 229E et OC43.» 1er congrès interne de l'INRS-Institut Armand-Frappier, Auberge Chéribourg, Magog-Orford, Québec, 5 - 6 novembre 1999
- **TALBOT, P.J., N. ARBOUR, J. EDWARDS, R. DAY, J. NEWCOMBE, P. DUQUETTE and A. BOUCHER (1999)** «Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses and coronavirus-induced autoimmunity in multiple sclerosis.» European Charcot Foundation Symposium 1999: «Genes and viruses in Multiple Sclerosis», Venice, Italy, October 28-30, 1999
- **BOUCHER, A., G. MERCIER, P. DUQUETTE and P.J. TALBOT (1999)** «Clonal T cell cross-reactivity between myelin antigens and human coronaviruses in multiple sclerosis.» 3rd Annual Scientific Meeting, Association of Moroccan Biologists in Canada, Centre de recherche Louis-Charles Simard, CHUM, Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, June 5, 1999 (invitée)
- **BOUCHER, A., G. MERCIER, P. DUQUETTE and P.J. TALBOT (1997)** «Clonal T lymphocytes cross-reactivity between myelin antigens and human coronaviruses in multiple sclerosis.» Fifth International neuroimmunology convention, Hotel Reine-Elizabeth, Montréal, Québec, August 21 (sélectionnée pour présentation orale)

ANNEXE II:
TIRÉS À PART DES ARTICLES PUBLIÉS

Generation from Multiple Sclerosis Patients of Long-Term T-Cell Clones that are Activated by both Human Coronavirus and Myelin Antigens

¹ANNIE BOUCHER, ¹FRANÇOIS DENIS, ²PIERRE DUQUETTE, AND
¹PIERRE J. TALBOT

¹Human Health Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, CANADA H7V 1B7; ²MS Clinic, Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, CANADA H2L 4K

1. INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a chronic central nervous system (CNS) disorder characterized by inflammation and myelin destruction involving autoreactive lymphocytes. While precise disease etiology is still unknown, it appears to be multifactorial, involving both genetic (such as HLA haplotype) and environmental factors (Sadovnick *et al.* 1993, Ebers *et al.* 1993). Various microbial infections have been proposed to be associated with triggering the pathology, but no conclusive evidence has been drawn so far.

Human coronaviruses (HCoV), of which two serotypes, OC43 and 229E are known, cause 10 to 35% of common colds. It has been hypothesized that a natural infection by these ubiquitous respiratory pathogens may lead in some genetically predisposed individuals to a demyelinating pathology. This rests mainly on observations that experimental murine coronavirus infections of genetically susceptible mice and rats induces an MS-like disease: CNS inflammation, cycles of demyelination and remyelination, and activation of myelin-reactive T cells (Lane *et al.* 1997, Lampert *et al.* 1973, Weiner *et al.* 1973, Watanabe *et al.* 1983). Moreover, accumulating evidence is consistent with the neurotropic and neuroinvasive potential of

The Nidoviruses (Coronaviruses and Arteriviruses).

Edited by Ehud Lavi *et al.*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001.

355

Adv. Exp. Med. Biol. 494: 355-362

HCoV: 1) acute and persistent infection of neural cell lines (Collins and Sorensen 1996, Arbour *et al.* 1999a,b); 2) infection of primary cultures of astrocytes, microglia and cerebral endothelial cells (Cabirac *et al.* 1995, Bonavia *et al.* 1997); 3) viral isolation from MS brains (Burks *et al.* 1980); 4) RT-PCR and *in situ* hybridization detection of both HCoV-229E and HCoV-OC43 in the brain, with a potential association with MS (Murray *et al.* 1992, Stewart *et al.* 1992, Arbour *et al.* 2000). Microbial pathogens might activate MS-associated autoreactive lymphocytes through molecular mimicry in individuals that are genetically predisposed by their HLA haplotype to recognize T-cell epitopes shared between the pathogen and myelin antigens (Oldstone 1997, Wucherpfennig and Strominger 1995, Cantor *et al.* 1998).

To evaluate whether molecular mimicry between HCoV and myelin antigens could participate in MS pathogenesis, T-cell cross-reactivity between myelin basic protein (MBP), a putative MS autoantigen and HCoV-229E was investigated in MS patients (Talbot *et al.* 1996). Results summarized in Table 1 show that of the numerous peripheral HCoV-229E or MBP-reactive T-cell lines generated, cross-reactivity involved 29% of T-cell lines from 10 of 16 MS patients and only 1.3% in 2 of 14 controls ($p < 0.0001$). To ascertain whether this MS-associated T-cell cross-reactivity could be linked to molecular mimicry, it was mandatory to demonstrate activation of T cells by both virus and myelin antigens at the single-cell level. Our previous study was also extended to HCoV-OC43 and another major myelin component and putative MS autoantigen, proteolipid protein (PLP). Importantly, both MBP and PLP can induce experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in rodents (Wekerle *et al.* 1994). We now describe the methodology used to produce and expand human T cell clones specific for coronaviral and myelin antigens and the production of cross-reactive T-cell clones.

Table 1. MS-associated cross-reactivity of peripheral T-cell lines for MBP and HCoV-229E (results from Talbot *et al.* 1996)

Donors	n	Cross-reactive T-cell lines		
		Lines	n	%
MS	16	39	10	29
Controls	14	2	2	1.3

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Donors

Patients diagnosed with either chronic progressive or relapsing remitting MS and who had not received treatment in the last six months were selected at random with prior informed consent and approval of the experimental protocol from institutional ethics committees.

2.2 Antigens

Human MBP was prepared from a normal adult brain (Montreal Brain Bank, Douglas Hospital, Verdun, Québec, Canada) as described (Talbot *et al.* 1996). Chromatography-purified PLP was a kind gift of Dr. Mario Moscarello (Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada). HCoV-229E was propagated in the human embryonic lung cell line L132 (ATCC). Viral antigen was prepared from L132 cells infected with HCoV-229E at a MOI of 0.01 at 33°C for 43 hours. Cells were lysed and clarified by low speed centrifugation. Before use, infectious virus in the viral antigen preparation (10^6 TCID₅₀/mL) was inactivated by exposure to ultra-violet light for 20 minutes. HCoV-OC43 was propagated in the human rectal carcinoma cell line HRT-18 (ATCC), cultivated and harvested as described above. Control antigen was obtained from parallel cultures. HHV-6 antigens in the form of infected cell lysates were provided by Dr. Louis Flamand, Laval University, Québec, Canada.

2.3 Generation and Maintenance of T-Cell Clones

Human blood samples (300-400 mL) were collected from human donors and buffy coat prepared. Peripheral blood lymphocytes (PBL) were separated on Ficoll/Hypaque (Pharmacia) gradients and 1×10^6 cells/mL were seeded into 96-well microtiter plates (Talbot *et al.* 1996). After 7 days

of incubation, 100 U/mL of interleukin-2 (Hoffman La Roche) was added. At day 12, primary T-cell lines were tested for antigen specificity by a tritiated thymidine incorporation assay. On day 16, antigen-specific lines were cloned by limiting dilution into 60-microwell Terazaki plates. A concentration of 5×10^5 autologous irradiated antigen-presenting cells/ well (APC; PBL prepared as described) were added, in the presence of 30 μ g/mL of either MBP or PLP (6 μ g/well) or a 1/20 final dilution of viral antigens. Interleukin-2 (50 U/mL) was added to enhance cloning efficiency. After incubation for 10-13 days, each well was checked for cell growth. Cells from plates showing growth in less than 33% of the wells were selected. Clones were tested for specificity in a proliferation assay but were also expanded in the presence of autologous APC and the specific antigen (MBP, PLP, HCoV-229E or OC43).

2.4 Antigen-Specific Proliferation Assays

Proliferation assays were performed by adding 1×10^4 T cells per well into 96-well round bottom microtiter plates in the presence of irradiated APC and various antigens in complete culture medium, as described above (0.1 mL/well). These specific and control antigens were MBP and PLP (300 μ g/well), HCoV-229E and -OC43 viral antigens in infected cell lysates (final dilution of 1/2), tetanus toxin (1 μ g), appropriate dilutions of uninfected cell lysates, and serum-free complete culture medium. Cells were incubated for 72 hours, with 1 μ Ci/well of tritiated-thymidine (Amersham) added for the last 18 hours. Cells were harvested onto glass microfiber filters (Skatron) on a 96-well Skatron model 11050 Micro cell harvester and counted in 2 mL of Ultimagold scintillation fluid (Packard), using a Canberra Packard Tri-Carb 2200a scintillation counter. The stimulation index was calculated as the ratio of the radioactivity (cpm) incorporated in the presence of specific over control antigen and a ratio above 3.0, with at least 1000 cpm incorporated was considered positive.

3. RESULTS

3.1 Human T-cell clones specific to coronaviral and/or myelin antigens

From 32 MS patients, the protocol described above led to the generation of 114 T-cell clones responding to viral antigens and 31 T-cell clones activated by myelin antigens, (Table 2). Positive clones showed

Annic

prolif
cell c
chron

Table 2

—

—

3.2

Th
T-cell
3. Us
virus
testec
myeli

Table

Clo	#
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10

4.

O
eithe
myel
thou
wher
limit
well.

proliferation indices between 3.0 and 19.0. A total of 10 cross-reactive T-cell clones were obtained from 6 patients that were diagnosed with either chronic progressive or relapsing remitting MS.

Table 2. T-cell clones generated from peripheral blood of MS patients

Donors (MS)	Total number of T-cell clones generated		
	HCoV Monospecific	MBP or PLP Monospecific	Virus-Myelin Cross-Reactive
32	114	31	10

3.2 Antigen specificity of the cross-reactive T-cell clone

The antigenic specificities of the ten coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones generated in this study from 6 MS patients are listed in Table 3. Using the same protocol, human herpesvirus type-6 (HHV-6), another virus potentially associated with MS (Challoner *et al.*, 1995), was also tested. Although virus-specific T-cell clones were generated, no HHV-6 and myelin antigen cross-reactive clones were obtained (data not shown).

Table 3. Antigen specificity of cross-reactive T-cell clones

Clone #	Selecting antigen	HCoV- OC43	HCoV- 229E	PLP	MBP
1	OC43	+	-	-	+
2	229E	-	+	-	+
3	PLP	-	+	+	-
4	PLP	-	+	+	-
5	MBP	-	+	-	+
6	MBP	-	+	-	+
7	OC43	+	-	+	+
8	229E	-	+	-	+
9	229E	-	+	+	+
10	229E	-	+	-	+

4. DISCUSSION

Our results are consistent with clonal T-cell cross-reactivity between either of the two known HCoV serotypes (229E and OC43) and two major myelin antigens and putative MS autoantigens (MBP and PLP). Even though, following Poisson's distribution, a clone is statistically obtained when growth is observed in less than 33% of seeded wells after cloning by limiting dilution, clonality will be confirmed by molecular techniques as well.

We were successful in elaborating a protocol to generate and stimulate human T-cell clones after a single blood sampling, despite the technical challenges involved in studying primary T cells in cultures. Autologous antigen-presenting cells were frozen and later thawed and irradiated when needed. This technique was thus independent of the patient's clinical status or his/her availability for blood samplings. The preservation of the clone's antigenic specificity was of premier concern and we were able to freeze and thaw the clones with no loss of antigenic specificity. Nevertheless, we remain concerned that anergy or apoptosis of T cells can occur upon repeated stimulations. Our protocol does consider these limitations and allows for the rapid determination of antigenic specificity, in order to preserve the T cells in a state that will allow freezing and later recovery of viable and functional cells. Nevertheless, we are currently making use of techniques such as immortalization of T-cell clones by infection with *herpes saimiri* virus, as well as T-cell receptor (TCR) reconstitution into hybridomas to allow for the detailed molecular characterization of the putative molecular mimicry mechanism underlying the observed myelin-coronavirus cross-reactivities.

Human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones represent precious tools to understand the triggering of autoimmunity by molecular mimicry in the context of a human disease. How susceptibility is determined could be related to peptide presentation. Indeed, we are in the process of typing the HLA haplotypes of donors to look for any DR2 associations. Molecular mimicry involving viruses represents a very attractive and unifying mechanism that can nicely explain T-cell activation against myelin determinants and the possible involvement of several microbial pathogens in MS. Moreover, cytokines and inflammation could also act as key players by increasing antigen presentation and cellular recruitment. Other viruses could be involved in MS through similar mechanisms, although our preliminary study did not reveal T-cell cross-reactivity with HHV-6. Finally, we will search for the presence of coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones in the CNS of MS patients and their possible involvement in local pathology.

5. CONCLUSION

Our observation that a respiratory virus can activate myelin-reactive T cells would explain the influence of environmental factors in disease etiology and add much credence to the possible role of such viruses in the triggering of MS in individuals that are genetically predisposed to such putative molecular mimicry at the level of T-cell recognition of foreign and

Ann

self-
offer
could
cont

AC

tha
Dr.

RI

Art

Ari

Ar

Be

Bu

C

C

E

L

:

C

self-antigens. Activation of such cells could also explain why MS relapses often follow respiratory infections. Moreover, a persistent CNS infection could represent a precipitating factor favoring local inflammation and contribute to recurrent disease exacerbations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Multiple Sclerosis Society of Canada. We thank Dr. Mario Moscarello (University of Toronto) for providing PLP, and Dr. Louis Flamand (Université Laval) for providing HHV-6 antigens.

REFERENCES

- Arbour, N., Ekandé, S., Côté, G., Lachance, C., Chagnon, F., Tardieu, M., Cashman, N.R., and Talbot, P.J., 1999a, Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E, *J. Virol.* 73:3326-3337.
- Arbour, N., Côté, G., Lachance, C., Tardieu, M., Cashman, N.R., and Talbot, P.J., 1999b, Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43, *J. Virol.* 73:3338-3350.
- Arbour, N., Day, R., Newcombe, J., and Talbot, P.J., 2000, Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses, *J. Virol.*, in press.
- Bonavia, A., Arbour, N., Yong, V.W., and Talbot, P.J., 1997, Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43, *J. Virol.* 71:800-806.
- Burks, J.S., DeVald, B.L., Jankovsky, L.D., and Gerdes, J.C. (1980) Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients, *Science* 209:933-934.
- 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., Sewart, P.M., Nowinski, R.C., Brown, J.P., and Burner, G.C., 1995, Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92:7440-7444.
- Collins, A.R., and Sorensen, O., 1986, Regulation of viral persistence in human glioblastoma and rhabdomyosarcoma cells infected with coronavirus OC43, *Microb. Pathog.* 6:573-82.
- Ebers, G.C., and Sadovnick, A.D., 1993, The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility, *J. Neuroimmunol.* 54:1-17.
- Lane, T.E., and Buchmeier, M.J., 1997, Murine coronavirus infection : a paradigm for virus-induced demyelinating disease, *Trends Microbiol.* 5:9-14.
- Murray, R.S., Brown, B., Brian, D., and Cabirac, G.F., 1992, Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain, *Ann. Neurol.* 31:525-533.
- Oldstone M.B.A., 1987, Molecular mimicry and autoimmune disease, *Cell* 50:819-820.
- Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D.W., Warren, S., Hader, W., Murray T.J., et al., 1993, A population-based study of multiple sclerosis in twins: update, *Ann. Neurol.* 33:281-285.
- Stewart, J.N., Mounir, S., and Talbot, P.J., 1992, Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients, *Virology* 191: 502-505.

- Talbot, P.J., Paquette, J.-S., Ciurli, C., Antel, J.P., and Ouellet, F., 1996, Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* **39**:233-240.
- Watanabe, R., Wege, H., and ter Meulen, V., 1983, Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis, *Nature* **5930**:150-153.
- Weiner, L.P., 1973, Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis, *Arch. Neurol.* **5**:298-303.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., and Linington, C., 1994, Animal models, *Ann. Neurol.* **36**:S47-53.
- Wucherpfennig, K.W., and 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.
- Zhao, Z.S., Granucci, F., Yeh, L., Schaffer, P.A., and Cantor, H., 1998, Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection, *Science* **279**:1344-1347.