

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Mécanismes de propagation des coronavirus humains au cerveau

Par
Mylène Gagnon

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

Jury d'évaluation

Examineur externe : Louis Flamand, Centre de recherche en rhumatologie et
immunologie, Centre de recherche du CHUL

Examineur interne : Yves-St-Pierre, INRS- Institut Armand-Frappier

Directeur de recherche : Pierre J. Talbot, INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Les coronavirus humains (HCoV) sont des virus respiratoires ayant la capacité d'atteindre et d'infecter le système nerveux central (SNC). Plusieurs observations démontrant leur caractère neuroinvasif et neurotrophe les ont associés à la SEP. Toutefois, les mécanismes de propagation de ces virus dans le cerveau demeurent toujours inconnus. Un mécanisme possible de neuroinvasion consiste au passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE), soit par l'infection des cellules endothéliales composant celle-ci, par la transcytose des virus libres à travers ces cellules ou encore par le passage de leucocytes circulants infectés. Afin de vérifier cette hypothèse, des tests de susceptibilité à l'infection par le HCoV de cellules endothéliales humaines de microvaisseaux cérébraux (HBMEC) et de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) furent réalisés. La détection de particules infectieuses a été effectuée par immunoperoxydase indirecte, les protéines virales ont été détectées par immunofluorescence indirecte et cytométrie en flux et finalement, la détection d'ARN viral a été réalisée par RT-PCR. Les résultats obtenus ont démontré l'infection productive des cellules endothéliales primaires par le HCoV-229E, ce qui représente un mode de propagation virale possible au SNC. De plus, les expériences réalisées avec les cellules mononucléaires provenant de donneurs sains ont révélé que les monocytes et les macrophages supportent la réplication de HCoV-229E, appuyant ainsi l'hypothèse du transport viral. L'ensemble des données souligne la possibilité que le HCoV pénètre le SNC par la voie sanguine après virémie et/ou par l'infection de cellules monocytaires.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Talbot de m'avoir ouvert la porte de son laboratoire. J'ai une grande admiration pour cet homme passionné des sciences et de la vie. Merci Pierre, tu possèdes un cœur immense !

Maintenant, je remercie de tout cœur ceux qui ont partagé avec moi le quotidien de la recherche :

Tout d'abord, mille mercis à Hélène Jacomy. Sa disponibilité, tout le temps et l'énergie qu'elle m'a consacré est digne de mention. Merci pour tout le support !

Je salue bien bas Francine Lambert, notre FranFran d'amour ! Sa vitalité et sa joie de vivre sont exemplaires. Merci pour toute l'aide technique et les conseils que tu m'as si chaleureusement donnés. Tu es irremplaçable !

Aussi, merci aux « hommes » du laboratoire, Marc Desforges et Julien St-Jean. Un gros merci Marc pour l'intérêt que tu as toujours su démontrer lorsque j'avais besoin d'aide, mais ce qui est le plus mémorable est ton entrain contagieux !

Merci beaucoup Julien pour la générosité de tes conseils et l'aide que tu m'as apportés.

Je tiens aussi à remercier Édith Gruslin et Annie Boucher, ex-collègues, pour leur bonne humeur et leurs encouragements !

J'ai une belle pensée pour Mélanie Tremblay, aussi ex-collègue de laboratoire. Elle a toujours su m'écouter et me supporter...Merci !

Finalement, un merci chaleureux aux membres de ma famille et amis pour tout le soutien...Vous possédez une place de choix au creux de mon cœur ! Je vous adore !

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
1. Revue de littérature	
1.1 Système nerveux central (SNC)-Généralités.....	1
1.1.1 Organisation cellulaire du SNC.....	2
1.1.2 La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	7
1.1.2.1 Structure et fonctions.....	7
1.1.2.2 Molécules et phénomènes entraînant l'altération de la BHE.....	9
1.1.3 La surveillance immunitaire au SNC.....	11
1.1.4 Voies d'entrée des virus au SNC.....	13
1.1.5 Inflammation au SNC.....	17
1.2 Sclérose en plaques (SEP)	
1.2.1 Description de la pathologie.....	18
1.2.2 Étiologie.....	20
1.2.2.1 Facteurs génétiques.....	20
1.2.2.2 Facteurs environnementaux.....	20
1.2.3 Infection virale et auto-immunité.....	23
1.3 Coronavirus	
1.3.1 Protéines structurales.....	24
1.3.2 Protéines non-structurales.....	25
1.3.3 Récepteurs cellulaires.....	26
1.3.3.1 Aminopeptidase-N.....	26
1.3.3.2 Acides sialiques.....	26
1.3.4 Réplication virale.....	27

1.3.5 Groupes antigéniques.....	28
1.3.6 Pathologies associées aux coronavirus.....	30
1.3.7 Coronavirus humains (HCoV) et SEP.....	30
1.3.8 Coronavirus murin comme modèle de SEP.....	31
2. Matériel et méthodes	
2.1 Cultures primaires de cellules humaines.....	33
2.1.1 Cellules endothéliales du cerveau.....	33
2.1.2 Cellules mononucléaires du sang périphérique.....	33
2.1.2.1 Monocytes, macrophages et lymphocytes.....	34
2.2 Lignées cellulaires humaines.....	35
2.2.1 Promonocytes (THP-1).....	35
2.2.2 Adénocarcinome iléorectal (HRT-18).....	35
2.2.3 Fibroblastes pulmonaires d'embryons (L-132).....	36
2.2.4 Cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux (HBMEC).....	36
2.3 Coronavirus humains (HCoV).....	37
2.3.1 Coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43).....	37
2.3.2 Coronavirus humain 229E (HCoV-229E).....	37
2.3.3 Production du HCoV.....	37
2.4 Tests de susceptibilité des PBMC à l'infection par le HCoV.....	38
2.4.1 Infection aiguë et persistante des monocytes et macrophages.....	38
2.4.2 Infection aiguë des lymphocytes.....	38
2.5 Analyse de la susceptibilité des PBMC.....	39
2.5.1 Détection de particules virales infectieuses par immunoperoxydase indirecte extracellulaire.....	39
2.5.2 Détection de protéines virales du HCoV par immunofluorescence indirecte en plateaux (monocytes et macrophages).....	40
2.5.3 Détection de protéines virales du HCoV par cytométrie en flux (lymphocytes).....	41
2.5.3.1 Production de fragments F(ab') ₂	42
2.6 Tests de susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau humain à l'infection par le HCoV.....	44

2.6.1 Infection aiguë de la lignée HBMEC et des cellules endothéliales en culture primaire.....	44
2.6.2 Infection aiguë de la lignée HBMEC sur lames LABTEK.....	45
2.7 Analyse de la susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau humain à l'infection par le HCoV.....	45
2.7.1 Détection de particules virales infectieuses par immunoperoxydase indirecte intra- et extra-cellulaire.....	45
2.7.2 Détection de protéines virales du HCoV par immunofluorescence indirecte.....	45
2.7.3 Préparation de l'ADNc (transcription inverse).....	46
2.7.4 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	47
2.8 Barrière hémato-encéphalique (BHE) <i>in vitro</i> pour test de passage du HCoV libre.....	48
3. Résultats	
3.1 Susceptibilité des lymphocytes, monocytes et macrophages (PBMC) à l'infection.....	50
3.1.1 Susceptibilité des lymphocytes.....	50
3.1.2 Susceptibilité des monocytes et macrophages au HCoV-229E.....	56
3.2 Susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau humain à l'infection.....	60
3.3 BHE <i>in vitro</i>.....	65
4. Discussion	
4.1 Susceptibilité des PBMC à l'infection par le HCoV.....	68
4.2 Susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau humain à l'infection.....	72
4.3 Modèle de propagation du HCoV au SNC.....	73
4.4 Liens avec la SEP.....	76
5. Conclusions et perspectives.....	77
Références.....	78

Liste des figures

Figure 1. Les différentes cellules constituant le SNC.....	6
Figure 2. Schématisation d'un capillaire sanguin cérébral.....	9
Figure 3. Mécanismes de passage des virus à travers la BHE.....	15
Figure 4. Schématisation de la structure des coronavirus.....	25
Figure 5. Détection de la présence de la protéine S du HCoV-229E et du HCoV-OC43, par cytométrie en flux, à la surface des lymphocytes en culture primaire provenant du donneur 3 (représentatif de l'ensemble des donneurs) et de la lignée THP-1, cette dernière représentant le témoin positif.....	54
Figure 6. Validation de la reconnaissance et de la spécificité des F(ab') ₂ utilisés en cytométrie en flux pour évaluer la susceptibilité des lymphocytes à l'infection par le HCoV.	55
Figure 7. Détection des antigènes viraux sur les monocytes et macrophages en culture primaire (donneur 6) infectés par le HCoV-229E par immunofluorescence indirecte en utilisant un Mab dirigé contre la protéine S du sérotype 229E (5-11H.6).....	57
Figure 8. Cultures primaires de macrophages humains provenant du sang périphérique d'un volontaire sain (donneur 1).....	59
Figure 9. Titres infectieux à 1, 2 et 4 jours post-infection obtenus suite à l'infection de cellules endothéliales cérébrales humaines par le HCoV.....	61
Figure 10. Détection d'antigènes viraux du HCoV-OC43 à l'aide d'un sérum hyper-immun suite à l'infection de la lignée HBMEC.....	62

Figure 11. Détection par RT-PCR de l'ARN codant la protéine N du HCoV suite à l'infection de la lignée de cellules endothéliales HBMEC.....	63
Figure 12. Détection par RT-PCR de l'ARN codant la protéine N du HCoV suite à l'infection des cellules endothéliales cérébrales humaines en culture primaire.	65
Figure 13. Modèle de propagation du HCoV au SNC.....	75

Liste des tableaux

Tableau 1. Virus associés à la SEP selon différentes approches expérimentales.....	22
Tableau 2. Sérotypes, hôtes naturels et maladies causées par les coronavirus.....	29
Tableau 3. Susceptibilité des PBMC à l'infection par le HCoV-229E.....	52
Tableau 4. Susceptibilité des PBMC à l'infection par le HCoV-OC43.....	53

Liste des abbréviations

Ac	: anticorps
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
APN	: aminopeptidase-N
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
BCoV	: coronavirus bovin
BHE	: barrière hémato-encéphalique
°C	: degré Celsius
CCV	: coronavirus canin
CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité
CO ₂	: dioxyde de carbone
CPA	: cellule présentatrice d'antigène
DAB	: 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DEPC	: diéthylpyrocarbonate
DICT 50	: dose infectieuse 50 % en culture de tissu
dNTP	: déoxynucléotide triphosphate
DTT	: dithiothréitol
ECGS	: <i>endothelial cells growth supplement</i>
EDTA	: acide éthylènediaminetétraacétique
EtBr	: bromure d'éthide
FECoV	: coronavirus entérique félin
FIPV	: virus félin de la péritonite infectieuse
FITC	: isothiocyanate de fluorescéine
h	: heure
HAM/TSP	: myélopathie/paraparésie spastique tropicale associée au HTLV-1
HBMEC	: <i>human brain microvascular endothelial cells</i>
HCMV	: cytomégalovirus humain
HCoV	: coronavirus humain
HEPES	: acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
HEV	: virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine

HEV _T	: virus de l'entérite hémorragique de la dinde
HHV-6	: virus de l'herpès humain de type 6
HRP	: <i>horseradish peroxidase</i> / peroxydase de raifort
HSV	: virus de l'herpès simplex
HSV-1	: virus de l'herpès simplex de type 1
HTLV-1	: virus T lymphotrope humain de type 1
IBV	: virus de la bronchite infectieuse aviaire
i.c.	: intra-cérébrale
IFN	: interféron
IgG	: immunoglobuline G
IgG1	: immunoglobuline G d'isotype 1
IL	: interleukine
i.n.	: intra-nasale
JHM	: souche du coronavirus murin, J. Howard Muller
j.p.i.	: jour post-infection
kDa	: kilodalton
LCR	: liquide céphalo-rachidien
LDL	: <i>low density lipoprotein</i>
LPS	: lipopolysaccharides
M	: molaire (mole/litre)
Mab	: anticorps monoclonal
MAG	: <i>myelin associated glycoprotein</i>
MBP	: <i>myelin basic protein</i>
2-Me	: 2-mercaptoéthanol
MEM	: <i>Earle's Minimum Essential Medium</i>
mg	: milligrammes
MgCl ₂	: chlorure de magnésium
MHV	: coronavirus murin (virus de l'hépatite murine)
MHV-3	: virus de l'hépatite murine de type 3
min	: minute
mL	: millilitres
mM	: millimolaire
M-MLV	: <i>Moloney murine leukemia virus</i>
MMP	: métalloprotéinase de la matrice

MOI	: multiplicité d'infection
ng	: nanogrammes
n.i.	: non-infecté
NK	: <i>natural killer</i>
NO	: oxyde nitrique
Nt	: neurotransmetteur
pb	: paire de bases
PBMC	: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (cellules mononucléaires du sang périphérique)
PBS	: tampon salin phosphaté
PCR	: réaction de polymérisation en chaîne
Pen-strep	: pénicilline et streptomycine
pH	: potentiel d'hydrogène
p.i.	: post-infection
PLP	: <i>proteolipid protein</i>
pmol	: picomoles
PRCoV	: coronavirus respiratoire porcin
PRRSV	: virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin
p/v	: poids sur volume
RbCoV	: coronavirus de lapin
rpm	: rotations par minutes
RT	: transcription inverse
SAg	: superantigène
SARS	: <i>severe acute respiratory syndrome</i> (syndrome respiratoire aigu sévère)
SARS-HCoV	: coronavirus humain causant le SARS
SB	: substance blanche
SDAV	: virus de la sialodoacryadénite
SEP	: sclérose en plaques
SFV	: virus de la forêt de Semliki
SG	: substance grise
SIV	: virus de l'immunodéficience du singe
SNC	: système nerveux central
SNP	: système nerveux périphérique
SSPE	: <i>subacute sclerosing panencephalitis</i>

SVF	: sérum de veau fœtal
TCoV	: coronavirus de dinde
TGEV	: virus de la gastro-entérite porcine transmissible
T _m	: température de fusion
TNF- α	: <i>tumor necrosis factor</i> -alpha
TP	: température de la pièce
TPCK	: N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhyl
Tris	: tris (hydroxyméthyl) aminométhane
U	: unités enzymatiques
μ g	: microgrammes
μ L	: microlitres
μ P	: micromètres
UV	: ultra-violet
V	: volt
VIH	: virus de l'immunodéficience humaine
VIH-1	: virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VSV	: virus de la stomatite vésiculaire
v/v	: volume sur volume

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Système nerveux central (SNC)-Généralités

Le système nerveux est responsable de communiquer avec les différentes structures de l'organisme et d'orchestrer les réactions métaboliques dans le but ultime de maintenir l'homéostasie. Le système nerveux comporte deux divisions principales, soit le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC est constitué de l'encéphale (cerveau) et de la moëlle épinière qui s'étend du niveau cervical au niveau coccygien. Ces organes sont responsables du processus d'intégration impliquant l'interprétation et l'analyse de l'information sensorielle reçue par la voie des fibres sensorielles. Aussi, l'émission de signaux le long des fibres motrices produisant une réaction appropriée dans les muscles et les glandes est effectuée par cette unité centrale. Les fonctions principales du SNC sont ainsi l'analyse des informations sensibles et la coordination des commandes motrices. De plus, l'encéphale est responsable des mécanismes déterminants, entre autres, la pensée, l'intelligence, l'apprentissage, la mémoire et les émotions. La moëlle épinière, quant à elle, forme un passage pour les nerfs se dirigeant ou s'éloignant de l'encéphale et assiste la coordination de nombreuses activités nerveuses comme les réflexes et les mouvements locomoteurs rudimentaires.

Le SNC est protégé par la boîte crânienne englobant l'encéphale et le rachis vertébral enfermant la moëlle épinière. De plus, un second revêtement constitué d'un tissu fibreux, les méninges couvrent ces organes.

Le SNC est organisé en substance grise (SG) et en substance blanche (SB) : la SG est principalement constitué de corps cellulaires organisés en noyaux, de dendrites et d'axones non-myélinisés*. C'est le lieu des connexions interneuronales et de l'intégration de l'information. La SB est faite de faisceaux d'axones myélinisés et est avant tout un organe de conduction.

*La structure des neurones sera présentée à la section suivante.

1.1.1 Organisation cellulaire du SNC

Le SNC est formé de neurones agglomérés qui bénéficient d'un grand apport sanguin et soutenus par les cellules gliales (névroglie).

Neurones

Les neurones sont les unités fonctionnelles du système nerveux et ont la capacité de générer des influx électriques en réponse à un stimulus. Ces cellules sont formées de trois parties : **1. Le corps cellulaire**, contenant le noyau et les organites cytoplasmiques. Il est le lieu de synthèse des neurotransmetteurs (Nt), agents chimiques indispensables à la transmission des influx nerveux d'une cellule à l'autre. Les corps cellulaires sont exclusivement situés dans le SNC. **2. Les dendrites**, minces prolongements du corps cellulaire constituent la partie sensorielle de la cellule. **3. L'axone**, prolongement unique et épais provenant du corps cellulaire a comme fonction la transmission de l'influx nerveux vers un effecteur grâce à la présence de Nt emmagasinés à l'intérieur de vésicules synaptiques situées au niveau des boutons terminaux de l'axone (Figure 1A).

Par ailleurs, les neurones ont longtemps été caractérisés par leur incapacité à se diviser dans le système nerveux adulte. La perte de la capacité de régénération des axones coïnciderait avec la formation de myéline. Ainsi, une ou des protéines de la myéline serai(en)t la cause de ce phénomène (Bandtlow, 2003). Toutefois, on reconnaît maintenant que la neurogénèse des neurones adultes est possible mais exclusive à certaines régions du SNC, principalement la moelle épinière. En effet, après un sectionnement complet le long de la moelle épinière d'une souris adulte, la réparation fonctionnelle de celle-ci a été observée et ce, sans aucune intervention (Seitz *et al.*, 2002). Bien que les mécanismes de régénération spontanée de la moelle épinière sont encore inconnus, les différents systèmes expérimentaux ont permis d'observer la croissance des axones, le maintien de la capacité de neurogénèse, un rôle possible des cellules gliales et la mise en place d'un environnement «embryonique» lors d'une telle lésion (Holder *et al.*, 1989 et 1991).

Cellules gliales (névroglie)

Les cellules gliales sont de 5 à 50 fois plus nombreuses que les neurones et contrairement à ces derniers, elles peuvent se multiplier dans le système nerveux adulte. Il se trouve quatre variétés de cellules gliales dans le SNC : les astrocytes, les oligodendrocytes, les microglies et les épendymocytes. La névroglie soutient, nourrit et protège les neurones.

Astrocytes : De forme étoilée, les astrocytes sont constitués d'un corps cellulaire et de prolongements cytoplasmiques diversement ramifiés. Ils se caractérisent par l'abondance de grains de glycogène, principale réserve énergétique cérébrale. La membrane plasmique astrocytaire possède des récepteurs pour les neurotransmetteurs, des neuropeptides, cytokines et facteurs de croissance. Les prolongements astrocytaires entretiennent d'importantes relations entre eux, avec les neurones et avec les capillaires sanguins. Ils constituent un véritable réseau tri-dimensionnel jouant un rôle de support structural au sein du parenchyme du SNC. Concernant les relations avec les neurones, les prolongements astrocytaires entourant les synapses favorisent la sélectivité de la transmission nerveuse en empêchant la diffusion des Nt. De plus, par l'intermédiaire d'acides aminés excitateurs sécrétés par les neurones et par les astrocytes, ces deux types cellulaires établissent entre eux d'importantes relations. Par ailleurs, les astrocytes envoient des prolongements cytoplasmiques qui entourent presque complètement les capillaires sanguins et les séparent des cellules nerveuses. Entre ces prolongements et l'endothélium composant les capillaires sanguins se trouve une lame basale, synthétisée en partie par les cellules endothéliales et en partie par les astrocytes. L'anatomie des capillaires sera décrite plus en détail à la section 1.1.2. Les astrocytes seraient également capables d'agir en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Girvin *et al.*, 2002) démontrant la présence d'outils immunitaires au SNC. Pour des raisons structurales, les astrocytes ont également un rôle dans les échanges entre le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le SNC (Figure 1B).

Oligodendrocytes et myéline : Ils possèdent un corps cellulaire de petit volume d'où partent quelques prolongements. Les cellules de ce type dans la substance grise sont

situés contre les corps cellulaires des neurones. Celles de la substance blanche, se disposent entre les fibres nerveuses (axones) et assurent la formation de la gaine de myéline par l'enroulement en couches superposées de leurs prolongements autour des axones. L'oligodendrocyte envoie un certain nombre de prolongements qui s'enroulent autour des axones adjacents. La myéline centrale contient 70 % de lipides et 30 % de protéines. Cette richesse en lipides exclut l'eau et les ions qui y sont dissous et fait de la myéline un bon isolant électrique et maximise alors la qualité de transmission de l'influx nerveux et augmente la vitesse de conduction. Le cholestérol, les phospholipides et les glycolipides sont les principaux lipides de la myéline centrale. Les principales protéines spécifiques de la myéline du SNC sont la PLP (*ProteoLipid Protein*), la MBP (*Myelin Basic Protein*) et la MAG (*Myelin Associated Glycoprotein*). Les sections d'axones myélinisés, internodes, sont séparées par les nœuds de Ranvier, dépourvus de myéline, l'axone à ce niveau est entouré par des prolongements astrocytaires. Les nœuds de Ranvier constituent une zone de faible résistance électrique. La conduction nerveuse le long de l'axone myélinisé s'effectue de façon saltatoire d'un nœud de Ranvier à l'autre (Figure 1C et D).

Microglies : Les cellules microgliales représentent 5 à 20 % de la population gliale totale et se rencontrent plus fréquemment dans la substance grise. Ces cellules dérivent probablement des monocytes qui colonisent le SNC lors de l'embryogenèse et dans les premières semaines de vie. Du point de vue immunitaire, les cellules microgliales peuvent s'activer et se transformer en cellules présentatrices d'antigènes (Girvin *et al.*, 2002) et exprimer les molécules du CMH de classe I et II. Elles sécrètent également de nombreuses molécules pro-inflammatoires dont plusieurs cytokines, des protéases, des anions superoxyde et de l'oxyde nitrique (NO) connu pour être neurotoxique (voir section 1.1.2.2) (Figure 1E).

Épendymocytes et système ventriculaire de l'encéphale : Les cellules épendymaires sont des cellules gliales hautement différenciées (Barres, 1999) constituant le revêtement du système ventriculaire de l'encéphale (cavités) par la formation d'un épithélium cubique ou prismatique simple cilié et jouant ainsi un rôle dans les échanges

entre le LCR et le SNC. Leur pôle basal émet un prolongement cytoplasmique qui s'enchevêtre avec les prolongements des astrocytes sous-épendymaires. L'origine des ventricules découle des transformations considérables subies par le tube neural lors de l'embryogenèse. La forme que prend cette cavité dans chaque région de l'encéphale traduit les modifications locales et les pressions mécaniques exercées par ce dernier en se développant. De plus, lors du développement, les cellules souches (vraisemblablement des cellules gliales) à l'origine des cellules neurales résident dans la lumière de la zone ventriculaire et il semblerait que suite à la maturation de l'encéphale, que quelques cellules totipotentes persistent. Toutefois, la majorité des cellules nouvellement formées dans la zone ventriculaire sont vouées à la mort tandis que certaines deviendront des neurones (Barres, 1999). Les ventricules sont le lieu d'élaboration du LCR par des cellules spécialisées (Figure 1F).

Les informations générales concernant le SNC ont été tiré de *Essentials of human anatomy and physiology*. Marieb, 2000.

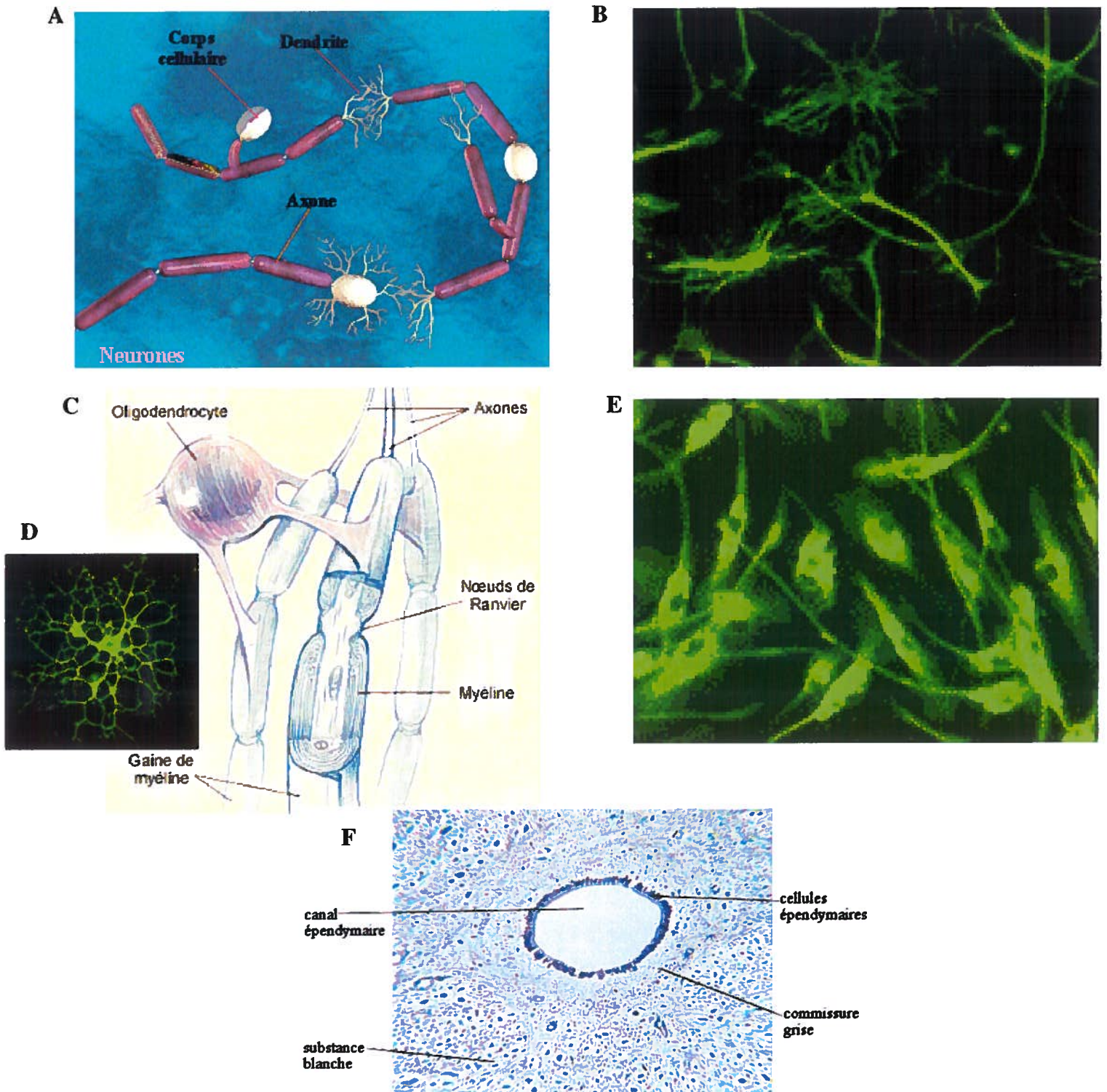


Figure 1. Les différentes cellules constituant le SNC

(A) Schématisation de neurones; (B) Image en fluorescence d'astrocytes; (C) Organisation d'un oligodendrocyte avec des neurones; (D) Image en fluorescence d'oligodendrocytes; (E) Image en fluorescence de microglies; (F) Organisation des cellules épendymaires au niveau du système ventriculaire.

1.1.2 La barrière hémato-encéphalique (BHE)

1.1.2.1 Structure et fonctions

Le maintien de l'homéostasie au niveau de l'encéphale est d'une extrême importance étant donné que tous les faits et gestes et fonctions vitales du corps humain y sont régis. Pour assurer une certaine exclusion du SNC aux fluctuations de la composition sanguine, les capillaires sanguins cérébraux sont dotés de caractéristiques les différenciant fortement des capillaires périphériques : le recouvrement cellulaire des capillaires est continu et il y a présence de jonctions serrées intercellulaires ; aucune ouverture n'y est détectable. On y retrouve une faible activité de pinocytose (absorption de molécules plasmatiques de tailles importantes) et des interactions avec les prolongements astrocytaires (Miller, 1999). Toutefois, il y a une demi-douzaine de zones au cerveau appelé organes « circumventriculaires », comme le plexus choroïde, qui sont alimentés par des capillaires poreux. La BHE, terme donné à l'organisation particulière des capillaires sanguins cérébraux, est constituée selon le « three cells model » de cellules endothéliales, de péricytes et de prolongements astrocytaires (Pardridge, 1999). La barrière est représentée schématiquement à la Figure 2.

La BHE que les chercheurs ont longtemps crue absolue et impénétrable est en fait une interface dynamique et sélective entre le flux sanguin et le cerveau. Les cellules endothéliales, composantes clé de la BHE, régulent la perméabilité de cette dernière. Elles sont effectivement très riches au niveau des processus de transport spécialisé de petites molécules et nutriments indispensables au métabolisme cérébral, tel le glucose, les acides aminés, les acides monocarboxyliques, les hormones thyroïdiennes et plusieurs vitamines hydrosolubles. Les cellules endothéliales, au même titre que toute cellule épithéliales, sont des cellules polarisées qui possèdent une face apicale (du côté de la lumière de la cavité, ici il s'agit du vaisseau) et une face basolatérale (du côté de la lame basale, l'encéphale).

Les péricytes sont des cellules phagocytaires partageant une membrane basale commune avec les cellules endothéliales. Il y aurait un péricyte pour trois cellules endothéliales. La démonstration de la présence de marqueurs macrophagiques, de leur capacité de phagocytose et de présentation antigénique nous donne des pistes quant à certains de leurs rôles (Thomas, 1999). Leurs fonctions ne sont encore que spéculations, mais il semblerait qu'ils agiraient en tant que muscle lisse au niveau des capillaires cervicaux en contrôlant le diamètre des vaisseaux par constriction/dilatation (Pardridge, 1999) et qu'ils pourraient influencer les réponses immunitaires au SNC par la production d'agents immunomodulateurs (Miller, 1999).

Les prolongements astrocytaires recouvrent près de 99 % de la surface des vaisseaux. Bien que cette proximité ne constitue pas un contact direct, étant donné que les prolongements et les cellules endothéliales sont séparés par la lame basale, les astrocytes ont un rôle important dans le développement et le maintien de la BHE. En effet, ils seraient responsables de favoriser l'étanchéité de la barrière, en plus d'influencer l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales par la sécrétion de facteurs solubles non-identifiés à ce jour (Miller, 1999; Hickey, 1999).

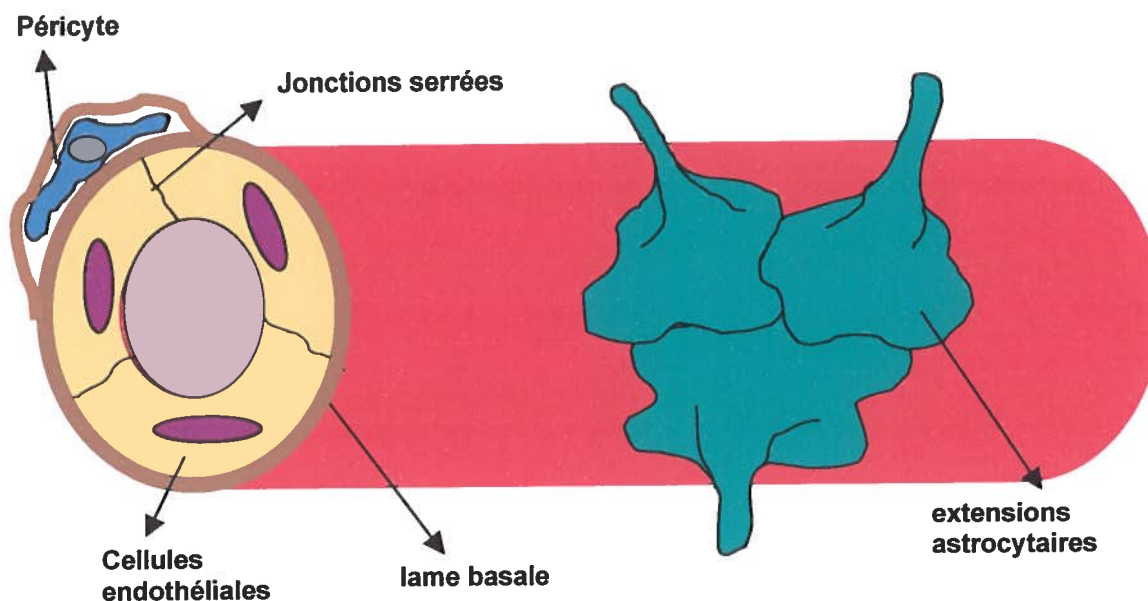


Figure 2. Schématisation d'un capillaire sanguin cérébral

La BHE est constituée selon le « three cells model » de cellules endothéliales, de péricytes et de prolongements astrocytaires (Pardridge, 1999). Par leurs caractéristiques spéciales; recouvrement endothélial continu, jonctions serrées, faible activité de pinocytose et l'interaction avec les extensions astrocytaires, les capillaires sanguins cérébraux assurent le maintien de l'homéostasie au SNC.

1.1.2.2 Molécules et phénomènes entraînant l'altération de la BHE

Une BHE saine sait réguler de manière efficace la circulation des molécules et des cellules du sang vers le cerveau et vice-versa. Par contre, l'infiltration excessive et incontrôlée des cellules immunitaires, par exemple, peut survenir lorsque la barrière subit des dommages.

D'une part, plusieurs molécules pro-inflammatoires peuvent contribuer à ce phénomène. En effet, la dégradation de la lame basale par certaines protéases telles les gélatinases et les collagénases, faisant partie de la famille des métalloprotéases de la

matrice (MMP), est possible (Chambers et Matrisian, 1997). Plusieurs types cellulaires produisent ce type de molécules, telle les cellules endothéliales, épithéliales et les cellules leucocytaires, en réponse à la présence de facteurs inflammatoires comme les cytokines (Borregaard et Cowland, 1997; Welgus *et al.*, 1992; Leppert *et al.*, 1995) ou suite à une infection virale (Dhawan *et al.*, 1995; Miletti et Talbot, 2001-communication personnelle).

De plus, l'oxyde nitrique (NO), généré par certaines cellules immunitaires activées ou infectées (Baskin *et al.*, 1997), s'avère être préjudiciable pour l'intégrité de la BHE. Bien que ce radical libre possède des rôles importants au niveau du SNC (sécrété par certains neurones, il est un intermédiaire dans la neurotransmission (Schmidt et Walter, 1994)), il peut induire des dommages tissulaires et médier la neurotoxicité (Rubbo *et al.*, 1996).

Aussi, des constituants viraux peuvent être toxiques à la BHE. Une étude démontre effectivement que les gp120 et gp160 du VIH-1 sont toxiques aux cellules endothéliales et neuronales humaines et de rat, entraînant des changements morphologiques et la mort de ces cellules (Kanmogne *et al.*, 2002).

D'autre part, des troubles ou accidents physiologiques, tel un manque dans l'apport d'oxygène au cerveau (anoxie), ont comme conséquence l'hyperperméabilité de la BHE, entraînant ainsi des oedèmes du cerveau. Des études *in vitro* utilisant un modèle de BHE ont permis de déterminer que le manque d'oxygène interrompt l'expression de la protéine Zonula occludens-1 impliquée dans la formation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales composant la BHE (Fischer *et al.*, 2002).

1.1.3 La surveillance immunitaire au SNC

Le cerveau fut longtemps considéré comme un organe immunoprivilégié en se basant sur le nombre faible de cellules présentatrices d'antigènes, l'absence de vaisseaux lymphatiques et la présence de la BHE. Toutefois, il y a de plus en plus d'observations suggérant que le cerveau est sous surveillance immunologique. En effet, la découverte du dynamisme de la BHE permet d'admettre qu'elle peut être influencée par divers facteurs exogènes (médicaments) et endogènes tel les cytokines et ainsi permettre une certaine circulation de cellules sanguines au SNC.

La mise en évidence de la capacité de sécrétion de cytokines et de présentation d'antigènes de cellules résidentes du SNC, les cellules gliales, apporte une preuve tangible de la présence au SNC des éléments nécessaires à la réaction immunitaire. (Ransohoff et Tani, 1998; O'Keffe *et al.*, 1999 ; Girvin *et al.*, 2002).

Quatre groupes de leucocytes sont retrouvés au SNC; les cellules T et B, les Natural Killer (NK) et les monocytes/macrophages (Hickey, 1999). En effet, les cellules immunitaires activées en circulation (monocytes, lymphocytes T et cellules B), sous des conditions normales, peuvent franchir la BHE grâce aux molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales. Ainsi, règle générale, pour qu'il y ait adhésion et migration, les cellules immunitaires et les cellules endothéliales formant la barrière doivent être activées. L'entrée des cellules T, par exemple, n'est pas spécifique à l'antigène. C'est-à-dire qu'une cellule T spécifique à l'ovalbumine, si elle est activée pourra pénétrer au SNC (Meyermann *et al.*, 1996). Toutefois, en l'absence de leur antigène, les cellules ressortent du SNC, sans incident, pour rejoindre la circulation sanguine (Hickey *et al.*, 1991). Comme seule une minorité de cellules immunitaires sont activées, leur circulation dans le SNC est donc restreinte et heureusement, car ce dernier est particulièrement vulnérable aux lésions pouvant résulter d'une réaction immunitaire. Une étude, utilisant des rats comme modèle, a permis de constater qu'en conditions d'inflammation, après injection d'une molécule pro-inflammatoire telle que le LPS au niveau du parenchyme cérébral, une accumulation importante de lymphocytes T dans le

cerveau était observée comparativement aux conditions basales (Hickey *et al.*, 1991). De plus, plusieurs expériences *in vitro* consistant en la co-culture de cellules endothéliales et d'astrocytes sur des membranes poreuses, ont démontré la migration des lymphocytes T activés à travers un modèle de BHE. Ces mêmes études ont démontré le passage des lymphocytes au niveau du cytoplasme des cellules endothéliales ou au niveau des jonctions serrées entre les cellules endothéliales et ce, sans bris apparent de la barrière (Lou *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1999).

Les molécules d'adhésion responsables de l'attachement et de la migration des leucocytes au niveau des cellules endothéliales sont les sélectines et les intégrines. Les sélectines sont impliquées au niveau de l'adhésion initiale et les intégrines, dont ICAM-1, V-CAM-1 et PE-CAM-1, quant à elles jouent un rôle dans l'attachement secondaire et la migration (Wong *et al.*, 1999). Les observations suivantes permettent d'appuyer le rôle important des molécules d'adhésion dans ce phénomène. En effet, durant l'activation d'une réponse immunitaire au SNC, étape clé dans la progression de la sclérose en plaques (sujet plus amplement discuté à la section 1.2), il se produit une régulation à la hausse de l'expression des intégrines au niveau des microvaisseaux. Cette observation est aussi démontrée *in vitro* en exposant des cellules endothéliales cérébrales à des cytokines comme TNF α , IFN γ et IL-1 (Mc Carron *et al.*, 1993a; 1993b). Aussi, l'exposition des cellules endothéliales humaines à des lymphocytes activés a pour conséquence l'augmentation de l'expression de E-sélectine au niveau des cellules endothéliales (Lou *et al.*, 1996). De plus, le traitement des cellules endothéliales stimulées par un anticorps contre la E-sélectine réduit la migration des lymphocytes (Wong *et al.*, 1999), démontrant l'importance de ces molécules dans la migration efficace des cellules immunitaires. Aussi, des souris knock-out pour la P-sélectine furent examinées pour leur susceptibilité à la méningite induite par cytokine; l'infiltration leucocytaire et la perméabilité de la barrière sont significativement inhibées comparativement aux souris de type sauvage développant une inflammation sévère des méninges caractérisée par l'accumulation de leucocytes au SNC et par l'augmentation de la perméabilité de la BHE (Tang *et al.*, 1996).

Ainsi, les lymphocytes T activés, en réponse à un agent infectieux ou tout autre stimulus, peuvent accéder au SNC en traversant la BHE, la quantité de cellules migratrices est d'autant plus élevée lorsque le corps est au prise avec une infection. L'inflammation au SNC est toutefois rare, puisqu'il existe apparemment plusieurs points de contrôle dans la cascade menant à celle-ci. Les cellules T activées entrent au SNC; elles reconnaissent leur antigène ou elles quittent en retournant dans la circulation sanguine. Dans le premier cas, la cascade menant à l'inflammation est amorcée. Toutefois, même si la cellule ne trouve pas son antigène, la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, par celle-ci peut permettre davantage de circulation au SNC et entraîner de l'inflammation.

1.1.4 Voies d'entrée des virus au SNC

Pour certains virus, après la phase initiale d'infection, survient une phase de dissémination par l'emprunt de la voie nerveuse et/ou la voie sanguine.

Plusieurs virus utilisent les voies nerveuses pour se propager davantage dans l'organisme, soit de manière exclusive, soit associé à une diffusion par virémie. Les fibres sensorielles, motrices et autonomes peuvent être utilisées. Le virus de la rage est un exemple de virus utilisant exclusivement le transport neuronal pour se rendre au SNC. L'événement clé initiant ce phénomène est l'infection des terminaisons axonales au contact des tissus infectés. De cette façon, le virus est transporté passivement par le flux axonal. Un autre bel exemple de transport neuronal est celui impliquant le réovirus mammaire. En effet, lorsqu'injecté au niveau du coussinet de la patte chez la souris, le virus est rapidement incorporé par les fibres nerveuses sensorielles et motrices pour être transporté vers la moelle épinière (Flamand *et al.*, 1991). Par ailleurs, les souches JHM et A59 du MHV sont neuroinvasives et peuvent se rendre au SNC suite à une infection par voie intranasale (in), en empruntant le nerf olfactif (Barnett et Perlman, 1993) tout comme le poliovirus, le VSV et le HSV (Anderson et Field, 1982) qui utilisent aussi ce mode de transport.

La présence du virus dans le sang (virémie), second mode de dissémination, peut avoir plusieurs origines. Effectivement, le virus peut être transporté du site de multiplication locale par le drainage des canaux lymphatiques et être ainsi acheminé dans la circulation sanguine. Aussi, l'entrée directe du virus par les capillaires irriguants la zone de multiplication locale est possible.

La virémie associée à l'inoculation intranasale de souris par le coronavirus murin neurotrophe MHV-JHM a été démontrée (Barthold et Smith, 1992). Dans le même ordre d'idée, les virus produits après l'inoculation de MHV-A59 (responsable d'hépatites et d'infections neurologiques) du côté apical de cellules rénales murines polarisées sont relargués préférentiellement du côté basolatéral (Rossen *et al.*, 1995). Ceci pourrait fournir des voies supplémentaires d'entrée au SNC par les souches du MHV dont l'accès par les nerfs est bien établi.

De plus, dans une étude effectuée par Cabirac *et al.*, en 1993, impliquant l'inoculation intranasale et intraoculaire de primates par le coronavirus JHM OMP1, la présence d'ARN et d'antigènes viraux dans le cerveau et aussi, des produits viraux furent détectés au niveau des vaisseaux sanguins. Ceci suggère donc que la propagation au SNC s'est effectuée par la voie sanguine.

Après l'établissement d'une virémie, la pénétration des virus au SNC peut survenir de plusieurs façons dépendamment du type de virémie. D'une part, la virémie peut être qualifiée de plasmatique, le virus étant retrouvé à l'état libre dans le sang ou d'autre part, associée aux cellules sanguines.

Les mécanismes de passage à travers la BHE sont illustrés à la Figure 3. Le virus libre peut : 1- passer dans les espaces intercellulaires des capillaires fenêtrés au niveau du plexus choroïde de l'encéphale ou à travers une barrière endommagée (telle que vu à la section 1.1.2.2; 2-se multiplier dans les cellules endothéliales et de cette façon, être en mesure de franchir la barrière par le relargage de virus infectieux du côté basolatéral ou par lyse cellulaire. Voici des exemples de virus utilisant l'infection des cellules

endothéliales afin d'atteindre le SNC : le virus de l'immunodéficience du singe (SIV) (Strelow *et al.*, 2002), le coronavirus humain sérotype 229E (HCoV-229E) (Cabirac *et al.*, 1995), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Moses et Nelson, 1994), le virus de la forêt de Semliki (SFV) induisant une encéphalomyélite démyélinisante dans le SNC de souris (Soilu-Hanninen *et al.*, 1994); 3- être transporté, tel le VIH (Hocini H. *et al.*, 2001), par transcytose à l'aide du système endosomal cellulaire. Le virus traverse ainsi le cytoplasme à l'intérieur de vésicules et sort côté cerveau.

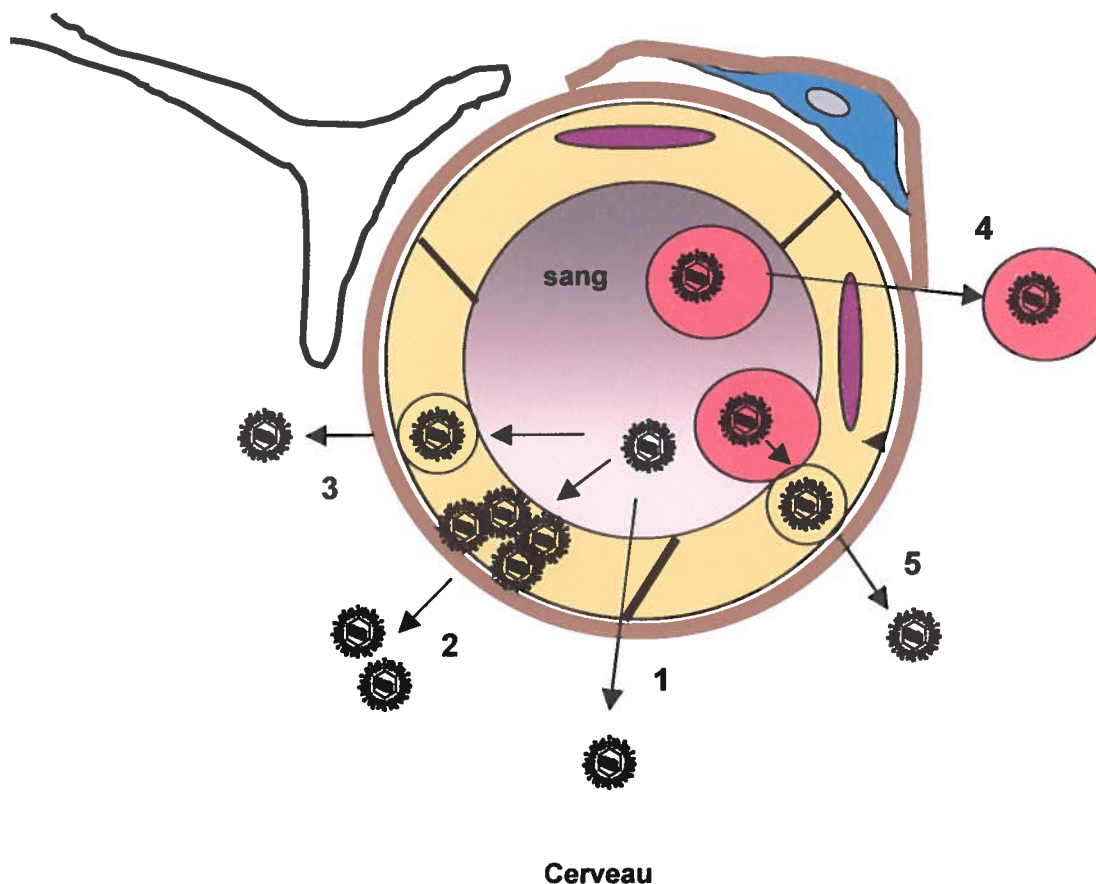


Figure 3. Mécanismes de passage des virus à travers la BHE

1- Les virus libres peuvent traverser la BHE en passant dans les espaces intercellulaires.
 2- La multiplication des virus dans les cellules endothéliales permet le relargage de ceux-ci au SNC par bourgeonnement ou par lyse cellulaire. 3- La transcytose des virus à l'intérieur de vésicules est aussi possible. 4- Les virus associés aux cellules sanguines peuvent franchir la barrière lors du trafic normal de ces cellules au SNC. 5- Le contact entre les cellules sanguines infectées et les cellules endothéliales peut permettre le bourgeonnement des virus à l'intérieur de ces dernières, le virus traversant par la suite la cellule dans une vésicule afin d'atteindre le SNC.

Plus récemment, une découverte intéressante concerne l'implication des lipoprotéines-ApoE, responsables du transport des LDL vers les cellules de l'organisme incluant les neurones, dans l'encéphalite humaine sévère causée par le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1). En effet, bien que le transport neuronal du virus jusqu'au SNC est un fait, la propagation par voie sanguine est aussi possible et l'étude portant sur des souris démontre que la présence d'ApoE est essentielle à la pénétration du virus de l'herpès dans le cerveau et que celui-ci a la capacité de lier la lipoprotéine (Burgos *et al.*, 2002).

Concernant le virus associé aux cellules leucocytaires, celui-ci peut : **4**-être transporté au SNC au cours du trafic normal des cellules immunitaires (voir section 1.1.3 sur la surveillance immunitaire au SNC); **5**-bourgeonner suite au contact des cellules sanguines infectées et des cellules endothéliales (se référer à l'exemple suivant).

Les lymphocytes T infectés semblent jouer un rôle décisif dans l'incidence et le développement d'infections virales au SNC. Prenons par exemple la paraparésie spastique tropicale (TSP) et la myélopathie associée au HTLV-1 (HAM), qui sont des affections neurologiques causées par le virus de la leucémie humaine de type 1, HTLV-1. Le virus infecte de façon chronique les lymphocytes T et l'entrée du virus dans le SNC se fait par l'intermédiaire de la migration des lymphocytes à travers la BHE. En effet, l'exposition des lymphocytes infectés à des cellules endothéliales cérébrales de rat eu comme conséquence l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et de la perméabilité de ces dernières. De plus, le contact entre les lymphocytes infectés et les cellules endothéliales permet le bourgeonnement des virus vers les cellules endothéliales. Les virus sont ainsi internalisés dans des vésicules qui traversent par transcytose les cellules endothéliales pour accéder au SNC (Romero *et al.*, 2000).

L'encéphalite induite par le VIH survenant chez plus du tiers des individus séropositifs implique aussi les lymphocytes T. Les lymphocytes et monocytes infectés transmigrent à travers la barrière hémato-encéphalique, processus facilité en partie par la protéine virale Tat qui induit l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules

endothéliales et la production de chimiokines par les astrocytes et les microglies (Wu *et al.*, 2000). La migration est aussi facilitée par l'oxide nitrique dérivé des cellules endothéliales et des monocytes-macrophages et par l'augmentation de la production de l'activité de gélatinase B par les monocytes-macrophages infectés par le VIH (Nottet, 1999). De plus, il a été démontré que les cellules phagocytaires mononucléaires tel que les microglies sont susceptibles au VIH-1 et produisent de grandes quantités de chimiokines. Les microglies infectées modulent de façon significative la migration des monocytes à travers un modèle de BHE et au niveau du cerveau de souris tout en régulant à la baisse les protéines formant les jonctions serrées entre les cellules endothéliales (Persidsky *et al.*, 2000).

Certains virus peuvent utiliser plus d'un mécanisme afin d'accéder au SNC. Tel est le cas du virus de la rougeole, causant la panencéphalite sclérosante sub-aiguë (SSPE), et du VIH pouvant atteindre le SNC par l'infection des cellules endothéliales des capillaires sanguins ou par l'intermédiaire de leucocytes infectés (Cosby *et al.*, 2002; Moses et Nelson, 1994; Wu *et al.*, 2000).

1.1.5 Inflammation au SNC

Une fois rendu au SNC, la capacité du virus à endommager les cellules neurales dépend de son tropisme mais aussi de la perméabilité de ces cellules à l'infection. Lorsque les cellules du SNC deviennent le lieu de la multiplication virale, cette dernière active la population de microglies adjacentes. De plus, la production locale d'IFN-alpha/béata induit l'expression des molécules du CMH sur les cellules du SNC, principalement les astrocytes et les microglies et amorce la phagocytose par ces dernières. Par la phagocytose, l'activation des microglies s'accroît et a pour conséquence la régulation à la hausse des molécules du CMH, la capacité à présenter des antigènes et la sécrétion de chimiokines. Ceci entraîne la régulation à la hausse des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales composant la BHE. Il s'ensuit la transmigration de lymphocytes T CD8+ activés, attirés par l'IFN-gamma sécrété par les NK en contexte

d'infection virale. La présence d'IFN-gamma favorise ensuite une réponse immunitaire essentiellement gouverné par les lymphocytes T CD4+. Ainsi, une importante régulation à la hausse des molécules du CMH et la sécrétion de substances chimiotactiques et toxiques se produisent en rafale. Conséquemment, une grande quantité de cellules inflammatoires, incluant les macrophages et les cellules B est appelée sur le site d'infection. Un examen histologique révèle la présence d'agrégats leucocytaires périvasculaires et des cellules sanguines en processus de migration au SNC. Des cytokines pro-inflammatoires sont produites au SNC altérant la barrière et favorisant l'expression de sélectines et intégrines sur celle-ci (Hickey, 1999).

Le déroulement de l'infection dépend alors de la balance et de la spécificité de la population lymphoïde. Généralement, un délai dans le recrutement de lymphocytes effecteurs permet au virus de se propager dans le SNC tandis qu'une réponse rapide et spécifique empêchera de façon efficace l'étendue de l'infection (Dorries, 2001). Par contre, la réponse immunitaire peut s'avérer très nuisible suite à l'activation d'une population de cellules T autoréactives. Ce problème sera discuté plus amplement à la section 1.2.3 dans le contexte des maladies auto-immunitaires.

1.2 Sclérose en plaques (SEP)

1.2.1 Description de la pathologie

La sclérose en plaques est une maladie auto-immunitaire caractérisée par l'inflammation chronique du SNC, la destruction de la gaine de myéline des fibres nerveuses et une perte de fonction de l'organe cible, le cerveau (Shi *et al.*, 2001). Cette maladie fut décrite pour la première fois par un neurologue français, le Dr Jean-Martin Charcot en 1868. Touchant deux fois plus de femmes que d'hommes, la maladie se déclenche entre 20 et 40 ans (Bar-Or *et al.*, 1999) faisant d'elle la maladie neurologique la plus répandue chez les jeunes adultes de notre pays. Toutefois, des enfants (une centaine au Québec) et des personnes dans la cinquantaine peuvent aussi manifester des signes de la maladie. On estime à 50 000 le nombre de canadiens atteints, dont 12 000 québécois. Chaque jour, il est estimé que trois nouveaux cas sont enregistrés au Canada.

La SEP peut se traduire par des troubles visuels, de la faiblesse extrême, des troubles de l'équilibre et de la coordination, de la raideur musculaire, des difficultés d'élocution et de déglutition, des troubles sensoriels et la paralysie. La destruction de la gaine de myéline entourant les axones, remplacée par du tissu scléreux, nuit à la transmission des influx nerveux et est responsable des troubles neurologiques observés chez les patients (Talbot, 1995). La sévérité des symptômes est plus souvent liée à la localisation des aires endommagées au niveau du cerveau et de la moelle épinière qu'à la gravité et progression de la maladie. Différentes formes de SEP ont été identifiées. La plupart des personnes atteintes, 70 %, présentent d'abord la forme cyclique au moment du diagnostic, caractérisée par des poussées suivies de rémissions partielles ou complètes. Environ la moitié de ces patients voit leur état s'aggraver dans les dix années suivant le diagnostic en développant la forme progressive secondaire tandis que 20 à 25 % présenteront une forme bénigne caractérisée par quelques poussées entrecoupées de longues rémissions. Environ 10 à 15 % souffrent de la forme dite progressive primaire, au moment du diagnostic, évoluant lentement mais progressivement.

La maladie serait la conséquence de l'entrée de cellules inflammatoires au SNC, plus spécifiquement, par l'entrée de populations particulières de cellules T ou B dites autoréactives contre un antigène du SNC; de telles cellules réagissant contre les épitopes de la MBP ou de la PLP ont été trouvées chez des patients SEP (Ota *et al.*, 1990). Lorsqu'activé, le lymphocyte T autoréactif peut engendrer des dommages directs, par une activité cytotoxique, la libération de cytokines ou encore de façon indirecte par la production dépendante des cellules T d'anticorps pathogéniques (Nauclicr *et al.*, 1996). La pénétration des cellules au SNC est sans aucun doute favorisée par l'augmentation de la perméabilité de la BHE détectée au niveau de tissus sclérosés (Gay et Esiri, 1991). Les cellules inflammatoires prédominantes dans le cerveau de patients atteints de SEP sont les lymphocytes et les macrophages (Martino *et al.*, 2000). Cette inflammation endommage la myéline rapidement après l'entrée des cellules au SNC, menant à la dénudation des axones et aux symptômes neurologiques (Noseworthy *et al.*, 2000).

1.2.2 Étiologie

La cause exacte de cette maladie dégénérative du SNC échappe encore à la science. La distribution géographique de la maladie découlant d'études épidémiologiques laisse croire à l'implication de facteurs environnementaux. La prévalence de la SEP est plus importante dans le nord de l'Europe, en Amérique du Nord et dans le sud de l'Australie (Kurtzke, 1991). De plus, il n'est pas rare d'observer plusieurs cas de SEP à l'intérieur d'une famille, l'augmentation de la prévalence étant de 15 à 20 fois (Compston, 1991), suggérant ainsi la possibilité que la maladie ait une composante génétique.

1.2.2.1 Facteurs génétiques

Le taux de concordance entre jumeaux homozygotes est de 31 %, soit 6 fois supérieur à celui trouvé chez les jumeaux dizygotes (Sadovnick *et al.*, 1993), ce qui suggère que la susceptibilité à la SEP est sous une influence génique. Plus d'un gène ont été reliés à la susceptibilité à la SEP, le premier facteur de risque identifié étant la présence de l'allèle HLA-DR2, un antigène d'histocompatibilité impliqué dans la présentation antigénique (Jersild *et al.*, 1973). Aussi, des gènes dans la région codant pour le CMH, situés sur le chromosome 6 sont suspectés (Ebers *et al.*, 1996; Haines *et al.*, 1996; Sawcer *et al.*, 1996). De plus, l'allèle HLA-DQ, les gènes du TNF-alpha et de divers composants de la cascade du complément ont été associés à la SEP (Steinman, 2001). Toutefois, la plupart des jumeaux homozygotes étant discordants pour la maladie, ceci appuie l'importance de facteurs environnementaux dans l'incidence de celle-ci.

1.2.2.2 Facteurs environnementaux

Des études ont permis d'observer un changement du niveau de risque chez les individus après migration. En effet, des individus allant d'une région à prévalence élevée vers une région à prévalence faible acquièrent le niveau de risque de leur nouveau lieu de

résidence si âgés de moins de 15 ans, tandis que ceux de plus de 15 ans conservent le niveau de risque de leur lieu de naissance (Kurtzke, 1997). Ceci suggère que l'exposition à un facteur environnemental dans l'enfance serait impliquée dans le déclenchement de la maladie.

Une autre observation appuyant l'implication de facteurs environnementaux est celui des Iles Feroe. Ces îles étaient exemptes de cas de SEP jusqu'au débarquement des troupes britanniques en 1940. Des cas de SEP sont apparus deux à trois ans après l'arrivée des troupes, suggérant que les soldats ont introduit avec eux un agent infectieux impliqué dans le déclenchement de la SEP (Kurtzke et Heltberg, 2001).

Il est possible que des virus soient impliqués à une certaine étape du développement de la maladie et cette hypothèse est renforcée par la relation établie entre l'infection virales des voies respiratoires supérieures ou du tractus gastro-intestinal et les rechutes observées chez les patients atteints de SEP (Sibley *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1993; Panitch, 1994).

De nombreux virus ont été associés avec la SEP depuis plusieurs années (Tableau 1). La base de l'association repose sur l'isolement de particules virales à partir de tissus atteints, la détection d'une importante présence d'anticorps anti-viraux dans le sérum ou le liquide céphalo-rachidien chez les malades, ou par la détection d'ARN ou protéines virales dans le SNC (Talbot, 1995).

Tableau 1. Virus associés à la SEP selon différentes approches expérimentales

Virus	Approche expérimentale
Coronavirus	Virus isolé de tissu malade ^{1,9} Prépondérance d'anticorps anti-viraux ² Présence de matériel génétique viral au SNC ³
Cytomégalovirus	Virus isolé de tissu malade ¹
Epstein-Barr	Prépondérance d'anticorps anti-viraux ⁴
Flavivirus	Virus isolé de tissu malade ¹
Herpès humain 6	Prépondérance d'anticorps anti-viraux ⁵ Présence d'antigènes viraux liée aux plaques de démyélinisation ⁶
Herpès simplex	Virus isolé de tissu malade ¹ Prépondérance d'anticorps anti-viraux ²
Influenza type 1	Prépondérance d'anticorps anti-viraux ²
Oreillons	Prépondérance d'anticorps anti-viraux ²
Para-influenza type 1	Virus isolé de tissu malade ¹
Rage	Virus isolé de tissu malade ¹
Rougeole	Virus isolé de tissu malade ¹ Prépondérance d'anticorps anti-viraux ² Présence de matériel génétique viral au SNC ⁷
Rubéole	Prépondérance d'anticorps anti-viraux ²
T-lymphotrope type 1	Présence de matériel génétique viral au SNC ⁸
Vaccine (variole)	Prépondérance d'anticorps anti-viraux ²
Varicelle	Prépondérance d'anticorps anti-viraux ²

1-Johnson, 1985; 2-Salmi *et al.*, 1981; 3-Murray *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1992; Arbour *et al.*, 2000; 4-Bray *et al.*, 1992; 5- Sola *et al.*, 1993; Soldan *et al.*, 1997; 6-Challoner *et al.*, 1997; 7-Haase *et al.*, 1981; Cosby *et al.*, 1989; 8-Reddy *et al.*, 1989; 9-Burks *et al.*, 1980.

1.2.3 Infection virale et auto-immunité

Des mécanismes ont été proposés pour expliquer l'implication de l'infection virale dans le processus des maladies auto-immunitaires telle la SEP.

Tout d'abord, les cellules T autoréactives peuvent être activées par la réponse immunitaire induite par l'infection virale. En effet, les cytokines libérées au site d'inflammation mène au recrutement non-spécifique de cellules immunitaires et permet l'activation des cellules T. Des cellules T autoréactives peuvent être présentes parmi les cellules recrutées (Fairweather *et al.*, 2001).

Aussi, l'activation des cellules T autoréactives peut survenir par la présentation des antigènes du soi libérés suite à des dommages tissulaires causés par l'action directe des virus ou par l'inflammation, ce mécanisme est la propagation de déterminants (Vanderlugt *et al.*, 2000).

Le mimétisme moléculaire est un troisième mécanisme avancé pour expliquer comment une infection virale peut déclencher une maladie auto-immunitaire. Ceci implique l'activation de cellules T autoréactives par la reconnaissance croisée d'un épitope viral et d'un épitope du soi (Oldstone, 1987; Wucherpfennig et Strominger, 1995; Miller *et al.*, 2001).

Finalement, l'action de superantigènes peut apporter une théorie supplémentaire concernant le lien entre l'activation de cellules T autoréactives et l'infection virale. Effectivement, les superantigènes sont des protéines, le plus souvent d'origine bactérienne ou virale, liant une région du CMH de classe II d'une cellule présentatrice d'antigènes à la région V β du récepteur de la cellule T, activant cette dernière sans tenir compte de la spécificité peptide-CMH (Hodstev *et al.*, 1998).

1.3 Coronavirus

Les coronavirus font partie de l'ordre des *Nidovirales* et sont membres de la famille des *Coronaviridae*. Ce sont des virus enveloppés d'environ 120 nm de diamètre ayant un génome constitué d'un ARN simple brin de polarité positive de 27 à 32 kb. La structure des coronavirus est illustrée schématiquement à la Figure 4.

1.3.1 Protéines structurales

L'enveloppe des coronavirus possède des projections d'environ 20 nm formées par la trimérisation de glycoprotéines S (spicule), lui donnant l'aspect d'une couronne. Cette protéine est responsable de la liaison au récepteur, de l'induction de la fusion membranaire, de l'entrée du virus dans la cellule et de l'effet cytopathique (Lai et Cavanagh, 1997). Elle est la principale cible du système immunitaire, étant la composante virale la plus accessible. De plus, la protéine HE, une glycoprotéine possédant une activité d'hémagglutinine-estérase forme de courts spicules à la surface de certains coronavirus (Lai et Holmes, 2001). L'enveloppe des coronavirus est constituée des protéines M (membrane) et E (enveloppe). Ces deux protéines sont essentielles à l'assemblage viral (Bos *et al.*, 1996; Vennema *et al.*, 1996). La glycoprotéine M est aussi impliquée dans la formation de la capsidie entourant la nucléocapsidie de certains coronavirus. Finalement, la protéine N, une phosphoprotéine de 50 à 60 kDa, entre dans la formation de la nucléocapsidie en s'associant à l'ARN et constituerait probablement avec la protéine M la capsidie interne (Lai et Holmes, 2001).

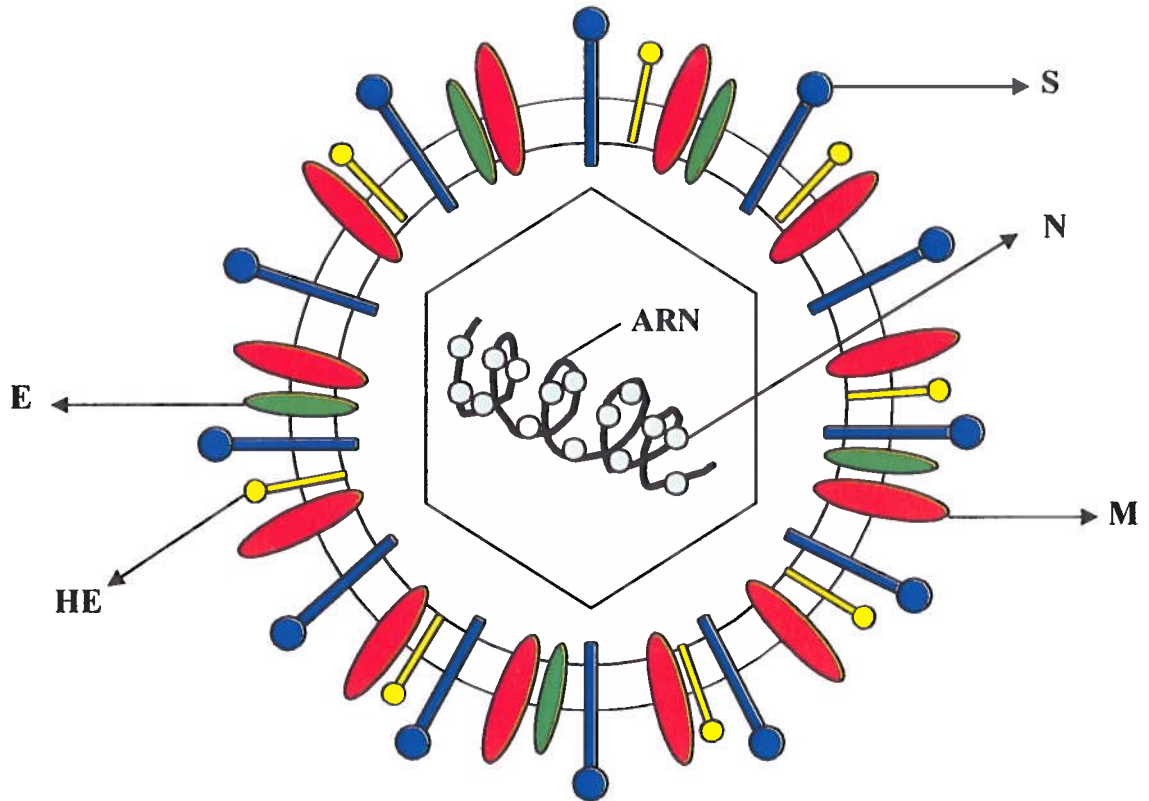


Figure 4. Schématisation de la structure des coronavirus

1.3.2 Protéines non-structurales

La principale protéine non-structurale des coronavirus est l'ARN polymérase ARN-dépendante, responsable de la réplication virale, dont le gène occupe les deux tiers du génome en 5', soit environ 20 kb (Lai et Holmes, 2001). Le nombre et la localisation des autres protéines non-structurales sur le génome varient selon les différents coronavirus (Lai et Cavanagh, 1997) et leurs fonctions sont toujours inconnues.

1.3.3 Récepteurs cellulaires

1.3.3.1 Aminopeptidase-N

L'entrée du coronavirus humain HCoV-229E est médiée par l'attachement spécifique à l'aminopeptidase-N (APN), également nommée CD13. Cette protéine fait partie de la famille des métalloprotéases dépendantes du zinc et est distribuée sur différents types cellulaires et tissulaires. Entre autres, elle est présente au niveau de l'épithélium du petit intestin et des tubules proximaux rénaux, sur des fibroblastes de poumons, et aussi sur les cellules monocytaires et granulocytaires (Olsen *et al.*, 1997; Kolb *et al.*, 1996; Yeager *et al.*, 1992; Look *et al.*, 1989). De plus, l'APN se retrouve sur les péricytes formant la BHE et sur les membranes synaptiques du SNC (Kunz *et al.*, 1994; Look *et al.*, 1989). Sa présence a aussi été détectée sur des lignées humaines de cellules neurales et gliales susceptibles à l'infection par le HCoV-229E et la corrélation entre la quantité de récepteur présente et le niveau d'attachement viral a été observée (Lachance *et al.*, 1998).

Les fonctions connues de l'APN incluent la digestion des peptides au niveau du petit intestin et l'inactivation des Nt au niveau du cerveau (Bowes et Kenny, 1987; Matsas *et al.*, 1985; Semenza, 1986).

D'autres coronavirus, faisant partie du même groupe antigénique que le HCoV-229E, utilisent aussi l'APN comme récepteur (se référer au Tableau 2). Il s'agit du virus de la gastro-entérite porcine transmissible (TGEV), du virus félin de la péritonite infectieuse (FIPV) et du coronavirus entérique félin (FeCV) (Delmas *et al.*, 1995; Tresnan *et al.*, 1996).

1.3.3.2 Acides sialiques

Le récepteur du HCoV-OC43 est quant à lui moins bien défini. L'entrée du virus serait assurée par la présence de glycoprotéines contenant des résidus d'acide sialique (acide N-acétyl-9-O-acétylneuraminique) sur les cellules cibles (Vlasak *et al.*, 1988).

Toutefois, ces glycoprotéines sont retrouvées sur un large éventail de cellules n'étant pas toutes susceptibles à l'infection. Ceci indique que bien que les acides sialiques soient nécessaires à l'infection (Schultze et Herrler, 1992), ils ne constituent pas le récepteur principal. Par ailleurs, le coronavirus bovin (BCoV) utilise aussi les acides sialiques dans le processus d'attachement cellulaire (Vlasak *et al.*, 1988).

1.3.4 Réplication virale

L'attachement du virus à la surface cellulaire est suivi par l'internalisation de celui-ci par un mécanisme de pénétration qui est encore incertain. En fait, il semble que les virus entrent via endocytose (Krzystyniak et Dupuy, 1984) et/ou par fusion virus-cellule au niveau de la membrane plasmique (Weismiller *et al.*, 1990; Kooi *et al.*, 1991; Li et Cavanagh, 1992). Une fois dans la cellule, le virus est décapsidé; la protéine N se dissocie de l'ARN. De cette façon, la synthèse de l'ARN polymérase ARN-dépendante peut survenir. La polymérase est traduite à partir du gène 1 situé à l'extrémité 5' de l'ARN génomique. Le rôle de la polymérase est de synthétiser des brins négatifs d'ARN viral à partir du brin positif génomique polyadénylé en 3' et coiffé en 5'. Ces brins négatifs sont utilisés à deux fins : synthèse des ARNm viraux pour la traduction en protéines et production d'ARN génomiques positifs pour l'incorporation dans les capsides virales. Le modèle suivant de transcription des ARNm à partir du génome viral a été proposé, il s'agit de l'élongation discontinue en 3' des brins négatifs. En effet, des ARN négatifs de différentes longueurs ayant des séquences de tête communes en 5' serviraient comme matrices pour la production des ARNm sous-génomiques (Sawicki SG et Sawicki DL, 1995 et 1998 ; Baric et Yount, 2000). L'initiation de la traduction des ARNm en protéines utilise un mécanisme dépendant de la coiffe. Une fois traduites, certaines protéines virales vont subir des modifications post-traductionnelles. Les virus sont ensuite encapsidés et bourgeonnent.

1.3.5 Groupes antigéniques

La classification des coronavirus en trois groupes antigéniques (Tableau 2) a été déterminée par des tests sérologiques et à l'aide des séquences nucléotidiques (Lai et Holmes, 2001). Les coronavirus de mammifères constituent les deux premiers groupes tandis que le troisième comprend des virus aviaires.

L'agent étiologique de la pneumonie atypique, le nouveau coronavirus SARS-HCoV, ne se rapproche point de façon étroite à l'un ou l'autre des trois groupes antigéniques existants, en se basant sur les analyses phylogénétiques des protéines virales faites à l'aide de la séquence nucléotidique complète du virus (Marra *et al.*, 2003). Par contre, la souche semble être apparenté aux coronavirus MHV et BCoV. Cette conclusion a pu être tirée après des analyses génomiques comparatives (Qin *et al.*, 2003). De cette façon, le nouveau coronavirus ferait ainsi partie du groupe antigénique II.

Tableau 2. Sérotypes, hôtes naturels et maladies causées par les coronavirus. Tiré de Lai et Holmes, 2001.

Groupe antigénique	Virus	Hôte	Infection respiratoire	Infection entérique	Hépatite	Infection neurologique	Autres*
I	HCoV-229E	Humain	X			?	
	TGEV, PRCoV	Porc	X	X			X
	CCoV	Chien		X			
	FECoV	Chat		X			
	FIPV	Chat	X	X	X	X	X
	RbCoV	Lapin		X			X
II	HCoV-OC43	Humain	X	?		?	
	MHV	Souris	X	X	X	X	
	SDAV	Rat					X
	HEV	Porc	X	X		X	
	BCoV	Bovin	X	X			
	SARS-HCoV ^{1,2}	Humain	X	X			
III	IBV	Poulet	X		X		X
	TCoV	Dinde	X	X			

*Inclut péritonite infectieuse, troubles immunologiques, néphrite, pancréatite, parotidite, myocardite et sialodacryoadénite.

HCoV-229E : coronavirus humain 229E; TGEV : virus de la gastro-entérite porcine transmissible; PRCoV : coronavirus respiratoire porcin; CCoV : coronavirus canin; FECoV : coronavirus entérique félin; FIPV : virus félin de la péritonite infectieuse; RbCoV : coronavirus de lapin; HCoV-OC43 : coronavirus humain OC43; MHV : virus de l'hépatite murine; SDAV : virus de la sialodoacryadénite; HEV : virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine; BCoV : coronavirus bovin; IBV : virus de la bronchite infectieuse aviaire; TCoV : coronavirus de dinde.

1-Nassiri, 2003; 2-Qin *et al.*, 2003.

1.3.6 Pathologies associées aux coronavirus

Les coronavirus sont responsables de diverses infections chez les animaux occasionnant des troubles respiratoires, entériques, neurologiques ou autres (voir Tableau 2). Leur transmission se fait généralement par les voies respiratoires ou entériques dans lesquelles les virus causent une infection locale (Holmes, 2001). Toutefois, certains coronavirus infectent de manière systémique leurs hôtes, il s'agit du HEV, du FCoV, du IBV et du MHV (Holmes, 2001). Par ailleurs, chez l'humain, le HCoV est responsable de 10 à 35 % des rhumes (Myint, 1994). Il est aussi la cause de pneumonies (Riski et Hovi, 1980) et d'insuffisance respiratoire chez les nouveaux-nés (Gagneur *et al.*, 2002). De plus, le coronavirus humain semble être impliqué dans les infections du tractus gastro-intestinal (Resta *et al.*, 1987) et l'accumulation de données scientifiques suggèrent le potentiel de ces virus à infecter le SNC (discuté plus en détail dans la section suivante). Dernièrement, en 2002-2003, dans la mystérieuse vague de pneumonie atypique originaire du sud de la Chine et ayant touché Toronto, un nouveau coronavirus a été identifié, le SARS-HCoV (Zhang *et al.*, 2003). Le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) dont ce virus est responsable se présente avec de la fièvre, de la toux, des malaises, des difficultés respiratoires et de la diarrhée. Aucun traitement pharmacologique n'a été approuvé par la FDA et jusqu'à maintenant, aucun résultat clinique convaincant n'a été obtenu avec l'usage de la ribavirine. Les efforts sont donc regroupés afin de trouver un traitement, voir même un vaccin contre l'infection qui a déjà fait plusieurs victimes et risque de réapparaître de façon saisonnière si l'on se réfère au profil épidémiologique des coronavirus humains.

1.3.7 Coronavirus humains (HCoV) et SEP

Ces virus respiratoires sont associés à la SEP sur la base de plusieurs observations. En effet, le caractère neuroinvasif des HCoV, sa capacité à accéder au SNC, a été démontré par l'isolement de coronavirus à partir de cerveaux de patients atteints de SEP (Burks *et al.*, 1980) et par la détection d'ARN au niveau de cerveaux humains (Stewart *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1992; Arbour *et al.*, 2000). Aussi, des titres supérieurs en

anticorps dirigés contre le coronavirus ont été détectés au niveau du liquide céphalo-rachidien chez les patients souffrant de SEP comparativement à des personnes saines (Salmi *et al.*, 1982).

De plus, le caractère neurotrope de ces virus, soit le potentiel du virus à infecter les cellules du SNC, a lui aussi été démontré par bon nombre de données : la susceptibilité de lignées humaines d'origine neurale et cultures primaires d'astrocytes et de microglies (Talbot *et al.*, 1993; Arbour *et al.*, 1999a,b; Bonavia *et al.*, 1997).

Les mécanismes pouvant expliquer comment le coronavirus peut participer au développement d'une maladie inflammatoire telle la SEP ont été énumérés à la section 1.2.3. De façon plus spécifique, l'infection de cellules neurales par le coronavirus humain induisant la production de MMP (Edwards *et al.*, 2000) pourrait donc entraîner les effets reliés à l'inflammation. De plus, les observations suivantes soutiennent l'hypothèse du mimétisme moléculaire; réactivité croisée en lignée (Talbot *et al.*, 1996) et au niveau clonal (Boucher *et al.*, 2001 a,b) des lymphocytes T reconnaissant à la fois des antigènes viraux et ceux du SNC de façon plus importante chez les patients atteints de SEP que chez les témoins.

1.3.8 Coronavirus murin comme modèle de SEP

Les modèles animaux sont d'une grande importance dans la compréhension de maladies aussi complexes que la SEP.

Le modèle de choix s'avère être celui du coronavirus murin (MHV). Il existe de nombreuses souches de MHV possédant des tropismes différents pour le cerveau, le foie, le tractus gastro-entérique et respiratoire et causant diverses pathologies chez les rongeurs. L'issue de l'infection dépend de la souche, de la dose virale utilisée, de la voie d'inoculation, du fond génétique, de l'âge et de l'état de santé de l'animal. Comme discuté à la section 1.1.4, le caractère neuroinvasif de deux souches du MHV, JHM et A59, est bien établi, en effet, ils peuvent atteindre le SNC suite à une infection par voie

intranasale en empruntant le nerf olfactif (Barnett et Perlman, 1993). Aussi, des études démontrent une virémie du MHV suite à l'infection de souris (Barthold et Smith, 1992), voie supplémentaire d'entrée au SNC pour ensuite infecter les neurones, les oligodendrocytes, les astrocytes et les microglies (Dales et Anderson, 1995; Stohlman et Hinton, 2001). Il a aussi été démontré que l'infection du SNC par les souches JHM et A59 entraîne la destruction de la gaine de myéline (Pappenheimer, 1958; Lampert *et al.*, 1973; Herndon *et al.*, 1975; Lavi *et al.*, 1984) avec l'implication du système immunitaire, puisque celle-ci peut-être prévenue par l'immunosuppression des souris (Houtman *et al.*, 1995).

Cette démyélinisation a plusieurs points en commun avec la SEP. En effet, elle est consécutive à l'infection virale, facteur environnemental suggéré dans le déclenchement de la SEP. Une susceptibilité génétique est associée à la SEP et il se trouve que la susceptibilité à l'infection au MHV est influencée par le fond génétique des animaux (Buschman et Skamene, 1995). Les deux pathologies se traduisent par des lésions semblables dans la matière blanche (Noseworthy *et al.*, 2000). De plus, l'implication de la réponse immunitaire dans la démyélinisation a été démontrée autant chez la souris (Houtman et Fleming, 1996) que dans la SEP (section 1.2.1).

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Cultures primaires de cellules humaines

2.1.1 Cellules endothéliales du cerveau

Les cellules endothéliales du cerveau humain provenaient de biopsies effectuées chez des patients atteints d'épilepsie et nous ont été fournies par le laboratoire du Dr Jack P. Antel de l'unité de Neuroimmunologie à l'Institut de neurologie de Montréal (Université McGill). Les cellules ont été cultivées dans du milieu *M199 1X Earle's salts* pour cellules endothéliales (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) additionné de 20 % (volume/volume, v/v) de milieu conditionné de mélanome de souris (ATCC, Cloudman S91, clone M3), 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (Wysent, St-Bruno, Québec, Canada), 5 % (v/v) de sérum humain inactivé (Pel-Freez, Brown Deer, Wisconsin, É-U), 25 mM d'acide N-2 hydroxyéthylpipérazine-N'-2 éthanesulfonique (HEPES) (Invitrogen), 100 unités (U)/mL de pénicilline (Invitrogen) et 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen) (pen-strep), ITS (Collaborative Biomedical product, VWR, Ville Mont-Royal, Québec, Canada) et 30 µg/mL de supplément de croissance pour cellules endothéliales (ECGS) (Becton Dickenson Biosciences, Oakville, Ontario, Canada). Ces cellules se multipliant en culture, il a été possible de les passer de façon hebdomadaire et ce jusqu'à un maximum de 5 ou 6 passages, les cellules se dégénéralant par la suite. Afin de favoriser l'adhésion des cellules, les flacons ont été préalablement traités à la gélatine type B provenant de peau de bovin 0,5 % (p/v) (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, É-U.) dans du PBS, et ce, à chaque passage.

2.1.2 Cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC)

Les PBMC ont été isolées à partir de 90 mL de sang provenant de donneurs adultes sains (9 tubes vacutainer + héparine). Tout d'abord, le sang a été centrifugé à 1800 rotations par minutes (rpm) pendant 10 minutes (min) (GS-6R Centrifuge; Beckman, Palo Alto, Ca, É.-U.) afin de dissocier le sérum des éléments figurés du sang. Les cellules leucocytaires se trouvant juste à l'interface sérum-globules rouges, le sérum a

donc été retiré (tube 50 mL, Fisher, Nepean, Ontario, Canada) pour ensuite recueillir la couche cellulaire qui a été suspendue dans un volume de 50 mL de RPMI 1640 (Invitrogen) contenant pen-strep avant d'être centrifugée à 1800 rpm pendant 30 min (Beckman modèle GS-6R) à travers une couche de Ficoll-Hypaque (2x15mL) (Amersham Biosciences, Baie-d'Urfé, Québec, Canada). Le sérum, décomplémenté dans un bain-marie pendant 30 min à 56°C a ensuite été centrifugé à 3000 rpm pendant 20 min (Beckman modèle GS-6R) avant d'être filtré sur filtre 0.20 µm (Corning, New-York, É.-U.). Les anneaux de PBMC ont ensuite été prélevés et lavés dans 50 mL de RPMI 1640 additionné de pen-strep avant d'être de nouveau lavés deux fois pour ensuite regrouper les culots. À la suite du dernier lavage, les cellules ont été resuspendues dans du RPMI complet, contenant 10 mM d'HEPES (Invitrogen), 1 mM de sodium pyruvate (Invitrogen), 0.1 mM d'acides aminés non essentiels (Invitrogen), pen-strep, 1.25 µg/mL de fungizone (Invitrogen). Elles ont été dénombrées à l'aide d'un hémacimètre avant de dissocier les différentes populations cellulaires tel que décrit à la section suivante.

2.1.2.1 Monocytes, macrophages et lymphocytes

Afin de permettre la séparation des différentes populations cellulaires, l'adhésion des monocytes-macrophages a été réalisée en mettant trois millions de cellules par puits dans des plateaux de culture 24 puits (Costar, Corning, Cambridge, MA, É.-U.) et en incubant ces plateaux une heure (h) à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % (v/v) de CO₂. Ensuite, le surnageant contenant les lymphocytes a été recueilli et les puits lavés 3 fois avec du RPMI 1640 complet (tel que décrit à la section 2.1.2) afin de retirer le maximum possible de lymphocytes. Ces derniers ont été mis en culture dans un flacon F75 (75 cm²) pour cellules en suspension (Sarstedt, Montréal, Québec, Canada) avec RPMI complet additionné de 10 % (v/v) de sérum autologue (décomplémenté et filtré) et de 2-mercaptoéthanol (2-Me) 10 U/mL (Invitrogen) à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % (v/v) de CO₂. Concernant les monocytes adhérents en plateaux, une partie a été mise en culture avec RPMI complet additionné de 1 % (v/v) de sérum autologue, tandis que l'autre partie a été amenée à se différencier en macrophages (environ 7 jours) en étant mis en culture avec RPMI complet contenant 10 % (v/v) de sérum autologue. Il

est important de prendre note que ces populations cellulaires n'ont pas la capacité de se multiplier en culture.

2.2 Lignées cellulaires humaines

2.2.1 Promonocytes (THP-1)

La lignée THP-1 est issue d'un clonage de cellules isolées d'une leucémie monocyttaire aiguë (ATCC, Manassas, VA, É.-U.) et nous a été fournie par le laboratoire de Dr Daniel Oth, maintenant retraité de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les cellules ont été maintenues dans du RPMI 1640 (Invitrogen) additionné de 10 % (v/v) de SVF, 1 mM de sodium pyruvate, 0.1 mM d'acides aminés non-essentiels, pen-strep, 2-mercaptoéthanol (2-Me) 10 U/mL.

2.2.2 Adénocarcinome iléorectal (HRT-18)

Les cellules HRT-18 furent établies par Tompkins *et al.* en 1974 et sont utilisées pour la production du coronavirus humain OC43 (Weiss, 1983). Le laboratoire les a obtenues du Dr David Brian de l'Université du Tennessee à Knoxville, États-Unis. Elles ont été cultivées dans du *Earle's Minimum Essential Medium* (MEM) (Invitrogen) additionné de 10 % (v/v) de SVF, 0.1 mM d'acides aminés non-essentiels et pen-strep. Cette lignée a été utile lors des productions virales, du test d'immunoperoxydase indirecte pour déterminer le nombre de particules virales infectieuses (sérotypage OC43) produit par les cellules dont la susceptibilité a été testée, et aussi comme témoin positif en immunofluorescence indirecte et en RT-PCR.

2.2.3 Fibroblastes pulmonaires d'embryons (L-132)

Les cellules L132 ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC). Cette lignée est connue comme étant susceptible au coronavirus humain 229E (Bradburne, 1969) et sert donc à la production de ce virus. Elles ont été cultivées dans du MEM (Invitrogen) additionné de 10 % (v/v) de SVF, 0.1 mM d'acides aminés non-essentiels et pen-strep. Cette lignée a été utile lors des productions virales, du test d'immunoperoxydase indirecte afin de déterminer le nombre de particules virales infectieuses (sérotypé 229E) produit par les cellules dont la susceptibilité a été étudiée, et aussi comme témoin positif en immunofluorescence indirecte et en RT-PCR.

2.2.4 Cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux (HBMEC)

Ces cellules endothéliales proviennent d'un donneur adulte et furent immortalisées à l'aide de l'antigène T de SV40 et fournies par le laboratoire du Dr K.S. Kim, Division des maladies infectieuses de l'Université de médecine Johns Hopkins, Baltimore, É.-U. Contrairement aux cellules primaires, le traitement des flacons à la gélatine n'a pas été nécessaire. Les cellules ont été maintenues en culture dans du RPMI 1640, additionné de 10 % (v/v) SVF, 1 mM de sodium pyruvate, 0.1 mM d'acides aminés non-essentiels, 1 % (v/v) de BME (*Basal medium eagle*) vitamines (Sigma/Aldrich, St-Louis, Missouri, É.-U.), pen-strep, 30 µg/mL de supplément de croissance pour cellules endothéliales (ECGS) et 5 U/mL d'héparine (Gibco BRL, Life Technology, New-York, É.-U.).

Toutes les lignées ont été maintenues dans une étuve à une température de 37°C dans une atmosphère contenant 5 % (v/v) de CO₂ (Forma Scientific, USA).

2.3 Coronavirus humains (HCoV)

2.3.1 Coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43)

Le sérotype HCoV-OC43 (ATCC) fut initialement isolé d'un patient atteint d'un rhume (McIntosh et al., 1967). Les virus utilisés lors des expériences sont issus des cinquième et sixième passages sur la lignée HRT-18 et possédaient des titres viraux de 5.0 et 3.5×10^6 DICT₅₀/mL respectivement lorsque titrés par test d'immunoperoxydase indirecte.

2.3.2 Coronavirus humain 229E (HCoV-229E)

Le sérotype HCoV-229E (ATCC) provient d'un patient qui était affecté par une infection des voies respiratoires supérieures (Hamre et Procknow, 1966). Les stocks viraux utilisés lors des expériences sont issus des cinquième et sixième passages sur la lignée L-132 et montraient un titre viral de 5.0×10^6 DICT₅₀/mL lorsque titré par essai d'immunoperoxydase indirecte.

2.3.3 Production du HCoV

Un stock viral des deux sérotypes de coronavirus humains a été produit. Un sixième passage viral (P6) a été obtenue suite à l'infection de flacons F150 (150 cm²) (Fisher) de L-132 et HRT-18 à environ 70 % de confluence par 229E et OC43 respectivement. Les virus de cinquième passage (P5) ont été mis en contact avec les cellules dans un volume minimal de 5 ml de MEM + 1 % (v/v) SVF ; 229E à une dilution 1/10 et OC43 à une dilution 1/5 additionné de trypsine TPCK (Sigma-Aldrich) à 10 unités/mL. Les cellules ont été incubées pour une période de 2 h à 33°C dans une atmosphère contenant 5 % (v/v) de CO₂ avec agitation occasionnelle, pour ensuite rajouter 10 mL de MEM + 1 % (v/v) SVF avec TPCK concernant OC43. La récolte s'est effectuée après 2 jours pour 229E et après 4 jours pour OC43. Au moment de la récolte, les surnageants ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 30 min (Beckman modèle GS-6R)

pour ensuite être aliquotés et conservés à -80°C . Les titres des 2 productions ont été déterminés par un test d'immunoperoxydase indirecte tel que décrit à la section 2.5.1.

2.4 Tests de susceptibilité des PBMC à l'infection par le HCoV

2.4.1 Infection aiguë et persistante des monocytes et macrophages

Les cellules ont été cultivées en plateaux 24 puits à raison d'environ 150 000 cellules/puits étant donné la proportion de monocytes dans le sang circulant (5 % de 3×10^6 cellules déposées initialement). Les plateaux étaient au nombre de trois pour chacun des types cellulaires afin de permettre 3 temps d'analyse. Après un rinçage au PBS (KCl 2.68 mM; NaCl 137 mM ; KH_2PO_4 1.47 mM ; Na_2HPO_4 8.1 mM) les cellules ont été mises en contact avec l'une ou l'autre des souches virales, en triplicata et à une multiplicité d'infection de 1, avec l'addition de trypsine TPCK (Sigma) à 10 unités/mL pour le HCoV-OC43. Le contact, d'une durée de 2 h à 37°C , a été suivi par trois lavages avec RPMI + pen-strep. Les plateaux ont été remis en culture et afin de s'assurer de l'efficacité des lavages, un volume de surnageant a été prélevé après 30 min d'incubation (Jour 0). Suite à l'infection, les surnageants ont été recueillis et clarifiés par une centrifugation de 5 min à 1200 rpm (Beckman modèle GS-6R) (immunoperoxydase indirecte, section 2.5.1) et les cellules fixées à la paraformaldéhyde 4% (p/v) dans PBS (immunofluorescence indirecte, section 2.5.2) à chaque temps d'analyse, soit 1, 3 et 5 jours post-infection. Afin de déterminer si les HCoV infectent de façon persistante ces types cellulaires, les cellules ont été maintenues en culture jusqu'à 28 jours post-infection, en prenant soin de récolter le surnageant et de rafraîchir le milieu de culture de façon hebdomadaire.

2.4.2 Infection aiguë des lymphocytes

Les cellules ont été comptées suite à une agitation légère des flacons afin de les dissocier et centrifugées pendant 7 min à 1000 rpm (Beckman modèle GS-6R). Celles-ci ont été resuspendues dans du RPMI 1640 complet + 1 % (v/v) sérum autologue entre

5×10^6 et 8×10^6 de cellules/mL (dépendamment de la quantité de cellules isolées au départ). Le contact entre la quantité de cellules établie et les deux sérotypes de coronavirus humains à une MOI de 1 s'effectuait en triplicata dans des pétris de 6 cm de diamètre (VWR) pendant 2h à 37°C, 5 % (v/v) CO₂ + TPCK pour OC43 avec agitations régulières. Suite à trois lavages effectués dans du milieu RPMI 1640 complet sans SVF les cellules ont été transférées dans des flacons F25 (25cm²) pour cellules en suspension (Sarstedt) contenant 8 mL de milieu RPMI 1640 complet + 10 % (v/v) sérum autologue + 2-Me 10 U/mL. Afin de s'assurer de l'efficacité des lavages, un volume de surnageant a été prélevé après 30 min d'incubation (Jour 0). Par la suite, la cueillette des surnageants (immunoperoxydase indirecte, section 2.5.1) et des cellules (cytométrie en flux, section 2.5.3) a eu lieu à différents temps correspondant à 1, 3 et 5 jours post-infection. Les surnageants ont été clarifiés à l'aide d'une centrifugation de 5 min à 1200 rpm (Beckman modèle GS-6R). Les témoins cellulaires non-infectés ont été obtenus en effectuant les mêmes manipulations sauf que l'incubation initiale de 2h s'effectuait en présence de milieu sans virus. Par ailleurs, ce sont les cellules THP-1 qui ont servi de contrôle positif à l'infection en respectant le protocole utilisé pour les lymphocytes, à l'exception que le transfert des cellules après infection se faisait préférablement dans des flacons F75 (75cm²).

2.5 Analyse de la susceptibilité des PBMC

2.5.1 Détection de particules virales infectieuses par immunoperoxydase indirecte extracellulaire

Cette technique a été utilisée pour déterminer et quantifier la production de particules infectieuses par les cellules dont la susceptibilité a été testée. Les lignées HRT-18 et L-132 ont été utiles pour mesurer le HCoV-OC43 et le HCoV-229E respectivement. Les deux lignées cellulaires ont été mises en culture, au préalable, dans des plateaux 96 puits (Costar) de façon à obtenir des feuillets semi-confluent (70 %). Les plateaux ont été vidangés de leur milieu à l'aide d'essuis-tout stériles WYPALL® L20 (Kimberly-Clark ® Corp., Mississauga, Ontario, Canada) et 100 µL/puits de milieu MEM + 1 % (v/v) SVF additionné ou non de 10 U/mL de trypsine-TPCK (Sigma) a été

déposé à l'aide d'une pipette multicanaux. Les échantillons de surnageants ont été soniqués (Branson sonicateur, Shelton, CT, É.-U.) 30 secondes (sec) (pour briser les agrégats) et dilués en série sur le feuillet de cellules susceptibles. En fait, 11 µL de surnageant a été déposé dans le premier puits afin d'obtenir la dilution 10^{-1} et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-8} . Après une incubation de 2h à 33°C, 100 µL de milieu MEM + 1 % (v/v) SVF a été ajouté à chaque puits et l'incubation a été poursuivie jusqu'à 4 (OC43) ou 5 (229E) jours, moment où les cellules ont été lavées avec du PBS puis fixées pendant 20 min avec une solution de peroxyde d'hydrogène 0,3 % (v/v) (Sigma-Aldrich) dans du méthanol 100 %. Celles-ci ont ensuite été séchées à l'air avant d'être mises en contact avec l'ascite de souris anti-229E 5-11H.6 ou avec l'ascite de souris anti-OC43 1-10C.3 tous deux dilués 1/500 (la provenance et la spécificité de ces ascites sont indiquées à la section 2.5.3.1). Les cellules ont été incubées pendant 2h à 37°C avec 5 % (v/v) CO₂ avant d'être lavées à 5 reprises au PBS. Une seconde incubation de 2h à 37°C sans CO₂ avec un anticorps de chèvre 1/1000 couplé à la peroxydase de raifort (HRP) et dirigé contre les IgG de souris (KPL, Gaithersburg, MD, É.-U.) a suivi. Après avoir effectué 5 lavages au PBS, la réaction a été révélée avec 0,025 % (p/v) DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Sigma-Aldrich) dans PBS, filtré sur papier filtre Whatman (Fisher, Nepean, Ontario, Canada) additionné de 33 µL de peroxyde d'hydrogène. La réaction enzymatique a finalement été arrêtée par l'addition d'eau à l'aide d'un flacon laveur. Le titre viral a été calculé par la méthode de Kärber (Payment et Pavilanis, 1980) suite à l'observation colorimétrique au microscope optique. Les virus de passage P6 ont été utilisés comme témoin positif alors que le milieu seul a été utilisé comme témoin négatif.

2.5.2 Détection de protéines virales du HCoV par immunofluorescence indirecte en plateaux (monocytes-macrophages)

Cette technique avait pour but la détection des protéines virales des HCoV suite à la fixation à chaque temps d'analyse des plateaux de monocytes et de macrophages infectés. Ces derniers ont été perméabilisés pendant 5 min à -20°C à l'aide de méthanol avant d'être incubés une heure à température pièce avec 5 % (v/v) SVF dans PBS-Tween-20 (0.1 %) (v/v) (Anachemia, Lachine, Montréal, Québec, Canada) afin de

bloquer les espaces de plastique libres avec lesquels les anticorps peuvent se lier de façon non-spécifique. Par la suite, le contact avec les anticorps primaires s'est effectué, pendant une heure à 37°C. Les anticorps 5-11H.6 (229E) et α HEV-4-E11.3 pool 6.94 (reconnaissant la protéine N du sérotype OC43 et produit au laboratoire tel que décrit à la section 2.5.3.1) ont été utilisés à une dilution 1/1000 dans du PBS. Après 3 lavages au PBS, pour enlever les anticorps primaires non liés, le contact d'une heure à 37°C avec l'anticorps secondaire anti-souris Alexa Fluor FITC (Molecular Probes, Eugene, Oregon, É.-U.) 1/1000 a suivi. Trois lavages ont été nécessaires après la dernière incubation avant de passer en microscopie à fluorescence. Les cellules ont été laissées dans le PBS et conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Étant donné que les anticorps primaires anti-HCoV sont d'isotype IgG1, l'un a été le contrôle négatif de l'autre et vice-versa. De plus, un montage sur lames de verres (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, É.-U.) traitées à la poly-L-lysine (1 mg/mL dans eau distillée) (Sigma-Aldrich), de THP-1 infectées par les deux sérotypes de HCoV a servi de contrôle positif d'immunofluorescence (voir infection des PBMC pour protocole). Afin de mettre sur lames les THP-1 en suspension, ces dernières ont été culottées par centrifugation et lavées avec du PBS avant d'être resuspendues à 1×10^6 cellules/mL. Ensuite, 30 μ L de la suspension cellulaire a été déposé dans les puits traités et les lames incubées pendant 10 min à température ambiante. Les cellules ont par la suite été fixées, pendant 20 min, à l'aide d'acétone (Anachemia) pré-refroidi pour enfin assécher les lames à l'air et les congeler à -20°C si le marquage n'était pas fait dans l'immédiat. Les conditions de marquage ont été exactement les mêmes que pour les plateaux de monocytes et macrophages.

2.5.3 Détection de protéines virales du HCoV par cytométrie en flux (lymphocytes)

C'est au moment des récoltes aux jours 1, 3 et 5 post-infection que la préparation des lymphocytes pour la cytométrie en flux a été effectuée. La même série de manipulations a été répétée avec la lignée THP-1 servant de témoin positif à l'infection. Pour chaque condition (non-infectées (n.i.), contact avec le HCoV-229E, contact avec le HCoV-OC43) et pour chaque temps d'analyse, 3×10^6 de cellules ont été nécessaires. Celles-ci ont été lavées dans du PBS, centrifugées à 1200 rpm pendant 5 minutes

(Beckman modèle GS-6R) et resuspendues dans du BSA 1 % (p/v) dans PBS et réparties dans 3 tubes Eppendorf (Fisher) distincts afin d'avoir 1×10^6 cellules/50 μ L/tube. Aux culots cellulaires ont été ajoutés 10 μ L des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 1-10C.3 F(ab')₂ et une incubation de 30 min à 4°C a suivi. Ces derniers utilisés à une concentration optimisée de 1 μ g pour 1×10^6 cellules, ont été utiles pour la détection de la protéine S des HCoV-229E et HCoV-OC43 respectivement. Aussi, étant donné que ces deux anticorps appartiennent au groupe isotypique IgG1, l'un a été le témoin négatif de l'autre et vice-versa. Afin de se débarrasser des anticorps libres, trois lavages au PBS ont précédé une deuxième incubation de 30 min, à 4°C et à la noirceur, avec 10 μ L par tube de F(ab')₂ de chèvre couplé à la phycoérythrine dilué 1/100 (DAKO Diagnostics Canada Inc, Mississauga, Ontario, Canada) et dirigé contre les IgG de souris. Suite à trois autres lavages au PBS, les cellules ont été transférées en tubes à cytométrie en polystyrène à fond rond (Becton Dickinson) et fixées pendant une heure à température pièce, à l'aide d'une solution de PBS contenant 2 % (p/v) de paraformaldéhyde à pH 7,2 diluée 1 : 1 dans PBS 1X. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un cytomètre calibre de Becton Dickinson.

2.5.3.1 Production de fragments F(ab')₂

La production de fragments F(ab')₂ a été une nécessité suite à la confirmation de l'attachement non-spécifique des anticorps complets via les récepteurs Fc des anticorps (Ac) complets lors des expériences de cytométrie en flux.

Les Ac choisis pour la production de fragments ont été les ascites de souris 5-11H.6 et 1-10C.3 détectant la protéine S de 229E et OC43 respectivement. Ces deux Ac furent produits dans le laboratoire à l'aide de souris BALB/c immunisées par les deux sérotypes de coronavirus humains. Tout d'abord, après clarification à 3500 rpm pendant 15 min (Beckman modèle GS-6R), les Ac ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur une colonne de Protéine-A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, É.-U.). Le principe de cette colonne repose sur la liaison des Ac à la protéine A par l'intermédiaire de leur portion Fc à pH légèrement basique (8.5) et l'élution de ceux-ci à

l'aide d'un tampon acide pH 4. Les Ac ont été recueillis en fractions dont l'absorbance a été mesurée, seulement celles correspondant au pic ont été regroupées et dialysées contre du PBS 0.5X à trois reprises pendant des périodes de 4 à 6 h. Les ascites ont ensuite été concentrés environ 10X (20mL au départ à 2mL après concentration) à l'aide de carboxyméthylcellulose (Aquacide II, Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA, USA) avant d'être dosés par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) qui consiste en la lecture de la densité colorimétrique par lecteur d'absorbance (STL-labinstruments, Autriche). Le test colorimétrique a été mis au point par Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Par la suite, la digestion avec la pepsine a été requise pour l'obtention des fragments $F(ab')_2$. Une solution de 1 mg/mL de pepsine (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) a été préparée dans du tampon citrate 0,1 M pH 3. Les échantillons d' Ac ont été acidifiés à pH 3,5 avec du tampon acide citrique 0,01 M (pH 2,8), et additionnés de 100 unités enzymatiques de pepsine/mg et placés dans un bain-marie à 37°C. Le temps optimal de digestion d'une heure fut déterminé précédemment dans le laboratoire. La réaction enzymatique a ensuite été neutralisée par du Tris-HCl 3M (pH 8,8) et les produits de réaction purifiés sur une colonne de Protéine-A-Sépharose. Les fractions contenant les $F(ab')_2$ ont été récupérées alors que les portions Fc seules ou les Ac complets restèrent liés à la colonne. Les fractions contenant les $F(ab')_2$ ont été mises ensembles et dialysées comme précédemment contre du PBS 0.5X pour être ensuite concentrées par Aquacide II et dosées. Les produits de digestion ont été déposés sur un gel Tris-Tricine 10 % dans le but de s'assurer de l'efficacité de la digestion (poids moléculaire des $F(ab')_2$: 100 kDa). De plus, par immunofluorescence indirecte (se référer à la section 2.7.2 pour la méthode), à l'aide de lames L-132 et HRT-18 infectées, il a été possible de valider la reconnaissance et la spécificité des $F(ab')_2$ obtenus en les utilisant aux dilutions 1/500 et 1/100.

2.6 Tests de susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau humain à l'infection par le HCoV

2.6.1 Infection aiguë de la lignée HBMEC et des cellules endothéliales en culture primaire

Les cellules HBMEC et les cellules endothéliales en culture primaire ont été mises en culture en Pétris de 10 et 6 cm de diamètre (VWR), respectivement dans leur milieu de maintenance de façon à atteindre une confluence d'environ 70 % en 2-3 jours. Les Pétris devant accueillir la culture primaire ont été préalablement traités avec de la gélatine 0.5 % (p/v) pendant deux heures à 37°C. Le jour du contact avec les virus, un Pétri a été utilisé dans le but de faire le décompte cellulaire afin d'utiliser une MOI la plus juste et reproductible possible. Après un rincage au PBS, les deux sérotypes de coronavirus humains des passages P5 et P6, aux dilutions appropriées dans du milieu RPMI 1640 (HBMEC) et M199 (cellules primaires) contenant 1 % (v/v) SVF ont été déposés sur les tapis cellulaires, en duplicata, et un contact d'une durée de 2h à 37°C a suivi, à une MOI de 1 avec l'addition de TPCK concernant OC43. Des témoins n.i. ont été produits en incubant les cellules avec du milieu seulement. Suite à trois lavages avec du milieu RPMI 1640 ou M199 sans sérum, les cellules ont été remises en culture avec du milieu de maintenance et afin de s'assurer de l'efficacité des lavages, un volume de surnageant a été prélevé après 30 min d'incubation (Jour 0). Par la suite, d'autres échantillons de surnageant ont été recueillis et clarifiés aux jours 1, 2, et 4 post-infection afin d'évaluer la présence de virus nouvellement produits (immunoperoxydase indirecte extracellulaire, section 2.7.1). De plus, aux jours 1 et 4 post-infection, les cellules ont été trypsinées et d'une portion de celles-ci, l'ARN a été extrait par la méthode du Trizol® LS (Invitrogen) en suivant les étapes conformément aux recommandations du fabricant, pour évaluer la présence des ARN viraux par RT-PCR (section 2.7.3 et 2.7.4). Par ailleurs, l'autre partie cellulaire a subi trois lavages au PBS avant d'être resuspendue et de subir trois cycles de congélations-décongélations afin de récupérer les virus intracellulaires. Les surnageants provenant du contenu cytoplasmique ont été conservés en vue du test d'immunoperoxydase indirecte intracellulaire (section 2.7.1). Des témoins à 4°C ont été également réalisés en effectuant les mêmes manipulations sur glace, ce qui permet

l'attachement des virus mais pas leur pénétration. Afin d'évaluer la possibilité d'infection persistante, les cellules HBMEC ont été maintenues en culture et passées de façon hebdomadaire pendant 6 semaines au terme des prélèvements. Des échantillons de surnageants recueillis lors des passages ont servi à l'évaluation de la production de particules infectieuses.

2.6.2 Infection aiguë de la lignée HBMEC sur lames LABTEK

Après avoir été trypsinées, les cellules ont été comptées et resuspendues à 5×10^5 /mL dans du milieu de maintenance additionné de 1 % (v/v) SVF. Ensuite, une partie de suspension virale de passage P5 a été additionnée à une partie de la suspension cellulaire dans un tube, et ce, pour les deux sérotypes de HCoV et donc avec addition de TPCK pour OC43. Les mélanges cellules-virus ont été déposés dans les puits de lames LABTEK stériles (Nalge Nunc Inter. Corp., Naperville, É.-U.), à raison de 100 μ L/puits, 2 lames par conditions (n.i., 229E et OC43) et une incubation d'une durée de 3 jours à 37°C a suivi. Un rinçage des lames au PBS a précédé leur fixation de 10 min à l'aide d'acétone pré-refroidi à -20°C. Les lames ont été séchées à l'air et conservées à -20°C jusqu'au jour de révélation par immunofluorescence indirecte (section 2.7.2).

2.7 Analyse de la susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau humain à l'infection par le HCoV

2.7.1 Détection de particules virales infectieuses par immunoperoxydase indirecte intra- et extra-cellulaire

Telle que décrit à la section 2.5.1

2.7.2 Détection de protéines virales du HCoV par immunofluorescence indirecte

Après décongélation des lames HBMEC fixées, les ascites anti-coronavirus 5-11H.6 (anti-S de 229E), 1-10C.3 (anti-S de OC43), 3-10H.5 (reconnaissant la protéine N du sérotype 229E et produit au laboratoire tel que décrit à la section 2.5.3.1) ou 4-9H.5 (reconnaissant la protéine S du sérotype 229E et produit au laboratoire tel que décrit à la

section 2.5.3.1) et le sérum hyper-immun anti-OC43 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland) ont été déposés sur celles-ci à des dilutions 1/500 et 1/1000 et une incubation d'une heure à 37°C a suivi. Suite à 5 lavages au PBS, les cellules fixées sur lames ont été mises en contact avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la FITC 1/500 (Cappel, Organon Teknika Corp., West Chester, PA.) pendant 45 min à 37°C. Finalement, c'est après 5 lavages au PBS et un lavage à l'eau distillée que les lames ont été montées au glycérol-PBS (9:1) (Gibco BRL, Life Technologies, New York, É.-U.) et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les témoins positifs étaient les cellules L-132 et HRT-18 infectées par le HCoV-229E ou le HCoV-OC43, respectivement.

2.7.3 Préparation de l'ADNc (transcription inverse)

Cinq µg d'ARN total, préalablement extrait en utilisant le Trizol® LS (Invitrogen), a été combiné à 10 pmol d'oligo d(T) (Service de synthèse d'oligonucléotides, INRS), complété dans un volume total de 29 µL avec de l'eau diéthylpyrocarbonate (DEPC) dans des tubes pour PCR (Sarstedt). Les tubes ont été incubés 5 min à 65°C et mis immédiatement sur glace. Vingt et un µL de mélange pour la transcription inverse a été ajouté à chacun des tubes. Ce mélange contenait 50 U de transcriptase inverse de *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV) (Invitrogen), 60 U d'inhibiteur de RNases RNA Guard™ (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 0,4 mM de déoxynucléotides triphosphates (dNTP)-sels de Na (USB, Cleveland, Ohio, É.-U.), tampon RT 5X (Gibco, BRL), 10 mM de dithiothréitol (DTT) (Gibco, BRL). La transcription inverse a été réalisée à 37°C pendant 90 min dans un thermocycleur (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA). L'ADNc a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Des extraits totaux d'ARN de cellules L-132 et HRT-18 infectées ont servi de témoins positifs.

2.7.4 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La première paire d'amorces E7 et E9 utilisées pour le PCR fut préalablement définie par Schreiber *et al.*, (1989) et sont des oligonucléotides de 20 pb (20-mers) ayant 55% de GC et une Tm de 59°C. E7 correspondait aux nucléotides 819 à 838 sur l'ARNm 7 codant pour la protéine de la nucléocapside (N) du HCoV-229E et sa séquence était 5'TCTGCCAAGAGTCTTGCTCG-3'. E9, quant-à elle, correspondait aux nucléotides 1035 à 1054 sur l'ARNm 7 codant la protéine de la nucléocapside (N) du HCoV-229E et sa séquence était 5'-AGCATAGCAGCTGTTGACGG-3'. La taille attendue de l'amplicon généré par ces amorces est de 235 pb.

La deuxième paire d'amorces, soit O1 et O3, fut préalablement définie par Stewart *et al.*, (1992) et représentait des oligonucléotides de 24 pb (24-mers) ayant 54% de GC et une Tm de 66°C et 65°C. O1 correspondait aux nucléotides 215 à 238 sur l'ARNm 7 codant pour la protéine de la nucléocapside du HCoV-OC43 et sa séquence était 5'-CCCAAGCAAAGCTGCTACCTCTCAG-3'. O3, quant-à lui, comportait les nucléotides 497 à 520 sur l'ARNm 7 codant la protéine de la nucléocapside (N) du HCoV-OC43 et sa séquence était 5'- GTAGACTCCGTCAATATCGGTGCC-3'. La taille attendue de l'amplicon généré par ces amorces est de 305 pb (Kamahora *et al.*, 1989).

Cinq µL de l'ADN complémentaire ont été ajouté à 45 µL de mélange à PCR. Ce mélange contenait le tampon 10X (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 2 mM MgCl₂ (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) et 50 pmol et 20 pmol de chaque amorce pour HCoV-229E et HCoV-OC43, respectivement, le tout complété avec de l'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC). Les tubes ont été placés dans le thermocycleur pour subir une incubation de 5 min à 94°C afin de dissocier les brins d'ADN. Ensuite, pendant la stabilisation de la température à 60°C pour 5 min, 2,5 U de *rTaq* DNA polymérase (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) a été ajouté avant que le thermocycleur effectue 30 cycles de 2 min à 72°C, 1 min à 94°C et 2 min à 60°C. Les réactions de PCR se sont

terminées par une période d'élongation de 10 min à 72°C. Les tubes ont été conservés à 4°C jusqu'au dépôt sur gel.

Dix μL des produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1 % (p/v) additionné de bromure d'éthide (EtBr), puis soumis à une migration de 120 V pendant environ 40 min. Les bandes représentant les amplicons d'ADN ont été visualisées par transillumination à l'aide d'une lampe UV en utilisant le IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, É.-U.).

L'amplification du gène de la *GAPDH* à partir des échantillons a permis de s'assurer de la présence d'ARN et de son intégrité. Les séquences des amorces utilisées sont : 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'

5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

et permettent l'obtention d'un amplicon d'une taille de 307 pb après 25 cycles à 55°C (Tokunaga *et al.*, 1987).

2.8 Barrière hémato-encéphalique (BHE) *in vitro* pour test de passage du HCoV libre

Lors de la mise au point de la BHE, divers modèles ont été testés afin d'avoir un système efficace, de qualité et permettant de tirer de l'information valable. La barrière à établir consistait en une couche de cellules endothéliales en contact avec du milieu astrocytaire conditionné cultivées sur inserts.

Modèle 1 : inserts de polyéthylène 1 μm (Falcon) traités de manière stérile à la gélatine type B provenant de peau de bovin 0,5 % (p/v) (Sigma-Aldrich)

Les membranes ont été traitées avec 1 mL de gélatine pendant 2h à 37°C et le surplus a ensuite été enlevé sans rincer.

Modèle 2 : inserts polyéthylène 1 μm traités de manière stérile au collagène I (rat tail collagen, BD Biosciences ; 3.4 mg/ml)

Les membranes ont été traitées avec 1mL de collagène 1X (2.5 mL acide acétique 10 % + 490 mL d'eau milli Q + 8 ml collagène 3.4 mg/mL) pendant 2h à température pièce pour ensuite être rincées à deux reprises avec du PBS stérile.

Modèle 3 : inserts Bio-coat pré-traités au collagène I, 1 μ m (BD Labware)

Après avoir trypsiné la lignée HBMEC ou les cellules endothéliales en culture primaire, celles-ci ont été déposées sur les membranes installées dans les puits de plateaux 12 puits (Costar) à raison de :

HBMEC : 50 000, 75 000, 100 000, 150 000, 250000, 500 000

cellules/membrane dans un volume de 500 μ L de milieu

Culture primaire : 50 000, 75 000, 100 000, 150 000 cellules/membrane dans un volume de 500 μ L de milieu

Dans les puits, sous la membrane, a été déposé 750 μ L de milieu pour cellules endothéliales respectif à la lignée et à la culture primaire et 750 μ L de milieu conditionné astrocytaire. Le milieu astrocytaire utilisé était un stock congelé provenant de la culture de la lignée humaine d'astrocytes fœtaux, SV-FHAS immortalisée avec l'antigène grand T de SV-40 (obtenue du Dr Stanimirovic de l'Institut des sciences biologiques du *National Research Council*, Ottawa, Ontario). Le stock a été généré précédemment dans le laboratoire en cultivant les SV-FHAS jusqu'à 80 % de confluence dans un milieu DMEM contenant 5 % (v/v) de SVF pour ensuite changer le milieu avec du milieu contenant 1 % (v/v) de SVF. Les cellules ont été remises en culture pour 48h à 37°C pour ensuite récupérer et filtrer le milieu (filtre 0.22 μ m) et congeler des aliquots à -20°C.

Les inserts ont été mis en culture à 37°C et l'évolution du tapis cellulaire a été suivie à tous les jours en microscopie et l'étanchéité de la barrière a été déterminée en mesurant la résistance électrique (MILLICELL[®]-ERS, Millipore Corporation, Bedford, MA.).

3. RÉSULTATS

3.1 Susceptibilité des lymphocytes, monocytes et macrophages (PBMC) à l'infection

Un des objectifs de ce projet était d'évaluer la susceptibilité de cellules mononucléaires en culture primaire à l'infection par le HCoV, afin de déterminer dans quelle mesure ce dernier serait apte à utiliser ces cellules pour atteindre le SNC. Les cellules mononucléaires provenant de sang périphérique de donneurs sains ont été dissociées en trois populations cellulaires distinctes les plus pures possible, les lymphocytes, monocytes et macrophages, avant le contact avec les deux sérotypes de HCoV. La méthode d'isolement classique des monocytes, l'adhésion au plastique (section 2.1.2.1), a été utilisée après la purification des PBMC par Ficoll-Hypaque. La « contamination » par les lymphocytes fut importante malgré les rinçages effectués. Toutefois, il est normal de constater une contamination de 40-50% dans la première heure suivant l'adhésion cellulaire et ce, suite à 2 rinçages et 30% suite à 5 rinçages (Almeida *et al.*, 2000). Cette présence lymphocytaire indésirable s'est estompée avec le temps en culture et les lavages réguliers des tapis monocytaires ont permis le décollement des lymphocytes. Les cultures de macrophages, quant à elles, furent d'une grande pureté. En effet, après 7 jours de différenciation, les tapis cellulaires n'étaient constitués que de cellules à aspect macrophagique. De plus, ce sont les lymphocytes qui ont toujours été récupérés en plus faible quantité en raison des pertes occasionnées par la méthode de dissociation sur plastique. De manière générale, le degré de pureté des différentes populations était suffisant pour l'étude visée.

3.1.1 Susceptibilité des lymphocytes

Le contact des lymphocytes avec le HCoV a été analysée par la détection de la production de particules infectieuses (immunoperoxydase indirecte) et la détection de protéines virales (cytométrie en flux). En se référant aux tableaux synthèse (Tableau 3 et 4), on peut constater qu'aucun virus n'a pu être détecté dans le milieu extracellulaire aux temps analysés, soit 1, 3, 5 et 7 jours post-infection et ceci, pour les deux sérotypes

viraux. Sachant que l'absence de production virale n'implique pas que la cellule est réfractaire à l'infection, la recherche de protéines virales en cytométrie en flux, a permis de mieux caractériser l'infection. Ainsi, tel qu'illustré à la Figure 5, la détection des protéines S du HCoV-229E et HCoV-OC43 à la surface des lymphocytes aux jours post-infection déterminés, s'est avérée aussi négative. L'autofluorescence des cellules est observée (cellules non marquées avec Ac) et en effet, pour chacun des temps d'analyse, le déplacement de la fluorescence en pourcentage (%) de cellules représenté par les colonnes, s'avère non significatif. L'efficacité des F (ab')₂ utilisés pour la détection des protéines virales a été confirmée par l'infection de la lignée promonocytaire THP-1, susceptible au HCoV. Idéalement, les monocytes en culture primaire auraient dû servir de témoins positifs afin d'éviter les cellules transformées et d'être en présence d'expériences avec des paramètres impeccables. Toutefois, étant donné la susceptibilité variable d'un donneur à l'autre de ces cellules pour le HCoV-229E et leur résistance face au HCoV-OC43, ils n'ont donc pas été des témoins de choix. La détection de la protéine S du HCoV-229E est importante après 1 j.p.i. tandis que c'est aux jours 3 et 5 post-infection que la détection de la protéine S du HCoV-OC43 a été maximale.

Tableau 3. Susceptibilité des PBMC à l'infection par le HCoV-229E

		<u>Titres viraux de supernageant aux jours post infection (log DICT₅₀/mL) :</u>				
Donneur/cellules		1	3	5	7	28
1.	1	3.16 ± 0.58	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	2	3.61 ± 0.38	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
2.	1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
3.	1	2.72 ± 0.19	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	2	3.17 ± 0.34	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
4.	1	3.06 ± 0.51	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
5.	1	3.17	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	2	4.94 ± 0.20	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
6.	1	3.39 ± 0.51	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	2	5.06 ± 0.20	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
7.	1	4.00 ± 0.70	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5

1 : monocytes

2 : macrophages

3 : lymphocytes

nd : non-déterminé

Tableau 4. Susceptibilité des PBMC à l'infection par le HCoV-OC43

		<u>Titres viraux de supernageant aux jours post infection (log DICT₅₀/mL) :</u>				
<u>Donneur/cellules</u>		<u>1</u>	<u>3</u>	<u>5</u>	<u>7</u>	<u>28</u>
1.	1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
2.	1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
3.	1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
4.	1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
5.	1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	nd
6.	1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
7.	1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
	3	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5

1 : monocytes

2 : macrophages

3 : lymphocytes

nd : non-déterminé

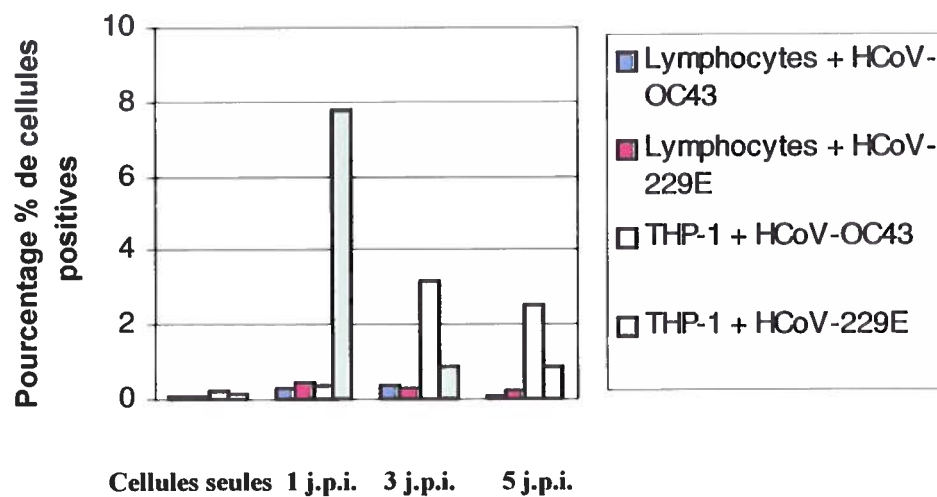


Figure 5. Détection de la présence de la protéine S du HCoV-229E et du HCoV-OC43, par cytométrie en flux, à la surface des lymphocytes en culture primaire provenant du donneur 3 (représentatif de l'ensemble des donneurs) et de la lignée THP-1, cette dernière représentant le témoin positif.

Par ailleurs, la reconnaissance et la spécificité des $F(ab')_2$ a aussi été vérifiée en immunofluorescence sur des lames de L-132 et HRT-18 infectées respectivement par le HCoV-229E et le HCoV-OC43 (Figure 6).

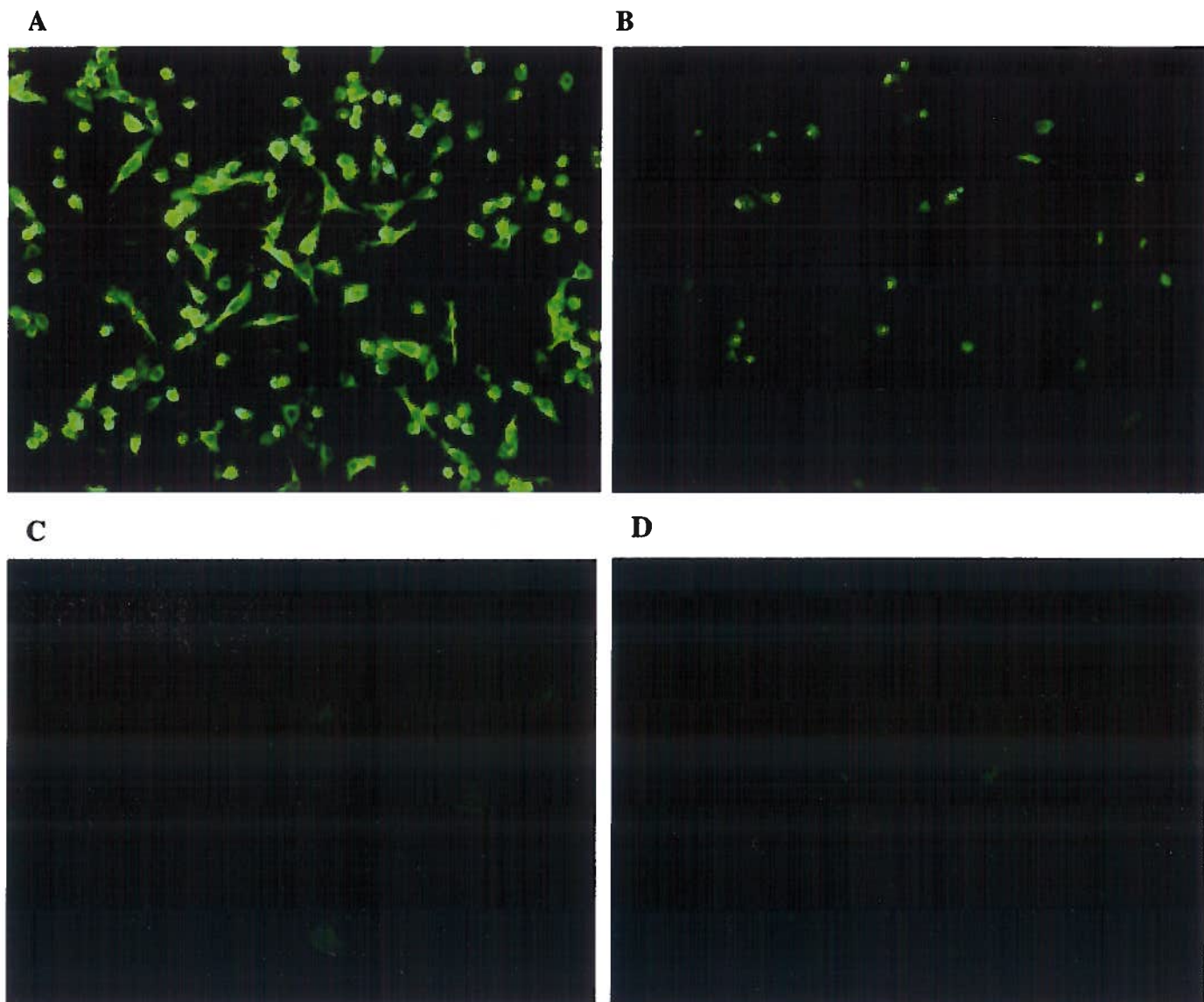


Figure 6. Validation de la reconnaissance et de la spécificité des $F(ab')_2$ utilisés en cytométrie en flux pour évaluer la susceptibilité des lymphocytes à l'infection par le HCoV. (A) $F(ab')_2$ 5-11H.6 1/500 sur L-132 infectées par le HCoV-229E ; (B) $F(ab')_2$ 1-10C.3 1/500 sur HRT-18 infectées par le HCoV-OC43 ; (C) $F(ab')_2$ 5-11H.6 1/500 sur HRT-18 infectées par le HCoV-OC43 ; (D) $F(ab')_2$ 1-10C.3 1/500 sur L-132 infectées par le HCoV-229E.

En résumé, les lymphocytes sont non-susceptibles à l'infection par le HCoV puisqu'aucune production détectable de virus ni de détection significative de protéines virales n'ont été observées.

3.1.2 Susceptibilité des monocytes et macrophages au HCoV-229E

Des résultats forts importants ont été obtenus dans l'évaluation de la susceptibilité des monocytes et des macrophages par le HCoV. En effet, ces cellules se sont montrées permissives à l'infection par le sérotype 229E en permettant la production de particules infectieuses (Tableau 3). En ce qui a trait au contact avec le sérotype OC43, les cellules se sont montrées non permissives à la multiplication virale. Il est intéressant de constater la variabilité de la susceptibilité des monocytes et macrophages à l'infection par le HCoV dans le groupe de donneurs sains. Effectivement, sur la totalité des donneurs (7), un de ceux-ci a offert une résistance totale à l'infection (donneur 2). Par ailleurs, deux d'entre eux ont démontrés une permissivité de leurs monocytes circulants à l'infection par le sérotype 229E mais une résistance après différenciation de ces cellules en macrophages (donneurs 4 et 7). Les autres participants quant à eux ont montrés une susceptibilité des monocytes et des macrophages (Tableau 3).

Pour les deux types cellulaires, c'est seulement au jour 1 post-infection qu'un titre viral a été détecté et pour un même donneur le titre a été plus important pour les macrophages. Afin de s'assurer que les particules virales détectées à 1 j.p.i ne soient pas que des virus résiduels dû à un mauvais lavage après le contact, la prise de surnageant 30-45 min (Jour 0) après le rincage pour confirmer l'efficacité des lavages était nécessaire. Aucune particule n'a été trouvée au jour 0 (résultats non-montrés) et la détection de protéines virales en immunofluorescence indirecte a fournit une preuve supplémentaire de la susceptibilité des monocytes et macrophages au HCoV-229E. En effet, les monocytes et macrophages ont démontré une réponse fortement positive au marquage de la protéine S du HCoV-229E à 1 j.p.i, réponse qui a diminué en intensité et en pourcentage de cellules positives jusqu'au jour 5 p.i (Figure 7). Le marquage spécifique de l'Ac est validé par le témoin isotopique où les cellules ne présentent aucune fluorescence.

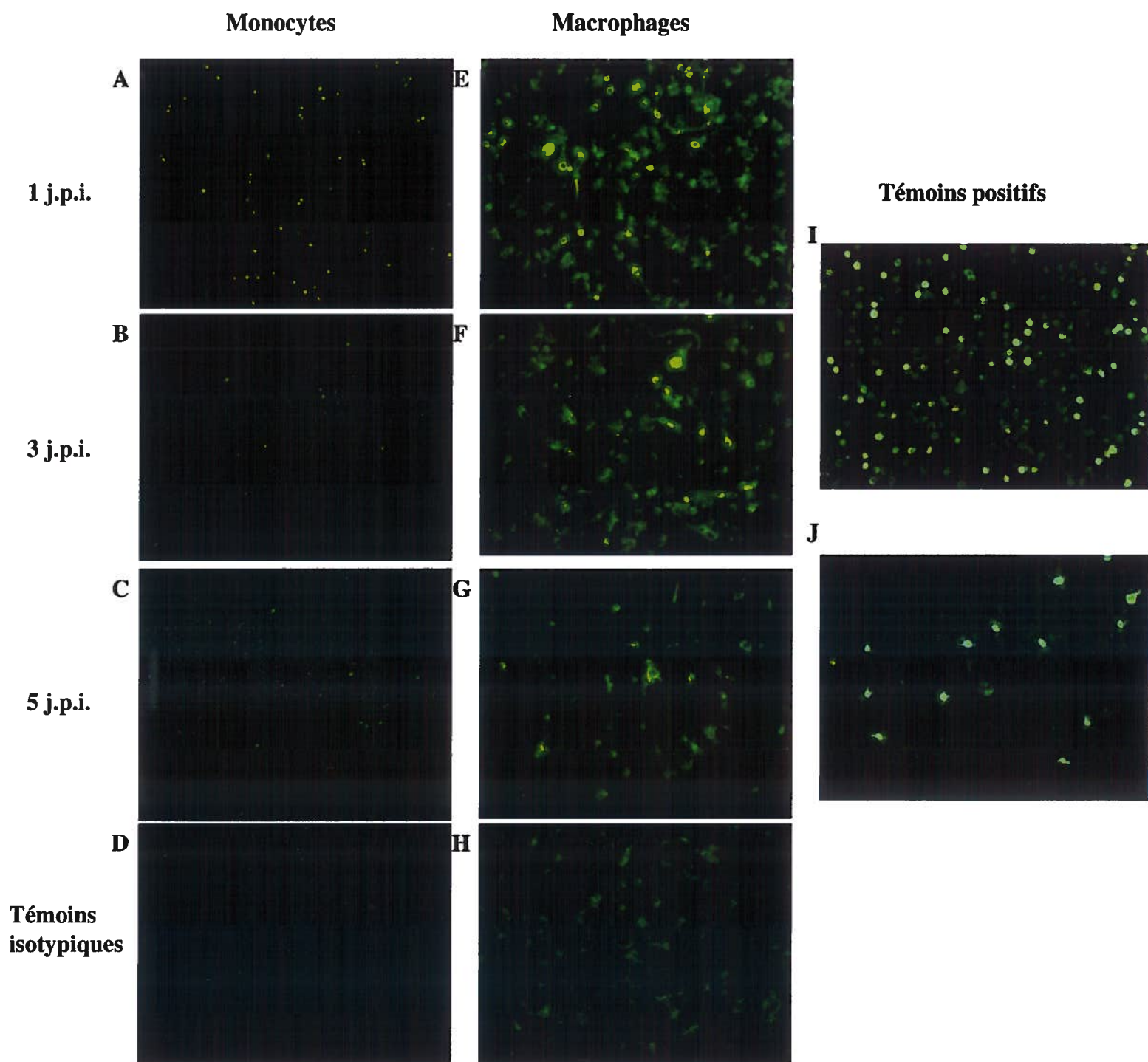


Figure 7. Détection des antigènes viraux sur les monocytes et macrophages en culture primaire (donneur 6) infectés par le HCoV-229E par immunofluorescence indirecte en utilisant un Mab dirigé contre la protéine S du sérotype 229E (5-11H.6). (A) Monocytes marqués à 1 j.p.i. ; (B) à 3 j.p.i. ; (C) à 5 j.p.i. et ; (D) avec le témoin isotypique α -HEV 4-E11.3 ; (E) Macrophages marqués à 1.j.p.i. ; (F) à 3 j.p.i. ; (G) à 5 j.p.i. et ; (H) avec le témoin isotypique α -HEV 4-E11.3 ; (I) THP-1 infectées par HCoV-229E et marquées à 1 j.p.i et ; (J) infectées par HCoV-OC43 et marquées à 3 j.p.i. avec l'Ac α -HEV 4-E11.3 dirigé contre la protéine N du sérotype OC43.

Le témoin positif des marquages par immunofluorescence a été la lignée promonocytaire THP-1. La forte susceptibilité des THP-1 aux deux sérotypes de coronavirus est illustrée à la Figure 7 (I et J).

Par ailleurs, la détection d'antigènes viraux du HCoV-OC43 dans les monocytes et macrophages en immunofluorescence s'est avérée négative (résultats non-montrés).

De plus, fait intéressant, l'infection des macrophages par le HCoV-229E donne lieu à des changements « cytomorphologiques ». La Figure 8 permet de constater que dès le premier jour post-infection, les cellules ont pris du volume comparativement aux cellules non-infectées et aux cellules ayant été en contact avec le HCoV-OC43.

Ainsi, les monocytes et macrophages en culture primaire provenant de volontaires sains se sont avérés susceptibles à l'infection par le HCoV-229E. Bien qu'il y ait des différences de susceptibilité « inter-donneurs », ces cellules supportent, en effet, la réplication de ce virus puisque des particules virales infectieuses ont été trouvées dans le surnageant. La détection de protéines virales est venue corroborer ce résultat. Les macrophages ont produit des titres viraux plus élevés que les monocytes et ont subi des changements morphologiques suite à l'infection.

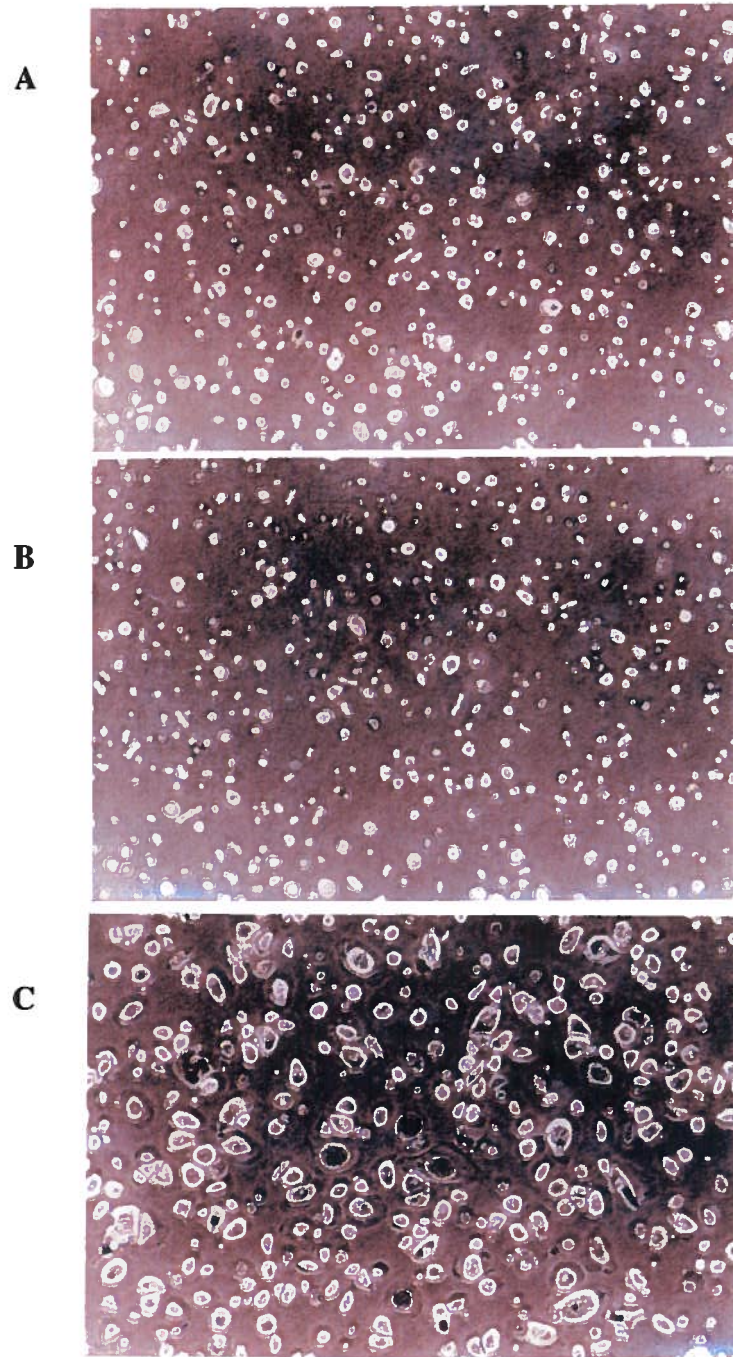


Figure 8. Cultures primaires de macrophages humains provenant du sang périphérique d'un volontaire sain (donneur 1). (A) Macrophages non-infectés, 8^e jour en culture dans du milieu contenant 10 % (v/v) de sérum autologue ; (B) 1 j.p.i. après un contact de 2 h avec HCoV-OC43 à une MOI de 1; (C) Morphologie des macrophages à 1 j.p.i après un contact de 2 h avec HCoV-229E à une MOI de 1.

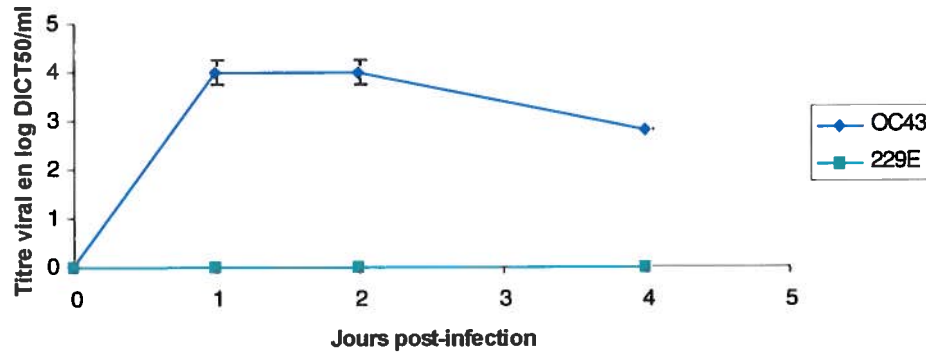
3.2 Susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau humain à l'infection

Afin d'appuyer notre hypothèse voulant que le HCoV pénètre le SNC par la BHE via la circulation sanguine, la susceptibilité d'une lignée de cellules endothéliales de cerveau humain et de cellules primaires à l'infection par le HCoV a été vérifiée.

La cinétique d'infection de la lignée HBMEC par le sérotype OC43 a révélé que c'est au premier et au deuxième jour p.i que le titre infectieux a été maximal (4×10^6 DICT₅₀/mL)(Figure 9).

Pour apporter davantage d'éléments à l'évaluation de la susceptibilité des cellules HBMEC à l'infection par le HCoV-229E, s'avérant à tout le moins non-productive par l'absence de détection de particules infectieuses, un test d'immunoperoxydase indirecte intracellulaire a été effectué. Aucune particule n'a pu être détectée par cette méthode, laissant supposer que les cellules ne sont pas susceptibles au sérotype 229E (résultats non-montrés).

A



B

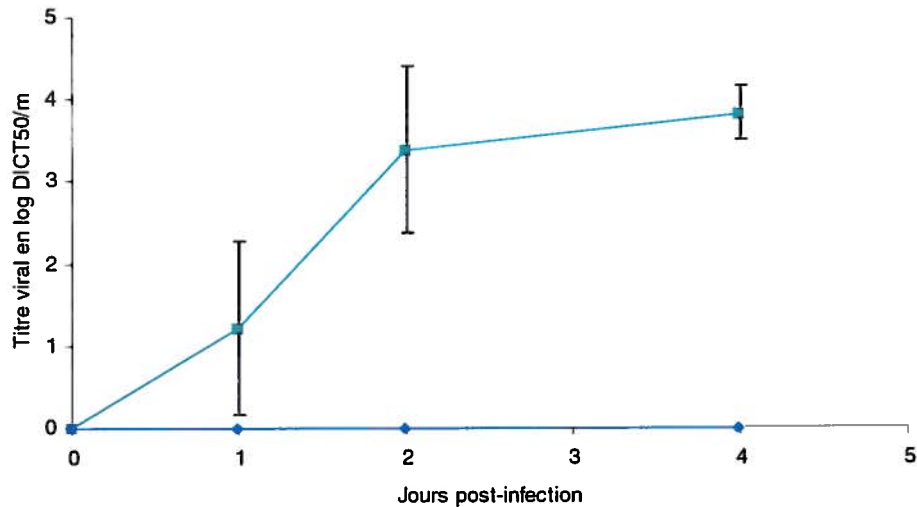


Figure 9. Titres infectieux à 1, 2 et 4 jours post infection obtenus suite à l'infection de cellules endothéliales cérébrales humaines par le HCoV. Ces résultats consistent en la moyenne des résultats de trois expériences indépendantes. (A) Détection de la réplication virale suite au contact de la lignée HBMEC avec les deux sérotypes de HCoV et; (B) suite au contact des cellules endothéliales en culture primaire avec les deux sérotypes de HCoV.

De plus, des résultats supplémentaires confirment la susceptibilité des HBMEC au HCoV-OC43 par immunofluorescence (Figure 10).

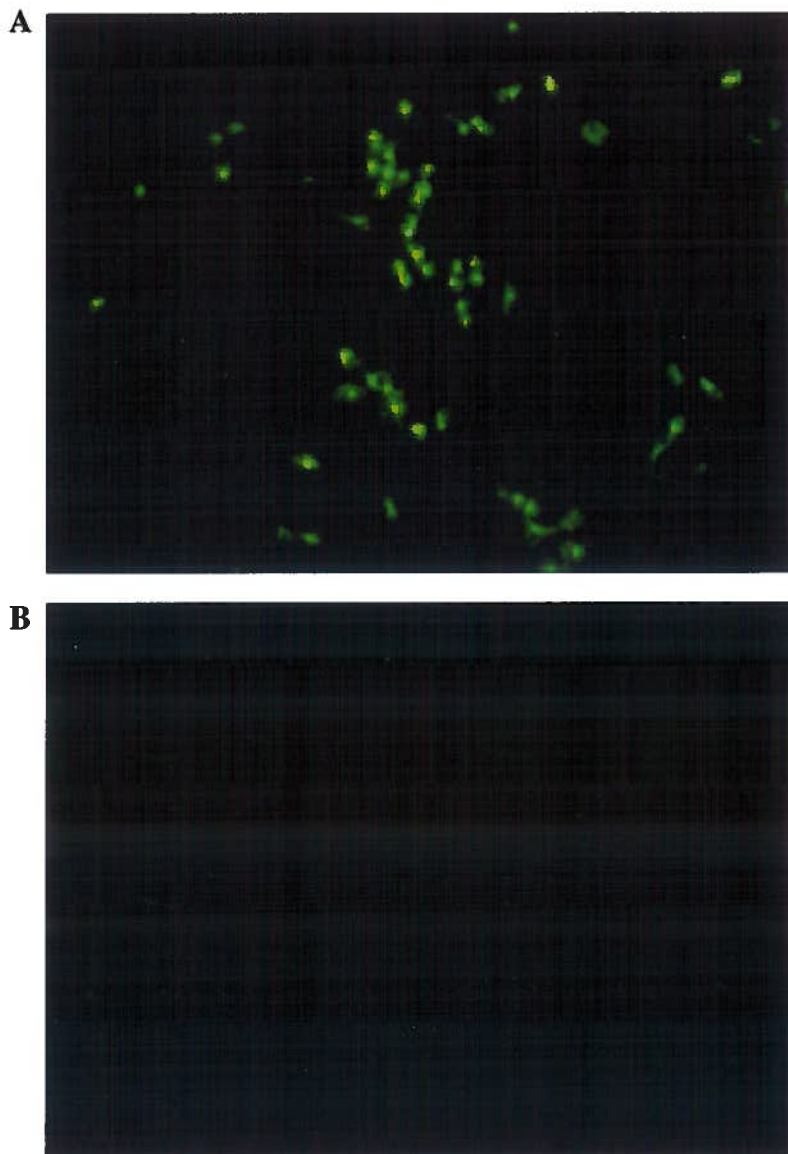


Figure 10. Détection d'antigènes viraux du HCoV-OC43 à l'aide d'un sérum hyper-immun suite à l'infection de la lignée HBMEC. (A) Cellules HBMEC infectées par le HCoV-OC43 ; (B) Cellules non-infectées.

Il est à noter que cette technique n'a permis la détection d'aucun antigène du sérotype 229E suite au contact de ce dernier avec la lignée cellulaire (résultats non-

montrés), confirmant que celle-ci est non-susceptible au coronavirus de ce sérotype, à tout le moins pas à un niveau détectable par les techniques utilisées.

La susceptibilité de la lignée HBMEC a été étudiée de façon plus sensible, par la détection de l'ARN codant pour les protéines N des HCoV en RT-PCR à différents temps post-infection (Figure 11). En se référant aux résultats précédents concernant la lignée, la présence de bandes correspondant à l'ARN du HCoV-OC43 dans les puits 5 et 6 contenant les amplicons obtenus à partir de lysats cellulaires de HBMEC infectées par le HCoV-OC43 à 2 et 4 j.p.i respectivement était attendue. Ainsi, ce résultat est consistant avec la détection de virus et d'antigènes viraux.

Il est intéressant de constater la présence de faibles bandes au niveau des puits 3 et 4 contenant les amplicons obtenus à partir de lysats cellulaires de HBMEC mises en contact avec le sérotype 229E. Bien qu'aucun titre viral n'ait été détecté précédemment, la présence de ces bandes démontre la capacité du virus à pénétrer et à se répliquer faiblement à l'intérieur de la lignée cellulaire.

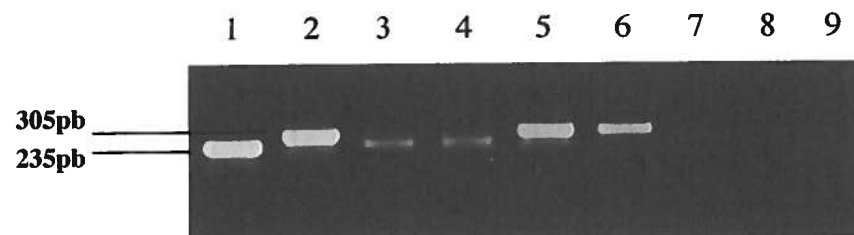


Figure 11. Détection par RT-PCR de l'ARN codant la protéine N du HCoV suite à l'infection de la lignée de cellules endothéliales HBMEC.

1 : Témoin positif, L-132 infectées par le HCoV-229E ; 2 : Témoin positif, HRT-18 infectées par le HCoV-OC43 ; 3 : HBMEC + HCoV-229E, 2j.p.i. et ; 4 : 4 j.p.i. ; 5 : HBMEC + HCoV-OC43, 2 j.p.i. et ; 6 : 4 j.p.i. ; 7 : HBMEC n.i. ; 8 : HBMEC + HCoV-229E, à 4°C ; 9 : HBMEC + HCoV-OC43, à 4°C.

Pour s'assurer que l'ARN viral détecté provenait du contenu intracellulaire et non de virus qui aurait pu se lier de façon non-spécifique à la surface des cellules, des tests de liaison à 4°C ont été effectués et ont permis de constater l'absence d'ARN viral (puits 8 et 9), confirmant que la détection d'ARN du HCoV-229E dans les puits 3 et 4 résulte bien de la pénétration et de la faible réplication du virus dans les cellules HBMEC.

Par ailleurs, la susceptibilité des cellules endothéliales cérébrales en culture primaire à l'infection par le HCoV a aussi été analysée en parallèle. Comme mentionné plus haut, seul le sérotype 229E s'est multiplié à l'intérieur de ces cellules. La cinétique d'infection présentée à la Figure 9 permet de constater l'augmentation du titre infectieux au cours de l'infection et que c'est au quatrième jour post-infection que celui-ci a été maximal en atteignant presque 4×10^6 DICT₅₀/mL. Afin d'éviter de conclure rapidement à la non-susceptibilité en se basant uniquement sur l'absence de particules infectieuses suite au contact avec le HCoV-OC43, un test d'immunoperoxydase indirecte intracellulaire a été effectué. Aucune particule infectieuse n'a été trouvée de cette façon (résultats non-montrés).

De plus, par RT-PCR, la détection de l'ARN codant pour les protéines N des HCoV a été effectuée en utilisant les lysats de cellules infectées par les deux sérotypes et des résultats similaires à ceux de la lignée ont été obtenus. Effectivement, le gène codant la protéine N des deux sérotypes de virus a été détectée, mais en moindre importance pour OC43. Dans les puits 1 et 2, se retrouvent les bandes confirmant la susceptibilité des cellules endothéliales à l'infection par le sérotype 229E. Une faible bande dans le puits 3, correspondant à l'ARN codant pour la protéine N du HCoV-OC43 permet de conclure que ce dernier a la capacité de pénétrer dans la cellule et s'y répliquer à un faible niveau. Tous les témoins nécessaires sont présents afin d'assurer la validité des résultats obtenus.

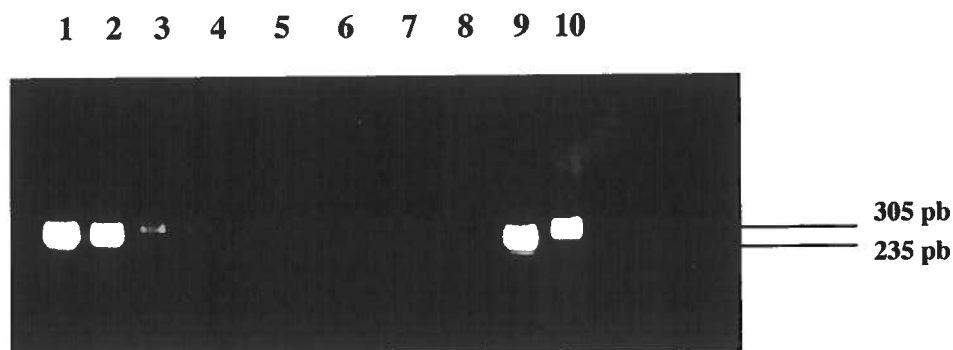


Figure 12. Détection par RT-PCR de l'ARN codant la protéine N du HCoV suite à l'infection des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales humaines (endo). 1 : Endo + HCoV-229E, 2 j.p.i. et ; 2 : 4 j.p.i. ; 3 : Endo + HCoV-OC43, 2 j.p.i. et ; 4 : 4 j.p.i. ; 5 et 6 : Endo n.i. ; 7 : Endo + HCoV-229E, à 4°C ; 8 : Endo + HCoV-OC43, à 4°C ; 9 : Témoin positif, L-132 infectées par le HCoV-229E ; 10 : Témoin positif, HRT-18 infectées par le HCoV-OC43.

À la lumière des résultats, la lignée de cellules endothéliales HBMEC est susceptible à l'infection par le HCoV-OC43, tandis que la culture primaire est susceptible à l'infection par le HCoV-229E. Toutefois, les deux sérotypes ont la possibilité de pénétrer à l'intérieur des deux types cellulaires et de se répliquer à un niveau indétectable par le test utilisé.

3.3 BHE *in vitro*

Parmi les trois modèles de BHE artificielle testés, c'est celui impliquant les inserts « Bio-coat » prétraités au collagène qui a offert le meilleur rendement. En effet, des problèmes d'adhésion cellulaire sur les inserts des deux autres modèles, soit les inserts de polyéthylène traités à la gélatine ou au collagène, ont été rencontrés, et ce autant pour la lignée HBMEC que pour les cellules endothéliales en culture primaire. C'est donc ce modèle qui a été sélectionné afin de tenter de mettre au point la méthode pour effectuer des tests de passage du HCoV à travers les cellules endothéliales dans un but de caractérisation. Il était important de réussir à établir une barrière à 100 % de confluence donc étanche et uniforme, sur laquelle les deux sérotypes du HCoV allait être déposés, afin que les virus détectés du côté opposé ne passent au niveau d'espaces intercellulaires.

Il a été possible d'obtenir au mieux, une confluence uniforme d'environ 75 % après 2 jours d'incubation pour les deux types cellulaires. Ceci correspondait à mettre au départ les quantités optimales de cellules suivantes : pour la lignée, 75 000 cellules ont été déposées sur l'insert, tandis que c'est 150 000 cellules pour la culture primaire.

Par contre, au-delà des deux jours, la lignée cellulaire avait tendance à s'étendre « en grappes ». Effectivement, de nombreuses zones à multi-couches cellulaires ont été observées. Ceci ne correspondait aucunement au modèle de barrière souhaité.

En ce qui à trait aux cellules en culture primaire, les résultats ont été davantage positifs. La couche cellulaire est restée uniforme mais très fragile au soulèvement. Toutefois, puisque ces cellules n'ont pas une grande capacité de division, jamais il n'a été possible d'atteindre une confluence de 100 %. De plus, un approvisionnement et la durée de vie en culture des cellules limités, ont restreint les essais. Cet aspect du projet n'a donc pas donné les résultats escomptés.

4. DISCUSSION

La SEP est une maladie dégénérative du SNC. Tout comme la majorité des maladies neurologiques, les causes demeurent inconnues. La pré-disposition génétique serait le facteur clé dans le développement de telles affections, mais de plus en plus, le rôle des facteurs environnementaux tel que les virus est supposé dans l'étiologie de la maladie.

Les coronavirus humains sont des suspects importants puisque bien des preuves les mettent en cause (voir revue de littérature section 1.3.6), notamment, ils ont été isolés du cerveau (Burks *et al.*, 1980) et leurs petits cousins murins (MHV) provoquent chez la souris une pathologie neurologique ayant bon nombre de ressemblances avec la SEP humaine (Pappenheimer, 1958; Lampert *et al.*, 1973; Herndon *et al.*, 1975; Lavi *et al.*, 1984).

Comment la physiologie du système nerveux central, si restrictive, peut permettre une telle outrance : la pénétration de virus au cerveau ! D'une part, ceux-ci peuvent s'y rendre par la route neurologique et d'autre part, en empruntant la voie sanguine. La barrière hémato-encéphalique (BHE) peut être altérée par l'infection directe des cellules endothéliales la formant ou par des molécules sécrétées par des cellules sanguines infectées. En ce sens, les résultats de T. Miletta (2001) appuient cette dernière hypothèse. En effet, elle a démontré que la lignée pro-monocytaire THP-1 supporte bel et bien l'infection par les deux sérotypes de coronavirus humains et qu'il y a promotion de la sécrétion de métalloprotéinases de la matrice (MMP-9) connues comme étant des molécules altérant la BHE.

C'est à l'hypothèse du passage à travers la BHE que je me suis attardée tout au long de mon projet de maîtrise. Tout d'abord, en déterminant la susceptibilité de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) de nombreux donneurs sains et aussi en évaluant la susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau humain (lignée et cellules en culture primaire) à l'infection par les deux sérotypes de coronavirus humains.

4.1 Susceptibilité des PBMC à l'infection par le HCoV

Nous nous sommes attardés exclusivement à l'évaluation de la susceptibilité des lymphocytes, monocytes et macrophages en s'appuyant sur certaines observations concernant d'autres membres des *Nidovirales*. En effet, l'infection des monocytes-macrophages contribue aux pathologies causées par le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (PRRSV), le virus de l'entérite hémorragique de la dinde (HEV_T) et le coronavirus murin (MHV) (Liu *et al.*, 2001; Rautenschlein et Sharma, 2000; Thanawongnuwech *et al.*, 2000). De plus, le MHV-3 se multiplie à l'intérieur des lymphocytes B et T et cause leur lyse, atrophiant les organes lymphoïdes (rate et thymus) des souris susceptibles (Lamontagne *et al.*, 1989).

La susceptibilité des lymphocytes, analysée par la détection de particules infectieuses et de protéines virales, s'est avérée négative (Tableaux 3 et 4, Figure 5). Ces résultats sont consistants avec ceux observés par T. Miletti (2001). En effet, l'ensemble des lignées lymphocytaires testées dans son projet soit, des lignées de lymphocytes T tel que les cellules H9 (lymphome humain), la lignée Jurkat; clone E6-1 (leucémie aiguë (ATCC)), les cellules MT-2 et MT-4 (leucémies de cellules T), soit une lignée de lymphocytes B, les cellules Raji (lymphome de Burkitt) n'ont été susceptibles à aucun des deux sérotypes du coronavirus humain. Ainsi, contrairement au MHV-3 qui a la capacité d'infecter les lymphocytes (Lamontagne *et al.*, 1989b), les deux sérotypes de HCoV quant à eux semblent en être incapables. Les lymphocytes humains possèderaient en quelque sorte une résistance intrinsèque à l'infection par le HCoV. En se basant sur les conclusions tirées d'études portant sur les mécanismes de résistance cellulaire aux infections virales, il est possible d'émettre des pistes afin de comprendre le phénomène observé dans nos travaux. L'équipe du Dr Lamontagne a émit que la restriction de la réplication virale du MHV-3, au niveau de macrophages et lymphocytes provenant de souris résistantes, serait contrôlée par un mécanisme cellulaire intrinsèque influençant le niveau de particules produites (Lamontagne *et al.*, 1989a). Une étude plus approfondie a permit de constater que la résistance observée au niveau de lymphocytes B et T purifiés, provenant de souris résistantes au virus, était due à un blocage de la RNA polymérase,

troublant ainsi la réplication virale (Lamontagne *et al.*, 1989b). De plus, la production ou la présence d'interleukines telles IL-2 et IFN-gamma, favoriserait les défenses cellulaires, ceci est entre autres appuyé par l'étude de Kohl *et al.*, 1989 traitant du phénomène avec des cellules murines mises en contact avec le HSV.

Les titres infectieux (Tableaux 3 et 4) et la détection de protéines virales en immunofluorescence (Figure 7) démontrent que seule l'infection par le coronavirus humain 229E a été supportée par les monocytes circulants et les macrophages dérivés de la différenciation *in vitro* des premiers. Ces cellules semblent supporter une infection aiguë puisque rapidement (3 j.p.i.) la détection de particules virales est en vain et ce, jusqu'à 28 j.p.i. et dès 5 j.p.i. la détection de protéines virales est faible.

La susceptibilité de macrophages humains en culture primaire au HCoV-229E a déjà été démontrée (Patterson et Macnaughton, 1982; Collins, 2002) de même qu'au HCoV-OC43, bien que le niveau d'infection ait été très faible. En effet, moins de 5 % des cellules étaient positives à l'infection par le HCoV-OC43 en immunofluorescence, comparativement à plus de 55 % de cellules positives dans les cultures infectées par le sérotype 229E (Collins, 2002). Toutefois, la démonstration de la susceptibilité de monocytes humains en culture à l'infection par le sérotype 229E est une première. De plus, la lignée THP-1, grandement utilisée comme modèle pour les études d'interactions entre les virus et les monocytes, est susceptible aux deux sérotypes (Miletti et Talbot, 2001-communication personnelle).

La variabilité de la susceptibilité des monocytes et macrophages à l'infection par le HCoV retrouvée dans ce groupe de donneurs était à prévoir et peut être expliquée en se référant aux mécanismes de résistance virale impliquant ici le contrôle génétique au niveau des récepteurs cellulaires (Bushman et Skamene, 1995). Ainsi, afin de mieux caractériser la susceptibilité il aurait été intéressant de vérifier la présence du récepteur du HCoV-229E, l'APN (CD13), à la surface des différentes cellules de chacun des donneurs.

Contrairement à la lignée THP-1, la différenciation *in vitro* des monocytes en culture primaire en macrophages, à l'aide du sérum autologue (sérum du donneur), n'a pas restreint leur permissivité à l'infection par le HCoV-229E. D'ailleurs, pour un même patient dont les monocytes et les macrophages sont infectables, le titre viral à 1 jour post-infection est plus important pour ces derniers. Aussi, selon les résultats obtenus lors de l'étude de la persistance virale, l'infection des monocytes et macrophages par le coronavirus de sérotype 229E est aiguë, donc sans ressurgence de production virale. Il aurait été intéressant de vérifier la présence d'ARN viral en parallèle, étant donné la plus grande sensibilité de la méthode. Un virus connu pour sa latence à l'intérieur des cellules monocytaires est le virus de l'herpès humain de type 6 (HHV-6) (Kondo *et al.*, 1991). De plus, la présence de l'ADN de ce virus au niveau des PBMC de patients atteints de SEP, contrairement à des témoins sains, suggère un lien entre l'infection latente au HHV-6 et cette maladie (Kim *et al.*, 2000). Par ailleurs, le changement morphologique des macrophages, attribuable à l'infection (Figure 8), a déjà été observé et les cellules y sont qualifiées de « giant cells » (Patterson et Macnaughton, 1982). Dernièrement, ce changement morphologique a été attribué à l'apoptose. En effet, suite à l'infection de monocytes/macrophages provenant de donneurs sains et de patients atteints de sclérose en plaques par le sérotype 229E, les changements au niveau de l'ADN ainsi que le marquage de l'annexine V (protéine indicatrice de bris de la membrane plasmique) ont indiqué fortement le phénomène de l'apoptose (Collins, 2002). Il est à noter qu'aucun changement morphologique ou autres signes reliés à l'apoptose n'ont été observés au niveau des cellules infectées par le sérotype OC43. En ce qui concerne nos observations, il est difficile de savoir si une cellule de grande taille résulte du gonflement d'une cellule ou plutôt de la fusion de plusieurs cellules en réponse à l'infection. C'est en procédant à l'analyse des cellules en microscopie électronique ou par la coloration de l'ADN cellulaire à l'aide du 4', 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) que l'on aurait pu observer la présence ou non de multiples noyaux.

Toutefois, il y a quelques exceptions à la règle, comme mentionné plus haut, dans le cas de deux donneurs dont les macrophages se sont montrés réfractaires à l'infection. Bien que le contact avec le virus a eu toujours lieu lors du 7 ou 8^e jour de différenciation,

il est probable vu la différence dans le rythme de maturation des cellules que la maturation ait été plus avancée dans ces deux cas et que les cellules soient dans un état de repos (phase G0) et ainsi moins susceptibles à l'infection. Une étude sur le MHV vient appuyer cette hypothèse en avançant que les cellules en division (phase S) sont davantage susceptibles au virus (Daniel et Talbot, 1987). Il aurait été intéressant de stimuler la différenciation avec des composés tel le PMA ou les acides rétinoïques puisqu'ils utilisent des voies de signalisation diverses (Matikainen et al., 1994 ; Schwende et al., 1996) afin de déceler des variations de susceptibilité.

L'incapacité du sérotype OC43 à infecter les monocytes et macrophages en culture primaire s'explique difficilement. En effet, le virus est pourtant capable d'infecter de manière aiguë et persistante la lignée THP-1. Toutefois, il faut avoir à l'esprit que le stade de différenciation de cette lignée promonocytaire ne correspond pas à celui des cellules monocytaires circulantes chez un individu sain. Ainsi, une des hypothèses avancées pour expliquer les résultats soutient que le HCoV-OC43 peut infecter les monocytes à un stade de maturation précoce représenté par les THP-1 mais est incapable de se multiplier à l'intérieur de monocytes à un stade plus avancé retrouvé dans la circulation sanguine. Ce phénomène serait dans la même veine que l'observation de la perte de susceptibilité aux deux sérotypes de coronavirus humains de la lignée promonocytaire THP-1 suite à sa maturation en macrophage (Miletti et Talbot, 2001-communication personnelle). Une autre hypothèse pour expliquer ce phénomène repose sur la présence de molécules telles les cytokines ou les interleukines. En effet, l'habileté du HCoV-OC43 à infecter les cellules leucocytaires dépend peut-être de la présence d'un ou de facteur(s) soluble(s) dans l'environnement cellulaire, par exemple, le pré-traitement de cellules monocytaires humaines avec l'IL-4 est nécessaire à l'infection *in vitro* de ces dernières par le cytomégalovirus humain (HCMV) (Kitajima *et al.*, 2001).

4.2 Susceptibilité de cellules endothéliales du cerveau humain à l'infection

L'analyse de la susceptibilité de la lignée HBMEC et de cellules endothéliales cérébrales humaines à l'infection par le HCoV s'est avérée intéressante mais discordante. En effet, seul le sérotype OC43 a pu se répliquer à l'intérieur de la lignée tandis que seul le sérotype 229E a pu le faire à l'intérieur des cellules en culture primaire (Figure 9). Cette différence flagrante de susceptibilité entre la lignée et les cellules en culture primaire est peut-être une des conséquences de la transformation cellulaire par l'antigène T de SV40. En effet, des changements au niveau des récepteurs cellulaires peuvent survenir suite à la transformation et ainsi modifier la susceptibilité de la cellule. Aussi, l'altération du cytosquelette suite à la transformation par l'antigène T de SV40, observée sur des cellules épithéliales humaines, influencerait les propriétés reliées à la croissance et à la maturation cellulaire (De Silvia *et al.*, 1994). Par ailleurs, un complexe membranaire antigène-T-p53 est formé au niveau des cellules transformées (Butel, 1986) et pourrait peut-être ainsi agir sur les interactions virus-récepteurs cellulaires et/ou modifier la dynamique de la membrane cellulaire. De plus, la provenance des cellules est peut-être en cause. En fait, dépendamment de leur source au niveau de l'encéphale, les cellules possèdent peut-être des caractéristiques différentes et donc une susceptibilité différente à l'infection. Les résultats obtenus pour les cellules en culture primaire sont en accord avec l'étude de Cabirac *et al.*, 1995, dans laquelle la susceptibilité de cellules endothéliales de microvaisseaux humains à l'infection par le HCoV-229E a été observée. Par ailleurs, le virus de l'immunodéficience humain (VIH) et le virus de la rougeole sont aussi capables d'infecter les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Moses et Nelson, 1994; Andres *et al.*, 2003), c'est d'ailleurs une façon d'accéder au SNC.

L'infection de la lignée HBMEC par le HCoV-OC43 est caractéristique d'une infection aiguë puisque le titre viral chute dans le temps et qu'après le premier passage en persistance, aucune particule virale n'est détectée et ce les six semaines suivantes. Concernant les cellules en culture primaires, leur courte vie en culture n'a pu nous permettre d'évaluer cet aspect de l'infection.

Fait très intéressant, les deux sérotypes du HCoV ont la capacité de pénétrer à l'intérieur de la lignée et des cellules en culture primaire. Ceci est appuyé par la détection de l'ARN codant la protéine N du HCoV (Figures 11 et 12). Ainsi, la résistance à l'infection productive de la lignée au HCoV-229E et des cellules en culture primaire au HCoV-OC43 se situe au niveau des étapes du cycle viral subséquentes à la pénétration virale.

4.3 Modèle de propagation du HCoV au SNC

À la lumière de l'ensemble des résultats, un modèle possible de propagation du HCoV au SNC a été élaboré et résumé à la Figure 13 : Après l'infection locale, le passage de l'épithélium respiratoire permettrait aux virus d'accéder à la circulation sanguine. Aucune étude exhaustive n'a été effectuée à ce jour afin de démontrer si une virémie transitoire pouvait être associée à l'infection respiratoire causée par le HCoV. Toutefois, lors de l'infection d'un épithélium respiratoire en culture primaire et d'explants de trachée humaine par le coronavirus humain 229E, les virus nouvellement synthétisés sont relargués principalement du côté apical (représentant la lumière du tube respiratoire) (Wang *et al.*, 2000). Cependant, il est connu que le coronavirus murin (MHV), lorsqu'inoculé par la voie i.n., peut atteindre la circulation sanguine (Barthold et Smith, 1992). Il en est peut-être de même pour le HCoV. De plus, selon des observations faites à partir d'un modèle expérimental de souris, mis au point afin de mieux comprendre le HCoV, la présence d'une virémie est suggérée. En effet, l'ARN viral du HCoV-OC43 a été détecté, après inoculation intra-cérébrale (i.c.), au niveau des tissus cardiaques, pulmonaires et musculaires (Jacomy et Talbot, 2003).

La virémie peut être plasmatique (virus libre) ou associée aux cellules sanguines. Selon les résultats obtenus, l'incapacité d'infection des PBMC par le HCoV-OC43 suggère que celui-ci serait à l'état libre dans la circulation sanguine tandis que le HCoV-229E aurait la capacité de se multiplier et d'être transporté à l'intérieur des monocytes et macrophages et aussi d'être relargué sous forme de virus libres dans la circulation. D'ailleurs, le HCMV, qui utilise le même récepteur que le HCoV-229E,

l'aminopeptidase-N (CD13) (Larsson *et al.*, 1998), infecte les monocytes et, en tant que membre des herpèsvirus, y persiste. Aussi, l'invasion du SNC par des monocytes et macrophages dérivés du sang périphérique sont impliqués dans la démence associée au VIH. Une accumulation de macrophages périvasculaires, infectés par le VIH, a été observée au niveau de spécimens de cerveaux venant de patients séropositifs atteints de l'encéphalopathie (HIVE) contrairement à ceux venant de patients séropositifs sans encéphalopathie et de témoins séronégatifs (Fischer-Smith *et al.*, 2001).

Au voisinage de la BHE, le passage des virus libres ou associés aux cellules peut survenir selon les mécanismes discutés à la section 1.1.4. Plus spécifiquement, et toujours selon les résultats obtenus, les deux sérotypes de HCoV auraient la possibilité d'entrer à l'intérieur des cellules endothéliales composant la barrière. L'étude réalisée n'a pu permettre de caractériser davantage l'interaction entre le HCoV et les cellules endothéliales, étant donné l'échec de la mise au point d'un modèle de BHE *in vitro*. Il est possible de supposer que la multiplication virale ou le passage par transcytose pourraient permettre aux virus d'accéder au SNC. De plus, tel que le font les lymphocytes et monocytes infectés par le VIH, les monocytes et macrophages infectés par le HCoV-229E pourrait transmigrer à travers la barrière (Wu *et al.*, 2000).

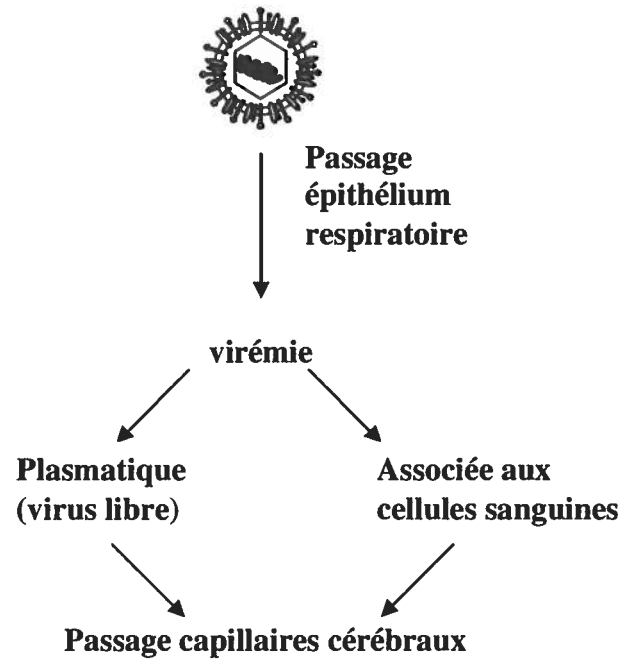


Figure 13. Modèle de propagation du HCoV au SNC

4.4 Liens avec la SEP

Le HCoV peut être relié à la SEP sur la base de plusieurs observations. En effet, le caractère neuroinvasif des HCoV a été démontré entre autres par la détection d'ARN viral au niveau de cerveaux humains (Stewart *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1992; Arbour *et al.*, 2000). Aussi, le caractère neurotrope de ce virus a été largement démontré : la susceptibilité de lignées humaines d'origine neurale et cultures primaires d'astrocytes et de microglies (Talbot *et al.*, 1993; Arbour *et al.*, 1999a,b; Bonavia *et al.*, 1997). De plus, à partir des résultats présentés dans ce mémoire, il est possible de dire que les cellules endothéliales cérébrales sont aussi susceptibles au HCoV. Aussi, l'observation de la susceptibilité des monocytes et macrophages à l'infection par le HCoV-229E est d'un grand impact étant donné qu'un des types cellulaires inflammatoires prédominants dans le cerveau de patients atteints de SEP sont les macrophages (Martino *et al.*, 2000).

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail consistait à évaluer la susceptibilité de PBMC provenant du sang périphérique de volontaires sains et de cellules endothéliales cérébrales humaines à l'infection par le HCoV afin de déterminer dans quelle mesure l'hypothèse d'accès au SNC via la voie sanguine s'y rattache.

Les monocytes et macrophages humains en culture primaire se sont avérés être susceptibles à l'infection seulement par le HCoV-229E. L'infection de type aiguë a résulté en la production de virus dans le milieu extracellulaire. Ce résultat indique que ce sérotype pourrait se servir de ces cellules afin de se propager dans la circulation et se rendre au SNC.

De plus, l'étude sur la susceptibilité des cellules endothéliales a démontré que le HCoV a la capacité de pénétrer à l'intérieur de la lignée HBMEC et des cellules endothéliales en culture primaire. Ceci suggère le potentiel du HCoV à traverser la BHE.

En perspectives, il serait bénéfique de mettre au point le modèle de BHE *in vitro* afin de caractériser le passage du HCoV et de monocytes et macrophages infectés. Aussi, il serait intéressant de vérifier la production de MMP (facteur favorisant la migration des lymphocytes T et la dégradation de la lame basale) et de cytokines par les monocytes et macrophages suite à l'infection par le HCoV-229E et d'en évaluer les effets sur les cellules endothéliales cérébrales (surexpression de molécules d'adhésion, altération). De plus, il serait d'intérêt de faire une étude exhaustive sur la susceptibilité de PBMC de patients souffrant de neuropathologies tel la SEP comparativement à des témoins sains.

Références

ALMEIDA, M.C., Silva, A.C., Barral, A., Barral Netto., M. 2000. «A simple method for human peripheral blood monocyte isolation». Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol. 95, no.2, p. 221-223.

ANDERSON J. R., Field, H.J. 1982. «The development of retinitis in mice with nonfatal herpes simplex encephalitis». Neuropathol. Appl. Neurobiol., vol. 8, no. 4, p. 277-287.

ANDERSON, O., Lygner, P.E., Bergstrom, T., Andersson, M., Valhne, A. 1993. «Viral infections trigger multiple sclerosis relapses : a prospective seroepidemiological study». J. Neurol., vol. 240, no. 7, p. 417-422.

ANDRES, O., Obojes, K., Kim, K.S., ter Meulen, V., Scheinder-Schaulies, J. 2003. «CD-46 and CD150-independant endothelial cell infection with wild-type measles viruses». J. Gen. Virol., vol. 84, p. 1189-1197.

ARBOUR, N., Côté, G., Lachance, C., Tardieu, M., Cashman, N.R., Talbot, P.J. 1999a. «Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronaviruses OC43». J. Virol., vol. 73, no. 4, p. 3338-3350.

ARBOUR N., Ekande, S., Côte, G., Lachance, C., Chagnon, F., Tardieu, M., Cashman, N.R., Talbot, P.J. 1999b. «Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E». J. Virol., vol. 73, no. 4, p.3326-2237.

ARBOUR, N., Day, R., Newcombe, J., Talbot, P.J. 2000. «Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses». J. Virol., vol. 74, no. 19, p. 8913-8971.

BANDTLOW, C.E. 2003. «Regeneration in the central nervous system». Exp. Geront., vol. 38, p. 79-86.

BAR-OR, A., Oliveira, E.M.L., Anderson, D.E., Hafler, D.A. 1999. «Molecular pathogenesis of multiple sclerosis». J. Neuroimmunol., vol. 100, no. 1-2, p. 252-259.

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

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

BARRES, B.A. 1999. «A new role for glia: generation of neurons!». Cell., vol. 97, p. 667-670.

BARTHOLD, S.W., Smith, A.L. 1992. «Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice». Arch. Virol., vol. 122, p.35-44.

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

BONAVIA A., Arbour, N.,Yong, V.W.,Talbot, P.J. 1997. «Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43». J. Virol., vol. 71, no. 1, p. 800-806.

BORREGAARD, N., Cowland, J.B. 1997. «Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes». Blood., vol. 89, no. 10, p. 3503-3521.

BOS E. C., Luytjes, W.,Van der Meulen, H.V., Koerten, H.K., Spaan, W.J. 1996. «The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus». Virology, vol. 218, no. 1, p. 52-60.

BOUCHER, A., Denis, F., Duquette, P., Talbot, P.J. 2001a. «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., vol. 494, p. 355-362.

BOUCHER, A., Tremblay, M., Arbour, N., Edwards, J., Day, R., Newcombe, J., Duquette, P., Denis, F., Talbot, P.J. 2001b. «The role of neuroinvasive coronaviruses in autoimmune processes associated with multiple sclerosis». Dans: Genes and viruses in multiple sclerosis. Éd. O.R. Hommes, H. Wekerle, M. Clanet. Amsterdam, Elsevier, p. 209-220.

BOWES, M.A., Kenny, A.J. 1987. «An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 and aminopeptidase N in lymphoid tissues». Immunology, vol. 60, p. 247-253.

BRADFORD, M.M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding». Anal. Biochem., vol. 72, p.248-254.

BRAY, P.F., Luka, J., Bray, P.F., Culp, K.W., Schligt, J.P. 1992. «Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein». Neurology, vol. 42, no. 9, p. 1798-1804.

BURGOS, J.S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M.J., Valdivieso, F. 2002. «Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system». J. Virol., vol. 76, no. 23, p. 12394-12398.

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

BUSCHMAN, E., Skamene, E. 1995. «Genetic resistance to coronavirus infection. A review ». Dans : Corona-and related viruses. Éd. Talbot, P.J., Levy, G.A. New York, Plenum Press, p.1-11.

BUTEL, J.S. 1986. «SV-40 large T-antigen : dual oncogene». Cancer Surv., vol. 5, no. 2, p. 343-365.

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

CABIRAC G.F., Soike, K.F., Butunoi, C., Hoel, K., Johnson, S., Cai, G.Y., Murray, R.S. 1993. «Coronavirus JHM OMP1 pathogenesis in owl monkey CNS and coronavirus infection of owl monkey CNS via peripheral routes». Adv. Exp. Med. Biol., vol. 342, p. 347-352.

CHALLONER, P.B., Smith, K.T., Parker, J.D., MacLeod, D.L., Coulter, S.N., Rose, T.M., Schultz, E.R., Bennett, J.L., Garber, R.L., Chang, M., Schad, P.A., Stewart, P.M., Nowinski, R.C., Brown, J.P., Burner, G.C. 1997. «Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, no. 16, p. 7440-7444.

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

COLLINS, A.R. 2002. «In vitro detection of apoptosis in monocytes/macrophages infected with human coronavirus». Clin. Diag. Lab. Immunol., vol. 9, no. 6, p. 1392-1395.

COMPSTON, D.A.S. 1991. «Genetics and immunology». Dans: McAlpine's multiple sclerosis. Éd. Matthews WB. Edinburgh, Churchill Livingstone, p. 301-319.

COSBY, S.L., McQuaid, S., Taylor, M.J., Bailey, M., Rima, B.K., Martin, S.J., Allen, I.V. 1989. «Examination of 8 cases of multiple sclerosis and 56 neurological and non-neurological controls for genomic sequences of measles virus, canine distemper virus, simian virus-5 and rubella virus». J. Gen. Virol., vol. 70, no. Pt8, p. 2027-2036.

COSBY, S.L., Duprex, W.P., Hamill, L.A., Ludlow, M., McQuaid, S. 2002. «Approches in the understanding of morbillivirus neurovirulence». J. Neurovirol., vol. 8, suppl 2, p. 85-90.

DALES, S., Anderson, R. 1995. «Pathogenesis and diseases of the central nervous system caused by murine coronaviruses». Dans: The coronaviridae. Éd. Siddell, S.G., New York, Plenum Press, p. 257-282.

DANIEL, C., Talbot, P.J. 1987. «Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A 59. Brief report». Arch. Virol., vol. 96, no. 3-4, p. 241-248.

DE SILVIA, R., Englezou A., Schevzov G., Gerwin B.I., Harris, C.C., Gunning P., Reddel R.R. 1994. «Induction of anchorage independent growth and serum resistance in immortalized human bronchial epithelial cells by alteration of the cytoskeleton». Cell. Mol. Biol. Res., vol. 40, no. 4, p. 323-335.

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

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

DORRIES, R. 2001. «The role of T-cell mediated mechanisms in virus infections of the nervous system». Curr. Top. Microbiol. Immunol., vol. 253, p. 219-245.

EBERS, G.C., Kukay, K., Bulman, D.E., Sadvonic, A.D., Rice, G., Anderson, C., Armstrong, H., Cousin, K., Bell, R.B., Hader, W., Paty, D.W., Hashimoto, S., Oger, J., Duquette, P., Warren, S., Gray, T., O'Connor, P., Nath, A., Auty, A., Metz, L., Francis, G., Paulseth, J.E., Murray, T.J., Pryse-Phillips, W., Rish, N. *et al.* 1996. «A full genome search». Nat. Genet., vol. 13, no. 4, p. 472-476.

EDWARDS, J.A., Denis, F., Talbot, P.J. 2000. «Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection». J. Neuroimmunol., vol. 108, no.1-2, p.73-81.

FAIRWEATHER, D., Kaya, Z., Shellman, G.R., Lawson, C.M., Rose, N.R. 2001. «From infection to autoimmunity». J. Autoimmun., vol. 16, no. 3, p. 175-186.

FISCHER, S., Wobben, M., Marti, H.H., Renz, D., Schaper, W. 2002. «Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1». Microvasc. Res., vol. 63, no. 1, p. 70-80.

FISCHER-SMITH, T., Croul, S., Sverstiuk, A.E., Capini, C., L'Heureux, D., Regulier, E.G., Richardson, M.W., Amini S., Morgello, S., Khalili, K., Rappaport, J. 2001. «CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection». J. Neurovirol., vol. 7, no. 6, p. 528-541.

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

GAGNEUR, A., Legrand, M.C., Picard, B., Baron, R., Talbot, P.J., de Parscau, L., Sizun, J. 2002. «Infections nosocomiales à coronavirus humains chez le nouveau-né». Arch. Pédiatr., vol. 9, p. 61-69.

GAY, D., Esiri, M. 1991. «Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. An immunocytological study». Brain., vol. 114, p. 557-572.

GIRVIN, A.M., Gordon, K.B., Welsh, C.J., Clipstone, N.A., Miller, S.D. 2002. «Differential abilities of central nervous system resident endothelial cells and astrocytes to serve as inducible antigen-presenting cells». Blood., vol. 99, no. 10, p. 3692-3701.

HAASE, A.T., Ventura, P., Gibbs, C.J., Tourtelotte, W.W. 1981. «Measles virus nucleotide sequences: detection by hybridization in situ». Science, vol. 212, no. 4495, p. 672-674.

HAINES, J.L., Ter-Minassian, M., Bazyk, A., Gusella, J.F., Kim, J., Terewedow, H., Pericak-Vance, M.A., Rimmler, J.B., Haynes, C.S., Roses, A.D., Lee, A., Shaner, B., Menold, M., Seboun, E., Fitoussi, R.P., Gartoiux, C., Reyes, C., Ribierre, F., Gyapay, G., Weissenbahc, J., Hauser, S.L., Goodkin, D.E., Lincoln, R., Usuku, K., Oksenberg, J.R. *et al.* 1996. «A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex». Nat. Genet., vol. 13, no. 4, p. 469-471.

HERNDON, R.M., Griffin, D.E., McCormick, U., Weiner, L.P. 1975. «Mouse hepatitis virus-induced recurrent demyelination. A preliminary report». Arch. Neurol., vol. 32, no. 1, p. 32-35.

HICKEY, W.F. 1999. «Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles». Seminars in Immunol., vol. 11, p. 125-137.

HICKEY, W.F., Hsu, B.L., Kimura, H. 1991. «T-lymphocyte entry into the central nervous system». J. Neurosci. Res., vol. 28, p. 254-260.

HOCINI, H., Becquart, P., Bouhlal, H., Chomont, N., Ancuta, P., Kazatchkine, M.D., Bélec, L. 2001. «Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells». J. Virol., vol. 75, no. 11, p. 5370-5374.

HODSTEV, A.S., Choi, Y., Spanopoulou, E., Posnett, D.N. 1998. «Mycoplasma superantigen is a CDR3-dependent ligand for the T cell antigen receptor». J. Exp. Med., vol. 187, no. 3, p. 319-327.

HOLDER, N., Clarke, J.D.W., Stephens, N., Wilson, S.W., Orsi, C., Bloomer, T., Tonge, D.A. 1991. «Continuous growth of the motor system in the axolotl». J. Comp. Neurol., vol. 303, p. 534-550.

HOLDER, N., Clarke, J.D.W., Wilson, S., Hunter, K., Tonge, D.A. 1989. «Mechanisms controlling directed axon regeneration in the peripheral and central nervous systems of amphibians». Nato Advanced Research Workshop on Recent Trends in Regeneration Research., Plenum Press, p. 179-190.

HOLMES, K.V. 2001. «Coronaviruses». Dans: Field's Virology, vol. 1, Éd. Knipe, D.M. et Howley, P.M. Philadelphie, Lippincott Williams & Wilkins, p. 1187-1203.

HOUTMAN, J.J. et Fleming, J.O. 1996. «Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination». J. Neurovirol., vol. 2, no. 6, p. 361-376.

HOUTMAN, J.J., Hinze, H.C., Fleming, J.O. 1995. «Demyelination induced by murine coronavirus JHM infection of congenitally immunodeficient mice». Adv. Exp. Med. Biol., vol. 380, p. 159-163.

JACOMY, H., Talbot, P.J. 2003. «Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43». Viol., accepté en avril 2003.

JERSILD, C., Fog, T., Hansen, G.S., Thomsen, M., Svejgaard, A., Dupont, B. 1973. «Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course». Lancet., vol. 2, no. 7840, p. 1221-1225.

JOHNSON, R.C. 1985. «Viral aspects of multiple sclerosis». Dans: Handbook of clinical neurology: demyelinating diseases. Vol. 3, Éd. Koetsier JC. Amsterdam, Elsevier, p. 319-336.

KAMAHORA, T., Soe, L. H., Lai, M.M. 1989. «Sequence analysis of nucleocapsid gene and leader RNA of human coronavirus OC43». Virus Res., vol. 12, no. 1, p. 1-9.

KANMOGNE, G.D., Kennedy, R.C., Grammas, P. 2002. «HIV-1 gp120 proteins and gp160 peptides are toxic to brain endothelial cells and neurons: possible pathway for HIV entry into the brain and HIV-associated dementia». J. Neuropathol. Exp. Neurol., vol. 61, no. 11, p. 992-1000.

KIM, J.S., Lee, K.S., Park, J.H., Kim, M.Y., Shin, W.S. 2000. «Detection of human herpesvirus 6 variant A in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients». Eur. Neurol., vol.43, no. 3, p. 170-173.

KITAJIMA, H., Okubo, Y., Honda, J., Yonemitsu, J., Yoshida, N., Fumimori, T., Oizumi, K. 2001. «Interleukin-4 is needed for the infection of monocytes by human cytomegalovirus». Intervirol., vol. 44, no. 4, p. 264-270.

- KOHL, S., Loo, L.S., Drath, D.B., Cox, P. 1989. «Interleukin-2 protects neonatal mice from lethal herpes simplex virus infection: a macrophage-mediated, gamma interferon-induced mechanism». J. Infect. Dis., vol. 159, no. 2, p. 239-247.
- KOLB A. F., Hegyi, A., Maile, J., Heister, A., Hagemann, M., Siddell, S.G. 1998. «Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N». Adv. Exp. Med. Biol., vol. 440, p. 61-67.
- KONDO, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M., Yamanishi, K. 1991. «Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages». J. Gen. Virol., vol. 72, p. 1401-1408.
- KOOI C., Cervin, M., Anderson, R. 1991. «Differentiation of acid-pH-dependent and –nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus». Virology, vol. 180, no. 1, p. 108-119.
- KRZYSTYNIAK K., Dupuy, J.M. 1984. «Entry of mouse hepatitis virus 3 into cells». J. Gen. Virol., vol. 65, no. 1, p. 227-231.
- KUNZ, J., Krause, D., Kremer, M., Dermietzel, R. 1994. «The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N». J. Neurochem., vol. 62, p. 2375-2386.
- KURTZKE, J.F. 1991. «Multiple sclerosis: changing times». Neuroepidemiology., vol. 10, no. 1, p.1-8.
- KURTZE, J.F. 1997. «The epidemiology of multiple sclerosis». Dans: Multiple sclerosis: clinical and pathogenetics basis. Éd. Raine CS, McFarland, H., Tourtelotte, WW, Londres, Chapman et Hall, p. 91-139.
- KURTZKE J. F., Heltberg, A. 2001. «Multiple sclerosis in the Faroe Islands: an epitome». J. Clin. Epidemiol., vol. 54, no. 1, p. 1-22.
- LACHANCE, C., Arbour, N., Cashman, N.R., Talbot, P.J. 1998. «Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by coronavirus 229E». J. Virol., vol. 72, no. 8, p. 6511-6519.
- LAI M.M.C., Cavanagh, D. 1997. «The molecular biology of coronaviruses». Adv. Virus Res., vol. 48, p. 1-100.
- LAI, M.M.C., Holmes, K.V. 2001. «*Coronaviridae*: the viruses and their replication». Dans: Field's Virology, vol.1, Éd. Knipe, D.M. et Howley, P.M. Philadelphie, Lippincott Williams & Wilkins, p. 1163-1185.
- LAMPERT, P. W., Sims, J.K., Kniazeff, A.J. 1973. «Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies». Acta Neuropathol (Berl), vol. 24, no. 1, p. 76-85.

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

LAMONTAGNE, L., Descoteaux, J.P., Jolicoeur, P. 1989b. «Mouse hepatitis virus 3 replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity». J. Immunol., vol. 142, no. 12, p. 4458-4465.

LARSSON, S., Soderberg-Naucler, C., Moller, E. 1998. «Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD13-positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals: implications for prevention of CMV transmission». Transplantation, vol. 65, no. 3, p. 411-415.

LAVI, E., Gilden, D.H., Highkin, M.K., Weiss, S.R. 1984. «Persistence of mouse hepatitis virus A59 RNA in a slow demyelinating infection in mice as detected by *in situ* hybridization». J. Virol., vol. 51, no. 2, p. 563-566.

LEPPERT, D., Waubant, E., Galardy, R., Bunnett, N.W., Hauser, S.L. 1995. «T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro». J. Immunol., vol. 154, no. 9, p. 4379-4389.

LI, D., Cavanagh, D. 1992. «Coronavirus IBV-induced membrane fusion occurs at near-neutral pH». Arch. Virol., vol. 122, no. 3-4, p. 301-316.

LIU, M.T., Keirstead, H.S., Lane, T.E. 2001. «Neutralization of the chemokine CXCL 10 reduces inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis». J. Immunol., vol. 167, p. 4091-4097.

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

LOU, J., Dayer, J.M., Grau, G.E., Burger, D. 1996. «Direct cell/cell contact with stimulated T lymphocytes induces the expression of cell adhesion molecules and cytokines by human brain microvascular endothelial cells». Eur. J. Immunol., vol. 26, p. 3107-3113.

MARRA, M.A. *et al.* 2003. «The genome sequence of the SARS-associated coronavirus». Science, vol. 300, no. 5624, p. 1399-1404.

MARIEB, E.N. 2000. *Essentials of human anatomy and physiology*. Sixième éd. San Francisco, CA, USA: Benjamin/Cummings Science Publishing. 558pp.

MARTINO, G., Furlan, R., Brambilla, E., Bergami, A., Ruffini, F., Gironi, M., Poliani, P.L., Grimaldi, L.M., Comi, G. 2000. «Cytokines and immunity in multiple sclerosis: the dual signal hypothesis». J. Neuroimmunol., vol. 109, no. 1, p. 3-9.

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

MATSAS, R., Stephenson, S.L., Hryszko, J., Kenny, A.J., Turner, A.J. 1985. «The metabolism of neuropeptides: phase separation of synaptic membrane preparations with triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N». J. Biochem., vol. 231, p. 445-449.

McCARRON, R.M., Wang, L., Racke, M.K., Mc Farlin, D.E., Spatz M. 1993a. «Effect of cytokines on ICAM expression and T cell adhesion to cerebrovascular endothelial cells». Adv. Exp. Med. Biol., vol. 331, p. 237-242.

McCARRON, R.M., Wang, L., Racke, M.K., Mc Farlin, D.E., Spatz M. 1993b. «Cytokine regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells». J. Neuroimmunol., vol. 43, p. 23-30.

MEYERMANN, R., Korr, J., Wekerle, H. 1996. «Specific target retrieval by encephalitogenic T cell lines». Clin. Neuropathol., vol. 5, p.101.

MILETTI, T. 2001. «L'interaction entre les leucocytes et les coronavirus humains». Mémoire de Maîtrise en sciences (M.Sc.) en virologie et immunologie, INRS-Institut Armand-Frappier.

MILLER, D.W. 1999. «Immunobiology of the blood-brain barrier». J. Neurovirol., vol. 5, p. 570-578.

MILLER, S.D., Olson, J.K., Croxford, J.L. 2001. «Multiple pathways to induction of virus-induced autoimmune demyelination: lessons from Theiler's virus infection». J. Autoimmun., vol. 16, no. 3, p. 219-227.

MOSES, A.V., Nelson, J.A. 1994. «HIV infection of human brain capillary endothelial cells: implications for AIDS dementia». Adv. Neuroimmunol., vol. 4, no. 3, p. 239-247.

MURRAY, R.S., Brown, B., Brian, D., Cabirac, G.F. 1992. «Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain». Ann. Neurol., vol. 31, no. 5, p. 525-533.

MYINT, S.H. 1994. «Human coronaviruses-a brief review». Review in medical virology, vol. 4, p. 35-46.

NASSIRI, R.M. 2003. «Severe acute respiratory syndrome». Med. Sci. Monit., vol. 9, no. 6, p. 25-27.

NAUCLÉR, C.S., Larsson, S., Möller, E. 1996. «A novel mechanism for virus-induced autoimmunity in humans». Immunol. Rev., vol. 152, p. 175-192.

NOSEWORTHY, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G. 2000. «Multiple sclerosis». N. Engl. J. Med., vol. 343, no. 13, p.938-952.

NOTTET, H.S. 1999. «Interactions between macrophages and brain microvascular endothelial cells: role in pathogenesis of HIV-1 infection and blood-brain barrier function». J. Neurovirol., vol. 5, no. 6, p. 659-669.

O'KEFFE, G.M., Nguyen, V.T., Benveniste, E.N. 1999. «Class II transactivator and class II MHC gene expression in microglia: modulation by the cytokines TGF-beta, IL-4, IL-13 and IL-10». Eur. J. Immunol., vol. 29, p. 1275-1285.

OLDSTONE M. B. 1987. «Molecular mimicry and autoimmune disease». Cell, vol. 50, no. 6, p. 819-820.

OLSEN J., Kokholm, K., Noren, O., Sjostrom, H. 1997. «Structure and expression of aminopeptidase N». Adv. Exp. Med.Biol., vol. 421, p. 47-57.

OTA, K., Matsui, M., Milford, E.L., Mackin, G.A., Weuner, H.L., Hafler, D.A. 1990. «T-cell recognition of a immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis». Nature, vol. 346, p. 183-187.

PANITCH, H.S. 1994. «Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis». Ann. Neurol., vol. 36, S25-28.

PAPPENHEIMNER, A.M. 1958. «Pathology of infection with the JHM virus» J. Nat. Can. Inst., vol. 20, p. 879-881.

PARDRIDGE, W.M. 1999. «Blood-brain barrier biology and methodology». J. Neurovirol., vol. 5, p. 556-569.

PATTERSON, S., Macnaughton, M.R. 1982. «Replication of human respiratory coronavirus strain 229E in human macrophages». J. Gen. Virol., vol. 60, p. 301-314.

PERSIDSKY, Y., Zheng, J., Miller, D., Gendelman, H.E. 2000. «Mononuclear phagocytes mediate blood-brain barrier compromise and neuronal injury during HIV-1-associated dementia». J. Leukoc. Biol., vol. 68, no. 3, p. 413-422.

PRAT, A., Biernackie, K., Lavoie, J.F., Poirier, J., Duquette, J., Antel, J.P. 2002. «Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium». Arch. Neurol., vol. 59, no. 3, p.391-397.

PRAT, A., Biernacki, K., Wosik, K., Antel, J.P. 2001. «Glial cell influence on the human blood-brain barrier». Glia, vol. 36, no. 2, p. 145-155.

QIN, L., Xiong, B., Luo, C., Guo, Z.M., Hao, P., Su, J., Nan, P., Feng, Y., Shi, Y.X., Luo, X.M., Chen, K.X., Shen, X., Shen, J.H., Zou, J.P., Zhao, G.P., Shi, T.L., Zhong, Y., Jiang, H.L., Li, Y.X. 2003. «Identification of probable genomic packaging signal sequence from SARS-CoV genome by bioinformatics analysis». Acta. Pharmacol. Sin., vol. 24, no. 6, p. 489-496.

RANSOHOFF, R.M., Tani, M. 1998. «Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation?». Trends. Neurosci., vol. 21, p. 154-159.

RAUTENSCHLEIN, S., Sharma, J.M. 2000. «Immunopathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) in turkeys». Dev. Comp. Immunol., vol. 24, p. 237-246.

REDDY, E.P., Sanberg-Wohlheim, M., Mettus, R.V., Ray, P.E., DeFreitas, E., Koprowsky, H. 1989. «Amplification and molecular cloning of HTLV-1 sequences from DNA of multiple sclerosis patients». Science, vol. 243, no. 4890, p. 529-533.

RESTA, S., Luby, J.P., Rosenfeld, C.R., Siegel, J.D. 1985. «Isolation and propagation of a human enteric coronavirus». Science, vol. 229, no. 4717, p. 878-981.

RISKI, H., Hovi, T. 1980. «Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold». J. Med. Virol., vol. 6, p.259.

ROMERO, I.A., Prevost, M.C., Perret, E., Adamson, P., Greenwood, J., Couraud, P.O., Ozden, S. 2000. «Interactions between brain endothelial cells and human T-cell leukemia virus type 1-infected lymphocytes: mechanisms of viral entry into the central nervous system». J. Virol., vol. 74, no. 13, p. 6021-6030.

ROSSEN, J.W., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., van der Ende, A., Strous, G.J., Rottier, P.J. 1995. «MHV-A59 enters polarized murine epithelial cells through the apical surface but is released basolaterally». Virology, vol. 210, no. 1, p. 54-66.

RUBBO, H., Darley-Usmar, V., Freeman, B.A. 1996. «Nitric oxide regulation of tissue free radical injury». Chem. Res. Toxicol., vol. 9, no. 5, p.809-820.

SADOVNICK A. D., Ebers, G.C. 1993. «Epidemiology of multiple sclerosis : a critical overview». Can. J. Neurol. Sci., vol. 20, no. 1, p. 17-29.

SALMI, A., Reunanen, M., Ilonen, J. 1981. «Possible viral etiology of multiple sclerosis». Dans: International Congress Series Neurology, Éd. Katsuki, S. Tsybaki, T. Toyokura, Y. Excerpta Medica, Amsterdam, p. 416-431.

SALMI A., Ziola, B., Hovi, T., Reunanen, M. 1982. «Antibodies to coronavirus OC43 and 229E in multiple sclerosis patients». Neurology, vol. 32, no. 3, p. 292-295.

SAWCER, S., Jones, H.B., Feakes, R., Gray, J., Smaldon, N., Chataway, J., Robertson, N., Clayton, D., Goodfellow, P.N., Compston, A. 1996. «A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22». Nat. Genet., vol. 13, no. 4, p. 464-468.

SAWICKI, S.G., Sawicki, D.L. 1995. «Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands». Adv. Exp. Med. Biol., vol. 380, p. 499-506.

SAWICKI, S.G., Sawicki, D.L. 1998. «A new model for coronavirus transcription». Adv. Exp. Med. Biol., vol. 440, p. 215-219.

SCHMIDT, H.H., Walter, U. 1994. «NO at work». Cell., vol. 78, no. 6, p. 919-925.

SCHULTZE B., Herrler, D., Herrler, G. 1992. «Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-0-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells». J. Gen. Virol., vol. 73, no. 4, p. 901-906.

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

SEITZ, A., Aglow, E., Heber-Katz, E. 2002. «Recovery from spinal cord injury: a new transection model in the C57Bl/6 mouse». J. Neurosci. Res., vol. 67, no. 3, p. 337-345.

SEMENZA, G. 1986. «Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli». Ann. Rev. Cell Biol., vol. 2, p. 255-313.

SHI, F.D., Ljunggren, H.G., Sarvetnick, N. 2001. «Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction». Trends Immunol., vol. 22, no. 2, p.97-101.

SIBLEY W. A., Bamford, C.R., Clark, K. 1985. «Clinical viral infections and multiple sclerosis». Lancet, vol. 1, no. 8441, p. 1313-1315.

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

SOLA, P., Merelli, E., Marasca, R., Poggi, M., Luppi, M., Montorsi, M., Torelli, G. 1993. «Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction». J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, vol. 56, no. 8, p. 917-919.

SOLDAN, S.S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P.A., Brennan, M.B., Maloni, H.W., McFarland, H.F., Lin, H.C., Patnaik, M., Jacobson, S. 1997. «Association of human herpesvirus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA». Nat. Med., vol. 3, no. 12, p. 1394-1297.

STEINMAN, L. 2001. «Multiple sclerosis: a two-stage disease». Nat. Immunol., vol. 2, no. 9, p. 762-764.

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

STOHLMAN, S.A., Hinton, D.R. 2001. «Viral induced demyelination». Brain Pathol., vol. 11, no. 1, p. 92-106.

STRELOW, L., Janigro, D., Nelson, J.A. 2002. «Persistent SIV infection of a blood-brain barrier model». J. Neurovirol., vol. 8, p. 270-280.

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

TALBOT P.J., Ekande, S., Cashman, N.R., Mounir, S., Stewart, J.N. 1993. «Neurotropism of human coronavirus 229E». Adv. Exp. Med. Biol., vol. 342, p. 339-346.

TALBOT P.J., Paquette, J.S., Ciurli, C., Antel, J.P., Ouellet, F. 1996. «Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis». Ann. Neurol., vol. 39, no. 2, p. 233-240.

TANG, T., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D., Mayadas, T.N. 1996. «Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins». J. Clin. Invest., vol. 97, p.2485-2490.

THANAWONGNUWECH, R., Halbur, P.G., Thacher, E.L. 2000. «The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection». Anim. Health Res. Rev., vol. 1, p. 95-102.

THOMAS, W.E. 1999. «Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells». Brain Res. Rev., vol. 31, no. 1, p. 42-57.

TOKUNAGA, K., Nakamura, Y., Sakata, K., Fujimori, K., Ohkubo, M., Sawada, K., Sakiyama, S. 1987. «Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers». Cancer Res., vol. 47, no. 21, p. 5616-5619.

TRESNAN, D.B., Levis, R., Holmes, K.V. 1996. «Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I». J. Virol., vol. 70, p. 8669-8674.

VANDERLUGT, C.L., Neville, K.L., Nikcevich, K.M., Eagar, T.N., Bluestone, J.A., Miller, S.D. 2000. «Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis». J. Immunol., vol. 164, no. 2, p. 670-678.

VLASAK, R., Luytjes, W., Lieder, J., Spaan, W.J.M., Palese, P. 1988. «The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetyl transferase activity». J. Virol., vol. 62, p. 4686-4690.

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

WANG G., Deering, C., Macke, M., Shao, J., Burns, R., Blau, D.M., Holmes, K.V., Davidson, B.L., Perlman, S., McCray, P.B.JR. 2000. «Human coronavirus 229E infects polarized airway epithelia from the apical surface». J. Virol., vol. 74, no. 19, p. 9234-9239.

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

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

WONG, D., Prameya, R., Dorovini-Zis, K. 1999. «In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1». J. Neuropathol. Exp. Neurol., vol. 58, p. 138-152.

WU, D.T., Woodman, S.E., Weiss, J.M, McManus, C.M., D'Aversa, T.G., Hesselgesser, J., Major, E.O., Nath, A., Berman, J.W. 2000. «Mechanisms of leukocyte trafficking into the CNS». J. Neurovirol., vol. 6, suppl. 1, S82-S85.

WUCHERPFENNIG, K.W., Strominger, J.L. 1995. «Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein». Cell, vol. 80, no. 5, p. 695-705.

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

ZHANG, Q.F., Cui, J.M., Huang, X.J., Lin, W., Tan, D. Y., Xu, J.W., Yang, Y.F., Zhang, J.Q., Zhang, X., Li, H., Zheng, H.Y., Chen, Q.X., Yan, X.G., Zheng, K., Wan, Z.Y., Huang, J.C. 2003. «Morphology and morphogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated virus». Act. Bioch. Bioph. Sin., vol. 35, no. 6, p. 587-591.