

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Activation de lymphocytes auto-réactifs spécifiques à la protéine basique  
de la myéline suite à l'infection par le coronavirus murin**

Par  
Edith Gruslin

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

Jury d'évaluation

Président du jury

et examinateur interne : Suzanne Lemieux, INRS-Institut Armand-Frappier

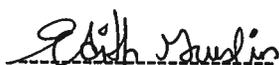
Examineur externe : Nathalie Labrecque, Hôpital Maisonneuve-Rosemont,  
Centre de recherche Guy-Bernier

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

## Résumé

Les maladies auto-immunitaires affectent 3 à 5% de la population. Bien que l'étiologie de ces pathologies soit inconnue, des facteurs génétiques et environnementaux y sont fréquemment associés. Parmi les facteurs environnementaux possiblement liés à la sclérose en plaques (SEP), une maladie auto-immunitaire caractérisée par une destruction de la myéline, se trouve une longue liste de virus, incluant les coronavirus. L'infection de la souris par le coronavirus murin (MHV) fournit un modèle animal d'étude de la SEP. L'objectif du travail était de caractériser l'induction possible de réactions auto-immunitaires spécifiques au système nerveux central suite à l'infection. Premièrement, la caractérisation du modèle d'étude a été réalisée. Suite à l'injection intra-cérébrale (i.c.) du MHV, souche A59, la mesure de la charge virale par un test de plages de lyse a indiqué qu'elle était maximale au cerveau 2 jours post-infection (p.i.) et au foie 4 jours p.i.. Le virus était devenu indétectable dans ces deux organes à 7 jours p.i.. De plus, un test ELISA a mis en évidence la production d'anticorps de façon significative chez tous les animaux à 7 jours p.i.. Deuxièmement, l'activation de lymphocytes spécifiques à un antigène du SNC suite à l'infection par le MHV a été mesurée par un test de prolifération cellulaire. Ainsi, des lymphocytes T spécifiques à une protéine de la myéline (protéine basique de la myéline), et non à des antigènes témoins (ovalbumine, lysats de poumon de souris), ont été détectés à 7 jours p.i. dans la rate de souris infectées mais pas de souris témoins. Troisièmement, la modulation de la transcription des gènes cellulaires induite par l'infection a été étudiée afin d'obtenir des informations sur le mécanisme responsable de l'activation de cette population cellulaire auto-réactive. Des matrices d'ADNc ont révélé un changement significatif de l'expression de 41 gènes sur les 1176 testés. Parmi ces changements, une augmentation de l'expression de plusieurs gènes (24/41) a été observée à 7 jours p.i. La majorité de ces gènes sont liés à la réponse immunitaire, certains étant impliqués dans la présentation antigénique, d'autres caractéristiques des leucocytes ou bien codant pour des chimiokines. Les résultats des matrices d'ADNc ont été validés par la confirmation par RT-PCR de certains des changements observés. La présente étude révèle donc que, dans un modèle animal de SEP, (1) le virus est éliminé du

foie et du cerveau à 7 jours p.i. alors qu'au même moment (2) l'activation de cellules T auto-réactives spécifiques à la myéline est observée et (3) qu'une hausse importante de l'expression de différents gènes reliés à l'immunité est détectée. Ceci suggère que l'activation observée des lymphocytes T auto-réactifs est le résultat d'un processus inflammatoire, bien que des études fonctionnelles exhaustives devront être réalisées pour le confirmer. Cependant, le rôle du mimétisme moléculaire, de la propagation de déterminants et des superantigènes dans l'activation de cette réponse auto-immunitaire n'est pas exclu. Ce travail confirme donc l'activation de lymphocytes T spécifiques à un antigène de la myéline suite à l'infection par le coronavirus murin. La caractérisation des mécanismes sous-jacents fournira des informations importantes dans la compréhension de l'auto-immunité viro-induite dans le contexte de la SEP.



Edith Gruslin



Pierre Talbot

## Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Talbot, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et soutenu durant la réalisation de mon projet de maîtrise.

Je voudrais également remercier Francine Lambert pour son support technique d'abord, mais aussi pour le support moral et tous les moments agréables passés en sa compagnie.

Je tiens à remercier le Dr Yves St-Pierre, spécialement pour sa contribution à la réalisation des expériences portant sur les matrices d'ADN complémentaire. Un merci spécial pour les conseils en tout genre ainsi que pour tout le temps qu'il m'a si généreusement accordé.

Je voudrais finalement remercier de tout mon cœur Steve Moisan, notamment pour l'aide qu'il m'a apportée lors des études sur l'expression des gènes suite à l'infection. Je ne peux passer sous silence le trésor de patience dont il a fait preuve à mon égard, les nombreux conseils dont il m'a entourée ainsi que les petits bonheurs qu'il sait créer autour de lui. Merci !

## Table des matières

|   |          |
|---|----------|
| Résumé.....   | i        |
| Remerciements.....                                  | iii      |
| Liste des figures.....                              | viii     |
| Liste des tableaux.....                             | x        |
| Liste des abréviations.....                         | xi       |
| <br>  |          |
| Introduction.....                                   | 1        |
| <br>  |          |
| 1. Revue de littérature                             |          |
| <b>1.1 Auto-immunité.....</b>                       | <b>2</b> |
| 1.1.1 Effets reliés à l'inflammation.....           | 3        |
| 1.1.2 Propagation de déterminants.....              | 7        |
| 1.1.3 Mimétisme moléculaire.....                    | 9        |
| 1.1.4 Superantigène.....                            | 13       |
| 1.1.5 Conclusion.....                               | 16       |
| <b>1.2 Sclérose en plaques (SEP)</b>                |          |
| 1.2.1 Description de la pathologie.....             | 17       |
| 1.2.2 Immunopathologie.....                         | 17       |
| 1.2.3 Étiologie.....                                | 18       |
| 1.2.3.1 Facteurs génétiques.....                    | 18       |
| 1.2.3.2 Facteurs environnementaux.....              | 19       |
| 1.2.4 SEP et coronavirus.....                       | 21       |
| 1.2.5 Conclusion.....                               | 22       |
| <b>1.3 Coronavirus – généralités</b>                |          |
| 1.3.1 Description du virus et de ses protéines..... | 22       |
| 1.3.1.1 Protéines structurales.....                 | 23       |
| 1.3.1.2 Protéines non-structurales.....             | 24       |
| 1.3.2 Division en groupes antigéniques.....         | 24       |
| 1.3.3 Infections causées par les coronavirus.....   | 24       |
| 1.3.4 Conclusion.....                               | 24       |
| <b>1.4 Coronavirus murin</b>                        |          |
| 1.4.1 Pathogenèse.....                              | 26       |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.4.2 Infection du système nerveux central (SNC) par le MHV.....  | 27        |
| 1.4.2.1 Neuroinvasion et neurotropisme.....   | 27        |
| 1.4.2.2 Persistance.....  | 28        |
| 1.4.3 Réponse immunitaire au SNC suite à l'infection par le coronavirus   |           |
| 1.4.3.1 Infection aiguë.....  | 28        |
| 1.4.3.2 Infection persistante.....  | 29        |
| 1.4.4 Démyélinisation.....  | 29        |
| 1.4.5 L'infection par le MHV comme modèle pour la SEP.....  | 31        |
| 1.4.6 Conclusion.....   | 32        |
| <b>2. Matériel et méthodes</b>  |           |
| <b>2.1 Lignées cellulaires.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>2.2 Production virale.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>2.3 Dosage du titre viral infectieux.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>2.4 Infection des animaux.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>2.5 Dosage du virus infectieux au cerveau et au foie des souris lors d'une<br/>    cinétique d'infection par le MHV-A59.....</b> | <b>35</b> |
| <b>2.6 Séropositivité des souris</b>  |           |
| 2.6.1 Préparation des antigènes.....  | 35        |
| 2.6.2 Test ELISA.....   | 36        |
| <b>2.7 Dosage des protéines.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>2.8 Mise en culture des splénocytes.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>2.9 Préparation des antigènes.....</b>   | <b>38</b> |
| 2.9.1 Lysat de cellules DBT et cellules DBT infectées par le MHV-A59...   | 38        |
| 2.9.2 Préparation de la protéine basique de la myéline (PBM)  |           |
| 2.9.2.1 Extraction.....   | 38        |
| 2.9.2.2 Immunobuvardage de type Western.....  | 39        |
| 2.9.3 Homogénat de poumons.....   | 41        |
| <b>2.10 Mesure de la prolifération cellulaire</b>   |           |
| 2.10.1 Antigènes.....   | 41        |
| 2.10.2 Culture de splénocytes.....  | 42        |
| 2.10.3 Incorporation de la thymidine tritiée.....   | 42        |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 2.10.4      | Mesure de la prolifération cellulaire.....   | 42        |
| 2.10.5      | Mesure de réactions croisées entre la PBM et le MHV.....                                   | 43        |
| <b>2.11</b> | <b>Extraction d'ARN de cerveau de souris.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>2.12</b> | <b>Traitement à la DNase.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>2.13</b> | <b>Électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant.....</b>                                    | <b>44</b> |
| <b>2.14</b> | <b>Préparation de l'ADN complémentaire (ADNc).....</b>                                     | <b>44</b> |
| <b>2.15</b> | <b>Réaction de polymérase en chaîne (PCR).....</b>   | <b>45</b> |
| <b>2.16</b> | <b>Matrices d'ADNc.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>3.</b>   | <b>Résultats.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Caractérisation des effets de l'infection</b>   |           |
| 3.1.1       | Réplication virale au cerveau et au foie.....  | 49        |
| 3.1.2       | Réponse humorale.....  | 50        |
| <b>3.2</b>  | <b>Réponse immunitaire dirigée contre un antigène viral et un antigène<br/>du soi.....</b> | <b>50</b> |
| 3.2.1       | Production de PBM.....   | 51        |
| 3.2.2       | Optimisation des tests de prolifération.....   | 52        |
| 3.2.2.1     | Temps p.i.....   | 52        |
| 3.2.2.2     | Concentration de l'antigène viral.....   | 53        |
| 3.2.2.3     | Concentration de la PBM.....   | 54        |
| 3.2.3       | Prolifération spécifique au MHV et à la PBM.....   | 55        |
| 3.2.4       | Réactions croisées de lymphocytes T reconnaissant la PBM et<br>le MHV.....                 | 57        |
| <b>3.3</b>  | <b>Modulation de l'expression génique au cerveau suite à l'infection par<br/>le MHV</b>    |           |
| 3.3.1       | Matrices d'ADNc.....   | 57        |
| 3.3.2       | Confirmation des changements par RT-PCR.....   | 58        |
| <b>4.</b>   | <b>Discussion.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>4.1</b>  | <b>Caractérisation des effets de l'infection.....</b>                                      | <b>67</b> |
| <b>4.2</b>  | <b>Réponse immunitaire dirigée contre un antigène viral et un antigène<br/>du soi.....</b> | <b>69</b> |
| 4.2.1       | Production de PBM.....   | 70        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2.2 Optimisation des tests de prolifération.....                 | 70        |
| 4.2.3 Prolifération spécifique induite par le MHV et la PBM.....   | 71        |
| <b>4.3 Étude de la variation d'expression de gènes au SNC.....</b> | <b>73</b> |
| <b>5. Conclusions et perspectives.....</b>                         | <b>80</b> |
| <b>Liste de références.....</b>                                    | <b>83</b> |

## Liste des figures

- Figure 1.** Effets de l'inflammation causée par une infection virale sur l'induction d'une réponse auto-immunitaire.
- Figure 2.** Implication de la propagation de déterminants suite à une infection virale dans une réponse auto-immunitaire.
- Figure 3.** Rôle du mimétisme moléculaire dans la réponse auto-immunitaire.
- Figure 4.** Activation polyclonale de lymphocytes T par un superantigène.
- Figure 5.** Représentation schématique d'un coronavirus.
- Figure 6.** Étapes de la préparation des sondes pour l'hybridation aux matrices d'ADNc.
- Figure 7.** Titres viraux moyens du MHV au cerveau et au foie de souris C57BL/6 infectées i.c. par le MHV.
- Figure 8.** Réponse humorale suite à l'infection de souris C57BL/6 par le MHV.
- Figure 9.** Immunobuvardage de type Western de PBM isolée de cerveau bovin.
- Figure 10.** Activation de lymphocytes T spécifiques au virus et à la PBM chez les souris infectées par le MHV.
- Figure 11.** Matrices d'ADNc hybridées avec une sonde produite à partir de l'ARN de cerveaux de souris témoins et infectées.

**Figure 12.** Expression du gène *li* aux cerveaux des souris témoins et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 p.i..

**Figure 13.** Expression du gène *CD3 $\gamma$*  aux cerveaux des souris témoins et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 p.i..

**Figure 14.** Expression du gène *galectine-3* aux cerveaux des souris témoins et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 p.i..

**Figure 15.** Expression du gène *CXCL10* aux cerveaux des souris témoins et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 p.i..

**Figure 16.** Expression du gène *GAPDH* aux cerveaux des souris témoins et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 p.i..

## Liste des tableaux

- Tableau 1.** Virus associés à la SEP selon différentes approches expérimentales.
- Tableau 2.** Sérotypes, hôtes naturels et maladies causées par les coronavirus.
- Tableau 3.** Description des amorces spécifiques et des conditions pour l'amplification par RT-PCR des différents gènes exprimés dans le cerveau de souris.
- Tableau 4.** Incorporation de thymidine tritiée par des splénocytes de souris suite à l'infection par le MHV sous différentes stimulations à divers temps p.i..
- Tableau 5.** Dilutions d'antigènes viraux présentés pour stimuler la prolifération spécifique de splénocytes en réponse au MHV suite à l'infection de souris par ce virus.
- Tableau 6.** Concentrations de PBM présentées pour stimuler la prolifération spécifique de splénocytes en réponse à cet antigène suite à l'infection par le MHV.
- Tableau 7.** Lignées spécifiques au MHV ou/et à la PBM issues de splénocytes de souris C57BL/6 infectées i.c. par le MHV.
- Tableau 8.** Variations significatives d'expression observées entre des gènes au cerveau de souris infectées par le MHV et de souris témoins.

## Liste des abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
APS : persulfate d'ammonium  
ARN : acide ribonucléique  
ATCC : *American Type Culture Collection*  
BCoV : coronavirus bovin  
Bgp : glycoprotéine biliaire  
BHE : barrière hémato-encéphalique  
°C : degré Celsius  
CCoV : coronavirus canin  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone  
ConA : concanavaline A  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
cpm : comptes par minute  
DBT : *delayed brain tumor*  
DEPC : diéthylpyrocarbonate  
dNTP : déoxynucléotide triphosphate  
D.O. : densité optique  
DR : *death receptor*  
DTT : dithiothréitol  
EAE : encéphalite allergique expérimentale  
EDTA : acide éthylènediamine-tétraacétique  
FECoV : coronavirus entérique félin  
FIPV : virus félin de la péritonite infectieuse  
GH : hormone de croissance (*growth hormone*)  
HAM/TSP : myélopathie/paraparésie spastique tropicale associée au HTLV-1  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : acide sulfurique  
HCl : acide chlorydrique  
HCoV : coronavirus humain

HEPES : acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonique  
HEV : virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine  
HRP : peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*)  
HSK : ulcère de cornée herpétique (*herpes stromal keratitis*)  
HSV : virus de l'herpès simplex  
HTLV-1 : virus T lymphotrope humain de type 1  
IBV : virus de la bronchite infectieuse aviaire  
i.c. : intra-cérébrale  
IFN : interféron  
i.g. : intra-gastrique  
IgG : immunoglobuline G  
IL : interleukine  
i.n. : intra-nasale  
i.p. : intra-péritonéale  
IRF : *interferon-regulatory factor*  
IS : indice de stimulation  
JHM : J. Howard Muller  
kb : kilobases ( $10^3$  bases)  
KCl : chlorure de potassium  
kDa : kilodalton ( $10^3$  dalton)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : phosphate de potassium, monobasique  
LFA-1 : antigène-1 associé à la fonction leucocytaire  
LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire  
M : molaire  
MCP : *monocyte chemoattractant protein*  
Me : mercaptoéthanol  
MEM : *mimimum essential medium*  
MgCl<sub>2</sub> : chlorure de magnésium  
MIP : *macrophage inflammatory protein*  
MHV : virus de l'hépatite murine (*murine hepatitis virus*)  
mL : millilitres ( $10^{-3}$  litre)

mM : millimolaire ( $10^{-3}$  molaire)

M-MLV : *Moloney murine leukemia virus*

MMP : métalloprotéinase de matrice

MOG : glycoprotéine des oligodendrocytes de la myéline (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

MOI : multiplicité d'infection

MOPS : acide 3-N-[morpholino]propanesulfonique

N : normale

NaCl : chlorure de sodium

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : phosphate de sodium, dibasique

NK : *natural killer*

NKT : *natural killer T cell*

nm : nanomètre ( $10^{-9}$  mètre)

NOD : diabétiques non-obèse (*non obese diabetic*)

OPD : o-phénylène diamine

Osp : protéine de surface externe (*outer surface protein*)

PBM : protéine basique de la myéline

PBS : tampon salin phosphaté (*phosphate buffered saline*)

PBS-T : PBS additionné de Tween-20

PCR : réaction de polymérisation en chaîne (*polymerase chain reaction*)

pH : potentiel d'hydrogène

p.i. : post-infection

PLP : protéine protéolipidique

PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle

PRCoV : coronavirus respiratoire porcin

p/v : poids sur volume

PVDF : *polyvinylidene difluoride*

RAG : *recombination activating gene*

RANTES : *regulated upon activation normal T-expressed and presumably secreted protein*

RbCoV : coronavirus de lapin

RCT : récepteur des cellules T  
RT : transcription inverse (*reverse transcription*)  
SAg : superantigène  
SCID : *severe combined immunodeficiency*  
SDAV : virus de la sialdoacryadénite  
SDS : sulfate dodécyl de sodium  
SEB : entérotoxine B staphyloccoccale  
SEP : sclérose en plaques  
SNC : système nerveux central  
SSC : *standard saline citrate*  
SVF : sérum de veau fœtal  
TCoV : coronavirus de dinde  
TCP : *T-complex protein*  
TGEV : virus de la gastro-entérite porcine transmissible  
TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine  
TMEV : virus de l'encéphalomyélite de Theiler  
TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor-alpha*  
TNF-R : récepteur du *tumor necrosis factor*  
TP : température de la pièce  
Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane  
ufp : unités formatrices de plages  
 $\mu\text{L}$  : microlitres ( $10^{-6}$  litre)  
UV : ultra-violet  
V : volt  
VCAM-1 : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire - 1  
VLA-4 : antigène d'activation très tardif - 4 (*very late activation antigen-4*)  
v/v : volume sur volume

## Introduction

Les maladies auto-immunitaires surgissent lorsque le système de défense se retourne contre son hôte. La (les) raison(s) provoquant un tel dérèglement n'a(ont) toujours pas identifiée(s), bien que des causes génétiques et environnementales aient été associées à ce type de pathologie. Divers mécanismes ont d'ailleurs été avancés pour expliquer comment une infection virale pourrait être associée aux maladies auto-immunitaires. Il importe de comprendre comment ce phénomène est déclenché afin de mieux prévenir et traiter ces maladies.

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immunitaire entraînant de la démyélinisation au système nerveux central (SNC). Parmi les facteurs environnementaux reliés à cette maladie figurent les coronavirus. D'ailleurs, l'infection de souris par le coronavirus murin constitue un modèle animal d'étude de la SEP. C'est en utilisant ce modèle qu'il sera démontré qu'une infection virale peut mener à l'activation de cellules immunitaires dirigées contre un auto-antigène. Dans ce but, le modèle murin sera premièrement caractérisé au niveau de la réplication du virus, à l'aide d'un test de plages de lyse, et de la production d'anticorps, via un test ELISA, suite à l'infection. Deuxièmement, la présence d'une population de cellules T auto-réactives spécifique à la myéline chez les souris infectées par le coronavirus murin sera vérifiée par une mesure de prolifération cellulaire sous une stimulation antigénique. Troisièmement, la contribution de différents mécanismes pouvant expliquer comment une infection virale peut entraîner une réponse auto-immunitaire sera évaluée. Plus précisément, la prolifération de mêmes lignées lymphocytaires par différents antigènes sera mesurée pour étudier le mimétisme moléculaire alors que des études moléculaires seront réalisées à l'aide de matrices ADNc pour entre autres évaluer les effets liés à l'inflammation.

Ce mémoire présente d'abord une revue de la littérature traitant de l'auto-immunité, de la SEP, des coronavirus en général et du coronavirus murin en particulier. Puis, le matériel et les méthodes utilisés sont traités. Ensuite, les résultats obtenus sont décrits. Finalement, le fruit de ces travaux est discuté pour en tirer une conclusion globale.

# 1. Revue de littérature

## 1.1 Auto-immunité

Le système immunitaire doit être capable de défendre l'hôte face aux pathogènes en déclenchant une réponse contre les antigènes dérivés de ces derniers, tout en évitant de répondre aux propres antigènes de l'hôte. Pour ce faire, la tolérance au soi des cellules B est induite durant leur développement par différents mécanismes tels la délétion clonale, l'anergie, l'arrêt de la maturation et la modification du récepteur (*receptor editing*) (pour une revue : Tsubata et Honjo, 2000). Plusieurs mécanismes induisent la tolérance des cellules T : la tolérance périphérique, l'ignorance, la présence de cellules régulatrices et la délétion clonale. La tolérance des cellules T est induite par la délétion clonale dans le thymus des cellules T dont le récepteur (RCT) reconnaît fortement des complexes formés de peptide du soi et de molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Kappler *et al.*, 1987, Kretz-Rommel et Rubin, 2000). Néanmoins, certaines cellules T potentiellement autoréactives échappent à ce processus de sélection négative et se retrouvent alors en périphérie. Ceci est possible d'abord grâce à la sélection positive, si les cellules ont une faible affinité ou avidité pour un peptide du soi lié à un CMH exprimé à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) thymique (Datta, 2000), mais aussi si ces cellules se retrouvent en faible abondance ou encore simplement si l'autoantigène n'est pas exprimé au thymus (Benoist et Mathis, 1998). Lorsqu'ils circulent en périphérie, ces lymphocytes T sont inoffensifs tant qu'ils se trouvent au repos. La cellule auto-réactive doit recevoir à la fois un signal spécifique, la liaison du RCT à un complexe peptide du soi/CMH, ainsi qu'un signal non-spécifique de co-stimulation, offert par une CPA professionnelle, pour s'activer (Steinman, 1991, Barnaba, 1996). Le lymphocyte T auto-réactif activé peut alors causer des dommages directement, par une action cytotoxique ou la libération de cytokines, ou encore indirectement, par la production dépendante des cellules T d'anticorps pathogéniques (Naucclér *et al.*, 1996). Toutefois, une protection contre l'auto-immunité peut être assurée par les cellules NKT chez la souris (Gombert *et al.*, 1996 ; Harif, S. *et al.*, 2001 ; Singh *et al.*, 2001). Lorsque qu'une réponse auto-immune est néanmoins induite, elle peut causer des dommages et ainsi conduire à des maladies auto-immunitaires.

Les maladies auto-immunitaires affectent 3 à 5 % de la population américaine (Jacobson *et al.*, 1997). Elles sont initiées par une population particulière de cellules T ou B autoréactives dirigées contre un seul antigène. Elles peuvent être spécifiques à un organe ou systémique, selon que l'antigène cible soit exprimé dans un seul organe ou largement dans l'hôte, respectivement (Marrack *et al.*, 2001). Les maladies auto-immunitaires spécifiques à un organe, comme le diabète de type 1 et la SEP, sont caractérisées par une inflammation chronique, une destruction tissulaire et une perte de fonction de l'organe cible (Shi *et al.*, 2001). Malgré l'association reliant certains gènes, notamment ceux du CMH, à différentes maladies auto-immunitaires (Merriman et Todd, 1995), l'étiologie exacte de ce type de pathologie demeure inconnue. Pourquoi les lymphocytes autoréactifs, observés à des niveaux physiologiques chez des individus sains (Caranaud et Bach, 1993), sont-ils activés à un moment particulier et entraînent alors une pathologie chez certains individus seulement? Une hypothèse fréquemment retenue soutient que le déclenchement de la maladie requiert un facteur environnemental, par exemple une infection, qui entraîne l'activation d'une population auto-réactive déjà présente chez un individu génétiquement prédisposé (Aichele *et al.*, 1996, Barnaba, 1996, Gianani et Sarvetnick, 1996). Les sections 1.1.1 à 1.1.4 décrivent divers mécanismes avancés pour expliquer l'activation d'une telle population suite à une infection virale. Ces mécanismes mettent en scène une réponse immunitaire à un pathogène qui s'avère plus nuisible pour l'hôte que ne l'est le pathogène lui-même (Benoist et Mathis, 1998).

### **1.1.1 Effets reliés à l'inflammation**

Dans ce scénario, les cellules T autoréactives ne sont pas activées spécifiquement par un antigène du soi, mais plutôt par des cytokines libérées au site d'inflammation. Le virus jouerait un rôle d'adjuvant en entraînant la production de cytokines inflammatoires destinées à augmenter la protection de l'hôte mais entraînant du coup le développement de maladies auto-immunitaires (Fairweather *et al.*, 2001).

Ainsi, suite à une infection virale, la réponse immunitaire de l'hôte mène entre autres à l'activation de lymphocytes T spécifiques. La cellule T activée est en mesure de lier la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1) sur l'endothélium par un

antigène d'activation très tardif (VLA-4), puis de s'attacher à la paroi endothéliale (Fabbri *et al.*, 1999). Le lymphocyte T pénètre ensuite la barrière endothéliale par extravasation et se retrouve alors dans l'organe infecté. Une fois au site, le lymphocyte T activé sécrète des cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron(IFN)-gamma et le *tumor necrosis factor*-alpha (TNF- $\alpha$ ) qui jouent différents rôles (Boehm *et al.*, 1997). Ces dernières sont notamment responsables d'une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules épithéliales (Botazzo *et al.*, 1983). L'IFN- $\gamma$  induit par ailleurs la sécrétion de chimiokines (par exemple : CCL2 (aussi appelé MCP-1(*monocyte chemoattractant protein*)), RANTES, MIP (*macrophage inflammatory protein*)-1 $\alpha$  et 1- $\beta$ ) qui sont chimioattractantes pour les monocytes et les lymphocytes (Boehm *et al.*, 1997). La présence plus importante des molécules d'adhésion couplée à la sécrétion de chimiokines amène un recrutement non-spécifique de cellules inflammatoires. Un ensemble de cellules T est de cette façon conduit à l'organe inflammé. Les cellules T recrutées peuvent alors proliférer en réponse aux cytokines, sans considération pour la spécificité antigénique (Unutmaz *et al.*, 1994 ; Tough *et al.*, 1996). Les cellules T mémoires stimulées par des cytokines pro-inflammatoires démontrent même une fonction effectrice (Unutmaz *et al.*, 1994). Une réponse cellulaire est donc déclenchée sans qu'il n'y ait eu de stimulation par le RCT.

Néanmoins, la pertinence biologique du phénomène de l'activation non-spécifique dans l'auto-immunité est controversée. Certaines études indiquent que la majorité des cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> retrouvées au site de la pathologie sont spécifiques à l'antigène (Murali-Krishna *et al.*, 1998 ; Haring *et al.*, 2001). L'activation de la fonction effectrice des cellules T de façon non-spécifique ne fait pas l'unanimité non plus, étant suggérée par certaines équipes de recherche (Ehl *et al.*, 1997 ; Murali-Krishna *et al.*, 1998) et contredite par d'autres (Ke *et al.*, 1998). La stimulation non-spécifique peut également avoir des effets variables selon que les cellules soient naïves ou mémoires, ainsi que selon sa durée (Di Rosa et Barnaba, 1998).

Dans l'optique où l'inflammation ne mène pas à elle seule à une activation non-spécifique suffisante à l'induction d'une maladie auto-immunitaire, elle peut toutefois

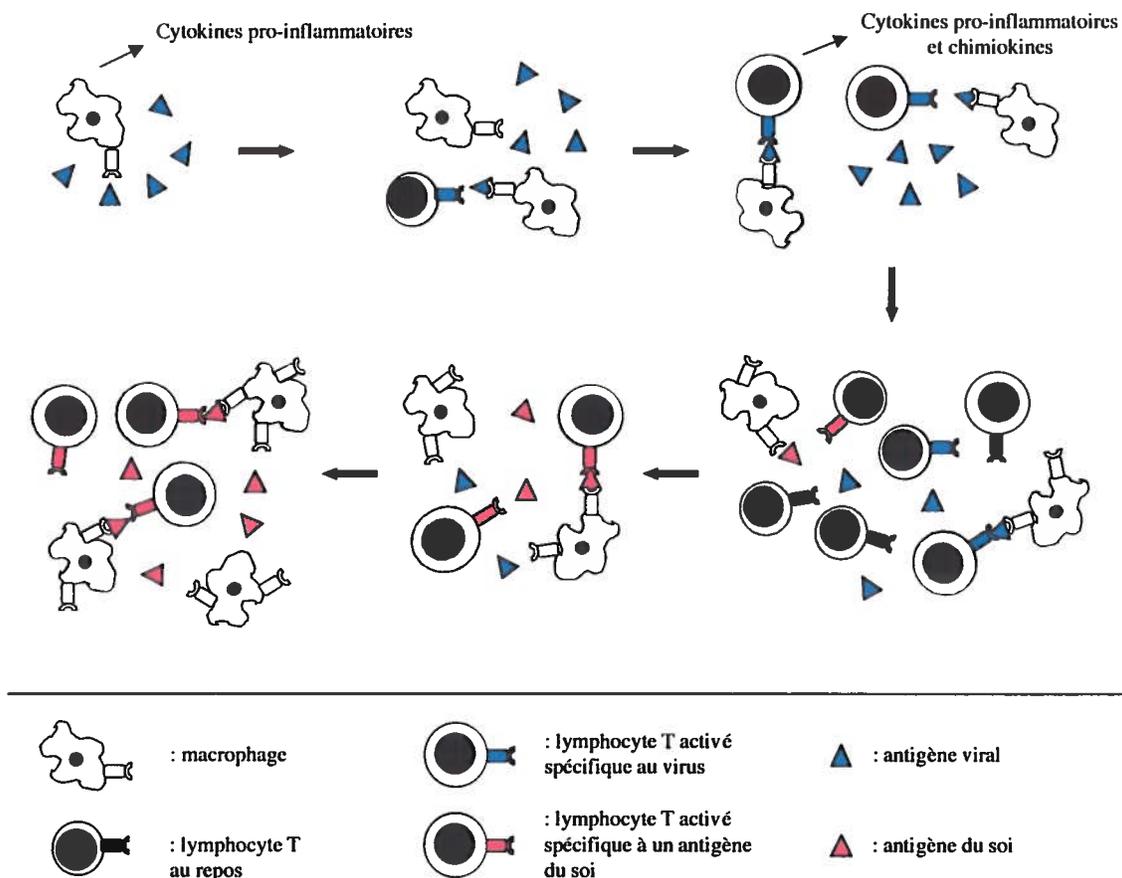
fournir à une population auto-réactive une porte d'entrée vers un organe cible. En effet, il est possible que parmi l'ensemble de cellules recrutées au site inflammé se trouvent des cellules auto-réactives spécifiques pour un antigène du soi exprimé dans l'organe cible. De plus, une augmentation de la production de cytokines peut contribuer à la division de cellules T activées (Wucherpfennig, 2001). Une réaction spécifiquement dirigée contre un antigène du soi pourra alors être déclenchée (Barnaba, 1996).

Plusieurs éléments favorisent la libération d'antigènes du soi et du non-soi dans un contexte inflammatoire causé par une infection virale. Les effets directs d'un virus cytopathique, le recrutement et l'activation non-spécifique de cellules T et de monocytes au site d'inflammation par les chimiokines et les cytokines pro-inflammatoires de même que l'action directe de certaines cytokines provoquent la mort cellulaire et la destruction tissulaire, ce qui augmente par conséquent la libération d'antigènes (Barnaba, 1996 ; Horwitz et Sarvetnick, 1999). La plus grande abondance d'antigènes qui en découle favorise leur présentation.

Les cytokines pro-inflammatoires sont également responsables d'une amélioration de l'efficacité de la présentation antigénique pour plusieurs raisons. Leur sécrétion amène une augmentation de l'expression des molécules de surface cellulaire telles les molécules de co-stimulation (Panoutsakopoulou et Cantor, 2001) et celles du CMH (Botazzo *et al.*, 1983). De plus, la réponse inflammatoire mène à la maturation complète de cellules dendritiques qui migrent aux organes lymphoïdes secondaires pour stimuler les cellules T naïves (Banchereau et Steinman, 1998). Les CPA présenteront dans ce contexte de façon plus efficace les antigènes viraux, mais aussi les antigènes du soi libérés par les cellules endommagées du tissu inflammé.

En résumé, une infection virale peut entraîner une réponse auto-immunitaire en induisant de l'inflammation au site d'infection (illustré à la figure 1). La présence de cytokines pro-inflammatoires mène au recrutement non-spécifique de cellules immunitaires et permet l'activation complète de cellules T. Des cellules T autoréactives spécifiques à des antigènes du soi présents dans l'organe cible peuvent être présentes

parmi l'ensemble de cellules recrutées. D'autre part, la destruction tissulaire entraîne la libération d'antigènes du soi. Les cellules T autoréactives présentes au site d'inflammation peuvent alors répondre via leur RCT à un antigène du soi qui leur est présenté de façon très efficace par les CPA sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires.



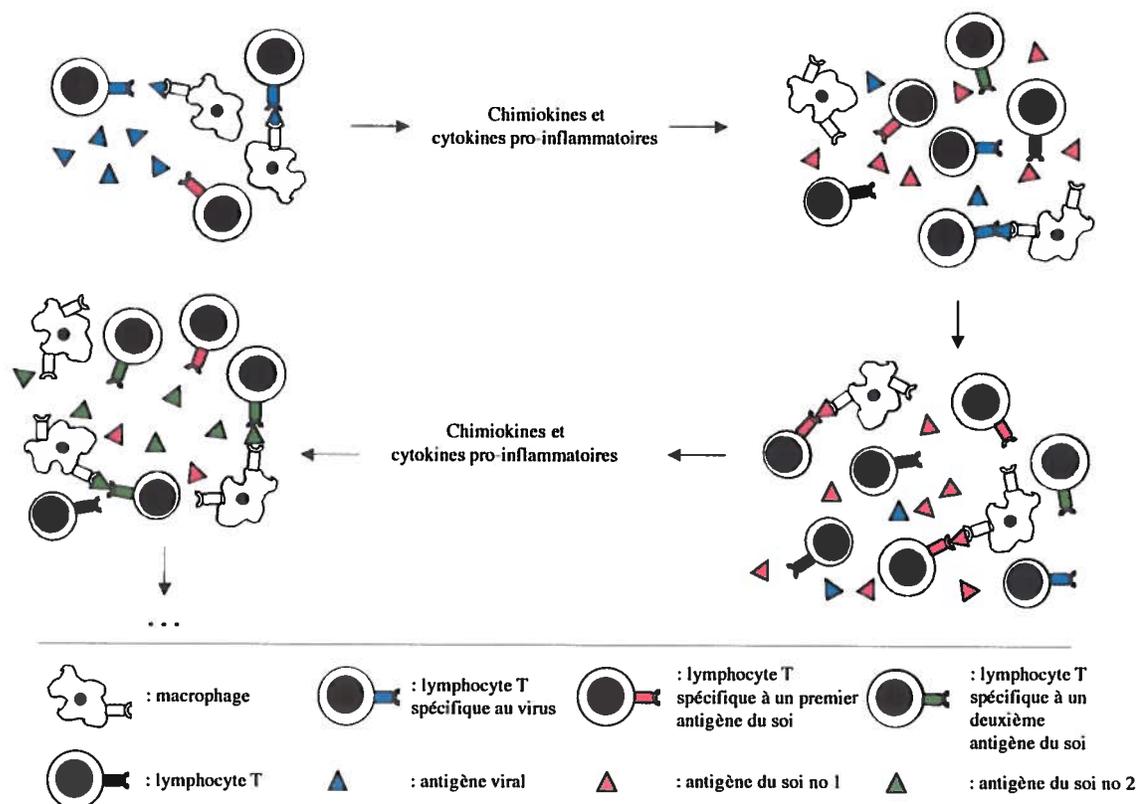
**Figure 1. Effets de l'inflammation causée par une infection virale sur l'induction d'une réponse auto-immunitaire.** La phagocytose d'antigènes viraux par le macrophage entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules T au site d'infection. Une cellule T spécifique pour un antigène viral reconnaît ensuite l'antigène présenté par une CPA, ce qui augmente la libération de cytokines et de chimiokines ainsi que l'efficacité de la présentation antigénique. Un grand nombre de cellules T est recruté de façon non spécifique au site d'infection. La mort des cellules infectées et les dommages tissulaires causés par l'inflammation mènent à la libération d'autoantigènes. Parmi l'ensemble de cellules T recrutées au site peut se trouver une sous-population auto-réactive. Le lymphocyte T autoréactif auquel l'autoantigène est présenté par une CPA va être activé, puis se diviser. La réponse auto-immunitaire est alors enclenchée.

### 1.1.2 Propagation de déterminants

La propagation de déterminants est un second mécanisme proposé pour expliquer comment une infection virale peut mener à l'établissement d'une maladie auto-immunitaire chronique. L'inflammation causée par l'infection au site engendre la libération de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines induisent une augmentation de la production des protéases cellulaires (Frosch *et al.*, 1993; Opdenakker et Van Damme, 1994) et extracellulaires (Paroli *et al.*, 2000) qui exposent et dégradent des épitopes cryptiques, facilitant ainsi leur présentation par le CMH (Kozlowski *et al.*, 1992, Sherman *et al.*, 1992, Accapezzato *et al.*, 1998). La réponse immunitaire contre l'antigène déclencheur se transforme pour s'orienter vers des antigènes nouvellement exposés au site d'inflammation. Le développement de l'encéphalite allergique expérimentale (EAE) peut d'ailleurs être bloqué par des inhibiteurs de protéases (Brosnan *et al.*, 1980). La propagation de déterminants est donc le phénomène par lequel des cellules T autoréactives sont activées *de novo* par des antigènes du soi libérés suite à des dommages tissulaires causés par l'inflammation (Vanderlugt *et al.*, 2000) (résumé à la figure 2).

La première démonstration de la présence de ce mécanisme a été faite dans le modèle murin de l'EAE (Lehmann *et al.*, 1992). Lehmann et ses collègues ont démontré que l'épitope immunodominant lors de l'induction de l'EAE différait des épitopes entraînant une réponse immunitaire lors de la phase chronique de la maladie. De plus, les lymphocytes T de souris chez lesquelles l'EAE a été induite par la protéine basique de la myéline (PBM) ont montré une réponse proliférative face à la protéine protéolipidique (PLP) (Perry *et al.*, 1991 ; Cross *et al.*, 1993). La propagation de déterminants a d'autre part été mise en évidence dans un modèle murin de diabète insulino-dépendant (Kaufman *et al.*, 1993). Des souris diabétiques non-obèse (NOD) ont été utilisées par l'équipe de Lehmann dans une expérimentation démontrant que la réponse immunitaire était initialement dirigée contre la glutamate décarboxylase, un antigène se trouvant notamment dans les îlots pancréatiques, puis ensuite vers d'autres antigènes des cellules pancréatiques  $\beta$  (Kaufman *et al.*, 1993). L'hypothèse de propagation de déterminants est de plus appuyée par des études menées sur un modèle murin de démyélinisation induite par le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV). La réponse immunitaire

induite par l'infection au TMEV est d'abord dirigée contre le virus, puis contre différents épitopes de la PLP et de la glycoprotéine des oligodendrocytes de la myéline (MOG) (Miller *et al.*, 1997).



**Figure 2. Implication de la propagation de déterminants suite à une infection virale dans une réponse auto-immunitaire.** Dans un contexte inflammatoire, la mort des cellules et les dommages tissulaires mènent à la libération d'autoantigène. Un lymphocyte T recruté dans ces conditions et spécifique à un autoantigène libéré peut alors être activé. Ce lymphocyte T se divise et une première réponse auto-immunitaire a lieu. L'inflammation est maintenue et les dommages tissulaires se poursuivent, exposant ainsi un second auto-antigène. Ce deuxième antigène du soi est reconnu par un lymphocyte T spécifique et la réponse auto-immunitaire se poursuit contre cet auto-antigène. Une cascade de réactions auto-immunitaires est alors déclenchée dans ce contexte inflammatoire.

La cascade de propagation de déterminants suit un ordre constant et prévisible (Tuohy *et al.*, 1998; Vanderlugt *et al.*, 2000). Cet ordre est déterminé par la fréquence et l'avidité des cellules T impliquées (Vanderlugt *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2001). La

régression de la réponse primaire pourrait être expliquée par différents mécanismes : l'exhaustion et la délétion clonale en périphérie, l'anergie des cellules T ou encore l'inhibition des cellules T par d'autres populations cellulaires (suppression) (Tuohy, 1999). Par ailleurs, la pathogénicité de la propagation de déterminants a été démontrée par des études de tolérance dans lesquelles la cascade de réponses auto-immunitaires a été bloquée. Ainsi, l'induction de la tolérance à l'aide d'épitopes du TMEV avant l'infection empêche l'induction de la maladie (Karpus *et al.*, 1995), alors qu'induire une tolérance envers différents épitopes impliqués dans la cascade de propagation de déterminants de la EAE inhibe la progression de la pathologie (McRae *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996).

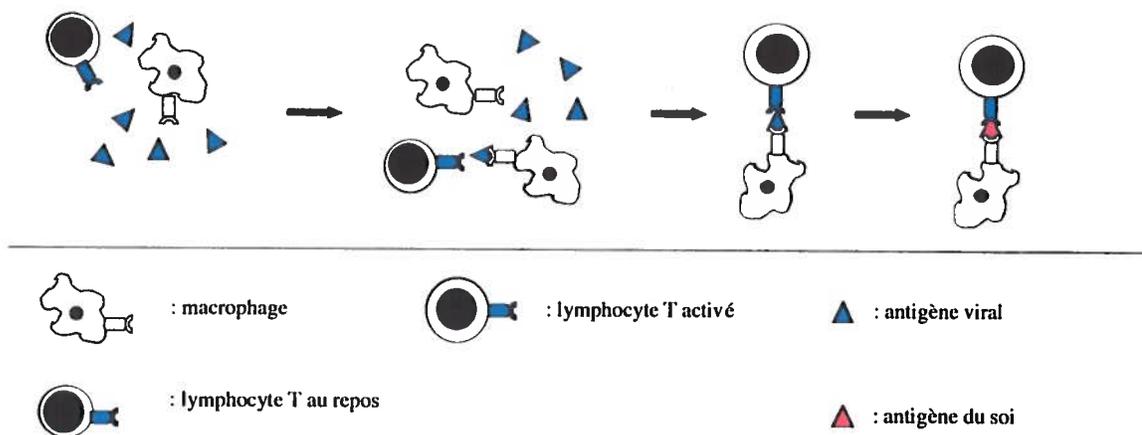
Toutefois, la théorie de la propagation de déterminants, comme les autres théories élaborées pour expliquer le lien entre l'infection virale et les maladies auto-immunitaires, ne fait pas l'unanimité. Une étude longitudinale menée sur le modèle murin de l'EAE induit par différents peptides n'a pas démontré de propagation de déterminants, mais plutôt une réponse demeurant centrée sur l'épitope utilisé pour induire la pathologie (Takács et Altmann, 1998). De plus, une étude réalisée avant, pendant et après l'EAE chez le rat a montré l'existence naturelle d'une réponse hétérogène contre la PBM, qui se restreint à un épitope dominant durant la maladie pour redevenir hétérogène suite à la rémission (Mor et Cohen, 1993).

En somme, la théorie de la propagation de déterminants implique que la réponse dirigée contre l'antigène lors du déclenchement de la maladie s'atténue pour laisser place à de nouvelles réactions dirigées alors contre des auto-antigènes déterminés selon une hiérarchie constante. Ce phénomène contribuerait aux épisodes de rechutes/rémissions et à la chronicité de maladies auto-immunitaires.

### **1.1.3 Mimétisme moléculaire**

Un troisième mécanisme avancé pour relier les infections virales et les maladies auto-immunitaires est le mimétisme moléculaire. Le concept de mimétisme moléculaire repose sur l'activation de cellules T autoréactives suite à la reconnaissance croisée par le RCT d'un épitope du pathogène et d'un épitope du soi (Oldstone, 1987 ; Miller *et al.*,

2001) (résumé à la figure 3). Cette reconnaissance de différents épitopes par un même RCT est possible grâce à la flexibilité et à la dégénérescence du RCT.



**Figure 3. Rôle du mimétisme moléculaire dans la réponse auto-immunitaire.** Lors d'une infection virale, le récepteur d'un lymphocyte T reconnaît un antigène étranger et la cellule est activée. Ensuite, cette dernière peut migrer à un organe cible, où son récepteur reconnaît un antigène du soi. Une réponse auto-immunitaire suit.

Nanda et ses collaborateurs (1995) ont démontré que le RCT est flexible et peut lier différents peptides présentés par une même molécule du CMH. De plus, une analyse par substitution à partir d'un antigène peptidique a démontré qu'un peptide n'ayant qu'un seul acide aminé commun avec le peptide de départ peut être reconnu par le RCT (Evavold *et al.*, 1995). Des études effectuées à l'aide de banques aléatoires de peptides combinatoires démontrent une flexibilité encore plus importante du RCT, concluant que les cellules T peuvent reconnaître des milliers de peptides différents (Hemmer *et al.*, 1997 ; Hemmer *et al.*, 2000). Par ailleurs, des souris transgéniques exprimant un seul peptide associé au CMH de classe II ont permis la sélection positive d'une population de cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant différents RCT (Ignatowicz *et al.*, 1996 ; Tourne *et al.*, 1997). Ces deux approches expérimentales, soit une cellule T reconnaissant plusieurs peptides et un complexe CMH-peptide permettant la sélection de différentes cellules T, ont contribué à démontrer la dégénérescence du RCT.

Par ailleurs, des homologies entre les séquences de virus et les constituants normaux des cellules de l'hôte sont bien caractérisées (Lane et Hoeffler, 1980 ; Clarke *et al.*, 1983 ; Fujinami *et al.*, 1983 ; Haynes *et al.* ; 1983 ; Talbot, 1997). L'induction par un peptide viral d'anticorps ayant une double reconnaissance ainsi que de cellules lymphoïdes proliférant sous la stimulation d'un autoantigène a d'abord été démontrée à l'aide de lapins immunisés avec un peptide de la polymérase du virus de l'hépatite B partageant une séquence de 6 acides aminés consécutifs avec la PBM (Fujinami et Oldstone, 1985). Il est plus tard apparu que l'identité de séquence n'est pas nécessaire au mimétisme moléculaire : un RCT peut reconnaître plusieurs peptides ayant une conformation semblable (Wucherpfennig et Strominger, 1995).

Ainsi, les récepteurs des cellules T sont flexibles (Nanda *et al.*, 1995) et un même RCT peut reconnaître des peptides d'origine différente ayant des conformations semblables (Wucherpfennig et Strominger, 1995). Mais est-il possible que des cellules autoréactives se trouvant au repos en périphérie soient activées par un antigène d'un agent infectieux ayant une structure semblable à l'antigène du soi ? Des études réalisées avec des souris transgéniques exprimant sur les cellules pancréatiques  $\beta$  la glycoprotéine ou la nucléoprotéine du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) ont démontré la présence d'une forte réponse cytotoxique dirigée contre les antigènes viraux suite à l'infection par le LCMV (Ohashi *et al.*, 1991 ; Oldstone *et al.*, 1991). C'est donc dire que la présence de l'antigène viral (considéré dans ce cas comme un antigène du soi) en périphérie n'induit pas la tolérance lors d'une infection subséquente. Ces expériences indiquent une absence de tolérance ou de l'ignorance et ouvrent la porte au principe du mimétisme moléculaire, bien qu'elles ne démontrent pas la pertinence du phénomène dans la réalité, où le mimétisme n'est jamais si exact (Albert et Inman, 1999).

Divers modèles expérimentaux suggèrent la présence du mimétisme moléculaire suite à une infection. L'infection par *Salmonella typhimurium* entraîne une réponse des cellules T CD8<sup>+</sup> contre un épitope immunodominant (nommé GroEL) ; ces lymphocytes CD8<sup>+</sup> reconnaissent aussi un peptide dérivé d'une protéine du soi (hsp60) (Lo *et al.*, 2000). Dans un autre modèle, des souris transgéniques exprimant la nucléoprotéine ou

glycoprotéine du LCMV sur les oligodendrocytes développent une maladie du SNC après une infection périphérique par le LCMV (Evans *et al.*, 1996). Une infection par un virus TMEV modifié et codant pour un peptide de la PLP induit chez la souris une maladie démyélinisante (Olson *et al.*, 2001). De plus, l'infection de souris par un autre TMEV modifié codant pour un peptide de *Haemophilus influenzae* partageant 6 des 13 acides aminés avec un peptide immunodominant de la PLP induit aussi une maladie démyélinisante (Olson *et al.*, 2001). Le mimétisme moléculaire est appuyé par un autre modèle, soit l'induction d'ulcères de cornée herpétiques (HSK) par le virus de l'herpès simplex (HSV). La réactivité croisée des cellules T est dans ce cas entre la protéine UL6 du virus et un antigène de la cornée ainsi qu'un peptide dérivé de IgG2a (Avery *et al.*, 1995). Les souris susceptibles à la HSK y deviennent résistantes si elles sont rendues tolérantes par le peptide G2a avant l'infection (Avery *et al.*, 1995). De plus, l'infection par un HSV mutant n'exprimant pas l'épitope partagé par l'autoantigène de la cornée et IgG2a n'induit pas de maladie auto-immunitaire (Zhao *et al.*, 1998).

Chez l'humain, l'implication du mimétisme moléculaire est suggérée dans différentes maladies neurologiques inflammatoires : 1 - dans la pathologie de la SEP par la présence de lignées de cellules T reconnaissant à la fois la PBM et le coronavirus (Talbot *et al.*, 1996), 2 - dans le syndrome de Guillain-Barré par la haute prévalence d'une infection à *Campylobacter jejuni* précédant l'apparition de la maladie (Rees *et al.*, 1995) jumelée au partage d'épitopes du microorganisme avec des gangliosides exprimés dans les nerfs périphériques humains et à la présence d'auto-anticorps contre ces gangliosides (Sheikh *et al.*, 1998), 3 - chez les patients atteints de myélopathie/paraparésie spastique tropicale associée au virus lymphotrope T humain de type 1 (HAM/TSP), une maladie semblable à la SEP, par la présence d'anticorps reconnaissant à la fois le virus lymphotrope de type 1 (HTLV-1) et les neurones (Levin *et al.*, 2002). Par ailleurs, environ 10 % des cas d'arthrite observés chez les patients à la suite d'une infection par *Borrelia burgdorferi* causant la maladie de Lyme sont résistants à l'antibiothérapie (Benoist et Mathis, 2001). La persistance de l'arthrite malgré l'absence de l'ADN du spirochète, de même qu'une association établie entre le CMH et la résistance à l'antibiothérapie laissent croire à la présence d'une maladie auto-immunitaire

(Benoist et Mathis, 2001). La réaction croisée impliquée ici est entre la protéine de surface externe A (OspA) de la bactérie et l'antigène-1 associé à la fonction leucocytaire (LFA-1) (Gross *et al.*, 1998) et a été démontrée au niveau clonal (Trollmo *et al.*, 2001).

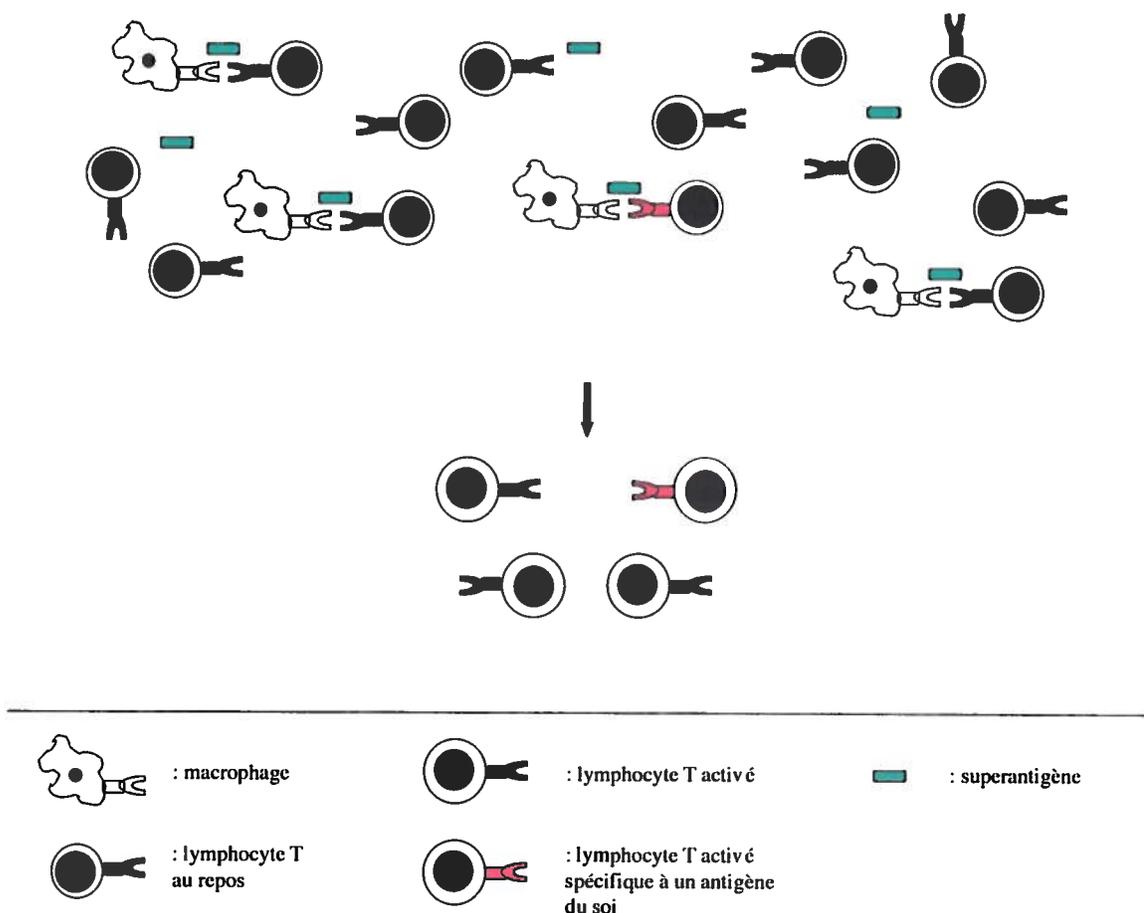
Cette théorie soulève, une fois encore, la controverse. D'abord, dans la maladie de Lyme, seulement 10% des clones T anti-OspA prolifèrent aussi contre LFA-1 $\alpha$ . L'absence d'un modèle murin empêche d'établir avec certitude que le mimétisme moléculaire observé n'est qu'un épiphénomène (Benoist et Mathis, 2001). D'autre part, le mimétisme moléculaire suggéré dans le modèle de HSK, induit par le HSV entre le peptide UL6 du virus et un antigène de la cornée ainsi qu'un peptide dérivé de IgG2a est aussi mis en doute par certaines observations. Deshpande et ses collaborateurs (2001) ne sont pas parvenus à démontrer de réponse spécifique au peptide UL6 de HSV suite à l'infection de souris par le HSV. De plus, les cellules T reconnaissant le peptide UL6 provenant de souris immunisées avec ce peptide ne reconnaissent ni le peptide G2a ni des cellules infectées par HSK (Deshpande *et al.*, 2001). D'autre part, des souris transgéniques n'exprimant qu'un RCT spécifique à l'ovalbumine ont développé la HSK suite à une infection par HSV-1, bien que leur RCT soit monoclonal et n'ait pas de réponse détectable contre les antigènes de HSV-1 (Deshpande *et al.*, 2001).

En bref, le mimétisme moléculaire soutient que le RCT d'un lymphocyte T peut reconnaître à la fois un antigène viral et un antigène du soi. Lors d'une infection virale, le lymphocyte T reconnaît un peptide viral et est activé. Par la suite, le lymphocyte T activé migre à un organe cible où il reconnaît de façon croisée un auto-antigène. Une réponse auto-immunitaire peut alors être déclenchée.

#### **1.1.4 Superantigène**

Les superantigènes (SAg) sont des protéines, le plus souvent d'origine bactérienne ou virale, qui lient une région du CMH de classe II d'une CPA à la région V $\beta$  du RCT et ce à l'extérieur du sillon antigénique (Nakagawa et Harrison, 1996; Torres et Johnson, 1998) (résumé à la figure 4). Ce contact entre les surfaces latérales du RCT et du CMH active la cellule T sans tenir compte de la spécificité peptide-CMH (Hodstev *et al.*, 1998).

Une grande partie (5 à 20%) de la population de lymphocytes T peut être activée par ce mécanisme (Li *et al.*, 1999) et une fraction de cet ensemble de cellules T activées peut être spécifique à un auto-antigène (Wucherpfennig, 2001).



**Figure 4. Activation polyclonale de lymphocytes T par un superantigène.** Un SAg lie un CMH de classe II et une région  $V_{\beta}$  du RCT. Plusieurs lymphocytes T sont ainsi activés, dont une fraction peut être spécifique à un antigène du soi.

Dans le modèle animal de l'EAE chez la souris PL/J, les cellules T  $V\beta 8$  sont importantes dans le déclenchement de la maladie (Acha-Orbea *et al.*, 1988). Chez les souris immunisées avec un peptide issu de la PBM ou ayant reçues des cellules T spécifiques à la PBM, l'injection d'un SAg qui active les cellules T  $V\beta 8$ , l'entérotoxine B

staphylococcale (SEB), induit soit 1- l'exacerbation de la maladie chez les souris déjà malades, 2- des rechutes chez les souris en rémission ou 3- l'apparition de symptômes chez les souris n'ayant pas eu d'épisode clinique (Brocke *et al.*, 1993; Schiffenbauer *et al.*, 1993). De plus, l'arthrite chez la souris immunisée avec du collagène est exacerbée ou déclenchée par un SAg de *Mycoplasma arthritidis* (Cole et Griffiths, 1993). Ainsi, un SAg peut mener à l'expansion d'une population autoréactive et à des signes cliniques d'une maladie (Schiffenbauer *et al.*, 1998).

Les SAg ont aussi été impliqués dans la réponse auto-immunitaire chez l'humain. Par exemple, la fréquence des cellules T V $\beta$ 14 dans le liquide synovial des articulations de patients atteints d'arthrite rhumatoïde est supérieure à celle retrouvée dans leur sang périphérique (Paliard *et al.*, 1991). De plus, les SAg peuvent activer les synoviocytes à exprimer diverses cytokines pro-inflammatoires et chimiokines (Mourad *et al.*, 1992 ; Mehindate *et al.*, 1994). L'induction de l'activation de lymphocytes T par des SAg présentés par des cellules synoviales est aussi possible (Origuchi *et al.*, 1995). L'implication des SAg est également suggérée dans le diabète de type 1, notamment par une étude démontrant une expansion sélective de la population de lymphocytes T V $\beta$ 7 dans les cellules infiltrant le pancréas de patients diabétiques (Conrad *et al.*, 1994). De plus, la proportion de lymphocytes T V $\beta$ 7 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique est supérieure chez les patients à celle des témoins; cette proportion est aussi plus élevée chez les patients récemment diagnostiqués que chez les patients chez qui le diabète est établi depuis plus longtemps (Luppi *et al.*, 2000). Par ailleurs, un rétrovirus endogène codant pour un SAg qui induit la prolifération des cellules T V $\beta$ 7 a été isolé et retrouvé chez les patients diabétiques testés, mais pas chez les témoins (Conrad *et al.*, 1997). Globalement, ces études suggèrent que les SAg peuvent être associés aux maladies auto-immunitaires.

Les recherches chez l'humain n'associent les SAg aux maladies auto-immunitaires que de façon circonstancielle (Schiffenbauer *et al.*, 1998). De plus, à l'instar des trois mécanismes présentés précédemment, l'implication des SAg dans les maladies auto-immunitaires est mise en doute par différentes études. Notons par exemple la

controverse soulevée par les travaux de Conrad et son équipe (1994) portant sur l'implication des SAg codés par un rétrovirus endogène dans le diabète de type I. Alors qu'une équipe de recherche n'est pas parvenue à détecter le rétrovirus en question dans l'ADN d'aucun sujet, diabétiques ou témoins (Muir *et al.*, 1999), différents laboratoires ont conclu à la présence ubiquitaire de la séquence du rétrovirus impliqué chez les diabétiques et les témoins (Badenhoop *et al.*, 1999 ; Jaeckel *et al.*, 1999) ou du moins d'une séquence hautement homologue (Kim *et al.*, 1999). Ces différentes études jettent un doute non-négligeable sur la principale association établie chez l'humain entre un SAg et une pathologie auto-immunitaire.

Finalement, un SAg pourrait activer plusieurs lymphocytes T ayant un certain V $\beta$ . Parmi les lymphocytes T ainsi activés peuvent se trouver des cellules auto-réactives. Les SAg peuvent donc participer à la réaction auto-immunitaire et être impliqués dans les rechutes et les exacerbations de maladies (Wucherpfennig, 2001). Bien que des études réalisées à l'aide de modèles animaux et certaines observations faites chez l'humain soient compatibles avec cette théorie, elle demeure controversée. La preuve définitive mettant un terme à cette controverse n'a toujours pas été apportée.

### **1.1.5 Conclusion**

Différentes théories expliquant le lien entre les infections et les maladies auto-immunitaires ont été présentées tout au long de la section 1.1. Ainsi, les cellules T autoréactives peuvent être activées: 1- indirectement dans un contexte inflammatoire (section 1.1.1), 2- dans une cascade de réactions dirigées contre différents épitopes du soi (section 1.1.2), 3- par une réaction croisée du RCT avec un antigène étranger et un antigène du soi (section 1.1.3) ou 4- par un superantigène (section 1.1.4). Aucune de ces théories n'est acceptée unanimement comme explication de l'étiologie des pathologies auto-immunitaires. Toutefois, il est à noter que ces mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs. Il est possible qu'ils soient impliqués à différentes étapes du processus auto-immunitaire (Wucherpfennig, 2001).

## 1.2 Sclérose en plaques

### 1.2.1 Description de la pathologie

La SEP est une maladie auto-immunitaire spécifique à un organe qui affecte environ 50000 Canadiens (Talbot, 1995) et 250 000 à 350 000 Américains (Noseworthy *et al.*, 2000). Cette maladie, qui touche deux fois plus de femmes que d'hommes, se déclenche typiquement à l'âge de 20 à 40 ans (Bar-Or *et al.*, 1999). Le cinquième des patients souffrent de la forme dite progressive primaire, qui évolue lentement mais continuellement (Noseworthy *et al.*, 2000). Chez les autres patients, la maladie est sous forme de rechutes et rémissions, où les symptômes évoluent sur plusieurs jours puis se stabilisent, avant que la condition ne s'améliore pour plus tard se dégrader à nouveau (Noseworthy *et al.*, 2000). La SEP peut se traduire par des troubles visuels, un manque de coordination, des troubles sensoriels et une paralysie (Steinman, 2001). Ces symptômes cliniques sont attribuables à la pathologie (Steinman, 1996), c'est-à-dire à la présence de plaques de démyélinisation associée à l'infiltration de cellules immunitaires (Noseworthy *et al.*, 2000). La destruction de la gaine de myéline entourant les axones nuit à la transmission des influx nerveux et est responsable des troubles neurologiques observés chez les patients (Talbot, 1995).

### 1.2.2 Immunopathologie

Les cellules inflammatoires traversent la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour se rendre au SNC en plusieurs étapes. Les cellules T activées expriment à leur surface la molécule VLA-4 et lient VCAM-1 pour ainsi être capables de procéder à l'extravasation de la BHE (Steinman, 1996). Alternativement, un bris de la BHE peut faciliter la pénétration des cellules inflammatoires (Noseworthy *et al.*, 2000). Ensuite, des métalloprotéinases de matrice (MMP) facilitent la dégradation de la matrice extracellulaire. Les cellules immunitaires ayant ainsi atteint le SNC peuvent ensuite recruter d'autres cellules inflammatoires, comme il l'a déjà été décrit à la section 1.1.1. Les cellules inflammatoires prédominantes dans le cerveau de patients SEP sont les lymphocytes et les macrophages (Martino *et al.*, 2000). Cette inflammation entraîne des dommages à la myéline, habituellement une à deux journées après la pénétration initiale des cellules (Coyle, 1996), ainsi que la phagocytose des débris relargués par les

microglies activées et les macrophages (Martino *et al.*, 2000). Les dommages causés à la myéline mènent à la dénudation des axones et aux symptômes neurologiques (Noseworthy *et al.*, 2000). Les axones dénudés peuvent alors être sujets à la remyélinisation, tant que les oligodendrocytes ne sont pas détruits, ou à des dommages irréversibles (Noseworthy *et al.*, 2000 ; Coyle, 1996).

### 1.2.3 Étiologie

Bien que la SEP ait été décrite il y a plus de 130 ans par Jean-Martin Charcot (Dodet, 1995), sa cause exacte demeure encore aujourd'hui inexpliquée. Des études épidémiologiques ont permis de classer les régions du monde en régions à haute, moyenne et faible prévalence (Kurtzke, 1991). La prévalence de la SEP est plus élevée dans le nord de l'Europe, en Amérique du Nord et dans le sud de l'Australie (Kurtzke, 1991). Les raisons de cette distribution sont obscures. Il semble que la maladie soit multifactorielle, ayant une composante génétique et une composante environnementale.

#### 1.2.3.1 Facteurs génétiques

Une prédisposition génétique est d'abord suggérée par une augmentation de 15 à 20 fois de la fréquence de l'incidence de SEP parmi la famille immédiate des patients (Compston, 1991). De plus, le taux de concordance entre les jumeaux homozygotes est de 31%, soit 6 fois supérieur à celui retrouvé chez les jumeaux dizygotes (Sadovnick *et al.*, 1993).

La susceptibilité à la SEP semble être polygénique (Coyle, 1996). Le premier facteur de risque génétique ayant été identifié est la présence de l'allèle HLA-DR2, un antigène d'histocompatibilité impliqué dans la présentation antigénique (Jersild *et al.*, 1973). D'autres études ont relié la susceptibilité à la SEP à des gènes sur le chromosome 6, plus précisément de gènes dans la région codant pour le CMH (Ebers *et al.*, 1996 ; Haines *et al.*, 1996 ; Sawcer *et al.*, 1996). Ainsi, en plus de l'allèle HLA-DR2, le locus HLA-DQ, les gènes du TNF- $\alpha$  et de divers composants de la cascade du complément ont été associés à la SEP (Steinman, 2001). Néanmoins, la pénétrance incomplète chez les jumeaux homozygotes appuie l'importance de facteurs environnementaux dans le

déclenchement de la maladie chez des individus génétiquement prédisposés (Coyle, 1996).

### **1.2.3.2 Facteurs environnementaux**

Le rôle joué par les facteurs environnementaux dans le déclenchement de la SEP est soutenu par diverses observations. D'abord, des études de migration effectuées chez des individus allant d'une région à prévalence élevée vers une région à faible prévalence ont démontré que les individus migrant après l'âge de 15 ans conservent le niveau de risque de la région de leur lieu de naissance, alors que ceux migrant avant cet âge acquièrent le niveau de risque de leur nouveau lieu de résidence (Kurtzke, 1997). Ces résultats suggèrent que la SEP se développe suite à l'exposition à un facteur externe durant le début de l'adolescence.

Par ailleurs, l'implication d'un (de) facteur(s) environnemental(aux) est aussi appuyée par l'épidémie survenue dans les Iles Feroe. Aucun cas de SEP n'avait été rapporté dans cet archipel danois jusqu'en 1943. L'apparition des premiers cas deux à trois ans suite à l'arrivée des troupes britanniques, qui ont occupé l'archipel de 1940 à 1945, suggèrent que les soldats ont introduit avec eux un agent infectieux impliqué dans le déclenchement de la SEP (Kurtzke et Heltberg, 2001).

D'autre part, l'association de facteurs infectieux à la SEP est également renforcée par la relation établie entre la présence d'infections virales des voies respiratoires supérieures ou du tractus gastro-intestinal et les rechutes observées chez les patients (Sibley *et al.*, 1985 ; Andersen *et al.*, 1993 ; Panitch, 1994).

L'implication des virus dans la SEP est suggérée par différents type d'études, soit : 1- en isolant des particules virales de tissus atteints, 2- en démontrant une plus importante présence d'anticorps anti-viraux chez les malades, 3 - en démontrant la présence du virus dans le SNC des patients (Talbot, 1995). Une liste des virus associés par l'une ou plusieurs de ces méthodes est présentée au tableau 1. Toutefois, il importe de

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

| <b>Virus</b>          | <b>Approche expérimentale</b>  |
|-----------------------|--|
| Coronavirus           | Virus isolé de tissu malade <sup>1,9</sup><br>Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>2</sup><br>Présence de matériel génétique viral au SNC <sup>3</sup> |
| Cytomégalovirus       | Virus isolé de tissu malade <sup>1</sup>   |
| Epstein-Barr          | Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>4</sup>   |
| Flavivirus            | Virus isolé de tissu malade <sup>1</sup>   |
| Herpes humain 6       | Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>5</sup><br>Présence d'antigène viral liée aux plaques <sup>6</sup>  |
| Herpes simplex        | Virus isolé de tissu malade <sup>1</sup><br>Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>2</sup>   |
| Influenza type 1      | Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>2</sup>   |
| Oreillons             | Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>2</sup>   |
| Para-influenza type 1 | Virus isolé de tissu malade <sup>1</sup>   |
| Rage                  | Virus isolé de tissu malade <sup>1</sup>   |
| Rougeole              | Virus isolé de tissu malade <sup>1</sup><br>Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>2</sup><br>Présence de matériel génétique viral au SNC <sup>7</sup>   |
| Rubéole               | Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>2</sup>   |
| T-lymphotrope type 1  | Présence de matériel génétique viral au SNC <sup>8</sup>   |
| Vaccine (variole)     | Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>2</sup>   |
| Varicelle             | Prépondérance d'anticorps anti-viraux <sup>2</sup>   |

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.*, 1995

7 - Haase *et al.*, 1981 ;  
Cosby *et al.*, 1989

8 - Reddy *et al.*, 1989

9 - Burks *et al.*, 1980

mentionner que la présence de virus au SNC et la maladie ne sont pas nécessairement liés (Talbot *et al.*, 2001).

Divers virus ont donc été proposés comme candidats pour le déclenchement et la progression de la SEP. Puisque l'infection de souris par le coronavirus murin entraîne une démyélinisation (voir la section 1.4.4) et est un excellent modèle animal de la SEP (voir la section 1.4.5), c'est au coronavirus que nous nous intéressons particulièrement dans le cadre de ce mémoire.

#### **1.2.4 SEP et coronavirus**

Plusieurs observations associent les coronavirus avec la SEP. Dans un premier temps, le caractère neuroinvasif du coronavirus, soit sa capacité à se rendre au SNC, est maintenant bien établi. D'abord, la présence de particules de coronavirus a été détectée dans le cerveau de patients atteints de SEP (Burks *et al.*, 1980). De plus, les titres en anticorps spécifiques au coronavirus sont supérieurs dans le liquide céphalo-rachidien des patients SEP que dans celui des témoins (Salmi *et al.*, 1982). Finalement, la présence de l'ARN du coronavirus dans le SNC de patients atteints de SEP a été démontrée par transcription inverse (RT) suivie d'une amplification en chaînes (PCR) et par hybridation *in situ* (Murray *et al.*, 1992 ; Stewart *et al.*, 1992 ; Arbour *et al.*, 2000).

Dans un deuxième temps, le potentiel neurotrope, c'est à dire le pouvoir du virus à infecter les cellules du SNC, est lui aussi démontré. Une infection aiguë par le coronavirus de cultures primaires de microglies et d'astrocytes humains (Bonavia *et al.*, 1997) ainsi que d'oligodendrocytes (Viau et Talbot, communication personnelle) a été démontrée. D'autre part, une infection persistante par le coronavirus a été démontrée dans des lignées cellulaires provenant du SNC (Arbour *et al.*, 1999a, b).

Ces observations démontrent que le coronavirus peut se rendre au SNC et y infecter des cellules neurales (neurones et cellules gliales). Bien qu'il ne puisse être

conclu à partir de ces informations que le coronavirus soit à l'origine de la SEP, une association entre l'infection virale du SNC et la maladie est suggérée.

Les divers mécanismes qui ont été proposés pour expliquer le lien entre une infection virale et une maladie auto-immunitaire ont été détaillés aux sections 1.1.1 à 1.1.4. Ces mécanismes expliquent comment l'infection coronavirale peut être reliée à la SEP. Par exemple, l'infection de cellules neurales peut induire la production de molécules pro-inflammatoires et de MMPs (Edwards *et al.*, 2000), entraînant les effets reliés à l'inflammation décrits à la section 1.1.1. D'autre part, une réactivité croisée en lignée (Talbot *et al.*, 1996) et au niveau clonal (Boucher *et al.*, 2001a,b) des lymphocytes T reconnaissant à la fois des antigènes viraux et du SNC a été observée plus fréquemment chez les patients atteints de SEP que chez les patients témoins. Cette dernière observation suggère l'implication du mimétisme moléculaire (décrit à la section 1.1.3), bien qu'elle n'établisse pas de lien direct avec la pathologie.

### **1.2.5 Conclusion**

La SEP est une maladie inflammatoire démyélinisante aux causes précises inconnues. Elle est probablement multifactorielle, l'exposition à un facteur environnemental déclenchant parfois la maladie chez une personne génétiquement prédisposée. Parmi les facteurs environnementaux associés à la maladie se trouvent une longue liste de virus dans laquelle figurent les coronavirus. Le pouvoir neuroinvasif, neurotrope et auto-immunogénique de ces virus est démontré, bien que leur association à la SEP demeure circonstancielle. Diverses études nous donnent des pistes quant au(x) mécanisme(s) qui pourrai(en)t expliquer le lien entre l'infection par le coronavirus et la SEP.

## **1.3 Coronavirus – généralités**

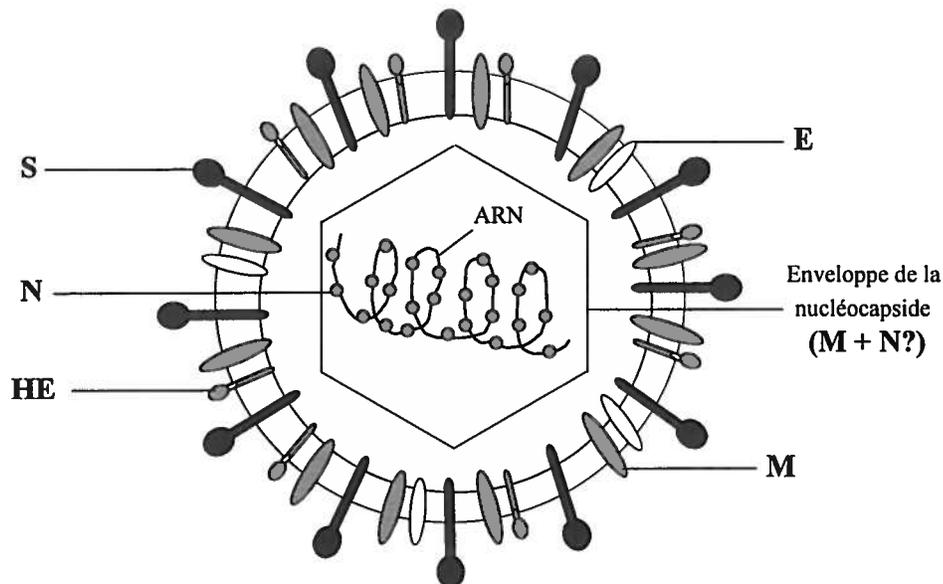
### **1.3.1 Description du virus et de ses protéines**

Le genre coronavirus appartient à la famille des *Coronaviridae*, elle-même membre de l'ordre des *Nidovirales*. Les coronavirus, représenté schématiquement à la figure 5, sont des virus enveloppés d'environ 120 nm de diamètre ayant des projections à

leur surface (Lai et Cavanagh, 1997). Leur génome est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive de 27 à 32 kilobases (kb), qui représente le plus long ARN connu à ce jour (Lai et Holmes, 2001).

### 1.3.1.1 Protéines structurales

L'ARN est associé à la protéine N, une phosphoprotéine de 50 à 60 kilodaltons (kDa), pour former la nucléocapside (Lai et Holmes, 2001). Chez certains coronavirus, la nucléocapside est entourée d'une capsid interne constituée notamment de la glycoprotéine M (membrane) et probablement de N (Lai et Holmes, 2001). L'enveloppe du coronavirus est constituée des deux protéines, la protéine M et la protéine E (enveloppe). Finalement, deux types de projections peuvent être retrouvées à la surface du virion. La protéine S (spicule) est une glycoprotéine formant un prolongement d'environ 20 nm à la surface de tous les coronavirus. Cette protéine est responsable de la liaison au récepteur et de l'induction de la fusion membranaire ainsi que de l'entrée du virus dans la cellule et de l'effet cytopathique (Lai et Cavanagh, 1997). La protéine HE (hémagglutinine-estérase) est une glycoprotéine formant de courts spicules à la surface de certains coronavirus seulement. La protéine HE cause l'hémagglutination (Lai et Holmes, 2001).



**Figure 5. Représentation schématique d'un coronavirus.**

### **1.3.1.2 Protéines non-structurales**

Les deux tiers en 5' de l'ARN du coronavirus, soit environ 20 kb, codent pour l'ARN polymérase ARN dépendante responsable de la réplication du virus (Lai et Holmes, 2001). Les autres protéines non-structurales se retrouvent en nombre et en endroits divers sur le génome des différents coronavirus (Lai et Cavanagh, 1997). Les fonctions de ces protéines demeurent inconnues.

### **1.3.2 Division en groupes antigéniques**

Les coronavirus sont classés en trois groupes antigéniques (tableau 2), déterminé par des tests sérologiques et à l'aide des séquences nucléotidiques (Lai et Homes, 2001). Les deux premiers groupes sont constitués des coronavirus de mammifères alors que le troisième comprend des virus aviaires.

### **1.3.3 Infections causées par les coronavirus**

Les coronavirus causent divers types d'infection chez les animaux (voir les exemples au tableau 2). Ils sont généralement transmis par les voies respiratoires ou entériques ; la plupart se répliquent d'abord dans les cellules épithéliales de ces tractus, où ils causent des infections locales (Holmes, 2001). Plusieurs sont également responsables d'infection d'autres types de cellules épithéliales ; c'est le cas du coronavirus de rat qui, en plus de causer une infection respiratoire, peut infecter les glandes salivaires et lacrymales pour causer une sialodacryoadénite (Percy et Williams, 1990). Finalement, certains coronavirus entraînent des infections systémiques chez leurs hôtes naturels (Holmes, 2001). C'est le cas du HEV, du FCoV, du IBV et du MHV (Holmes, 2001). Dans le cas de ce dernier, certaines souches sont à la fois responsables d'infections respiratoires, entériques, hépatiques et neurologiques (Barthold *et al.*, 1993) ou peuvent infecter le foie, la rate, le thymus et le cerveau (Lane et Buchmeier, 1997).

### **1.3.4 Conclusion**

Les coronavirus sont des virus à ARN de grande taille ayant 4 ou 5 protéines structurales, N, M, E, S et parfois HE, ainsi qu'une ARN polymérase et d'autres protéines non-structurales aux fonctions inconnues. Ils sont divisés en trois groupes antigéniques.

Les différents coronavirus infectent un large spectre d'hôtes et sont responsables d'une variété d'infections.

**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    | ✓                      |                     |          | ?                      |         |
|                    | TGEV, PRCoV | Porc      | ✓                      | ✓                   |          |                        | ✓       |
|                    | CCoV        | Chien     |                        | ✓                   |          |                        |         |
|                    | FECoV       | Chat      |                        | ✓                   |          |                        |         |
|                    | FIPV        | Chat      | ✓                      | ✓                   | ✓        | ✓                      | ✓       |
|                    | RBCoV       | Lapin     |                        |                     | ✓        |                        | ✓       |
|                    | II          | HCoV-OC43 | Humain                 | ✓                   | ?        |                        | ?       |
| MHV                |             | Souris    | ✓                      | ✓                   | ✓        | ✓                      |         |
| SDAV               |             | Rat       |                        |                     |          |                        | ✓       |
| HEV                |             | Porc      | ✓                      | ✓                   |          | ✓                      |         |
| BCoV               |             | Bovin     | ✓                      | ✓                   |          |                        |         |
| III                |             | IBV       | Poulet                 | ✓                   |          | ✓                      |         |
|                    | TCoV        | Dinde     | ✓                      | ✓                   |          |                        |         |

\* 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 sialodacryadénite ; HEV : virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine ; BCoV : coronavirus bovin ; IBV : virus de la bronchite infectieuse aviaire ; TCoV : coronavirus de dinde.

## 1.4 Coronavirus murin

### 1.4.1 Pathogénèse

Le coronavirus murin MHV a été isolé pour la première fois en 1947 à l'école médicale de Harvard à partir du cerveau de deux souris paralysées (Cheever *et al.*, 1949). Cette souche a été nommée JHM, en l'honneur du professeur J. Howard Muller (Pappenheimer, 1958). Depuis ce jour, plusieurs souches de MHV, ayant des tropismes divers pour le cerveau, le foie et d'autres tissus et entraînant différentes maladies chez les rongeurs, ont été isolées (Compton *et al.*, 1993). Par exemple, la souche MHV-3 est responsable d'hépatites fulminantes (Ding *et al.*, 1997), alors que la souche A59, isolée d'une souris atteinte d'une hépatite aiguë (Manaker *et al.*, 1961), est à la fois la cause d'hépatites ainsi que d'infections neurologiques et que la souche JHM est neurotrophe (Perlman, 1998).

En plus de la souche virale, différents facteurs tels le bagage génétique, l'état du système immunitaire et l'âge de l'hôte, de même que la dose et la voie d'inoculation du virus affectent la pathogénicité de l'infection par le MHV (Compton *et al.*, 1993 ; Houtman et Fleming, 1996a). Ainsi, les souris SJL sont génétiquement résistantes à l'infection par les souches A59 et JHM, alors que les souris BALB/c et C57BL/6 y sont susceptibles (Buschman et Skamene, 1995). Cette résistance génétique a été reliée à l'absence d'un récepteur fonctionnel pour le MHV, en l'occurrence une glycoprotéine biliaire (Bgp), chez les souris SJL (Boyle *et al.*, 1987). D'autre part, les rats Wistar Lewis sont susceptibles à l'infection par le MHV jusqu'à 10 jours post-natal et deviennent par la suite résistants (Sorensen *et al.*, 1987b), probablement à cause du développement de leur système immunitaire (Sorensen *et al.*, 1987a). Finalement, le mode d'administration du virus affecte l'issue de l'infection, comme le démontre entre autres l'injection de différentes doses de la souche A59 par voies intra-péritonéale (i.p.), intra-cérébrale (i.c.), intra-nasale (i.n.) et intra-gastrique (i.g.) et les différentes pathologies, hépatiques et/ou neurologiques encourues (Lavi *et al.*, 1986).

L'infection par le MHV a d'autre part des effets immunomodulateurs : les lymphocytes T de souris infectées ne prolifèrent pas de façon normale lorsqu'ils sont

stimulés par la concanavaline A (conA) ou par le CD3 (Smith *et al.*, 1987 ; Cook-Mills *et al.*, 1992 ; Cray *et al.*, 1993), bien que leur réponse à une stimulation spécifique par le virus ne soit pas affectée (De Souza *et al.*, 1991). Cette immunomodulation pourrait être consécutive à l'infection des macrophages par le MHV. L'infection de ces cellules peut mener à la sécrétion de prostaglandines ou d'autres immunosuppresseurs ou à celle d'IFN- $\alpha$  ou  $-\beta$ , pouvant supprimer la réponse immunitaire cellulaire (Wijburg *et al.*, 1997). Cette hypothèse est cependant contredite par une étude attribuant la diminution de la prolifération sous stimulation mitogénique ou polyclonale non pas aux cellules accessoires ou à leur produit, mais à un problème direct des lymphocytes T (De Souza et Smith, 1991).

#### **1.4.2 Infection du SNC par le MHV**

Le coronavirus murin peut causer divers troubles neurologiques, comme des encéphalites ou de la démyélinisation (Haring et Perlman, 2001). La plupart des études sur ce sujet sont réalisées avec les souches JHM et A59 chez la souris et le rat (Wege, 1995).

##### **1.4.2.1 Neuroinvasion et neurotropisme**

Les souches JHM et A59 du MHV sont neuroinvasives et peuvent se rendre au SNC suite à une infection par voie i.n. en empruntant le nerf olfactif (Barthold, 1988 ; Lavi *et al.*, 1988 ; Perlman *et al.*, 1989 ; Barnett et Perlman, 1993). De plus, le MHV se répand dans le sang des souris infectées ainsi que dans leur système lymphatique, ce qui pourrait lui fournir des voies supplémentaires d'entrée au SNC (Barthold et Smith, 1992). Une fois au SNC, les cellules cibles du MHV sont les neurones, les oligodendrocytes, les astrocytes ainsi que les microglies (Dales et Anderson, 1995 ; Stohlman et Hinton, 2001). L'encéphalite aiguë qui se développe suite l'infection par le virus JHM est souvent mortelle et les rares survivants souffrent fréquemment de démyélinisation chronique et de paralysie (Kyuwa et Stohlman, 1990). De nombreux variants de la souche parentale JHM ont été étudiés; ces variants infectent peu ou pas les neurones et permettent la survie d'un plus grand nombre de souris, en causant moins d'encéphalite et davantage de démyélinisation (Perlman, 1998). Par ailleurs, la souche A59 est pour sa part à la fois

hépatotrope et modérément neurotrope et peut, à l'instar de la souche JHM, causer de la démyélinisation (Lavi *et al.*, 1981).

#### 1.4.2.2 Persistance

Le coronavirus murin persiste dans la matière blanche au SNC (Perlman, 1998), notamment dans les astrocytes et les microglies (Perlman et Ries, 1987 ; Sun *et al.*, 1995). L'ARN ou les protéines encodées par ce virus ont été détectés jusqu'à un an après l'infection, respectivement par RT-PCR (Fleming *et al.*, 1994 ; Adami *et al.*, 1995) et par immunofluorescence (Kyuwa et Stohlman, 1990). De plus, le virus a parfois été détecté sous forme de virus infectieux (Knobler *et al.*, 1982). Le système immunitaire semble donc incapable d'éliminer complètement le virus du SNC.

### 1.4.3 Réponse immunitaire au SNC suite à l'infection par le coronavirus

#### 1.4.3.1 Infection aiguë

L'infection aiguë au SNC entraîne une réponse inflammatoire locale, durant laquelle différentes populations sont recrutées au site : macrophages, NK (*natural killer*), lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ainsi que lymphocytes B (Williamson *et al.*, 1991).

D'abord, plusieurs chimiokines sont transcrites au SNC suite à l'infection par le MHV : MIP-1 $\beta$ , CCL2 et 3, RANTES, MIP-2 et CXCL10 (aussi appelé IP-10) (Lane *et al.*, 1998). Ces chimiokines permettent le recrutement de cellules mononuclées au SNC (Marten *et al.*, 2001). Dans un premier temps, les cellules NK et les macrophages infiltrent le SNC (Marten *et al.*, 2001). Puis, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> arrivent au site d'infection, où ils semblent être d'une importance majeure dans l'élimination du virus (Williamson et Stohlman, 1990). D'ailleurs, les souris SCID (*severe combined immunodeficiency*) et les souris nues, qui ne possèdent pas de lymphocytes T fonctionnels, sont incapables d'éliminer le virus (Marten *et al.*, 2001). De plus, des souris dont les T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> ont été éliminés avant l'infection éliminent le virus plus lentement (Williamson et Stohlman, 1990). D'autre part, une fraction importante des cellules T, soit jusqu'à 50% des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et environ 30% des T CD4<sup>+</sup>, se trouvant au SNC est spécifique au virus (Bergmann *et al.*, 1999; Haring *et al.*, 2001). Les

cellules CD8<sup>+</sup> jouent un rôle anti-viral de deux façons : 1- elles effectuent la cytolyse grâce à la perforine, ce qui contrôle la réplication du virus dans les astrocytes et les microglies (Lin *et al.*, 1997) et 2- elles sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , ce qui contribue à l'élimination du virus des oligodendrocytes (Parra *et al.*, 1999). Bien que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par ces cellules puisse également contribuer au contrôle de la réplication virale dans les oligodendrocytes (Marten *et al.*, 2001), le rôle des cellules CD4<sup>+</sup> semble être davantage un rôle de soutien à la réponse anti-virale CD8<sup>+</sup> (Stohlman *et al.*, 1998). Ainsi, la sécrétion de cytokines par les T CD4<sup>+</sup> peut augmenter l'expansion des T CD8<sup>+</sup>, alors que les chimiokines produites peuvent favoriser l'infiltration des cellules T cytotoxiques et de macrophages au SNC (Marten *et al.*, 2001). Finalement, les anticorps produits par les lymphocytes B sont surtout reconnus pour leur rôle dans la protection contre l'infection des neurones (Buchmeier *et al.*, 1984) et dans la prévention de la ré-émergence du virus (Lin *et al.*, 1999), mais une étude menée avec des souris déficientes en lymphocytes B matures soutient qu'ils sont aussi des acteurs importants dans l'élimination de l'infection primaire au SNC (Matthews *et al.*, 2001).

#### 1.4.3.2 Infection persistante

Lorsque le système immunitaire n'élimine pas complètement le MHV, l'infection peut persister chez la souris (section 1.4.2.2). Durant l'infection persistante, les cellules NK et les macrophages périphériques sont éliminés du SNC (Marten *et al.*, 2001). Les cellules T CD8<sup>+</sup> retrouvées à ce moment au SNC ont perdu leur activité cytotytique, bien qu'elles aient encore la capacité de sécréter de l'IFN- $\gamma$  et que CD69, un marqueur d'activation, soit exprimé à leur surface (Bergmann *et al.*, 1999). La survie ou le recrutement des cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> semblent dépendre de la persistance du virus (Marten *et al.*, 2000). Par ailleurs, les cellules B empêchent la recrudescence du virus et permettent le maintien de la persistance du MHV au SNC (Lin *et al.*, 1999).

#### 1.4.4 Démyélinisation

L'infection du CNS par les souches A59 et JHM du MHV est responsable d'une destruction de la gaine de myéline isolant les axones (Pappenheimer, 1958 ; Lampert *et al.*, 1973 ; Herndon *et al.*, 1975 ; Lavi *et al.*, 1984). Plusieurs mécanismes ont été

proposés pour expliquer cette démyélinisation induite par un virus. La mort des oligodendrocytes suite à l'effet cytopathique de l'infection par le MHV a d'abord été proposée pour expliquer la destruction de la myéline (Lampert *et al.*, 1973 ; Powell et Lampert, 1975).

Toutefois, il est clair que le système immunitaire est impliqué dans le processus, tel que l'indiquent des études réalisées avec des souris immunosupprimées infectées par le MHV. En effet, des souris SCID (Houtman *et al.*, 1995), RAG (*recombination activating gene*)<sup>1-/-</sup> (Wu et Perlman, 1999) et immunocompétentes irradiées (Wang *et al.*, 1990) n'ont pas démontré de démyélinisation suite à l'infection par le coronavirus murin. Le transfert adoptif de splénocytes provenant de souris immunisées avec le MHV à des souris immunosupprimées a entraîné une démyélinisation (Wang *et al.*, 1990 ; Houtman *et al.*, 1995 ; Wu et Perlman, 1999). Une démyélinisation a aussi été observée suite au transfert de splénocytes sans lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, mais pas après le transfert de splénocytes sans cellules T CD4<sup>+</sup> ni CD8<sup>+</sup> (Wu *et al.*, 2000). Par ailleurs, la démyélinisation suite à l'infection par le MHV a été observée chez des souris nues, dépourvues de cellules T fonctionnelles mais possédant des cellules B (Houtman et Fleming, 1996b). Toutes ces études suggèrent donc un rôle du système immunitaire dans la démyélinisation. Mais comment le système immunitaire de l'hôte est-il impliqué dans ce processus pathologique ?

L'implication de la réponse immunitaire de l'hôte dans la démyélinisation peut d'abord être directe (Houtman et Fleming, 1996a). Dans cette hypothèse, l'infection virale entraîne une réponse de défense éliminant les cellules infectées (Houtman et Fleming, 1996a). Ainsi, les oligodendrocytes infectés peuvent devenir la cible du système immunitaire et être visés par des mécanismes cytotoxiques. Néanmoins, ni l'expression de Fas ni l'expression de perforine, tous deux impliqués dans le mécanisme cytolytique, pas plus que l'IFN- $\gamma$  ne sont associés à la démyélinisation (Parra *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1997 ; Parra *et al.*, 1999). La possibilité que d'autres récepteurs avec des domaines de mort (par exemple DR4, DR5 ou TNF-R1) soient impliqués n'a pas été considérée.

L'implication directe des cellules T cytotoxiques dans la démyélinisation n'est donc pour l'instant pas soutenue par des observations claires (Marten *et al.*, 2001).

La réponse immunitaire à l'infection virale peut aussi jouer un rôle indirect dans l'établissement de la démyélinisation (Houtman et Fleming, 1996a). Par exemple, la production de cytokines ou de produits toxiques par les macrophages répondant à l'infection virale peut endommager les oligodendrocytes avoisinants (Houtman et Fleming, 1996a). De plus, suite à l'infection par le MHV, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> contribuent à la démyélinisation et à l'inflammation en produisant la chimiokine RANTES, qui recrute des macrophages au SNC (Lane *et al.*, 2000).

Finalement, l'infection par le MHV peut déclencher une réponse auto-immunitaire dirigée contre un ou des antigène(s) du SNC (Stohlman et Hinton, 2001). Des cellules T spécifiques à la myéline ont été détectées chez le rat suite à l'infection par le MHV (Watanabe *et al.*, 1983). Le transfert de ces cellules entraîne de l'inflammation au SNC ainsi que des symptômes cliniques (Watanabe *et al.*, 1983). Chez la souris, la fréquence de cellules auto-réactives en l'absence de stimulation antigénique est augmentée suite à l'infection par le MHV (Kyuwa *et al.*, 1991). La présence de cellules auto-réactives spécifiques à un antigène du SNC chez la souris infectée par le coronavirus murin reste toutefois à démontrer (Marten *et al.*, 2001).

#### **1.4.5 L'infection par le MHV comme modèle pour la SEP**

L'infection de la souris par le coronavirus murin entraîne une démyélinisation impliquant la réponse immunitaire. Cette démyélinisation induite par le MHV chez la souris a plusieurs points en commun avec la SEP, ce qui en fait un modèle très utilisé pour l'étude de cette maladie neurologique auto-immunitaire (Lane et Buchmeier, 1997; Wege, 1995).

Dans un premier temps, la pathologie observée chez la souris est évidemment consécutive à l'infection virale, alors qu'il est suggéré que le déclenchement de la SEP soit relié à un facteur environnemental, par exemple un virus (section 1.2.3.2). Par

ailleurs, le fond génétique des souris influence la susceptibilité à l'infection au MHV (Buschman et Skamene, 1995), tout comme une susceptibilité génétique est associée à la SEP (section 1.2.3.1). De plus, la pathologie induite par le virus chez la souris se traduit par des lésions à la matière blanche semblables à celles observées chez les patients atteints de SEP (Cheever *et al.*, 1949 ; Lampert *et al.*, 1973 ; Noseworthy *et al.*, 2000). Finalement, le système immunitaire est impliqué dans la démyélinisation observée chez les souris infectées (Houtman et Fleming, 1996a; décrit précédemment à la section 1.4.4) tout comme il l'est dans la SEP (section 1.2.2), peut-être par une réaction auto-immunitaire. Une analogie peut donc être tracée entre les causes, les signes et le processus de la pathologie induite par l'infection au MHV chez la souris et la SEP.

#### **1.4.6 Conclusion**

Le coronavirus murin est responsable d'infections diverses dont l'issue dépend à la fois de la souche et de la dose virales utilisées, de la voie d'inoculation ainsi que du fond génétique, de l'âge et de l'état de santé de l'hôte. Le caractère neurotrope et neuroinvasif de certaines souches MHV expliquent l'infection du SNC observée. La réponse immunitaire au SNC entraîne l'élimination du coronavirus du SNC, bien qu'une immunité complète ne soit pas atteinte et que le virus puisse persister. Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer la démyélinisation induite par l'infection virale. Quoique l'effet cytopathique du virus sur les oligodendrocytes soit une des hypothèses émises, l'implication du système immunitaire dans le processus a été clairement démontrée. La réponse immunitaire pourrait entraîner la démyélinisation 1- de façon directe, 2- de façon indirecte, 3- en activant une réponse auto-immunitaire ou 4- par une combinaison de l'un ou l'autre de ces trois mécanismes. Finalement, les nombreuses similitudes présentes entre la pathologie induite par le MHV chez la souris et la SEP font du premier un excellent modèle animal pour l'étude du dernier.

## 2.0 Matériel et méthodes

### 2.1 Lignées cellulaires

La lignée de cellules DBT (*delayed brain tumor*) a été établie à partir d'une tumeur cervicale d'une souris CD1 inoculée avec la souche Schmidt-Ruppin du virus du sarcome de Rous. Cette lignée a été obtenue du Dr Michael Buchmeier du *Scripps Research Institute* de La Jolla (CA, É.-U.). D'autre part, la lignée de cellules L929 est dérivée de tissu connectif sous-cutané de souris C3H/An et provient de l'ATCC (Manassas, VA, É.-U.). Ces cellules ont été cultivées dans un milieu constitué de parts égales de *Earle's Minimum Essential Medium* (MEM) (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) et de *199 Hank's* (Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.), auquel ont été ajoutés 5% (volume/volume, v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (Wysent, St-Bruno, Québec, Canada), 1,7% (v/v) de bicarbonate de sodium (Invitrogen) et de 50 µg/mL de gentamycine (Invitrogen).

### 2.2 Production virale

Le virus a été produit sur des cellules DBT cultivées dans du milieu constitué de parts égales de *Earle's MEM* et *199 Hank's*, additionné de 1% (v/v) de SVF, à pH 6. Les cellules ont été infectées avec le virus MHV-A59 à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,001. Le virus a été laissé en contact avec les cellules dans un volume minimal de milieu pour 1 heure à 37°C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, avec agitation des flacons aux 10 minutes. Puis, 10 millilitres (mL) de RPMI (Invitrogen) contenant 1% (v/v) de SVF ont été ajoutés à chaque flacon avant de poursuivre l'incubation pour 24 heures. Les cellules infectées ont ensuite été centrifugées à 20°C pendant 5 minutes à 230 x g (GS-6R Centrifuge ; Beckman, Palo Alto, Ca, USA) et le surnageant a été récolté. Le virus ainsi produit a été aliquoté et conservé à -80°C jusqu'au moment du dosage des particules infectieuses par un test de plages décrit à la section 2.3. Les préparations qui ont été utilisées dans le cadre des expériences décrites aux sections suivantes sont issues du quatrième et du cinquième passage du virus sur la lignée DBT.

## 2.3 Dosage du titre viral infectieux

La production virale a été dosée par un test de plages de lyse réalisé avec des cellules DBT. Des cellules DBT ont d'abord été cultivées jusqu'à confluence dans des plateaux à 12 puits (ICN, Costa Mesa, CA, É.-U.). Les échantillons ont été traités pour briser les agrégats dans un bain sonicateur pendant 30 secondes, puis dilués dans des tubes de verre avec du milieu fait d'un mélange à part égale de *199X Hank's 2X* et de *Earle's MEM 2X* contenant 1% (v/v) de SVF. Le milieu des plateaux a été aspiré sous vide et 0,15 mL des dilutions préparées ont été ajoutés aux puits. Les plateaux ont ensuite été incubés dans une étuve à 37°C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> et agités aux 10 minutes pendant une heure. La solution virale a alors été aspirée et 1 mL par puits d'un mélange à parts égales de milieu *Earle's MEM 2X* et de *199 Hank's 2X* contenant 5% (v/v) de SVF et d'agar 3% (poids/volume; p/v) (Difco, Michigan, USA) à 42°C a été ajouté. Après solidification du mélange, les plateaux ont été ré-incubés dans l'étuve pendant 48 heures. Finalement, les cellules ont été fixées pendant 30 minutes avec une solution 3,1 M de formaldéhyde dans du tampon salin phosphaté (PBS) (2,68 mM de KCl, 137 mM de NaCl, 1,47 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) à un pH entre 7,2 et 7,4. L'agar a ensuite été enlevé et le feuillet cellulaire teint au violet de gentiane (Sigma, Oakville, On, Canada) pendant quelques minutes, avant d'être rincé à l'eau du robinet. Les plages de lyse ont alors été dénombrées afin de déterminer le titre infectieux.

## 2.4 Infection des animaux

Des souris C57BL/6 mâles (Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, Canada) de 4-5 semaines ont été anesthésiées par voie i.p. avec 0,15-0,20 mL d'un mélange 1/10 de kétamine-xylazine. Puis, elles ont été infectées par voie i.c. avec 100 unités formatrices de plage (ufp) du virus MHV-A59 (5<sup>e</sup> passage), produit tel que décrit à la section 2.2, dans 50 µL de PBS stérile. Les souris témoins ont été injectées avec la même dilution et le même volume de surnageant de cellules DBT non-infectées.

## **2.5 Dosage du virus infectieux au cerveau et au foie de souris lors d'une cinétique d'infection par le MHV-A59**

Pendant 10 jours suivant l'infection, des souris (n= 7 à 10) infectées i.c. par le MHV ont été sacrifiées quotidiennement par dislocation cervicale. Le cerveau et le foie des animaux ont été prélevés, puis homogénéisés sur glace dans 1/10 (p/v) de PBS froid (0-4°C). Les homogénats ont ensuite été centrifugés à 4°C pendant 20 minutes à 514 x g (GS-6R Centrifuge, Beckman, Mississauga, On, Canada). Une partie du surnageant des homogénats a ensuite été diluée 1/5 (v/v) dans du PBS stérile. Des aliquotes des deux dilutions obtenues (1/10 et 1/50, v/v) ont été conservés à -80°C. Le titre en virus infectieux a été déterminé par un test de plages de lyse tel qu'il est décrit à la section 2.3.

## **2.6 Séropositivité des souris**

### **2.6.1 Préparation des antigènes**

Des cellules L929 cultivées dans du milieu contenant un mélange à parts égales de *Earle's MEM* et *199 Hank's*, additionné de 1 % (v/v) de SVF à pH 6 ont été infectées avec le 4<sup>e</sup> passage du virus MHV-A59 à une MOI de 0,4. Le virus a été laissé en contact avec les cellules pendant 1 heure à 37°C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, avec agitations intermittentes aux 10 minutes. Puis, le volume des cultures a été complété à 20 mL de RPMI (Invitrogen) contenant 1 % (v/v) de SVF, avant de poursuivre l'incubation dans l'étuve pour 24 heures. Les cellules ont été lysées par 3 cycles de congélation (-80°C)/décongélation (37°C), puis soniquées (degré «100», BraunSonic 2000, Shelton, CO, É.-U.) 2 fois pendant 1 minute à intervalles de 30 secondes. Les cellules ont ensuite été centrifugées 30 minutes à 10 000 x g à 4°C (centrifugeuse Beckman modèle J2-21M). Le surnageant a alors été centrifugé à 100 000 x g pendant 60 minutes à 4°C (centrifugeuse Beckman modèle L5-65). Le culot obtenu a été resuspendu dans 1/50 du volume initial dans du PBS. La suspension a été soniquée comme décrit précédemment. Finalement, la suspension a été centrifugée à 230 x g pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse Beckman modèle GS-6R). Le contenu protéique a été dosé (tel que décrit à la section 2.7) et les aliquotes ont été congelés et conservés à -20°C. L'antigène ainsi obtenu a été testé en ELISA (voir la section 2.6.2) avec un sérum pré-immun ainsi

qu'avec un sérum de souris hyper-immunisée avec le MHV-A59 et ce à différentes dilutions afin de déterminer la concentration optimale à utiliser.

### 2.6.2 Test ELISA

Quotidiennement durant 10 jours suite à l'infection par le MHV, les souris (n=4) ont été anesthésiées tel que décrit à la section 2.4, puis saignées dans le sinus orbital à l'aide de capillaires héparinés. Le sang a ensuite été centrifugé 5 minutes à la température de la pièce (TP) à 2000 x *g* (*Mini Centrifuge*, VWR, Mississauga, On, Canada) et le sérum a été récolté, puis conservé à -20°C. La présence d'anticorps anti-MHV dans le sérum a été détectée par un test ELISA.

Les antigènes L929 et A59 ont été préparés tel que décrit à la section 2.6.1. D'abord, un lysat de cellules L929 et un lysat de cellules L929 infectées par MHV-A59 ont été homogénéisés au sonicateur (Branson 12, Shelton, CO, É.-U.). Les antigènes ont été mis en plateaux à 96 puits (ICN, Costa Mesa, CA, É.-U.), chaque puits contenant 0,6 µg dans 100 µL de PBS, pour 16 heures à la TP. Puis, les antigènes ont été retirés et le blocage a été réalisé en incubant 150 µL de diluant ELISA (10% SVF (v/v), 0,2% (v/v) Tween-20 (Bio-Rad, Richmond, Ca, USA) dans du PBS) par puits à la TP pendant une heure. Les puits ont été vidés et des dilutions en série du sérum murin ont été faites en plateaux dans du diluant ELISA. Après une incubation de 2 heures, les puits ont été lavés 5 fois avec le tampon de lavage (0,1% (v/v) de Tween-20 dans du PBS). L'anticorps anti-immunoglobuline G (IgG) de souris couplé à la *horseradish peroxidase* (HRP) (KPL, Gaithersburg, MD, USA) dilué 1/1000 a été ensuite ajouté aux puits dans un volume de 100 µL. Après 2 heures d'incubation à la TP, les puits ont été lavés 5 fois avec le tampon de lavage. Le substrat (0,05 M d'acide citrique pH 5.0, 0,1 M de phosphate sodique dibasique, 2,2 mM de *o*-phénylène diamine (OPD) et 3 mM de peroxyde d'hydrogène) a été ajouté dans un volume de 100 µL par puits et incubé pour 30 minutes à l'obscurité. La réaction a finalement été inhibée par l'ajout de 100 µL d'acide chlorhydrique (HCl) 1 N. L'absorbance à 492 nm des plateaux a ensuite été mesurée à l'aide d'un lecteur EasyReader 400T (SLT LabInstruments, Autriche).

Dans le but de calculer le titre en anticorps, la différence de la densité optique lue sur l'antigène L929/A59 moins l'antigène L929 pour chacune des dilutions d'un sérum pré-immun a été déterminée. La moyenne et l'écart-type de l'ensemble des différences obtenues a ensuite été calculée. Le titre en anticorps correspond à la dernière dilution de sérum testé où la différence entre la densité optique (D.O.) lue avec l'antigène A59 et l'antigène L929 est supérieure à la somme de la moyenne et de deux écart-type obtenue avec les dilutions du sérum pré-immun.

## 2.7 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford (1976). Les échantillons ont été dilués dans du PBS en duplicata dans un volume de 100  $\mu$ L, en plateau à 96 puits à fonds plat (ICN). La courbe standard a été obtenue en diluant en duplicata une solution d'albumine sérique de bœuf à 50  $\mu$ g/mL. Un volume de 100  $\mu$ L de solution de colorant Bio-Rad *Protein Assay* à 40% (v/v) final dans de l'eau distillée (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA) a été ajouté aux échantillons. L'absorbance à 600 nm a été lue 10 minutes plus tard à l'aide d'un lecteur EasyReader 400T (SLT LabInstruments).

## 2.8 Mise en culture des splénocytes

Les souris infectées i.c. par le MHV-A59 (section 2.4) et les souris témoins ont été sacrifiées 7 jours post-infection (p.i.) par dislocation cervicale. Les rates ont été prélevées de façon aseptique. Les splénocytes ont été récoltés en triturant les rates à l'aide d'un scalpel dans environ 12 mL de RPMI (Invitrogen) contenant 100 unités/mL de pénicilline G (Invitrogen), 10  $\mu$ g/mL de streptomycine (Invitrogen), 1,25  $\mu$ g/mL de fungizone (Invitrogen) et 0,01 M d'acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonique (HEPES) (Invitrogen). Les débris ont été décantés sur glace et le surnageant a été centrifugé à 4°C pendant 7 minutes à 230 x g (GS-6R Centrifuge, Beckman). Les cellules ont par la suite été resuspendues. Un choc osmotique par un contact de 10 secondes avec 2 mL d'eau distillée stérile a ensuite été réalisé, immédiatement suivi de l'ajout de 11 mL de RPMI (Invitrogen) contenant les mêmes concentrations de pénicilline, streptomycine, fungizone et HEPES que lorsque les rates ont été triturées. Les cellules ont à nouveau été

centrifugées à 4°C pendant 7 minutes à 230 x g (Centrifugeuse Beckman modèle GS-6R). Le culot a alors été resuspendu dans environ 5 mL de RPMI (Invitrogen) contenant 10% (v/v) de SVF et les mêmes concentrations de pénicilline, streptomycine, fungizone et HEPES. Un compte de viabilité cellulaire avec une solution 0,1% (p/v) de Bleu de Trypan (Sigma) dans du PBS à ensuite été effectué et les suspensions ont été diluées à une concentration finale de  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans du RPMI (Invitrogen) contenant 10% (v/v) de SVF, les mêmes concentrations de pénicilline, streptomycine, fungizone et HEPES et 55  $\mu$ M de 2-mercaptoéthanol (2-Me) (Invitrogen).

## **2.9 Préparation des antigènes**

Les splénocytes ont été stimulés par la présentation de différents antigènes. La préparation de ces antigènes est décrite aux sections 2.9.1 à 2.9.3.

### **2.9.1 Lysat de cellules DBT et de cellules DBT infectées par le MHV-A59**

Des cellules DBT ont été cultivées comme décrit à la section 2.1 et une partie a été infectée tel qu'indiqué à la section 2.2. Les cellules ont ensuite été soumises à 3 cycles de gel à -80°C suivi de dégel à 37°C. Le titre viral du lysat de cellules infectées a été évalué (comme décrit à la section 2.3) à  $2 \times 10^7$  ufp/mL. Les lysats de cellules infectées et non-infectées ont alors été aliquotés pour être conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

### **2.9.2 Préparation de la protéine basique de la myéline (PBM)**

#### **2.9.2.1 Extraction**

La PBM a été extraite à partir d'un cerveau bovin (une gracieuseté de l'Abattoir Gilles Fortin, Napierville) selon la méthode de Cheifetz et Moscarello (1985). La matière blanche du cerveau a été isolée et 36 g ont été hachés au mélangeur *Osterizer* (Sunbeam, Toronto, On, Canada). Un volume de 284 mL d'un mélange 2:1 de chloroforme/méthanol pré-refroidi à 4°C a été ajouté et la suspension a été homogénéisée au mélangeur à nouveau pendant 15 secondes. La suspension a ensuite été agitée à 4°C pour la nuit. L'homogénat a été filtré sur un papier filtre Whatman #1 à la TP (Fisher, Nepean, On, Canada). Le résidu a été lavé avec 130 mL d'une solution de

chloroforme/méthanol pré-refroidi à 4°C, puis avec 172 mL d'acétone pré-refroidie à 4°C. Le résidu a ensuite été homogénéisé dans 130 mL d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,2N et 130 µL de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) 0,1 M. La suspension a été gardée sous agitation pour la nuit à 4°C. Une centrifugation à 9000 x g à 4°C pendant une heure a ensuite été réalisée (centrifugeuse Beckman modèle J2-21M). Le surnageant a été conservé et le culot lavé avec 52 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 N et 52 µL de PMSF 0,1 M. Une seconde centrifugation à 9000 x g à 4°C pendant une heure a été réalisée (modèle J2-21M, Beckman). Le surnageant de cette deuxième centrifugation a été combiné à celui de la première et un volume égal d'éthanol pré-refroidi à -10°C a été ajouté. La solution a été laissée à 4°C pour la nuit. Puis, une centrifugation à -10°C pendant une heure à 9000 x g a alors été effectuée (modèle J2-21M, Beckman). Le culot a été lavé 3 fois à l'éthanol 90% pré-refroidi à -10°C. Chacun des lavages a été suivi d'une centrifugation à 9000 x g à -10°C, de 30 minutes après le premier lavage et de 15 minutes après les deux lavages suivants (modèle J2-21M, Beckman). Le culot a finalement été resuspendu dans 25 mL d'eau distillée et centrifugé à 230 x g pendant 7 minutes à 4°C (GS-6R Centrifuge, Beckman). Le surnageant a alors été aliquoté, dosé en protéines (voir la section 2.7) et conservé à -20°C sous forme lyophilisée.

### 2.9.2.2 Immunobuvardage de type Western

La présence et l'intégrité de la PBM suite à l'extraction a été confirmée à l'aide d'un immunobuvardage de type Western. La préparation lyophilisée a été resuspendue dans du RPMI (Invitrogen) et filtrée sur un filtre de PVDF *low protein binding Durapore®* de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA, É.-U.). L'immunobuvardage a été réalisé sur des échantillons avant et après la filtration. Une solution de 4 µg de protéines, 6 µL d'eau et 10 µL de tampon d'échantillon 2X (0,1 M tris(hydroxyméthyl) aminométhane (Tris)-HCl, pH6,8 ; 3,2% (p/v) SDS ; 4,4 mM 2-Me ; 0,02% (p/v) bleu de bromophénol ; 16 % (v/v) de glycérol). Les échantillons ont alors été chauffés à 100°C pendant 2 minutes. Ces échantillons ainsi qu'un marqueur protéique (*SDS-PAGE standards, broad range*, Bio-Rad) ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes dans le but de séparer les protéines selon leur

poids moléculaire (Laemmli, 1970). La migration a eu lieu successivement à travers 2 couches d'acrylamide de concentrations différentes : 4% (gel d'entassement : 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 ; 0,1% (p/v) sulfate dodécyl de sodium (SDS) ; acrylamide/bis 4% ; 0,05% (v/v) persulfate d'ammonium (APS) ; N,N,N',N'-tetraméthylethylenediamine (TEMED) (Invitrogen)) et 15% (gel de résolution : 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 ; 0,1% (p/v) SDS ; acrylamide/bis 15 % (v/v) ; 0,05 % (v/v) APS; TEMED). L'électrophorèse a été réalisée dans le tampon Tris-glycine à pH 8,3 (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0,1% (p/v) SDS). Le transfert des protéines du gel à une membrane de 0,2 µm de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Keene, NH, É.-U.) a été réalisé à 100V à 4°C pendant environ une heure dans un tampon de transfert à pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) méthanol). L'efficacité du transfert a été vérifiée à l'aide d'une coloration au rouge de Ponceau S (Sigma). Une étape de blocage en vue d'empêcher la liaison non-spécifique des anticorps a été réalisée dans une solution contenant 10% (p/v) de lait écrémé en poudre (Carnation, North York, On, Canada) et 0,05% (v/v) de Tween-20 pour 16 heures à 4°C. Un lavage de 10 minutes et 3 lavages de 5 minutes ont ensuite été réalisés dans du PBS contenant 0,05% (v/v) de Tween-20 (PBS-T). La membrane a par la suite été incubée une heure à la TP avec un anticorps IgG monoclonal de rat reconnaissant la région 82-87 de la PBM (Chemicon, Temecula, CA, E.-U.) dans une solution contenant 3% (p/v) de lait écrémé en poudre (Carnation). Un lavage de 10 minutes et 2 lavages de 5 minutes dans du PBS-T ont ensuite été réalisés. Un autre lavage d'une durée de 5 minutes dans une solution de PBS-T contenant 5% (p/v) de lait écrémé en poudre (Carnation) a finalement été fait. L'anticorps anti-IgG de souris couplé à la HRP (KPL) a ensuite été ajouté à une dilution 1/2000 dans du PBS-T contenant 5% (p/v) de lait écrémé en poudre. Une incubation d'une heure à la TP a alors été réalisée. Les protéines ont ensuite été visualisées par luminescence suite à une incubation de 5 minutes des membranes avec la solution Super Signal® West (Pierce, Rockford, IL, É.-U.). Les membranes ont finalement été exposées à un Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia) pour détecter le signal chimioluminescent.

### **2.9.3 Homogénat de poumon de souris**

Des poumons de souris ont été prélevés, puis homogénéisés sur glace dans du RPMI (Invitrogen) à l'aide d'un homogénéisateur Polytron® (Kinematica, Lucerne, Suisse). Une centrifugation à 510 x g pendant 20 minutes à 4°C a ensuite été effectuée. La quantité de protéines totales présentes dans le surnageant a été dosée tel qu'il est décrit à la section 2.7. Des aliquotes à une concentration de 1 mg/mL ont été préparés et conservés à -20°C.

## **2.10 Mesure de la prolifération cellulaire**

### **2.10.1 Antigènes**

La mesure de la prolifération cellulaire des splénocytes de souris a été réalisée en présence de différents antigènes. Tous les antigènes présentés ont été dilués dans du RPMI (Invitrogen) contenant 100 unités/mL de pénicilline G (Invitrogen), 10 µg/mL de streptomycine (Invitrogen), 1,25 µg/mL de fungizone (Invitrogen) et 0,01M d'HEPES (Invitrogen). Un volume de 10 µL de la dilution appropriée a été déposé au fond des puits d'un plateau à 96 puits (Costar, Corning, Cambridge, MA, É.-U.).

Les lysats de cellules DBT infectées par le MHV-A59 ont été exposés aux rayons ultra-violet (UV) pendant 20 minutes (UVBW-20 Dual Light Transilluminator, Ultra-Lum, Claremont, CA, É.-U.) afin d'inactiver le virus. Le lysat de cellules DBT a été soumis au même traitement. Une dilution 1/20 des lysats cellulaire a été réalisée avant le dépôt au fond des puits.

La PBM bovine, l'ovalbumine et l'homogénat de poumon ont été dilués à une concentration de 0,2 mg/mL avant d'être répartis dans les puits appropriés.

Par ailleurs, la prolifération des splénocytes a été mesurée sous une stimulation non-spécifique à l'antigène réalisée à l'aide d'un anticorps liant une protéine du complexe CD3 (CD3-ε), exprimé à la surface des cellules T. L'anti-CD3 murin a été purifié du surnageant de l'hybridome 145-2C11 (ATCC), un hybridome issu de la fusion de cellules

myéloïdes de souris Sp2/0 avec des splénocytes de hamster arménien. Cinq  $\mu\text{g}$  d'anticorps par puits ont été absorbés sur des plateaux à 96 puits (Costar) pour 16 heures à la TP. Par la suite, les puits ont été lavés 2 fois avec le milieu de culture RPMI (Invitrogen) avant l'ajout des splénocytes.

### **2.10.2 Culture des splénocytes**

Un volume de 200  $\mu\text{L}$  de splénocytes (décrit à la section 2.8) a ensuite été ajouté aux puits. Ainsi, chaque puits contenait  $4 \times 10^5$  splénocytes. Les cellules ont été cultivées, en présence des différents antigènes décrits à la section 2.10.1 ou en l'absence d'antigène, pendant 48 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$ .

### **2.10.3 Incorporation de la thymidine tritiée**

Une quantité de 0,5  $\mu\text{Ci}$  de thymidine tritiée (Amersham Pharmacia) dans un volume de 10  $\mu\text{L}$  ont ensuite été ajoutés à chaque puits. L'incubation s'est poursuivie pendant 18 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$ .

### **2.10.4 Mesure de la prolifération cellulaire**

L'ADN des cellules a ensuite été récolté sur des filtres de fibre de verre (Wallac, Turku, Finlande) à l'aide de l'appareil *Tomtec MACH III* (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, É.-U.). Les filtres ont été placés dans des sacs de plastique (Wallac) et 4 mL de liquide à scintillation *Beta Plate Scint* (Wallac) ont été ajoutés avant de sceller les sacs. La radioactivité présente sur les filtres a ensuite été mesurée par un compteur à scintillation *Trilux 1450 Microbeta* (Wallac). La prolifération observée a été considérée spécifique à l'antigène lorsque l'incorporation de thymidine tritiée était 2 fois plus importante en présence de l'antigène testé que de l'antigène témoin (indice de stimulation (IS)  $\geq 2$ ) et que l'incorporation de thymidine mesurée était supérieure à 1000 comptes par minute (cpm).

### **2.10.5 Mesure de réactions croisées entre la PBM et le MHV**

Les splénocytes de souris infectées par le MHV ont été mis en culture 21 jours p.i. (méthode décrite à la section 2.8). Ainsi,  $2 \times 10^5$  splénocytes ont été déposés dans chaque puits et cultivés en présence de PBM (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou de MHV (dilution 1/100 (v/v)). Les cellules ont été stimulées à des intervalles d'environ 3 jours par l'ajout d'interleukine(IL)-2 de rat (10 Unités/mL). Une stimulation par la présentation d'antigène (PBM ou MHV) et l'ajout de splénocytes frais a été réalisée 14, 28 et 42 jours suivant la mise en culture. La prolifération en présence de PBM et de MHV a été mesurée et comparée à celle mesurée en présence d'antigènes témoins (voir section 2.10.4) 28 et 42 jours après la mise en culture des splénocytes.

### **2.11 Extraction d'ARN de cerveaux souris**

Les souris infectées i.c. par le MHV-A59 (section 2.4) ont été sacrifiées par dislocation cervicale à 1, 2, 4 et 7 jours p.i. Le cerveau des animaux a été prélevé, puis congelé immédiatement à  $-80^\circ\text{C}$ . L'extraction d'ARN a été effectuée à l'aide de Trizol® LS (Invitrogen) d'après une adaptation de la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) utilisant du phénol et de la guanidine isothiocyanate. L'ARN total du cerveau a été extrait en homogénéisant le tissu dans 3 mL de Trizol (Invitrogen), puis en suivant les étapes conformément aux recommandations du fabricant. L'ARN obtenu a été resuspendu dans 150  $\mu\text{L}$  d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) et dosé en spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm. L'ARN ainsi obtenu a été conservé à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à son utilisation, après l'ajout de 20U d'inhibiteur de RNase (Ambion, Austin, Tx, USA).

### **2.12 Traitement à la DNase**

Les échantillons d'ARN total préparés en vue d'une utilisation future dans les expériences de matrices d'ADN complémentaire (ADNc) ont été traités à la DNase à l'aide de la trousse *Atlas™ Pure Total RNA labeling System* de Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, Ca, USA), conformément aux instructions du fabricant. Les volumes ont été ajustés proportionnellement pour un traitement fait avec 150  $\mu\text{L}$  d'ARN total. L'ARN traité a été resuspendu dans de l'eau sans RNase avant d'être dosé en

spectrophotométrie tel que décrit à la section 2.11. L'ARN ainsi obtenu a été aliquoté en 3 parties : la première partie (environ 15 µg) pour les matrices d'ADNc, la deuxième partie (environ 2 µg) pour en vérifier l'intégrité (section 2.13) et le reste pour des réactions de RT-PCR (section 2.14 et 2.15). Tous les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

## 2.13 Électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant

Afin de vérifier l'intégrité de l'ARN obtenu, les échantillons ont été déposés sur un gel dénaturant constitué de formaldéhyde et d'agarose. Un gel d'agarose 1% (p/v) a été préparé dans un tampon à pH 7,0 contenant 20 mM d'acide 3-N-[morpholino]propanesulfonique (MOPS), 5 mM d'acétate de sodium et 1 mM d'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA). Le mélange a été bouilli pendant 2 minutes puis refroidi à 65-70°C. Ensuite, 1,8 mL d'une solution de formaldéhyde 37% (v/v) (12,3 M) et 6 µL d'une solution stock de bromure d'éthidium (10 mg/mL) ont été ajoutés au mélange sous une hotte chimique. Le mélange a alors été coulé dans un portoir et laissé à la TP jusqu'à la solidification. Le gel solidifié a ensuite été déposé dans un appareil à électrophorèse contenant du tampon de migration (20 mM MOPS, 5 mM d'acétate de sodium, 1 mM d'EDTA, 0,25 mM de formaldéhyde), puis laissé à équilibrer pour au moins 15 minutes. Un µg d'ARN a été dilué dans 2 µL d'eau DEPC et additionné de 6 µL de tampon d'échantillon (*NorthernMax™ Formaldehyde Load Dye*, Ambion). Les échantillons ont été incubés pendant 15 minutes à 65°C, centrifugés brièvement à la TP à 2000 x g (*Mini Centrifuge*, VWR) et mis sur glace avant d'être déposés sur le gel. Le gel a été soumis à une migration à 100 V pendant environ 45 minutes. Les bandes d'ARN ribosomal murin ont ensuite été visualisées en utilisant le IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, Ca, USA).

## 2.14 Préparation de l'ADNc

Un µg d'ARN total a été ajouté à un mélange contenant 0,1 M dithiothréitol (DTT) (Invitrogen), 300 µg/µL d'amorces aléatoires (hexamères) (Invitrogen), 200 U de transcriptase inverse de *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) (Invitrogen), 7 U

d'inhibiteur de RNase (*ANTI-Rnase*, Ambion), 2 mM de désoxynucléotides triphosphates (dNTP)-sels de Na, tampon *first-strand buffer* (Invitrogen) dans un volume final de 20  $\mu$ L. La transcription inverse a été réalisée à 37°C pendant une heure et suivie d'une période d'inactivation de l'enzyme de 3 minutes à 93°C. L'ADNc a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

## 2.15 Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Chaque réaction de PCR a été réalisée à partir de 0,5-4  $\mu$ L de la réaction de transcription inverse (adapté selon les différents gènes amplifiés), 2,5 U de *rTaq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) dans du tampon de PCR (500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0) (Amersham Pharmacia). Toutes les réactions de PCR ont débuté par une période de 3 minutes à 94°C et se sont terminées par une période d'élongation de 10 minutes à 72°C. À l'intérieur d'un cycle d'élongation, la température de dénaturation était de 95°C et ce pour une durée de 30 secondes. La période d'appariement était d'une durée de 45 secondes à des températures variant selon les amorces utilisées (décrit au tableau 3). La température d'élongation était de 72°C et sa durée variait selon la taille du fragment amplifié (tableau 3). Le nombre de cycles, la séquence des amorces utilisées (déterminée à l'aide du site internet [www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) et la taille du fragment amplifié sont indiqués au tableau 3.

Dix à 20  $\mu$ L de la réaction PCR ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose 1% (p/v) et soumis à une électrophorèse à 100 V pendant environ 45 minutes. Les produits amplifiés ont été détectés par transillumination à l'aide d'une lampe UV en utilisant le IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, USA). Une analyse semi-quantitative a été réalisée par densitométrie à l'aide du programme ImageJ (NIH, Bethesda, MA, É.-U.) en relativisant à l'expression du gène de la *GAPDH*.

**Tableau 3. Description des amorces spécifiques et des conditions pour l'amplification par RT-PCR de différents gènes exprimés dans le cerveau de souris.**

| Nom du gène                   | Amorce    | Séquence des amorces (5' → 3') | Position sur le gène   | Taille de l'amplicon (pb) | Nombre de cycles | Température d'appariement (°C) | Durée de l'élongation (secondes) |
|-------------------------------|-----------|--------------------------------|------------------------|---------------------------|------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| <b>GAPDH</b>                  | sens      | CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT        | 58-81 <sup>a</sup>     | 307                       | 25               | 55                             | 45                               |
|                               | anti-sens | AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC       | 364-341                |                           |                  |                                |                                  |
| <b>CXCL-10</b>                | sens      | GGATGGCTGTCCCTAGCTCTG          | 612-631 <sup>b</sup>   | 206                       | 35               | 55                             | 45                               |
|                               | anti-sens | CCTTGGGAAGATGGTGGTTA           | 817-798                |                           |                  |                                |                                  |
| <b>Galectine-3</b>            | sens      | AGCACTAATCAGGTGAGC             | 1-18 <sup>c</sup>      | 841                       | 40               | 52                             | 60                               |
|                               | anti-sens | GGCTTAGATCATGGCGTGG            | 841-823                |                           |                  |                                |                                  |
| <b>CD3<math>\gamma</math></b> | sens      | CCTTCTATCCAGCACCCAGA           | 714-733 <sup>d</sup>   | 199                       | 30               | 55                             | 45                               |
|                               | anti-sens | CAAGGTTGACAAGTGCTCCA           | 912-893                |                           |                  |                                |                                  |
| <b>Ii</b>                     | sens      | TCACTGTATCCCCAACCCACA          | 3174-3193 <sup>e</sup> | 200                       | 35               | 55                             | 45                               |
|                               | anti-sens | CCCCTTACCTTGACCCAGTT           | 3373-3354              |                           |                  |                                |                                  |

<sup>a</sup> Choisie à partir de la séquence de l'ARNm (Tokunaga *et al.*, 1987)

<sup>d</sup> Choisie à partir de la séquence de l'ARNm (Haser *et al.*, 1987)

<sup>b</sup> Choisie à partir de la séquence de l'ARNm (Vanguiri et Farber, 1990)

<sup>e</sup> Choisie à partir de la séquence de l'ARNm (Koch *et al.*, 1987)

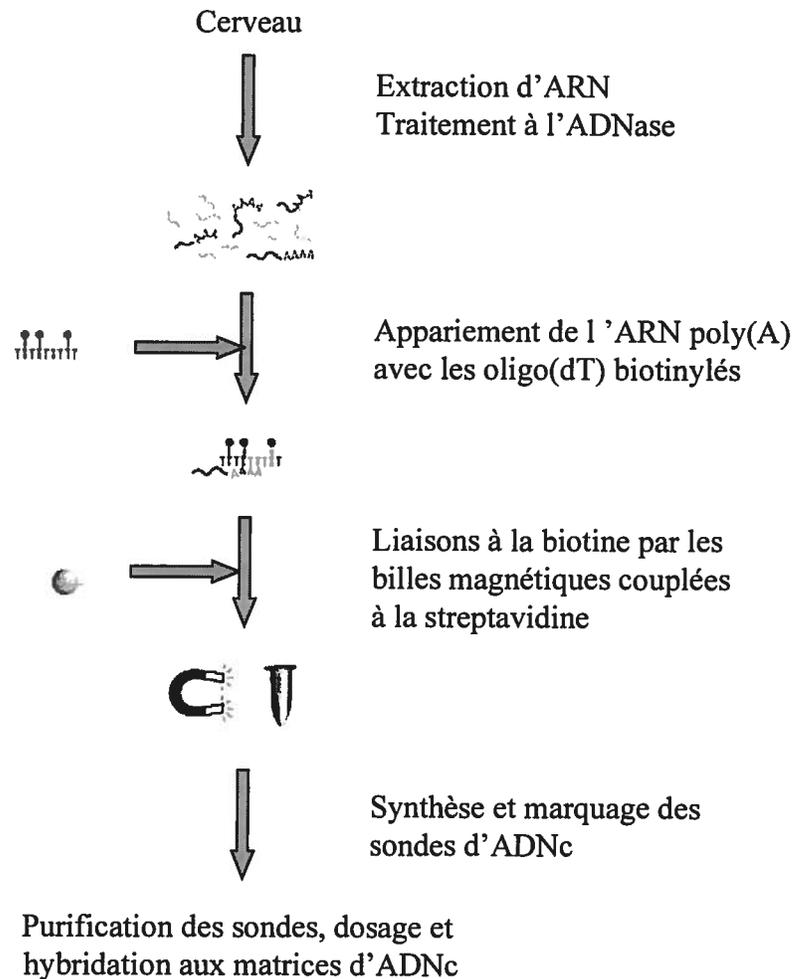
<sup>c</sup> Choisie à partir de la séquence de l'ARNm (Cherayil *et al.*, 1989)

## 2.16 Matrice d'ADNc

Des matrices d'ADNc ont été hybridées à des sondes marquées et purifiées selon les instructions du fabricant des *Atlas<sup>MC</sup> 1.2II cDNA array* (BD Biosciences) (méthode illustrée à la figure 6). Brièvement, l'ARN de cerveaux de souris a été extrait comme décrit à la section 2.11. Pour chaque condition expérimentale, le marquage des sondes a été réalisé à partir d'un mélange d'ARN provenant de 3 cerveaux de souris. L'utilisation d'une combinaison de différents cerveaux permet de diminuer l'importance relative des variations non-relées à l'infection virale observées entre les individus. Ensuite, l'ARN total a été traité à la DNase (section 2.12) et déposé sur un gel de formaldéhyde (décrit à la section 2.13). Puis, l'ARNm a été isolé de l'ARN total à l'aide d'oligo(dT) biotinylés et de billes magnétiques couplées à la streptavidine. Des sondes d'ADNc marquées radioactivement au [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP (Amersham Pharmacia) ont été produites par transcription inverse de l'ARNm à l'aide d'un mélange d'amorces spécifiques aux fragments d'ADNc des 1176 gènes retrouvés sur la matrice. Par la suite, les sondes ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne d'extraction *NucleoSpin* (BD Biosciences) et dosées à l'aide d'un compteur à scintillation LS-1701 (Beckman).

Les matrices ont été pré-hybridées une heure dans un four à hybridation à 68°C avec la solution ExpressHyb (BD Biosciences) contenant 0,5 mg/mL d'ADN extrait de sperme de testicules de saumon (Sigma). L'hybridation a ensuite été effectuée pendant 16 heures à 68°C avec les sondes purifiées, en utilisant la même quantité des différentes sondes, qui a été ajustée à l'aide du nombre de cpm. Les membranes ont finalement été lavées à 68°C sous agitation constante pendant 30 minutes quatre fois dans une première solution (2X *standard saline citrate* (SSC), 1% (p/v) SDS et une fois dans une deuxième solution (0,1X SSC, 0,5% (p/v) SDS). Un dernier lavage a été effectué à la TP dans une solution 2X SSC. Les membranes ont ensuite été exposées à un écran de phosphore pour 20 jours et numérisées (grandeur des pixels de 100 microns; voltage PMT 688 V, correction du bruit de fond locale) à l'aide d'un PhosphorImager SI (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA, USA). L'intensité des signaux a été mesurée à l'aide du logiciel ImageQuant (version 5,0; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, É.-U.). Le signal obtenu sur les membranes hybridées avec les sondes provenant de souris infectées et de

souris témoins à différents temps p.i. a été normalisé à l'aide de 9 gènes présents sur les membranes dont le niveau d'expression est connu pour peu varier sous différentes conditions (ubiquitine, phospholipase A2, hypoxanthine-guanine, phosphoribosyltransférase, glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase, myosine I, ornithine décarboxylase,  $\beta$ -actine, protéine liant le  $\text{Ca}^{2+}$  et protéine ribosomale S29).



**Figure 6. Étapes de la préparation des sondes pour l'hybridation aux matrices d'ADNc.** Schéma adapté de Clontech (*Atlas<sup>MC</sup> Pure Total RNA Labeling System*, BD Biosciences).

## **3.0 Résultats**

Les effets de l'infection de souris C57BL/6 par 100 ufp de MHV injectées i.c. ont d'abord été étudiés. Cette faible dose de virus, environ 60 fois inférieure à la dose létale 50, favorise la survie des souris suite à l'infection. Le titre de virus infectieux au cerveau et au foie ainsi que le titre en anticorps ont été déterminés suivant l'infection (résultats présentés à la section 3.1). Puis, la réponse immunitaire dirigée contre le MHV et celle spécifique à un antigène du SNC, la PBM, ont été évaluées (décrit à la section 3.2). Finalement, les effets de l'infection sur l'expression de gènes cellulaires au cerveau ont été étudiés, dans le but de relier ces effets à un mécanisme d'activation du système immunitaire contre un antigène du soi (présenté à la section 3.3).

### **3.1 Caractérisation des effets de l'infection**

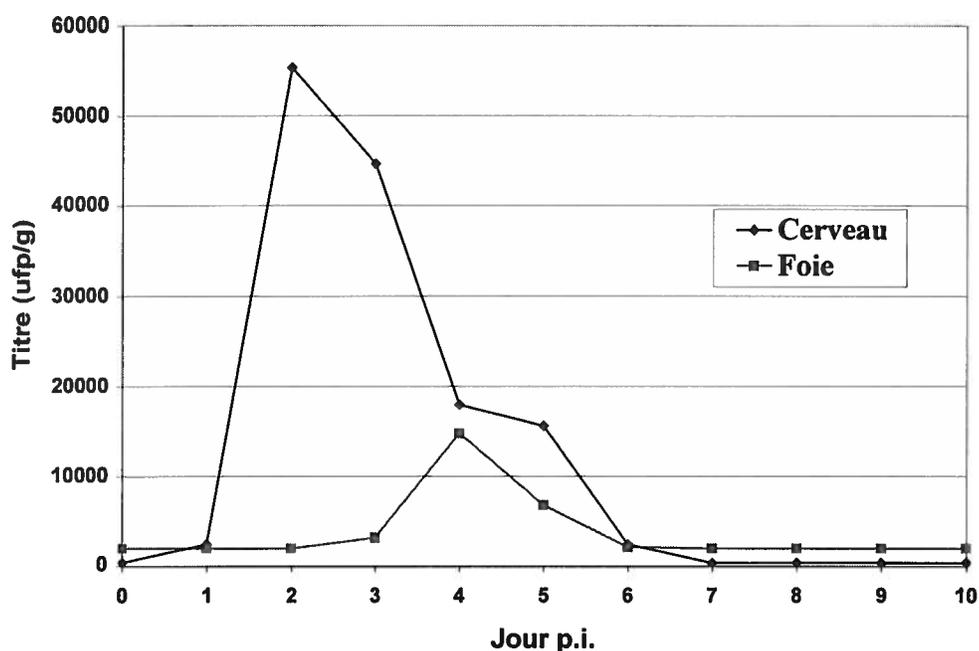
#### **3.1.1 Réplication virale au cerveau et au foie**

Le titre en virus infectieux a été évalué quotidiennement par un test de plages (section 2.3) durant les 10 jours suivant l'infection. Cette cinétique a été réalisée dans l'optique d'identifier les moments-clés lors de l'infection, c'est-à-dire le pic de réplication virale et l'élimination du virus infectieux.

Tel qu'illustré à la figure 7, le virus s'est répliqué rapidement au cerveau pour être détectable dès le jour 1 p.i. et a atteint un titre moyen maximal au deuxième jour suivant l'infection. Par la suite, la quantité de virus infectieux a chuté dès le jour 2 p.i., puis est devenue indétectable au jour 7. Par ailleurs, le MHV s'est répliqué également au foie suite à l'injection i.c.. Le maximum de particules virales infectieuses a été détecté 4 jours p.i.. Le virus a subséquemment été éliminé de cet organe et n'était plus détectable environ une semaine suivant l'infection. Aucune particule de virus infectieux n'a pu être détectée au cerveau ni au foie aux jours 18, 21, 22 et 26 p.i. (n=3) (résultats non-montrés).

### 3.1.2 Réponse humorale

Suite à l'étude de l'élimination du virus, la réponse immunitaire humorale de l'hôte a été étudiée durant les 10 jours suivant l'infection. Une faible production d'anticorps IgG a d'abord commencé à être observable chez certaines souris dès le quatrième jour p.i. (figure 8). La quantité d'anticorps spécifiques a augmenté de manière significative chez quelques souris au jour 6 p.i. et chez l'ensemble des souris 24 heures plus tard.

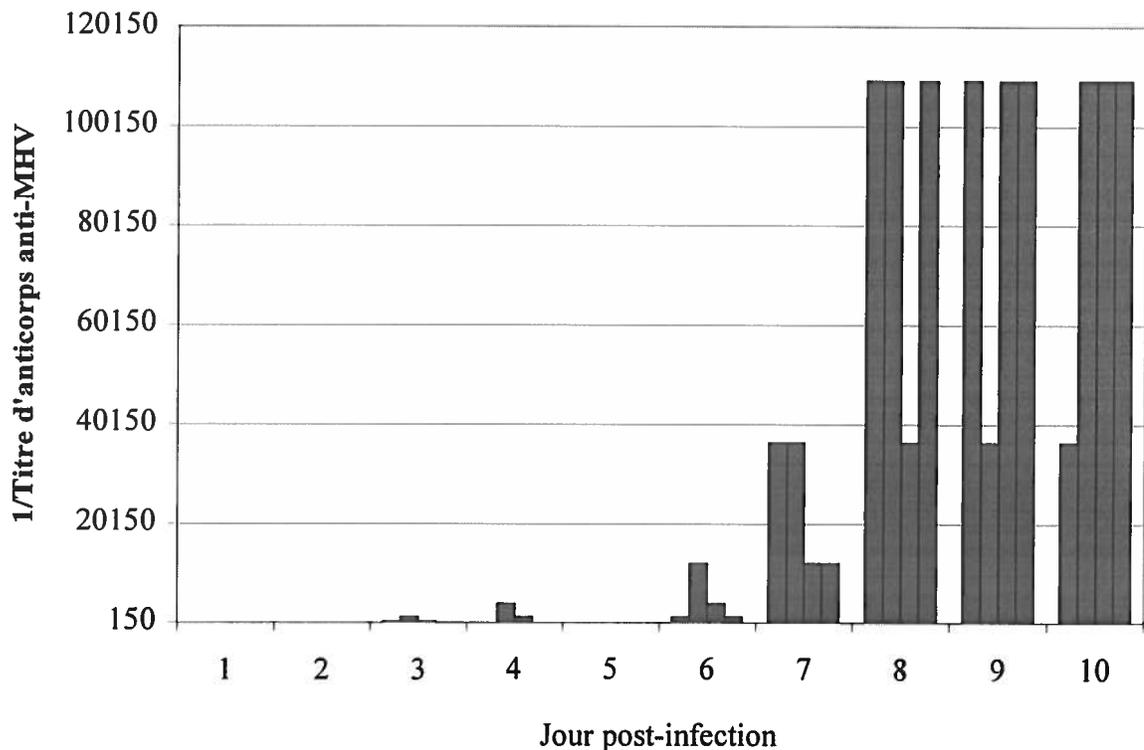


**Figure 7. Titres viraux moyens du MHV au cerveau et au foie de souris C57BL/6 infectées i.c. par le MHV.** Le titre a été déterminé via 3 tests de plages de lyse réalisés sur des cellules DBT (jour 1, 4, 7 : n=10 ; jour 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10 : n=7).

### 3.2 Réponse immunitaire dirigée contre un antigène viral et un antigène du soi

La réponse cellulaire contre le virus et un antigène du SNC suite à l'infection par le MHV a été évaluée dans le but de vérifier si une infection virale peut mener à l'activation d'une réponse immunitaire dirigée contre un antigène du SNC (section 3.2.3).

Pour ce faire, un auto-antigène, la PBM, a au préalable été purifié à partir de cerveau bovin puis analysé par immunobuvardage de type Western (section 3.2.1). Ensuite, les conditions expérimentales (jour p.i. étudié et concentration des antigènes) ont été optimisées afin de maximiser les réponses prolifératives détectées (section 3.2.2). Puis, l'activation de cellules T spécifiques à cette protéine de la myéline a été étudiée (section 3.2.3). Finalement, une expérimentation a été entreprise afin de déterminer la présence de réactions croisées spécifiques au virus et à la myéline au sein de lignées lymphocytaires stimulées par l'antigène viral et la PBM (section 3.2.4).



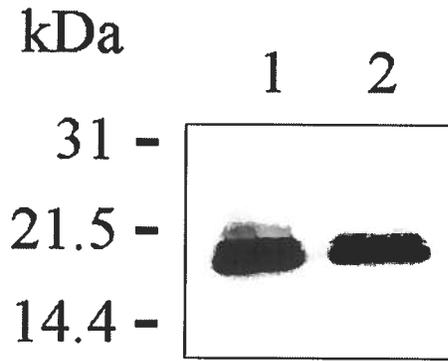
**Figure 8. Réponse humorale suite à l'infection i.c. de souris C57BL/6 par le MHV.**

Le titre en anticorps (IgG) spécifiques au MHV a été déterminé à partir du plasma de souris infectées. À chaque jour suivant l'infection, le plasma de 4 souris a été testé par ELISA.

### 3.2.1 Production de PBM

La qualité de la PBM obtenue d'un cerveau bovin a été analysée par immunobuvardage de type Western (présenté à la figure 9). La présence de bandes définies et l'absence d'une trainée verticale de protéines dans les puits indiquent qu'il n'y

a pas eu de dégradation protéique (Gallagher, 1999). Suite à son extraction (section 2.9.2.1), la PBM a été stérilisée par filtration. La protéine n'a pas été retenue sur le filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  utilisé. La PBM s'est retrouvée sous trois formes, estimées à 18,5 kDa et, dans une moindre mesure, à 21,5 kDa ainsi qu'à 17,2 kDa.



**Figure 9. Immunobuvardage de type Western de PBM isolée de cerveau bovin.** La protéine a été extraite par la méthode de Cheifetz et Moscarello (décrite à la section 2.9.2.1). Quatre  $\mu\text{g}$  de protéines ont été déposés sur un gel de polyacrylamide et soumis à une électrophorèse avant d'être transférés sur une membrane et immunodétectés à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique à la PBM (décrit à la section 2.9.2.2). Les marqueurs de masse moléculaire sont indiquées à gauche. 1 : PBM bovine avant filtration, 2 : PBM bovine après filtration.

### 3.2.2 Optimisation des tests de prolifération

Trois aspects des tests d'incorporation de thymidine par les lymphocytes T présents dans la rate de souris infectées suite à la stimulation des cellules par différents antigènes ont été optimisés : le jour p.i. où les splénocytes sont récoltés (section 3.2.2.1), la concentration de MHV présenté (section 3.2.2.2) et la concentration de PBM présentée (section 3.2.2.3).

#### 3.2.2.1 Temps p.i.

Il était d'abord important de connaître à quel moment suite à l'infection les rates devaient être prélevées pour la mise en culture des splénocytes. La prolifération des splénocytes 2, 3 et 7 jours p.i. sous la stimulation par un lysat de cellules DBT, un lysat

de cellules DBT infectées au MHV, par un anticorps liant le CD3 et sans ajout d'antigène (milieu RPMI seul) a été mesurée (résumé au tableau 4). Une immunosuppression importante a été observée 7 jours p.i. tel qu'en fait foi l'incorporation de thymidine sous stimulation par l'anti-CD3, qui est à ce moment entre 5 et 6 fois inférieure à celle mesurée aux jours 2 et 3 p.i.. Néanmoins, c'est également au jour 7 p.i. que la prolifération la plus importante sous stimulation par l'antigène viral a été notée (plus de 4 fois supérieure à celle obtenue par le lysat de cellules DBT ;  $IS \geq 4,5$ ).

**Tableau 4. Incorporation de thymidine tritiée par des splénocytes de souris sous différentes stimulations à différents temps suite à l'infection par le MHV.\***

| <b>Jour post-infection</b> | <b>Lysat de cellules DBT (cpm)</b> | <b>Lysat de cellules DBT infectées par le MHV (cpm)</b> | <b>Anti-CD3 (cpm)</b> | <b>Sans antigène (cpm)</b> |
|----------------------------|------------------------------------|---|-----------------------|----------------------------|
| <b>2</b>                   | 1 395 ± 298                        | 998 ± 224   | 163 438 ± 9 918       | 1 372 ± 188                |
| <b>3</b>                   | 470 ± 580                          | 584 ± 213   | 149 228 ± 22 642      | 599 ± 306                  |
| <b>7</b>                   | 1 412 ± 557                        | 6311 ± 1025   | 30 116 ± 13 077       | 1505 ± 281                 |

\* Les valeurs représentent la moyenne de l'incorporation de thymidine mesurée sous stimulation par le lysat de cellules DBT (n=24 puits), par le lysat de cellules DBT infectées par le MHV (n=48 puits), par l'anti-CD3 (n=4 puits) et en l'absence de stimulation (n=4 puits).

### 3.2.2.2 Concentration de l'antigène viral

La prolifération de splénocytes spécifiques au MHV 7 jours après l'infection a ensuite été mesurée en présence de différentes concentrations d'un lysat de cellules DBT infectées par le MHV ayant un titre de  $2 \times 10^7$  ufp/mL. La prolifération mesurée dans un puits a été considérée spécifique au virus lorsqu'elle était au moins 2 fois supérieure à celle mesurée dans les puits contenant un lysat de cellules DBT ( $IS \geq 2$ ). À la lumière des résultats obtenus (résumés au tableau 5), il s'est avéré qu'une dilution 1/400 (v/v) de ce

lysate était optimale puisqu'elle permettait la détection d'une proportion importante de puits contenant des lymphocytes T spécifiques au virus chez les souris infectées, et ce en l'absence de réponse non-spécifique par les cellules de souris témoins.

**Tableau 5. Dilutions d'antigène viral présentées pour stimuler la prolifération spécifique de splénocytes en réponse au MHV suite à l'infection de souris par ce virus.\***

| <b>Dilution du lysat de cellules DBT infectées par le MHV (v/v)</b> | <b>Souris témoins (% puits positifs)</b> | <b>Souris MHV (% puits positifs)</b> |
|---|--|--------------------------------------|
| <b>1/100</b>  | 4,2                                      | 56,2                                 |
| <b>1/200</b>  | 2,1                                      | 16,7                                 |
| <b>1/400</b>  | 0,0                                      | 52,1                                 |
| <b>1/800</b>  | 0,0                                      | 12,5                                 |
| <b>1/1000</b>   | 0,0                                      | 33,3                                 |
| <b>1/2000</b>   | 0,0                                      | 0,0                                  |

\* La moyenne de l'incorporation de thymidine tritiée mesurée sous stimulation par un lysat de cellules DBT (n=12 puits) a été utilisée pour calculer le pourcentage de puits positifs parmi les 48 puits sous stimulation avec l'antigène viral. Les splénocytes de souris témoins (n=7) et infectées par le MHV (n=9) ont été combinés en 2 groupes afin de permettre la comparaison de la prolifération dans les diverses conditions étudiées.

### 3.2.2.3 Concentration de la PBM

Enfin, la concentration de PBM à incuber avec les splénocytes de souris préparés à 7 jours p.i. a été optimisée en testant des concentrations croissantes (5 à 50 µg/mL). La prolifération sous la stimulation par l'antigène viral a été utilisée en tant que témoin positif démontrant la détection d'une réponse immunitaire cellulaire à l'infection. Une prolifération a été considérée comme spécifique lorsque l'IS était deux fois ou plus supérieur par rapport à la prolifération observée sans antigène (milieu RPMI seul). La plus grande proportion de puits répondant à la stimulation par cet antigène a été obtenue

lorsque 10  $\mu\text{g/mL}$  de PBM a été ajoutée (voir le tableau 6). À cette concentration, les cellules d'aucun puits n'ont proliféré spécifiquement à la PBM chez les souris témoins.

**Tableau 6. Concentrations de PBM présentées pour stimuler la prolifération spécifique de splénocytes en réponse à cet antigène suite à l'infection de souris par le MHV.\***

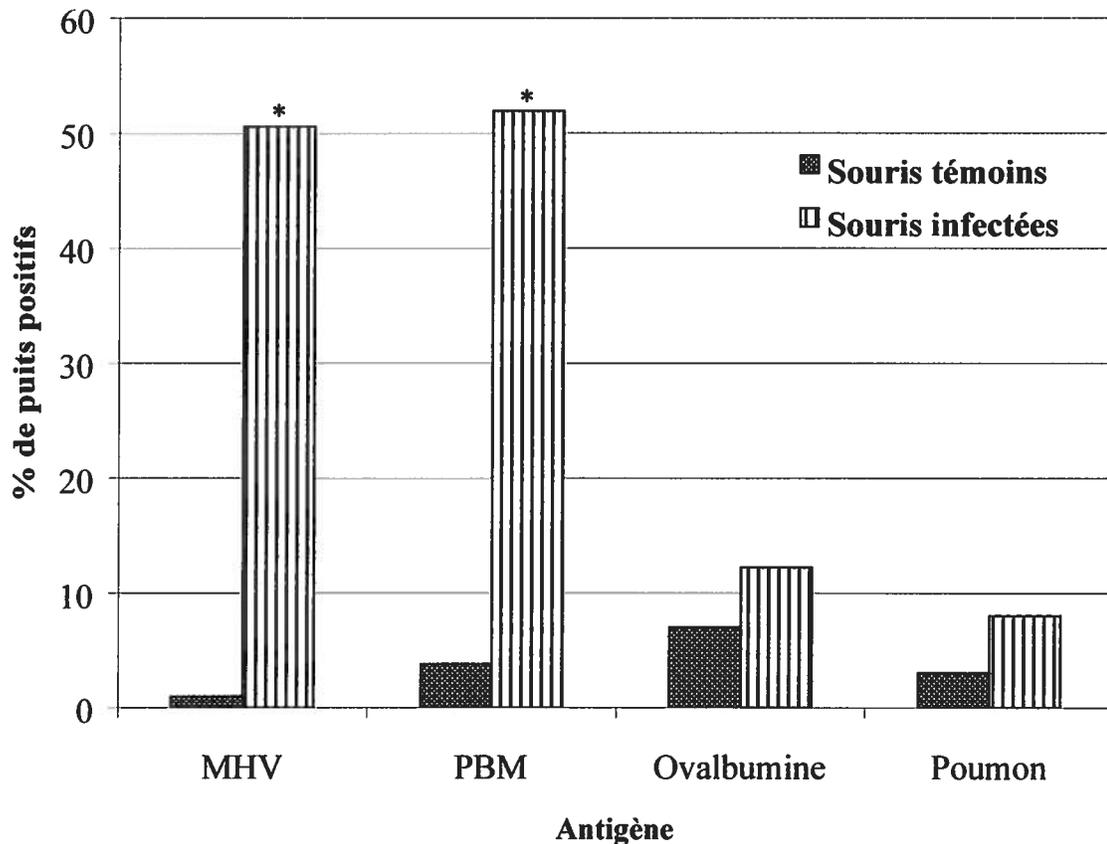
| Antigène                | Souris témoin<br>(% puits positifs) | Souris MHV<br>(% puits positifs) |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| MHV 1/400 (v/v)         | 0                                   | 50,0                             |
| PBM 5 $\mu\text{g/mL}$  | 12,5                                | 4,2                              |
| PBM 10 $\mu\text{g/mL}$ | 0                                   | 61,1                             |
| PBM 25 $\mu\text{g/mL}$ | 0                                   | 23,6                             |
| PBM 50 $\mu\text{g/mL}$ | 0                                   | 8,3                              |

\* La moyenne de l'incorporation de thymidine tritiée mesurée en l'absence d'antigène (milieu de culture seul ; n= 16 puits) a été utilisée pour calculer le pourcentage de puits positifs parmi les 72 puits sous stimulation avec la PBM ou l'antigène viral. Les splénocytes de souris témoins (n=5) et infectées par le MHV (n=6) ont été combinés en 2 groupes afin de permettre la comparaison de la prolifération dans les diverses conditions étudiées.

### 3.2.3 Prolifération spécifique au MHV et à la PBM

Les tests d'incorporation de thymidine ont donc été réalisés directement *ex vivo*, 7 jours p.i., avec une dilution d'un lysat de cellules DBT infectées par le MHV de 1/400 (v/v) et une concentration de PBM de 10  $\mu\text{g/mL}$  (soit selon l'ensemble des conditions optimisées à partir des résultats décrits à la section 3.2.2). La prolifération a également été mesurée suite à la présentation d'ovalbumine et d'antigènes de souris (fait d'un homogénat de poumons) afin de déterminer la spécificité de la réponse observée à l'antigène viral et à la myéline. Une activation spécifique en réponse au virus ainsi qu'à la PBM a été mesurée dans plus de la moitié des puits contenant des splénocytes de souris infectées (figure 10). Cette activation est significative ( $p < 0,0001$ ) par rapport aux souris témoins. De plus, aucune activation significative n'a été détectée sous la stimulation

antigénique par l'homogénat de poumon non plus que par l'ovalbumine. Cependant, aucun lien n'a pu être établi entre la présence d'une réponse au MHV et à la PBM par les cellules provenant d'une même souris. Ainsi, une réponse proliférative des splénocytes d'une souris au MHV n'implique pas la présence d'une réponse à la PBM, pas plus que l'absence d'une réponse au MHV n'entraîne l'absence d'une réponse à la PBM.



**Figure 10. Activation de lymphocytes T spécifiques au virus et à la PBM chez les souris infectées par le MHV.** La prolifération de splénocytes récoltés 7 jours p.i. a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée suite à la présentation des différents antigènes tel que décrit à la section 2.10. Pour être positif, l'IS devait être au moins égal à 2 par rapport à l'antigène approprié. La prolifération sous stimulation par le MHV et la PBM a été mesurée chez 30 souris (4 expériences distinctes), celle en présence d'ovalbumine pour 10 souris (2 expériences distinctes) et celle en présence de l'homogénat de poumon de souris chez 5 souris (1 expérience). La différence de la prolifération mesurée sous stimulation par le MHV et la PBM entre les splénocytes de souris témoins et infectées est significative ( $p < 0,0001$ ), alors que celle sous stimulation par l'ovalbumine ( $p = 0,27$ ) et par l'homogénat de poumons ( $p = 0,32$ ) ne le sont pas.

### 3.2.4 Réactions croisées de lymphocytes T reconnaissant la PBM et le MHV

La présence de réactivité croisée au sein de lignées lymphocytaires issues de splénocytes de souris récoltés à 21 jours p.i. par le MHV a été étudiée. À cette fin, les cellules ont été stimulées à des intervalles d'environ 3 jours par l'ajout d'IL-2 et à des intervalles de 14 jours par la présentation de PBM et d'antigènes viraux. La prolifération spécifique des lignées à ces deux antigènes a été évaluée aux 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> stimulations, soit après 6 et 8 semaines en culture. Seul un très faible nombre de lignées spécifiques (IS  $\geq$  2) à l'un et/ou l'autre des antigènes étudié a pu être établi chez les souris infectées par le MHV par rapport aux souris témoins (voir le tableau 7).

**Tableau 7. Lignées spécifiques au MHV ou/et à la PBM issues de splénocytes de souris C57BL/6 infectées i.c. par le MHV.**

| Antigène   | 3 <sup>e</sup> stimulation | 4 <sup>e</sup> stimulation |
|------------|----------------------------|----------------------------|
| MHV        | 2/200                      | 2/200                      |
| PBM        | 0                          | 0                          |
| MHV et PBM | 1/200                      | 0                          |

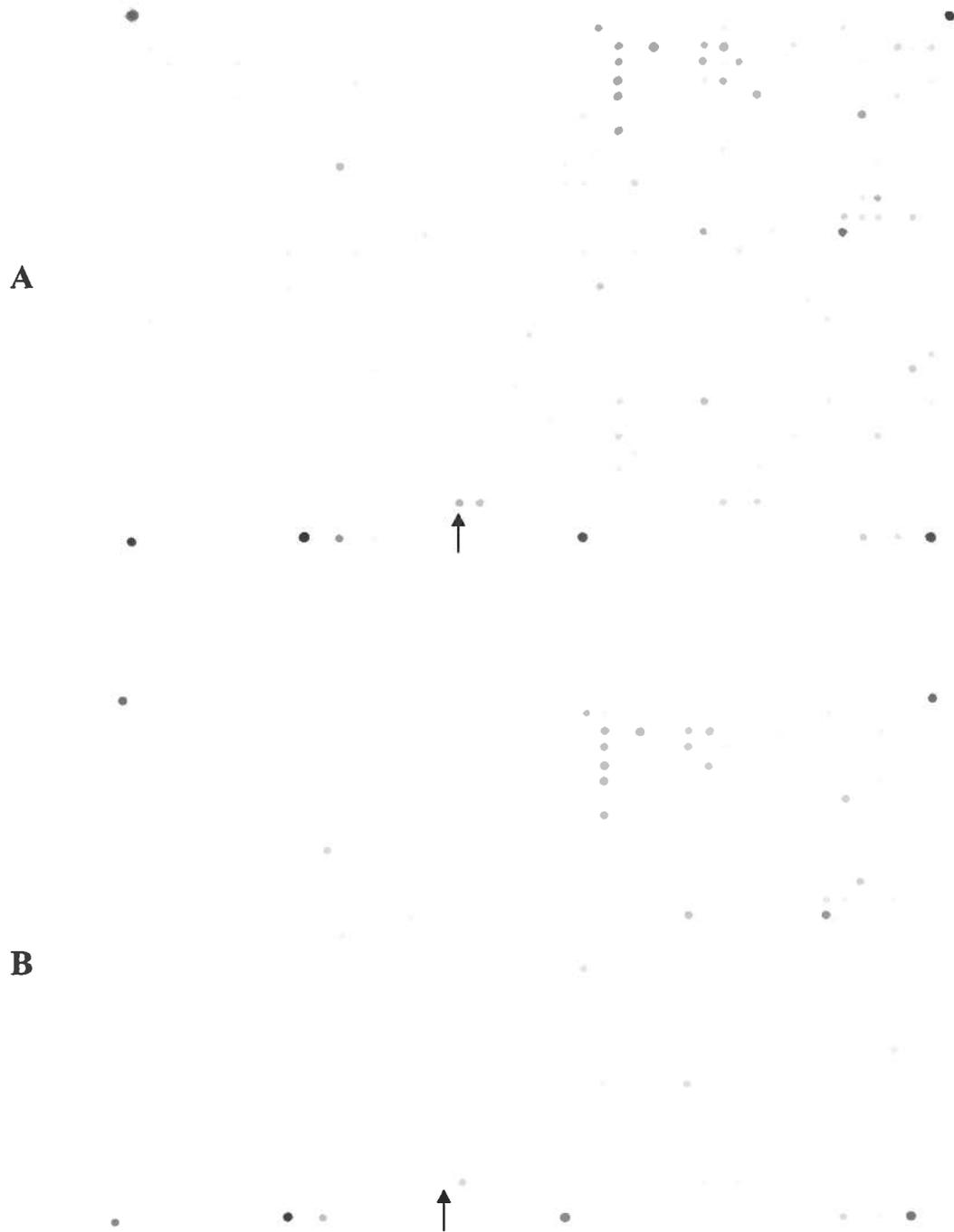
## 3.3 Modulation de l'expression génique au cerveau suite à l'infection par le MHV

### 3.3.1 Matrices d'ADNc

L'expression de 1176 gènes dans le cerveau de souris infectées par le MHV a été comparée à celle de souris témoins à 1, 2, 4 et 7 jours p.i. Ceci a été fait grâce à des matrices d'ADNc (voir un exemple des membranes à la figure 11). Nos résultats ont démontré une différence significative (variation du niveau d'expression supérieure ou égale à 7, doublée d'un niveau d'expression minimum de 5000 unités arbitraires) entre les souris infectées et témoin (n=3 pour chaque condition testée) pour 41 des gènes étudiés (tableau 7).

### 3.3.2 Confirmation des changements par RT-PCR

Les résultats de modulations significatives d'expression d'ARNm obtenus avec les matrices d'ADNc ont été validés de façon non-exhaustive par RT-PCR. Plusieurs changements observés avec les matrices d'ADNc ont été corroborés par RT-PCR relatifs à l'aide du même ARN que celui utilisé pour réaliser cette première expérience. Toutefois, à la différence des matrices d'ADNc, l'ARN de chacune des souris a été testé de façon individuelle et non pas en combinant l'ARN de plusieurs souris. Par exemple, l'augmentation de l'expression du gène *Ii* (*Ia-associated invariant chain*) au jour 7 p.i. chez les souris infectées par rapport au témoin a pu être vérifiée et est statistiquement significative (voir la figure 12). De plus, l'augmentation significative de l'expression du gène *CD3 $\gamma$*  au cerveau 7 jours suivant l'infection par le MHV a été observée par RT-PCR (voir la figure 13). De surcroît, l'augmentation du gène de la *galectine-3* a été observée par RT-PCR, tout comme elle avait été indiquée par les matrices d'ADNc (montré à la figure 14). L'augmentation de l'expression est observée dans les 3 cerveaux infectés testés, mais la variation du niveau d'expression mesuré entre les souris infectées est élevée, ce qui rend ce changement non-significatif statistiquement lorsqu'analysé par un test T de Student comparant l'expression du gène de la *galectine-3* chez les souris témoins et infectées. Finalement, une augmentation significative de l'expression du gène de la chimiokine *CXCL10* (*IP-10*) a été confirmée aux jours 1, 2, 4 et 7 suite à l'infection par le MHV (illustré à la figure 15). L'expression du gène de la *GAPDH*, connue pour sa stabilité, a été étudiée sur chacun des cerveaux testés (voir la figure 16) et utilisée pour l'étude semi-quantitative des gènes décrits précédemment.



**Figure 11. Matrices d'ADNC hybridées avec une sonde produite à partir de l'ARN du cerveau de souris témoins et infectées.** Les membranes (exemples illustrés ici) ont été hybridées avec une sonde synthétisée à partir d'un mélange obtenu en combinant l'ARN extrait du cerveau de 3 souris différentes à 4 jours p.i.. A : souris témoins, B : souris infectées par le MHV. La flèche pointe le signal obtenu suite à la liaison de la sonde au gène de l'hormone de croissance (*growth hormone* ; GH).

**Tableau 8. Variations d'expression significatives observées entre des gènes au cerveau de souris infectées par le MHV et de souris témoin.**

| Nom du gène  | Jour post-infection    |                |          |                      |
|--|------------------------|----------------|----------|----------------------|
|  | 1                      | 2              | 4        | 7                    |
| <i>heat shock protein, 84 kDa 1</i>                                | 20214.2 ↓ <sup>a</sup> | 1.3 ↓          | 1.6 ↓    | 11167 ↑ <sup>b</sup> |
| <i>FK506 binding protein 6 (65 kDa)</i>                            | 6951.0 ↓               | - <sup>c</sup> | -        | -                    |
| <i>growth hormone</i>  | 7.1 ↓                  | 2.6 ↓          | 116.5 ↓  | 9.3 ↓                |
| <i>prolactin</i>   | 6.1 ↓                  | 2.5 ↓          | 7.0 ↓    | -                    |
| <i>CXCL10</i>  | 65.2 ↑                 | 10658.4 ↑      | -        | 108133.5 ↑           |
| <i>complement component 1, q subcomponent binding protein</i>      | 2.2 ↓                  | 6668.1 ↓       | 1.2 ↓    | -                    |
| <i>chaperonin subunit 6b (zeta)</i>                                | -                      | 6137.7 ↓       | -        | -                    |
| <i>alcohol dehydrogenase family 3, subfamily A2</i>                | -                      | 5207.7 ↓       | -        | -                    |
| <i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1</i>         | -                      | 5099.0 ↓       | -        | -                    |
| <i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i> | -                      | 20.6 ↑         | 6.5 ↑    | 16.5 ↑               |
| <i>Ia-associated invariant chain (Ii)</i>                          | 1.2 ↑                  | 20.6 ↑         | 4.1 ↑    | 123.6 ↑              |
| <i>adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1</i>       | 1.1 ↓                  | 1.3 ↓          | 5680.7 ↓ | -                    |
| <i>phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta</i>             | -                      | -              | 25.1 ↓   | -                    |
| <i>adaptor protein complex AP-1, sigma 1</i>                       | -                      | 1.5 ↑          | 16.7 ↓   | -                    |
| <i>ribosomal protein S5</i>  | 1.9 ↓                  | 1.1 ↓          | 10.2 ↓   | 1.8 ↑                |
| <i>tubulin cofactor a</i>  | -                      | -              | 10.0 ↓   | -                    |
| <i>prosaposin</i>  | 1.2 ↓                  | 1.8 ↑          | 8.4 ↓    | 1.8 ↑                |
| <i>complement component 1, q subcomponent α polypeptide</i>        | 1.2 ↑                  | 1.7 ↑          | 1.2 ↓    | 7.0 ↑                |
| <i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>              | -                      | -              | -        | 7.3 ↑                |
| <i>CD68 antigen</i>  | -                      | -              | 1.1 ↑    | 7.7 ↑                |
| <i>cathepsin S</i>   | -                      | -              | -        | 7.8 ↑                |
| <i>CD8 antigen, alpha chain (CD8α)</i>                             | -                      | -              | -        | 8.6 ↑                |
| <i>lymphocyte antigen 86</i>                                       | 2.1 ↑                  | 1.8 ↑          | 2.1 ↑    | 8.8 ↑                |

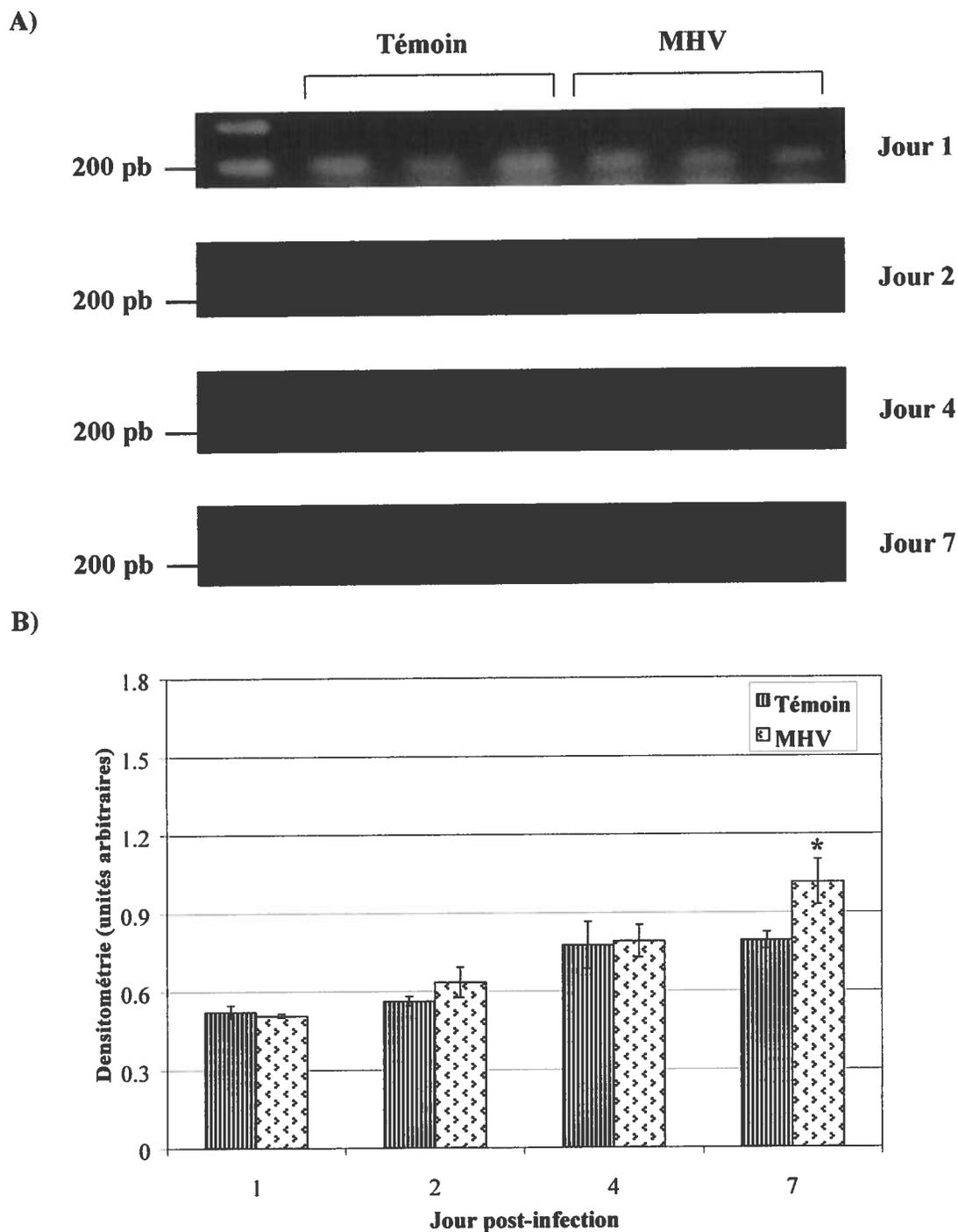
|   |       |       |       |                 |
|---|-------|-------|-------|-----------------|
| <i>galectin-3</i>   | -     | -     | -     | <b>12.8</b> ↑   |
| <i>interferon regulatory factor 1</i>                                     | -     | -     | -     | <b>13.6</b> ↑   |
| <i>lipocalin 2</i>  | -     | -     | -     | <b>15.3</b> ↑   |
| <i>high mobility group protein 1</i>                                      | 3.7 ↑ | 1.1 ↑ | 1     | <b>17.0</b> ↑   |
| <i>integrin beta 2 (CD18)</i>   | -     | -     | -     | <b>19.3</b> ↑   |
| <i>serine protease inhibitor 2-2</i>                                      | -     | -     | -     | <b>19.7</b> ↑   |
| <i>Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide</i>               | -     | -     | -     | <b>19.9</b> ↑   |
| <i>cystatin F (leukocystatin)</i>   | -     | -     | -     | <b>25.4</b> ↑   |
| <i>high mobility group protein 2</i>                                      | -     | -     | -     | <b>29.5</b> ↑   |
| <i>interferon gamma inducible protein, 47 kDa</i>                         | -     | -     | -     | <b>30.7</b> ↑   |
| <i>small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 9 (CXCL9)</i> | -     | -     | -     | <b>135.5</b> ↑  |
| <i>malate dehydrogenase, mitochondrial</i>                                | 1.2 ↓ | 1.9 ↑ | 2.3 ↓ | <b>415.0</b> ↑  |
| <i>CD3 antigen, gamma polypeptide</i>                                     | -     | -     | -     | <b>5095</b> ↑   |
| <i>Fc receptor, IgG, high affinity I</i>                                  | -     | -     | -     | <b>5187.0</b> ↑ |
| <i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1</i>                    | 1.8 ↑ | 1.8 ↑ | -     | <b>5446.9</b> ↑ |
| <i>interferon activated gene 204</i>                                      | -     | -     | -     | <b>5714.1</b> ↑ |
| <i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 2</i>             | -     | -     | -     | <b>8166.1</b> ↑ |
| <i>adaptor-related protein complex AP-3, sigma 1 subunit</i>              | 1.2 ↓ | 1.2 ↓ | 1.2 ↓ | <b>9095.1</b> ↑ |

(a) ↓ : facteur de diminution de l'expression par rapport aux souris témoins

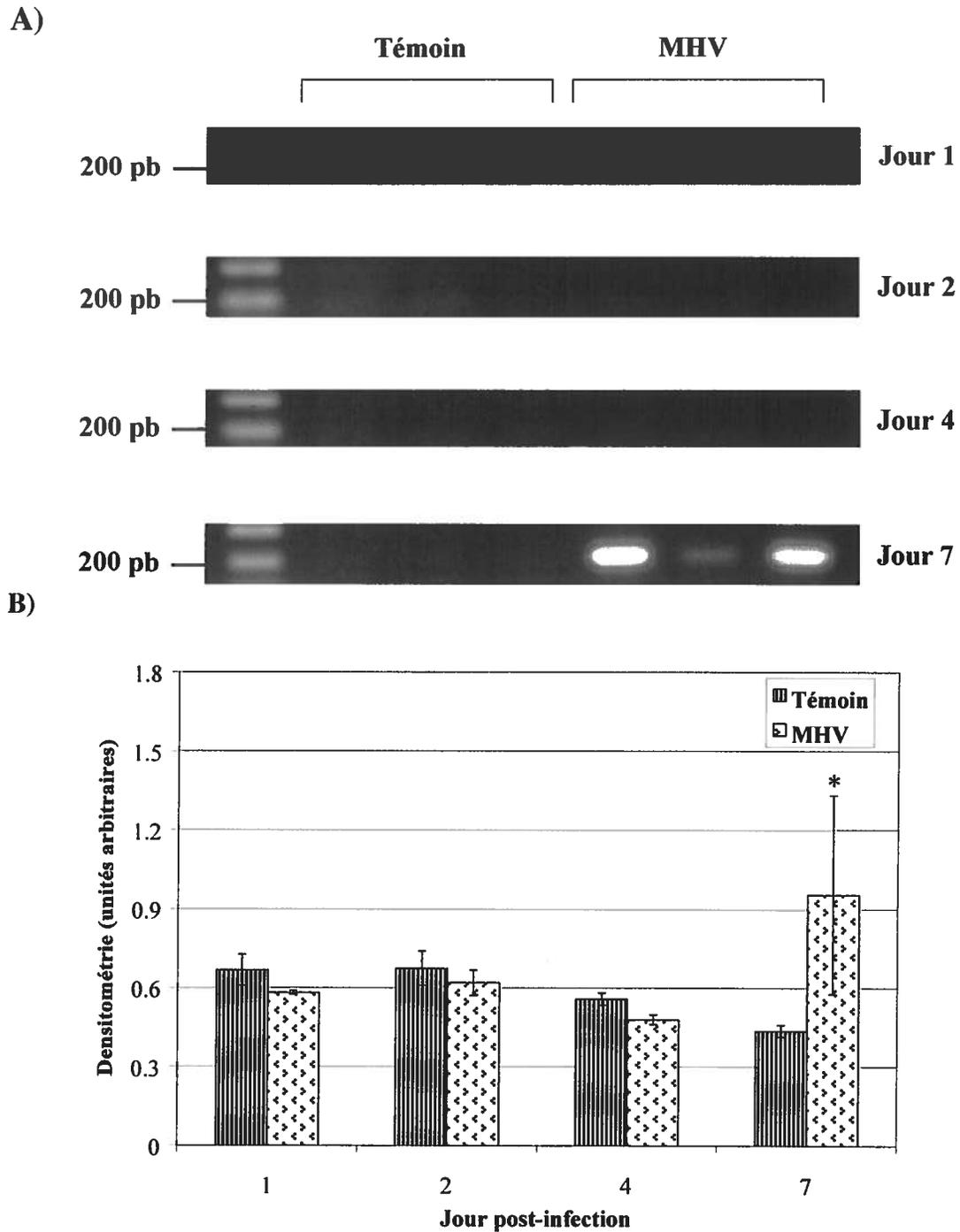
(b) ↑ : facteur d'augmentation de l'expression par rapport aux souris témoins

(c) - : niveau d'expression inférieur à 5000 unités arbitraires

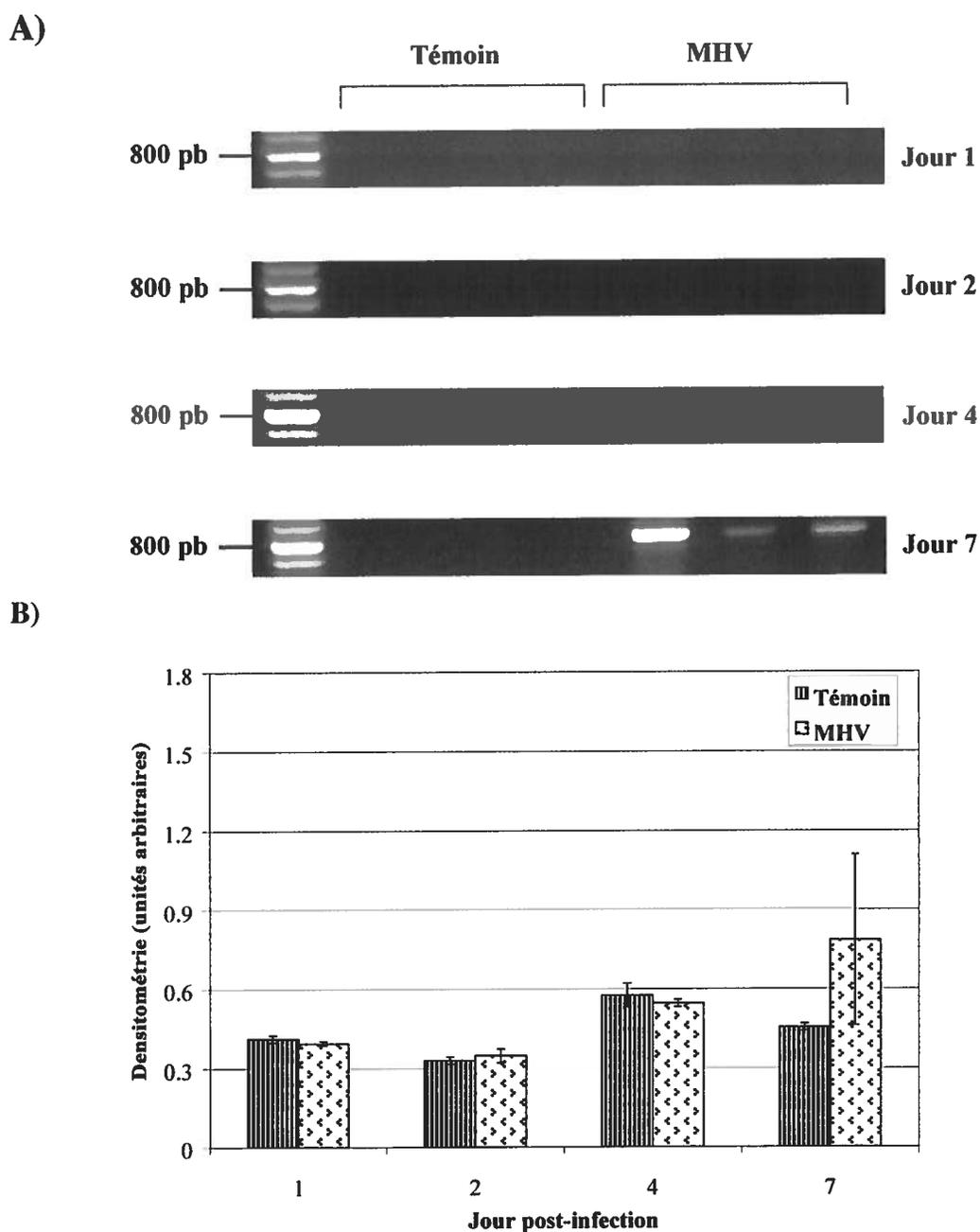
Les valeurs en caractères gras indiquent qu'il s'agit de variations significatives (variation du niveau d'expression supérieure ou égale à 7, niveau d'expression minimum de 5000 unités arbitraires).



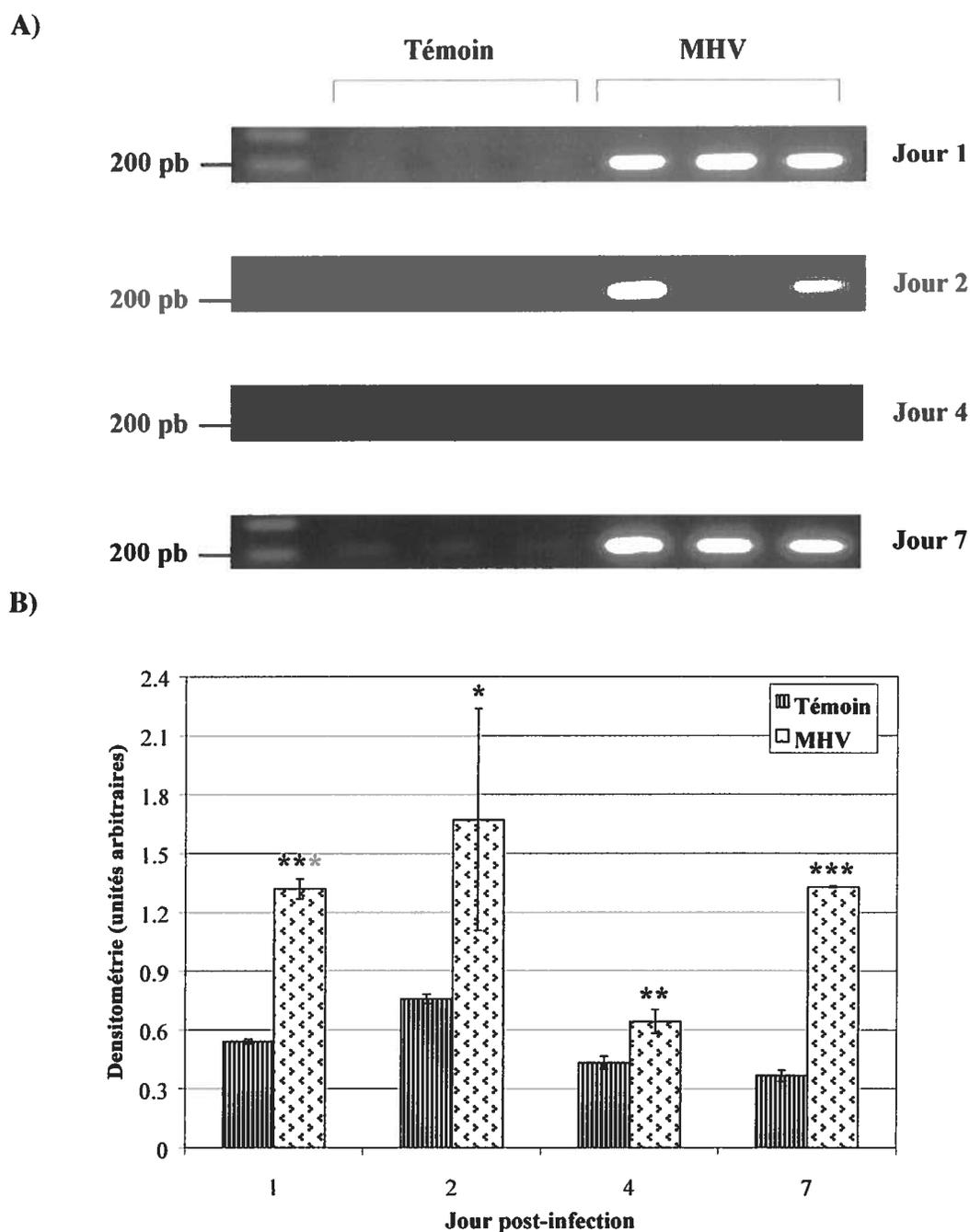
**Figure 12. Expression du gène *li* au cerveau des souris témoins et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 jours p.i.** A) RT-PCR réalisés à partir de l'ARN de cerveau de 3 souris infectées et témoins pour chacun des temps p.i. étudiés. Trente-cinq cycles de PCR à une température d'appariement de 55°C ont été réalisés (détails à la section 2.15). B) Analyse semi-quantitative relative à l'expression du gène *GAPDH* de l'intensité des amplicons effectuée par densitométrie. Chaque colonne représente la valeur moyenne de 3 souris, avec son écart-type correspondant. \* :  $p < 0,01$



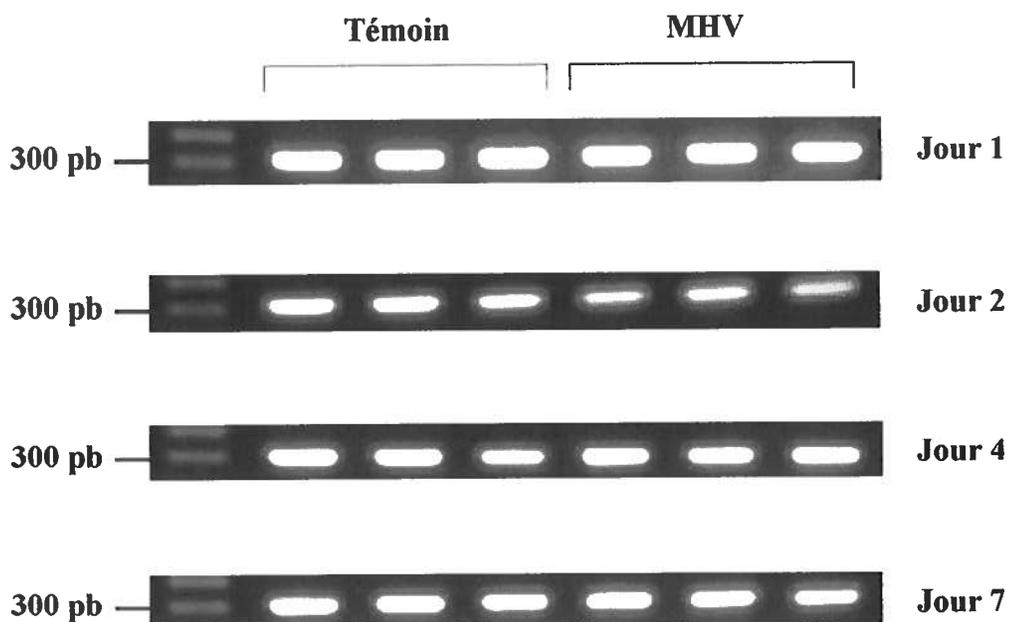
**Figure 13.** Expression du gène *CD3 $\gamma$*  au cerveau des témoins et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 jours p.i. A) RT-PCR réalisés à partir de l'ARN de cerveau de 3 souris infectées et témoins pour chacun des temps p.i. étudiés. Trente cycles de PCR à une température d'appariement de 55°C ont été réalisés (détails à la section 2.15). B) Analyse semi-quantitative relative à l'expression du gène *GAPDH* de l'intensité des amplicons effectuée par densitométrie. Chaque colonne représente la valeur moyenne de 3 souris, avec son écart-type correspondant. \* :  $p < 0,05$



**Figure 14. Expression du gène *galectine-3* au cerveau des souris témoins et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 jours p.i.. A) RT-PCR réalisé à partir de l'ARN de cerveau de 3 souris infectées et témoins pour chacun des temps p.i. étudiés. Quarante cycles de PCR à une température d'appariement de 52°C ont été réalisés (détails à la section 2.15). B) Analyse semi-quantitative relative à l'expression du gène *GAPDH* de l'intensité des amplicons effectuée par densitométrie. Chaque colonne représente la valeur moyenne de 3 souris, avec son écart-type correspondant. Jour 1 p.i. :  $p = 0,07$ , jour 2 p.i. :  $p = 0,18$ , jour 4 p.i. :  $p = 0,15$ , jour 7 p.i. :  $p = 0,08$**



**Figure 15.** Expression du gène *CXCL10* au cerveau des souris témoins et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 jours p.i.. A) RT-PCR réalisés à partir de l'ARN de cerveau de 3 souris infectées et témoins pour chacun des temps p.i. étudiés. Trente-cinq cycles de PCR à une température d'appariement de 55°C ont été réalisés (détails à la section 2.15). B) Analyse semi-quantitative relative à l'expression du gène *GAPDH* de l'intensité des amplicons effectuée par densitométrie. Chaque colonne représente la valeur moyenne de 3 souris, avec son écart-type correspondant. \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,0001$



**Figure 16. Expression du gène de la *GAPDH* au cerveau des souris témoin et infectées par le MHV aux jours 1, 2, 4 et 7 p.i.** RT-PCR réalisés à partir de l'ARN de cerveau de 3 souris infectées et témoins pour chacun des temps p.i. étudiés. Vingt-cinq cycles de PCR à une température d'appariement de 55°C ont été réalisés (détails à la section 2.15).

## 4.0 Discussion

L'infection par le MHV est un excellent modèle animal de la SEP (Lane et Buchmeier, 1997), une maladie neurologique apparemment auto-immunitaire. L'étiologie exacte de cette pathologie demeure inconnue, bien que diverses études suggèrent l'implication de facteurs environnementaux tels les virus (voir la section 1.2.3.2 pour de plus amples informations). Différentes hypothèses ont été proposées afin d'expliquer comment les infections virales peuvent être liées aux maladies auto-immunitaires : les effets non-spécifiques reliés à l'inflammation, la propagation de déterminants, le mimétisme moléculaire et les superantigènes (décrits respectivement aux sections 1.1.1 à 1.1.4).

Afin de démontrer que l'infection par le MHV chez la souris entraînait l'activation d'une population de lymphocytes T auto-réactifs spécifiques à la myéline, des souris C57BL/6 ont été infectées i.c. avec 100 ufp de MHV-A59, une dose inférieure à la dose létale 50 (établie dans notre laboratoire à 6000 ufp par souris). Dans le but de mieux caractériser le modèle dans les conditions étudiées, les effets de l'infection quant à la cinétique de répllication virale et à la réponse humorale ont dans un premier temps été étudiés. Puis, la présence de réponse auto-immunitaire dirigée contre la PBM a été démontrée à un moment où le virus infectieux n'était plus détecté ni au foie ni au cerveau. Finalement, des efforts ont été faits dans le but d'obtenir des informations quant au(x) mécanisme(s) pouvant être responsables de l'activation de cellules spécifiques à un antigène du SNC.

### 4.1 Caractérisation des effets de l'infection

Dans un premier temps, la caractérisation des effets de l'infection par le coronavirus murin a été réalisée. L'infection des souris C57BL/6 par le MHV a été faite par voie i.c.. Cette souche de souris est susceptible à l'infection par le coronavirus murin (Knobler *et al.*, 1981) et développe une démyélinisation suite à l'infection (Lavi *et al.*, 1984). Le MHV est un virus neuroinvasif, qui a la capacité de se rendre au cerveau via le nerf olfactif (Barthold, 1988 ; Lavi *et al.*, 1988 ; Perlman *et al.*, 1989 ; Barnett et

Perlman, 1993). L'injection i.c. permet donc d'introduire une dose de virus de façon plus directe et précise à un site où il peut se rendre suite à une infection naturelle. Néanmoins, un tel mode d'injection peut endommager la BHE et modifier les conséquences de l'infection (Perlman, 1998). Les souches JHM et A59 du MHV sont toutes les deux neuroinvasives et démyélinisantes (Pappenheimer, 1958 ; Lampert *et al.*, 1973 ; Herndon *et al.*, 1975 ; Lavi *et al.*, 1986). Ces souches sont les plus utilisées dans les études portant sur l'infection du SNC par le MHV (Wege, 1995). La souche A59 a été choisie dans cette étude parce qu'elle cause de la démyélinisation (Lavi *et al.*, 1984) tout en étant moins neurovirulente que la souche JHM (Robb *et al.*, 1979). La survie des souris a été favorisée par l'usage de cette souche de MHV et par la faible dose injectée (60 fois inférieure à la dose létale 50 préalablement déterminée au laboratoire).

À la dose utilisée (100 ufp), le virus s'est répliqué au site d'inoculation et s'est avéré détectable dès le premier jour suivant l'infection (figure 7). Le maximum de la charge virale au cerveau a été atteint 1 jour plus tard, pour commencer à diminuer à partir de ce pic. Le virus infectieux a été graduellement éliminé du cerveau jusqu'à devenir indétectable au jour 7 p.i.. Par ailleurs, l'infection i.c. a entraîné le passage du virus en périphérie puisqu'il s'est répliqué au foie, atteignant une charge maximale 4 jours p.i. et devenant indétectable 7 jours p.i.. La cinétique d'infection par la souche MHV-A59 de souris C57BL/6 injectée i.c. avec 100 ufp n'est pas disponible dans la littérature. Toutefois, une étude a été réalisée avec des souris C57BL/6 infectées par 1200 et 3000 pfu de MHV-A59 (Lavi *et al.*, 1984). Le virus infectieux présent suite à l'injection i.c. de 3000 ufp y a été dosé par un test de plages de lyse à partir d'échantillons de cerveau, de moelle épinière, de foie et de sang. Le titre viral maximal au cerveau était atteint entre les jours 3 et 11 p.i. et du virus infectieux y était trouvé jusqu'à 25 jours p.i. (Lavi *et al.*, 1984). Le maximum de réplication virale s'apparente donc fortement à nos résultats, alors que la dose de virus supérieure par un facteur 30 pourrait être responsable de la plus lente élimination du virus au cerveau par rapport à celle que nous avons observée. Par ailleurs, le virus inoculé au SNC s'est répandu en périphérie comme l'indique la détection de virus infectieux dans le sang 2-3 jours p.i. et au foie 5 jours p.i (Lavi *et al.*, 1984). Ceci va également dans le même sens que nos résultats, qui démontrent la présence de virus au

foie à 4 et 5 jours p.i.. Le virus infectieux n'était plus détectable au foie à 7 jours p.i. selon notre étude (figure 7) et 8 jours p.i. selon l'étude de l'équipe de Lavi (1984) jours p.i.. Les résultats obtenus suite à l'infection de souris par 3000 ufp de MHV-A59 par l'équipe de Lavi sont donc assez semblables aux nôtres en terme de jours où sont atteints les titres maximaux et où le virus est éliminé, bien que les titres que nous avons mesurés suite à l'infection par 100 ufp de MHV-A59 soient inférieurs. Cependant, la même étude réalisée par le groupe de Lavi indique que l'injection d'une dose plus faible de virus (1200 ufp, soit plus de 10 fois la dose que nous avons injectée) entraîne une infection du SNC mais non du foie (Lavi *et al.*, 1984). Il est possible que la souche de MHV-A59 et celle utilisée dans le cadre du présent projet aient divergé au fil des passages. La fréquence de recombinaison chez le MHV estimée à près de 25% (Baric *et al.*, 1990) couplée au taux élevé d'erreurs faites par l'ARN polymérase virale (Steinhauer et Holland, 1986) peuvent expliquer un tel phénomène. Le séquençage et la comparaison des deux souches virales permettrait de vérifier cette hypothèse.

L'étude de la réponse humorale par ELISA a démontré que, dans les conditions étudiées, des anticorps ont commencé à être produits chez certaines souris dès le jour 4 p.i. et étaient présents en quantité significative dès le jour 7 chez toutes les souris testées. Ces résultats vont donc dans le même sens que ceux obtenus par l'équipe de Lavi (1984) dans l'étude décrite précédemment, dans laquelle la présence d'anticorps dans le sérum a été détectée par immunofluorescence dès le jour 7 p.i. suite à l'injection de 1200 et 3000 ufp de virus.

## **4.2 Réponse immunitaire dirigée contre un antigène viral et un antigène du soi**

Suite à la caractérisation du modèle animal dans la présente étude au niveau de la production et de l'élimination du virus ainsi que de la réponse immunitaire humorale, l'activation de lymphocytes T dirigés contre un antigène de SNC a été étudiée. Une protéine de la myéline, la PBM, a été purifiée d'un cerveau bovin afin d'être présentée à des cellules T de souris infectées. Le cerveau bovin a été choisi comme source de la protéine car il est facilement disponible et que sa masse permet l'extraction d'une

quantité de PBM supérieure à celle obtenue d'un cerveau de rongeur. La qualité de cette protéine a du être vérifiée avant que le temps suite à l'infection étudié ainsi que les concentrations d'antigènes présentées ne soient optimisés. Puis, la présence de réponses prolifératives spécifiques au virus et à la PBM ont été vérifiées. Finalement, une tentative a été effectuée dans le but de déterminer le rôle joué par le mimétisme moléculaire dans l'activation de cellules auto-réactives suite à l'infection par le MHV.

#### **4.2.1 Production de PBM**

D'abord, la préparation de la PBM fut nécessaire à la réalisation des tests visant l'étude de la réponse immunitaire spécifique à cette protéine de la myéline. La PBM est une protéine représentant 25-30% des protéines totales de la myéline au SNC (Deber et Reynolds, 1991). Cette protéine est très conservée entre les différentes espèces (Martenson, 1983). La PBM bovine, dont les expériences décrites ont fait usage, est semblable à son homologue murine avec laquelle elle présente une identité de plus de 79% (alignement des séquences à l'aide de SIM, utilisant un algorithme décrit par Huang et Miller, 1991). Ainsi, des clones de cellules T spécifiques à la PBM ayant été établis à partir de lignées dérivées de souris prolifèrent lorsque stimulés par la PBM bovine (Sakai *et al.*, 1986). D'autre part, la PBM existe sous différentes formes, produites par épissage alternatif de l'ARNm (Fritz et McFarlin, 1989). Chez les bovins, l'isoforme de 18,5 kDa est le plus abondant, mais un isoforme de 21,5 kDa et un de 17,2 kDa sont aussi immunodéTECTÉS (Kerlero De Rosbo *et al.*, 1984). L'analyse par immunobuvardage de type Western (présentée à la figure 9) témoigne de la qualité de la préparation protéique et de la possibilité de stériliser la solution par filtration tout en conservant la protéine. De plus, la taille des formes observées (18,5 kDa, 21,5 kDa et 17,2 kDa) correspond à celle des isoformes connues chez cette espèce.

#### **4.2.2 Optimisation des tests de prolifération**

Il a été déterminé que c'est en récoltant les splénocytes 7 jours après l'infection que les chances de détecter une réponse cellulaire spécifique au virus étaient maximisées (indiqué au tableau 4). Toutefois, la prolifération des splénocytes stimulés par un anticorps liant le CD3, et activant de ce fait les cellules T, était diminuée de façon

importante à ce moment. Cette immunosuppression suite à l'infection par le MHV a d'ailleurs été rapportée par différentes équipes de recherche (Smith *et al.*, 1987 ; Cook-Mills *et al.*, 1992 ; Cray *et al.*, 1993). Il a aussi déjà été démontré que cette immunosuppression n'empêchait pas la réponse spécifique à l'antigène (De Souza *et al.*, 1991), tout comme nous l'avons observé.

#### **4.2.3 Prolifération spécifique induite par le MHV et la PBM**

La cause exacte des maladies auto-immunitaires est toujours inconnue. Une hypothèse soutient qu'une infection virale peut déclencher une réponse immunitaire dirigée contre un antigène du soi (les différents mécanismes pouvant expliquer une telle association sont décrits à la section 1.1.1 à 1.1.4). Il a auparavant été démontré chez la souris que l'infection par le MHV peut mener à une réponse auto-réactive des cellules T (Kyuwa *et al.*, 1991). Dans cette étude de Kyuwa et collaborateurs (1991), des lymphocytes T de souris infectées par le MHV produisent de l'IL-2 en présence de CPA et en l'absence d'antigène viral. L'IL-2 est sécrétée par des cellules T CD4<sup>+</sup> activées après une stimulation antigénique par des CPA (Minami *et al.*, 1993). Ceci suggère une activation des cellules T en présence d'un antigène non-viral, probablement d'un antigène du soi. Par ailleurs, des études chez des rats infectés par le MHV ont démontré la présence de lymphocytes T proliférant sous la stimulation par la PBM (Watanabe *et al.*, 1983). De plus, le transfert des lymphocytes stimulés par cet antigène du SNC à des rats entraîne une pathologie similaire à l'EAE (Watanabe *et al.*, 1983). Toutefois, aucune démonstration d'une réponse spécifique de lymphocytes T dirigée contre un antigène du SNC n'avait jusqu'à ce jour été observée chez la souris. Nos travaux démontrent donc pour la première fois une activation de cellules auto-réactives à un antigène du SNC suite à une infection par le MHV. De plus, cette activation est spécifique, comme le démontre l'absence de prolifération suite à la stimulation par l'ovalbumine ainsi que par des antigènes de souris (homogénat de poumon). Ces résultats obtenus à l'aide d'un modèle animal de SEP appuient donc l'hypothèse reliant les maladies auto-immunitaires aux infections virales.

Une expérimentation semblable avec des lymphocytes provenant des ganglions lymphatiques cervicaux pourrait être réalisée. Les cellules reconnaissant le virus et/ou la myéline pourrait y être plus abondantes puisque une étude réalisée avec des rats infectés i.c par le MHV-JHM suggère que l'expansion des lymphocytes T spécifiques au virus a lieu dans les ganglions lymphatiques cervicaux (Imrich *et al.*, 1994). De plus, il est connu qu'après une infection i.n. de souris par le MHV-JHM environ 30% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infiltrant le SNC sont spécifiques au virus (Haring *et al.*, 2001). Il serait intéressant de voir dans notre modèle si une fraction des lymphocytes au SNC suite à l'infection est spécifique à une protéine du SNC. Par ailleurs, il serait intéressant de confirmer que les lymphocytes T spécifiques à la myéline observés dans la rate sont CD4<sup>+</sup> et non CD8<sup>+</sup>, ce à quoi nous nous attendons en regard du mode de présentation antigénique par les CPA favorisé dans nos conditions expérimentales. De plus, la fréquence des cellules répondant à la stimulation par l'antigène viral et par la PBM dans la rate, les ganglions lymphatiques cervicaux et au SNC pourrait être évaluée. Ceci pourrait notamment être fait par la technique d'ELISPOT (*enzyme-linked immunospot*) (Xue et Perlman, 1997) ou par le marquage du CD4 des cellules et de l'IFN- $\gamma$  produit avec des anticorps conjugués à des fluorochromes suivi d'une analyse en cytométrie (Haring *et al.*, 2001 ; Dufour *et al.*, 2002).

Comme il a été décrit à la section 1.1, plusieurs mécanismes reliant les infections virales et les maladies auto-immunitaires ont été avancés. Mais quel mécanisme est responsable de l'activation des cellules spécifiques à la PBM suite à l'infection par le MHV ? Afin d'évaluer la contribution du mimétisme moléculaire dans le phénomène observé, une expérience visant à établir des lignées en culture primaire de splénocytes stimulés par un antigène viral et du SNC a été réalisée. Il est possible de vérifier la réponse proliférative d'une même lignée en la divisant et en soumettant les fractions à différentes stimulations. La présence de lignées répondant à la fois au virus et à la PBM appuierait l'hypothèse du mimétisme moléculaire tel qu'indiqué chez les patients atteints de SEP (Talbot *et al.*, 1996). Malheureusement, il a été impossible d'obtenir un nombre significatif de lignées proliférant suite à leur stimulation par l'un ou l'autre des antigènes d'intérêt. Ceci a été réalisé au début du projet et depuis les énergies ont été placées dans

l'optimisation des conditions qui serviraient à reprendre cette expérience. Ainsi, pour conclure quant au rôle joué par le mimétisme moléculaire dans l'activation des lymphocytes spécifiques à la PBM, l'expérience aurait intérêt à être répétée en cultivant des cellules prélevées 7 jours p.i. par le MHV dans les conditions optimisées pour les tests de prolifération décrits précédemment. Il serait également intéressant de suivre la viabilité des cellules en culture afin de vérifier qu'elles ne meurent pas par apoptose durant l'expérimentation. D'autre part, l'étude de la spécificité antigénique des lymphocytes au niveau clonal permettrait de recueillir de plus amples informations sur la contribution du mimétisme moléculaire. La reconnaissance par un même RCT d'un antigène viral et d'un antigène du SNC pourrait de cette manière être démontrée. De tels résultats permettraient de conclure que l'infection virale active des lymphocytes T spécifiques au virus qui reconnaîtraient aussi la myéline et entraîneraient sa dégradation.

Un autre mécanisme avancé pour expliquer le lien entre les infections virales et l'auto-immunité est la propagation de déterminants. Pour savoir si ce mécanisme revêt une importance dans l'activation de cellules T auto-réactives suite à l'infection par le MHV, une expérience dans laquelle des lignées seraient soumises à une stimulation par différents peptides de la myéline et d'autres protéines du SNC durant l'évolution de l'infection pourrait être entreprise. Un changement de la spécificité antigénique de la réponse appuierait ce mécanisme dans le maintien de la réponse dirigée contre le soi.

Dans le but d'obtenir des informations supplémentaires concernant le rôle joué par la réponse de l'hôte à l'infection du SNC sur le déclenchement d'une réponse auto-immunitaire, une étude de la variation transcriptionnelle induite par l'infection virale a été réalisée sur les gènes du cerveau des souris infectées par le MHV.

### **4.3 Étude de la variation d'expression de gènes au SNC**

Nous avons démontré l'activation de lymphocytes T reconnaissant un antigène du SNC suite à l'infection par le MHV. Par la suite, le lien entre les effets de l'infection i.c. par le MHV et l'activation des cellules auto-réactives par des acteurs qui ont ou n'ont pas encore été associés à ce phénomène a été étudié à l'aide de matrices d'ADNc. Ainsi, la

variation de l'expression de 1176 gènes cellulaires connus de souris a été étudiée dans le cerveau. La technologie des matrices d'ADNc a donc permis l'étude d'environ 3,5% du nombre total de gènes codant pour une protéine présents chez la souris, estimé à 33 924. (Wada, 2001). Le profil de l'expression génique au cerveau suite à l'infection par le MHV a été établi à quatre différents temps p.i.. Ces moments ont été choisis à l'aide de la cinétique d'infection préalablement réalisée (figure 7). Ainsi, l'étude a été faite 1 jour p.i., un temps précoce après l'infection, au jour 2 p.i., correspondant au moment où la charge virale est maximale au cerveau, au jour 4 p.i., où le virus est en voie d'y être éliminé, et au jour 7 p.i. où le virus infectieux est indétectable. Certains des changements observés ont ensuite été validés par une confirmation par RT-PCR.

Afin de limiter l'impact de la variation observée entre différentes souris soumises aux mêmes conditions expérimentales, l'ARN provenant de 3 souris différentes a été utilisé pour chacun des temps p.i. étudiés. Le niveau d'expression des gènes sur les différentes membranes a été normalisé à l'aide de la moyenne de l'expression de 9 gènes dont l'expression est connue pour peu varier sous différentes conditions. Les changements d'expression observés étaient en rapport à un groupe de 3 souris témoins. Les souris témoins ont été injectées i.c. avec le même volume et la même dilution d'un surnageant de cellules DBT. Le témoin permet donc de s'assurer que les effets observés sont attribuables à l'infection et non pas seulement à l'injection. Pour être considéré significatif, le changement devait arbitrairement être d'au moins 7 fois par rapport au témoin. De plus, le niveau d'expression devait être modérément élevé, soit de plus de 5000 unités arbitraires. Le niveau d'expression des gènes retrouvés sur les matrices d'ADNc varie de 0 à plus de 250 000 unités arbitraires pour des gènes fortement exprimés comme ceux des sous-unités de la *cytochrome c oxidase*. Les 41 gènes rapportés au tableau 7 représentent donc les plus grandes variations d'expression observées chez les gènes exprimés de façon modérée à élevée et non pas tous les changements que causent l'infection par le MHV.

L'établissement de ces critères de sélection arbitraires ne permet pas l'étude de tous les changements. Ainsi, la modulation de l'expression de certains gènes faiblement

exprimés (< 5000 unités arbitraires) de même que des petites variations (< 7 fois) n'ont pas été retenues parmi les gènes indiqués au tableau 7. On ne peut pas écarter l'hypothèse que certains de ces changements aient des conséquences importantes. Par ailleurs, l'infection peut avoir causé certaines variations d'expression dans une population cellulaire ou une région du cerveau spécifique. Il est possible que ces changements n'ait pas été détectés par notre approche expérimentale, dans le cas où leur variation aurait été faible relativement à l'expression de l'ARNm du cerveau entier.

Parmi les changements entraînés par l'infection au coronavirus murin, certains gènes ont vu leur expression diminuée. C'était le cas par exemple des gènes codant pour 2 hormones, la prolactine et l'hormone de croissance. De même, deux chaperonnes, la protéine 1 de choc thermique de 84 kDa et la *chaperonin subunit 6b (zeta) (T-complex protein(TCP)-1-zeta 2)*, ainsi que d'autres gènes présentés au tableau 7 ont été régulés à la baisse suite à l'infection.

À l'opposé, plus de la moitié des gènes (24/41) affectés par l'infection ont subi une modulation à la hausse de leur expression à 7 jours p.i.. La majorité des ces gènes ont été précédemment reliés à la réponse immunitaire. Parmi ceux-ci se trouvent des gènes connus codant pour des protéines impliquées dans la présentation antigénique, des gènes caractéristiques des leucocytes et des gènes de chimiokines.

L'expression de gènes associés à la présentation antigénique par le CMH de classe I (*ATP-binding cassette, subfamily B member 2* ou *TAP-1*) (Monaco, 1992) et par le CMH de classe II, *Ii* et *cathepsine S* (Watts, 1997 ; Riese *et al.*, 1998 ; Hsieh *et al.*, 2002), a augmenté 7 jours p.i.. Une augmentation de l'expression du gène *Ii* 2 jours p.i. a aussi été observée, bien que seule la variation observée 7 jours p.i. ait pu être confirmée de façon significative par RT-PCR (figure 12). De plus, l'expression du gène *IRF(interferon-regulatory factor)-1* qui est connu pour augmenter l'expression du CMH (Taniguchi *et al.*, 2001) était aussi à la hausse à 7 jours p.i.. Une augmentation de la présentation d'antigènes viraux peut contribuer à l'élimination de l'agent infectieux. Toutefois, l'augmentation des molécules de présentation antigénique peut aussi favoriser

la présentation d'antigènes du soi, dans ce cas d'antigènes de la myéline libérés par la lyse des cellules suite à l'infection virale ou aux dommages causés par l'inflammation.

Les matrices d'ADNc ont indiqué que l'expression de *CD68*, *CD45* et de l'intégrine  $\beta 2$ (*CD18*, *LFA-1\beta*), retrouvés à la surface de la plupart des leucocytes (Janeway *et al.*, 1997) était augmentée au jour 7 p.i.. *CD18* est une intégrine impliquée dans l'extravasation des leucocytes (Gahmberg *et al.*, 1998). Le blocage de *CD18* par sa liaison à un anticorps lors de l'EAE réduit l'inflammation et prolonge la survie des animaux (Rose *et al.*, 1997). De plus, l'expression de cette molécule est augmentée 5 à 8 jours suite à l'infection par le virus de la forêt de Semliki, un autre modèle animal de SEP (Soilu-Hanninen *et al.*, 1997). Ainsi, la migration des cellules au SNC est favorisée par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion comme *CD18*. Par ailleurs, les matrices d'ADNc ont aussi indiqué que l'expression de molécules présentes à la surface des macrophages et des microglies telles le récepteur *Fc des IgG* (*Fc\gamma RI*, *CD64*) et la *galectine-3* étaient à la hausse à 7 jours p.i.. L'augmentation de l'expression du gène de la *galectine-3* a été confirmée par RT-PCR (figure 14). La *galectine-3*, qui active la production d'IL-2 dans les cellules Jurkat (Hsu *et al.*, 1996), agit aussi comme chimioattractant pour les monocytes et les macrophages (Sano *et al.*, 2000). De plus, la *galectine-3* est un marqueur d'activation des macrophages et des microglies (Smith, 2001). L'expression de ce gène est augmentée dans les régions de démyélinisation dans le modèle de l'EAE (Reichert et Rotshenker, 1999). L'attachement de particules de myéline et leur ingestion par les microglies serait rendue possible notamment grâce aux récepteurs *Fc* et à la *galectine-3*, ainsi que grâce au complément (dont l'expression du sous-composant  $\alpha$  du composant *1q* était augmentée tel qu'indiqué au tableau 7) (Smith, 2001). Par ailleurs, il semble que la *galectine-3* soit aussi exprimée dans les lymphocytes T activés (Joo *et al.*, 2001). L'expression de *CD3\gamma* et de *CD8\alpha*, des molécules retrouvées à la surface des lymphocytes T, a été modulée à la hausse 7 jours après l'infection par le coronavirus murin. D'autre part, le niveau d'expression du gène *CD8\beta* est lui aussi modulé à la hausse 7 jours p.i., mais n'est pas considéré significatif car il demeure inférieur à 5000 unités arbitraires. La variation d'expression du gène *CD3\gamma* a été confirmée par RT-PCR (figure 13). L'augmentation de l'expression de ces molécules témoigne de l'infiltration leucocytaire suite à l'infection par le MHV. Cette infiltration a

été observée à 7 jours p.i., alors que le virus infectieux n'était déjà plus détectable au cerveau. L'étude de l'expression des gènes présents au cerveau suite à l'infection par le MHV a démontré l'augmentation d'une molécule d'adhésion favorisant l'infiltration leucocytaire. L'expression de gènes de cellules immunitaires au SNC témoigne de leur présence au SNC. Ces cellules peuvent causer des dommages de façon directe ou indirecte à l'hôte. L'infection par le MHV a donc entraîné une réaction inflammatoire au cerveau, détectée essentiellement 7 jours après l'infection alors que le virus infectieux n'y est plus détectable.

Le recrutement des cellules du système immunitaire au SNC est augmenté par la présence de chimiokines. D'ailleurs, l'expression des chimiokines CXCL9 a été observée 7 jours p.i., alors que celle de CXCL10 était augmentée dès le premier jour p.i. (confirmation par RT-PCR à la figure 15). Ces deux chimiokines lient le récepteur CXCR3 présent à la surface des cellules T et NK (Farber, 1997 ; Loetscher *et al.*, 1997). L'expression de CXCL9 joue un rôle dans l'élimination du cytomégalo virus chez des souris infectées (Salazar-Mather *et al.*, 2000) ainsi que dans la réponse aiguë à l'infection par le MHV (Liu *et al.*, 2001a). Dans cette dernière étude, l'expression de CXCL9 au cerveau de souris infectées par le MHV est augmentée de façon importante 7 et 12 jours p.i., mais pas de façon précoce (2 jours p.i.) ou tardive (35 jours p.i.), ce qui concorde avec les résultats que nous avons obtenus. De plus, le traitement des souris avec un sérum contenant des anticorps reconnaissant cette chimiokine entraîne une diminution de l'infiltration des lymphocytes T au cerveau et une augmentation de la mortalité des animaux (Liu *et al.*, 2001a). Par ailleurs, il a été démontré dans cette étude que la chimiokine CXCL10 (IP-10) est exprimée de manière précoce suite à l'infection (2 jours p.i.) et qu'elle est encore exprimée 35 jours p.i. (Liu *et al.*, 2001a). Le blocage de cette chimiokine par l'administration d'un sérum anti-CXCL10 lors de la phase aiguë de l'infection entraîne une augmentation de la mortalité, une diminution de l'infiltration des lymphocytes T et une élimination plus lente du virus du SNC (Liu *et al.*, 2000). Lorsqu'un traitement semblable est administré à des souris en phase chronique de l'infection avec le MHV ayant développé de la démyélinisation, l'infiltration de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de macrophages diminue, la démyélinisation cesse de progresser



et l'état neurologique des souris s'améliore (Liu *et al.*, 2001b). De même, des souris déficientes en CXCL10 infectées par le MHV contrôlent moins bien la réplication virale au cerveau tout en démontrant moins de démyélinisation (Dufour *et al.*, 2002). Cette chimiokine contribue également au recrutement de cellules inflammatoires durant l'EAE (Fife *et al.*, 2001) et son expression augmente suite à l'infection par le virus de Theiler (Ransohoff *et al.*, 2002). Chez les patients atteints de SEP, un niveau d'expression élevé de CXCL9 et CXCL10 a été démontré dans les lésions actives de démyélinisation (Simpson *et al.*, 2000) ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien durant les attaques (Sorensen *et al.*, 1999). L'expression de ces chimiokines au début de l'infection favorise le recrutement de lymphocytes T et/ou de cellules NK, ce qui joue un rôle bénéfique pour l'élimination du virus. Néanmoins, l'expression de ces chimiokines alors que le virus infectieux n'est plus détectable au cerveau pourrait avoir l'effet de recruter davantage de cellules dans un contexte de réponse auto-immunitaire.

À long terme, une étude plus approfondie des changements que nous avons observés pourrait être entreprise. Par exemple, des études au niveau protéique permettraient d'étudier la variation du produit de ces gènes. De plus, des expériences d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ* à divers temps p.i. permettraient d'identifier les types cellulaires impliqués dans ces variations ainsi que la cinétique de leur apparition au SNC. Également, des études fonctionnelles, par exemple avec des souris déficientes en un des gènes impliqués (*knock-out*), pourraient être réalisées pour évaluer le rôle biologique des divers changements observés.

Le profil d'expression des gènes a par ailleurs été tracé précédemment dans la moelle épinière de souris ayant développé l'EAE (Ibrahim *et al.*, 2001). Deux cent treize changements ont été identifiés parmi les quelques 11 000 gènes étudiés. Le plus grand groupe de gènes subissant une modulation d'expression était celui formé des gènes impliqués dans l'immunité et la présentation antigénique (n=72). Tout comme dans notre modèle, l'expression de *Ii*, *IRF-1*, *CD18*, *récepteur Fc des IgG*, *galectine-3*, *CXCL9* et de *CXCL10* est augmentée. D'un autre côté, l'analyse de l'expression des gènes dans les lésions de SEP par rapport à des cerveaux sains a été réalisée (Withney *et al.*, 1999), de

même que la comparaison du profil d'expression des cerveaux de patients atteints de SEP, de souris ayant l'EAE et de cerveaux normaux a été effectuée (Whitney *et al.*, 2001) ainsi que celle comparant l'expression génique dans les lésions inflammatoires aiguës et les lésions silencieuses chroniques (Lock *et al.*, 2002). Cette dernière étude a montré l'augmentation de l'expression de 39 gènes ainsi que la diminution de 49 gènes dans toutes les lésions de SEP étudiées (Tompkins et Miller, 2002). De plus, 8 des 29 gènes dont l'expression est à la hausse dans les plaques de patients atteints de SEP dans l'étude de Whitney et collaborateurs (1999) sont également identifiés dans l'étude de Lock et de ses collègues (2002). D'autre part, l'étude de Lock et collaborateurs (2002) est la première à distinguer les lésions de SEP de type aigu et chronique au niveau moléculaire (Tompkins et Miller, 2002). En outre, deux des changements observés y sont validés dans le modèle de l'EAE (Lock *et al.*, 2002). Bien qu'une part importante des changements observés dans ces différentes études concernent l'expression de gènes reliés à l'immunité, une comparaison exhaustive entre ces études n'est présentée dans aucune de ces publications (Tompkins et Miller, 2002). L'utilisation de banques de données compilant les résultats obtenus sur l'expression des milliers de gènes étudiés permettrait de tracer des liens entre ces différentes expériences et d'en tirer de précieuses informations (Tompkins et Miller, 2002).

## 5.0 Conclusions et perspectives

Les maladies auto-immunitaires surviennent lorsqu'une population de cellules T ou B spécifiques à un antigène du soi est activée. L'origine de telles affections demeure inconnue encore aujourd'hui. Toutefois, l'implication des virus dans le processus pathologique a été proposée et divers mécanismes sont avancés pour expliquer une telle association. La SEP est une maladie auto-immunitaire à laquelle plusieurs virus, dont les coronavirus, ont été associés. D'ailleurs, l'infection de souris par le coronavirus murin constitue un excellent modèle animal de SEP.

D'abord, la caractérisation de ce modèle animal a révélé que l'infection i.c. par une faible dose de MHV-A59 a entraîné la réplication du virus au SNC (cerveau) et en périphérie (foie) (section 3.1.1). La charge virale maximale mesurée par un test de plages de lyse était retrouvée à 2 jours p.i. au cerveau et 4 jours p.i. au foie alors que le virus était indétectable à ces deux endroits à 7 jours p.i. (figure 7). Un test ELISA a permis de détecter les anticorps produits et présents en quantité significative 7 jours p.i..

Puis, la prolifération de lymphocytes T spléniques spécifiques au virus et à un antigène du SNC (PBM) a été mesurée par un test d'incorporation de thymidine tritiée à 7 jours p.i. Nos résultats montrent donc que l'infection par le coronavirus murin entraîne l'activation d'une population de cellules auto-réactives reconnaissant spécifiquement une protéine de la myéline, qui semblent aussi être ciblée par les lymphocytes T de patients atteints de SEP.

Par la suite, des efforts ont été réalisés dans le but d'identifier le ou les mécanismes responsables de cette réponse auto-immunitaire observée suite à une infection virale. L'implication du mimétisme moléculaire a d'abord été étudiée. Suite à des problèmes techniques, ces expériences se sont malheureusement avérées non concluantes. On ne peut pour l'instant statuer sur l'importance du mimétisme moléculaire dans l'activation observée de cellules auto-réactives.

D'autre part, les mécanismes responsables de l'activation de lymphocytes auto-réactifs suite à l'infection virale ont été étudiés sous un angle moléculaire. Le profil d'expression génique révélé par des matrices d'ADNc indique que plus de la moitié des gènes dont l'expression varie suite à l'infection sont régulés à la hausse à 7 jours p.i.. À ce moment, le virus semble éliminé de l'organisme et la réponse des cellules T spécifiques à la myéline est détectée. Néanmoins, la majorité de ces gènes ont précédemment été reliés à l'immunité, certains d'entre eux codant pour des protéines impliquées dans la présentation antigénique ou exprimées chez les leucocytes ou encore pour des chimiokines. Ces résultats suggèrent que les effets reliés à l'inflammation jouent probablement un rôle important dans la réponse auto-immunitaire. Néanmoins, une telle affirmation devrait être confirmée par des études fonctionnelles, ce qui dépasse le cadre des objectifs de ce mémoire. De plus, il reste à déterminer si ces effets sont spécifiques à des antigènes précis ou le résultat de mécanismes non-spécifiques (*bystander effect*).

En résumé, l'infection par le MHV entraîne la réplication du virus au cerveau et au foie. Le virus n'est plus détectable 7 jours p.i. À ce moment, une réponse cellulaire spécifique à un antigène du SNC, une protéine de la myéline, est détectée. La régulation à la hausse de nombreux gènes reliés à la réponse immunitaire suggère la présence d'une réponse immunitaire au cerveau suite à l'infection par un virus. Il est possible que les effets reliés à l'inflammation soient impliqués dans l'activation d'une population de lymphocytes auto-réactifs. Nous avons donc démontré à l'aide d'un modèle animal de SEP qu'une infection virale peut entraîner l'activation d'une population de lymphocytes T auto-réactifs dirigés contre une protéine de la myéline, peut-être, du moins en partie, suite aux effets liés à l'inflammation.

Des études subséquentes pourraient être entreprises en vue d'obtenir de plus amples informations sur les mécanismes impliqués dans cette activation de cellules auto-réactives. D'une part, les changements d'expression observés au niveau transcriptionnel pourraient être étudiés au niveau protéique. D'autre part, la contribution du mimétisme moléculaire et de la propagation de déterminants ou même d'un superantigène pourrait

être étudiée afin de déterminer la place qu'occupe chacun des mécanismes suggérés dans l'activation d'une réponse auto-immunitaire suite à l'infection par le coronavirus murin.

## Références

- ACCAPEZZATO, D., Nisini, R., Paroli, M., Bruno, G., Bonino, F., Houghton, M., Barnaba, V. 1998. «Generation of an MHC class II-restricted T cell epitope by extracellular processing of hepatitis delta antigen». J. Immunol., vol. 160, no. 11, p. 5262-5266.
- ACHA-ORBEA, H., Mitchell, D.J., Timmermann, L., Wraith, D.C., Tausch, G.S., Waldor, M.K., Zamvil, S.S., McDevitt, H.O., Steinman, L. 1988. «Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention». Cell, vol. 54, no. 2, p. 263-273.
- ADAMI, C., Pooley, J., Glomb, J., Stecker, E., Fazal, F., Fleming, J.O., Baker, S.C. 1995. «Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection : Quasispecies nature of the persisting MHV RNA». Virology, vol. 209, no. 2, p. 337-346.
- AICHELE, P., Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. 1996. «Immunopathology of organ specific autoimmunity as a consequence of virus infection». Immunol. Rev., vol. 152, p. 21-45.
- ALBERT, L.J., Inman, R.D. 1999. «Molecular mimicry and autoimmunity». N. Engl. J. Med., vol. 341, no. 27, p. 2068-2074.
- ANDERSEN, O., Lygner, P.E., Bergstrom, T., Andersson, M., Vahlne, A. 1993. «Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study». J. Neurol., vol. 240, no. 7, p. 417-422.
- 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 coronavirus OC43». J.Virol., vol. 73, no. 4, p. 3338-3350.
- ARBOUR, N., Ekandé, S., Côté, G., Lachance, C., Chagnon, F., Cashman, N.R., Talbot, P.J. 1999b «Persistent infection of human oligodendrocytic and neuronal cell lines by human coronavirus 229E» J.Virol., vol. 73, no. 4, p. 3326-3337.
- ARBOUR, N., Day, R., Newcombe, J., Talbot, P.J. 2000. «Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses». J. Virol., vol. 74, no. 19, p. 8913-8971.
- AVERY, A.C., Zhao, Z.S., Rodriguez, A., Bikoff, E.K., Soheilian, M., Foster, C.S., Cantor, H. 1995. «Resistance to herpes stromal keratitis conferred by an IgG2a-derived peptide». Nature, vol. 376, no. 6530, p. 431-434.

BADENHOOP, K., Donner, H., Neumann, J., Herwig, J., Kurth, R., Usadel, K.H., Tonjes, R.R. 1999. «IDDM patients neither show humoral reactivities against endogenous retroviral envelope protein nor do they differ in retroviral mRNA expression from healthy relatives or normal individuals». Diabetes, vol. 48, no. 1, p. 215-218.

BANCHEREAU, J. et Steinman, R.M. 1998. «Dendritic cells and the control of immunity». Nature, vol. 392, no. 6673, p. 245-252.

BARIC, R.S., Fu, K. Schaad, M.C. et Stohlman, S.A. 1990. «Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation group». J. Virol., vol. 177, no. 2, p. 646-656.

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.

BARNABA, V. 1996. «Viruses, hidden self-epitopes and autoimmunity». Immunol. Rev., vol. 152, p. 47-66.

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

BARTHOLD, S.W. 1988. «Olfactory neural pathway in mouse hepatitis virus nasooencephalitis». Acta Neuropathol., vol. 76, no. 5, p. 502-506.

BARTHOLD, S.W., Beck, D.S., Smith, A.L. 1993. «Enterotropic coronavirus (mouse hepatitis virus) in mice : influence of host age and strain on infection and disease». Lab. Anim. Sci., vol. 43, no. 4, p. 276-284.

BARTHOLD, S.W. et Smith, A.L. 1992. «Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice». Arch. Virol., vol. 122, no. 1-2, p. 35-44.

BENOIST, C., Mathis, D. 1998. «The pathogen connection». Nature, vol. 394, no. 6690, p. 227-228.

BENOIST, C., Mathis, D. 2001. «Autoimmunity provoked by infection : how good is the case for epitope mimicry ?». Nat. Immunol., vol. 2, no. 9, p. 797-801.

BERGMANN, C.C., Altman, J.D., Hinton, D., Stohlman, S.A. 1999. «Inverted immunodominance and impaired cytolytic function of CD8<sup>+</sup> T cells during viral persistence in the central nervous system». J. Immunol., vol. 163, no. 6, p. 3379-3387.

BOEHM, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. 1997. «Cellular responses to interferon-gamma». Annu. Rev. Immunol., vol. 15, p. 749-795.

BONAVIA, A., Arbour, N., Yong, W.V., 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.

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 human 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.

BOTTAZZO, G.E., Pujol-Borell, B.R., Hanafusa, T., Feldmann, M. 1983. «Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity». Lancet, vol. 2, no. 8359, p. 1115-1119.

BOYLE, J.F., Weismiller, D.G., Holmes, K.V. 1987. «Genetic resistance to mouse hepatitis virus correlates with absence of virus-binding activity on target tissues». J. Virol., vol. 61, no. 1, p. 185-189.

BRADFORD, M.M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing 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.

BROCKE, S., Gaur, A., Piercy, C., Gautman, A., Gijbels, K., Fathman, C.G., Steinman, L. 1993. «Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen». Nature, vol. 365, no. 6447, p. 642-644.

BROSNAN, C.F., Cammer, W., Norton, W.T., Bloom, B.R. 1980. «Proteinase inhibitors suppress the development of experimental allergic encephalomyelitis». Nature, vol. 285, no. 5762, p. 235-237.

BUCHMEIER, M.J., Lewicki, H.A., Talbot, P.J., Knobler, R.L. 1984. «Murine hepatitis virus-4 (strain JHM)-induced neurologic disease is modulated in vivo by monoclonal antibody». Virology, vol. 132, no. 2, p. 261-270.

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. et 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.

CARNAUD, C. et Bach, J.F. 1993. «Cellular basis of T-cell autoreactivity in autoimmune diseases». Immunol. Res., vol. 12, no. 2, p.131-148.

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.

CHEEVER, F.S., Daniels, J.B., Peppenheimer, A.M., Bailey, O.T. 1949. «A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. I. Isolation and biological properties of the virus». J. Exp. Med., vol.90, p. 181-184.

CHEIFETZ, S. et Moscarello, M.A. 1985. «Effect of bovine basic protein charge microheterogeneity on protein-induced aggregation of unilamellar vesicles containing a mixture of acidic and neutral phospholipids». Biochemistry, vol. 24, no. 8, p. 1909-1914.

CHERAYIL, B. J., Weiner, S. J., Pillai, S. 1989. «The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE». J. Exp. Med., vol. 170, no. 6, p. 1959-1972.

CHOMCZYNSKI, P. et Sacchi, N. 1987. «Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroforme extraction». Anal. Biochem., vol. 162, no. 1, p. 156-159.

CLARKE, M.F., Gelmann, E.P., Reitz, M.S. Jr. 1983. «Homology of human T-cell leukemia virus envelope gene with class I HLA gene». Nature, vol. 305, no. 5929, p. 60-62.

COLE, B.C., Griffiths, M.M. 1993. «Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by the *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM». Arthritis Rheum., vol. 36, no. 7, p. 994-1002.

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

COMPTON, S.R., Barthold, S.W., Smith, A.L. 1993. «The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses». Lab. Anim. Sci., vol. 43, no. 1, p. 15-28.

CONRAD, B., Weidmann, E., Trucco, G., Rudert, W.A., Behboo, R., Ricordi, C., Rodriguez-Rilo, H., Finegold, D., Trucco, M. 1994. «Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology». Nature, vol. 371, no. 6495, p. 351-355.

CONRAD, B., Weissmahr, R.N., Boni, J., Arcari, R., Schupbach, J., Mach, B. 1997. «A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes». Cell, vol. 90, no. 2, p. 303-313.

COOK-MILLS, J.M., Munshi, H.G., Perlman, R.L., Chambers, D.A. 1992. «Mouse hepatitis virus infection suppresses modulation of mouse spleen T-cell activation». Immunology, vol. 75, no. 3, p. 542-545.

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.

COYLE, P.K. 1996. «The neuroimmunology of multiple sclerosis». Adv. Neuroimmunol., vol. 6, no. 2, p. 143-154.

CRAY, C., Mateo, M.O., Altman, N.H. 1993. «In vitro and long-term in vivo immune dysfunction after infection of BALB/c mice with mouse hepatitis virus strain A59». Lab. Anim. Sci., vol. 43, no. 2, p. 169-174.

CROSS, A.H., Tuohy, V.K., Raine, C.S. 1993. «Development of reactivity to new myelin antigens during chronic relapsing autoimmune demyelination». Cell Immunol., vol. 146, no. 2, p. 261-269.

DALES, S. et 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.

DATTA, S.K. 2000. «Positive selection for autoimmunity». Nat. Med., vol. 6, no. 3, p. 259-261.

DEBER, C.M. et Reynolds, J.S. 1991. «Central nervous system myelin : structure, function and pathology». Clin. Biochem., vol. 24, no. 2, p. 113-134.

DESHPANDE, S.P., Lee, S., Zheng, M., Song, B., Knipe, D., Kapp, J.A., Rouse, B.T. 2001. «Herpes simplex virus-induced keratitis : evaluation of the role of molecular mimicry in lesion pathogenesis». J. Virol., vol. 75, no. 7, p. 3077-3088.

DE SOUZA, M.S. et Smith, A.L. 1991. «Characterization of accessory cell function during acute infection of Balb/cByJ mice with mouse hepatitis virus (MHV), strain JHM». Lab. Anim. Sci., vol. 41, no. 2, p. 112-118.

DE SOUZA, M.S., Smith, A.L., Bottomly, K. 1991. «Infection of Balb/cByJ mice with the JHM strain of mouse hepatitis virus alters in vitro splenic T cell proliferation and cytokine production». Lab. Anim. Sci., vol. 41, no. 2, p. 99-105.

DING, J.W., Ning, Q., Liu, M.F., Lai, A., Leibowitz, J., Peltekian, K.M., Cole, E.H., Fung, L.S., Marsden, P.A., Yeger, H., Phillips, M.J., Levy, G.A. 1997. «Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel *fgl2* prothrombinase». J. Virol., vol. 71, no. 12, p. 9223-9230.

DI ROSA, F., Barnaba, V. 1998. «Persisting viruses and chronic inflammation : understanding their relation to autoimmunity». Immunol. rev., vol. 164, p. 17-27.

DODET, B. 1995. «La sclérose en plaques, maladie énigmatique». Biofutur, vol. 144, p. 15-22.

DUFOUR, J.H., Dziejman, M., Liu, M.T., Leung, J.H., Lane, T.E., Luster, A.D. 2002. «IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)- deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking». J. Immunol., vol. 168, no. 7, p. 3195-3204.

EBERS, G.C., Kukay, K., Bulman, D.E., Sadvonick, 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., Risch, 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.

EHL, S., Hombach, J., Aichele, P., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. 1997. «Bystander activation of cytotoxic T cells : studies on the mechanism and evaluation of in vivo significance in a transgenic mouse model». J. Exp. Med., vol. 185, no. 7, p. 1241-1251.

EVANS, C.F., Horwitz, M.S., Hobbs, M.V., Oldstone, M.B. 1996. «Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease». J. Exp. Med., vol. 184, no. 6, p. 2371-2384.

EVAVOLD, B.D., Sloan-Lancaster, J., Wilson, K.J., Rothbard, J.B., Allen, P.M. 1995. «Specific T cell recognition of minimally homologous peptides : evidence for multiple endogenous ligands». Immunity, vol. 2, no. 6, p. 655-663.

FABBRI, M., Bianchi, E., Fumagalli, L., Pardi, R. 1999. «Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules». Inflamm. Res., vol. 48, no. 5, p. 239-246.

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

FARBER, J.M. 1997. «Mig and IP10: CXC chemokines that target lymphocytes». J. Leukoc. Biol., vol. 61, no. 2, p. 246-257.

FIFE, B.T., Kennedy, K.J., Panlagua, M.C., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., Luster, A.D., Karpus, W.J. 2001. «CXCL10 (IFN-gamma inducible protein-10) control of encephalitogenic CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis». J. Immunol., vol. 166, no. 12, p. 7617-7624.

FLEMING, J.O., Houtman, J.J., Alaca, H., Hinze, H.C., McKenzie, D., Aiken, J., Bleasdale, T., Baker, S. 1994. «Persistence of viral RNA in the central nervous system of mice inoculated with MHV-4». Dans : Coronaviruses, Éd. Laude, H. et Vautherot, JF, New York, Plenum Press, p. 327-332.

FRITZ, R.B. et McFarlin, D.E. 1989. «Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein». Chem. Immunol. vol. 46, p.101-125.

FROSCH, S., Bonifas, U., Eck, H.P., Bockstette., M., Droege, W., Rude, E., Reske-Kunz, A.B. 1993. «The efficient bovine insulin presentation capacity of bone marrow-derived macrophages activated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor correlates with a high level of intracellular reducing thiols». Eur. J. Immunol., vol. 23, no. 7, p.1430-1434.

FUJINAMI, R.S. et Oldstone, M.B.A. 1985. «Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus : mechanism for autoimmunity». Science, vol. 230, no. 4729, p. 1043-1045.

FUJINAMI, R.S., Oldstone, M.B., Wroblewska, Z., Frankel, M.E., Koprowski, H. 1983. «Molecular mimicry in virus infection : crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 80, no. 8, p. 2346-2350.

GAHMBERG, C.G., Valmu, L., Fagerholm, S., Kotovuori, P., Ihanus, E., Tian, L., Pessa-Morikawa, T. 1998. «Leukocyte integrins and inflammation». Cell. Mol. Life Sci., vol. 54, no. 6, p. 549-555.

GALLAGHER, S.R. 1999. «Electrophoretic separation of proteins: One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins». Dans : Currents Protocols in Molecular Biology vol. 2. Éd. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. Massachussets, John Wiley & Sons, Inc, p. 10.2A.1-10.2A.34.

GIANANI, R., Sarvetnick, N. 1996. «Viruses, cytokines, antigen, and autoimmunity». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, no. 6, p. 2257-2259.

GOMBERT, J.M., Herbelin, A., Tancrede-Bohin, E., Dy, M., Carnaud, C., Bach, J.F. 1996. «Early quantitative and functional deficiency of NK1(+)-like thymocytes in the NOD mouse». Eur. J. Immunol., vol. 26, no. 12, p. 2989-2998.

GROSS, D.M., Forsthuber, T., Tary-Lehmann, M., Etling, C., Ito, K., Nagy, Z.A., Field, J.A., Steere, A.C., Huber, B.T. 1998. «Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis». Science, vol. 281, no. 5377, p. 703-706.

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., Weissenbach, 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.

HARING, J. et Perlman, S. 2001. «Mouse hepatitis virus». Curr.Opin. Microbiol., vol. 4, no. 4, p. 462-466.

HARING, J.S., Pewe, L.L., Perlman, S. 2001. «High-magnitude, virus-specific CD4 T-cell response in the central nervous system of coronavirus-infected mice». J. Virol., vol. 75, no. 6, p. 3043-3047.

HASER, W. G. , Saito, H., Koyama, T., Tonegawa, S. 1987. «Cloning and sequencing of murine T3 gamma cDNA from a subtractive cDNA library». J. Exp. Med., vol. 166, no. 4, p. 1186-1191.

HAYNES, B.F., Robert-Guroff, M., Metzgar, R.S., Franchini, G., Kalyanaraman, V.S., Palker, T.J., Gallo, R.C. 1983. «Monoclonal antibody against human T cell leukemia virus p19 defines a human thymic epithelial antigen acquired during ontogeny». J. Exp. Med., vol. 157, no. 3, p. 907-920.

HEMMER, B., Fleckenstein, B.T., Vergelli, M., Jung, G., McFarland, H., Martin, R., Wiesmuller, K.H. 1997. «Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clones». J. Exp. Med., vol. 185, no. 9, p. 1651-1659.

HEMMER, B., Jacobsen, M., Sommer, N. 2000. «Degeneracy in T-cell antigen recognition – implications for the pathogenesis of autoimmune diseases». J. Neuroimmunol., vol. 107, no. 2, p. 148-153.

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.

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.

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.

HORWITZ, M.S., Sarvetnick, N. 1999. «Viruses, host responses, and autoimmunity». Immunol. Rev., vol. 169, p. 241-253.

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

HOUTMAN, J.J. et Fleming, J.O. 1996b. «Dissociation of demyelination and viral clearance in congenitally immunodeficient mice infected with murine coronavirus JHM». J. Neurovirol., vol. 2, no. 2, p. 101-110.

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.

HSIEH, C.S., de Roos, P., Honey, K., Beers, C., Rudensky, A. 2002. «A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation». J. Immunol., vol. 168, no. 6, p. 2618-2625.

HSU, D.K., Hammes, S.R., Kuwabara, I., Greene, W.C., Liu, F.T. 1996. «Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of beta-galactoside-binding lectin, galectin-3». Am. J. Pathol., vol. 148, no. 5, p. 1661-1670.

HUANG, X. et Miller, W. 1991. «A time-efficient, linear-space local similarity algorithm». Adv. Appl. Math., vol. 12, p. 337-357.

IBRAHIM, S.M., Mix, E., Bottcher, T., Koczan, D., Gold, R., Rolfs, A., Thiesen, H.J. 2001. «Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis». Brain, vol. 124 (Pt 10), p. 1927-1938.

IGNATOWICZ, L., Kappler, J., Marrack, P. 1996. «The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand». Cell, vol. 84, no. 4, p. 521-529.

IMRICH, H., Schwender, S., Hein, A., Dorries, R. 1994. «Cervical lymphoid tissue but not the central nervous system supports proliferation of virus-specific T lymphocytes during coronavirus-induced encephalitis in rats». J. Neuroimmunol., vol. 53, no. 1, p.73-81.

JACOBSON, D.L., Gange, S.J., Rose, N.R., Graham, N.M. 1997. «Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States». Clin. Immunol. Immunopathol., vol. 84, no. 3, p. 223-243.

JAECKEL, E., Heringlake, S., Berger, D., Brabant, G., Hunsmann, G., Manns, M.P. 1999. «No evidence for association between IDDMK(1,2)22, a novel isolated retrovirus, and IDDM». Diabetes, vol. 48, no. 1, p. 209-214.

JANEWAY, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D. 1997. Immunobiology: the immune system in health and disease. 3<sup>e</sup> Ed. New York : Current Biology Ltd/Garland Publishing, 608 pages.

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.

JOO, H.G., Goedegebuure, P.S., Sadanaga, N., Nagoshi, M., von Bernstorff, W., Eberlein, T.J. 2001. «Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes». J. Leukoc. Biol., vol. 69, no. 4, p.555-564.

KAPPLER, J.W., Roehm, N., Marrack, P. 1987. «T cell tolerance by clonal elimination in the thymus». Cell, vol. 49, no. 2, p. 273-280.

KARPUS, W.J., Pope, J.G., Peterson, J.D., Dal Canto, M.C., Miller, S.D. 1995. «Inhibition of Theiler's virus-mediated demyelination by peripheral immune tolerance induction». J. Immunol., vol. 155, no. 2, p. 947-957.

KAUFMAN, D.L., Clare-Salzler, M., Jan, J., Forsthuber, T., Ting, G.S., Robinson, P., Atkinson, M.A., Sercarz, E.E., Tobin, A.J., Lehmann, P.V. 1993. «Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes». Nature, vol. 366, no. 6450, p. 69-72.

KE, Y., Ma, H., Kapp, J.A. 1998. «Antigen is required for the activation of effector activities, whereas interleukin 2 is required for the maintenance of memory in ovalbumin-specific, CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes». J. Exp. Med., vol. 187, no. 1, p. 49-57.

KERLERO DE ROSBO, N., Carnegie, P.R., Bernard, C.C, Linthicum, D.S. 1984. «Detection of various forms of brain myelin basic protein in vertebrates by electroimmunoblotting». Neurochem. Res., vol. 9, no. 10, p. 1359-1369.

KIM, A., Jun, H.S., Wong, L., Stephure, D., Pacaud, D., Trussel, R.A., Yoon, J.W. 1999. «Human endogenous retrovirus with a high genomic sequence homology with IDDMK(1,2)22 is not specific for Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients but ubiquitous». Diabetologia, vol. 42, no. 4, p. 413-418.

KNOBLER, R.L., Haspel, M.V., Oldstone, M.B. 1981. «Mouse hepatitis virus type 4 (JHM strains) induced fatal central nervous system disease. I. Genetic control and murine neuron as the susceptible site of disease». J. Exp. Med., vol. 153, no 4, p. 832-843.

KNOBLER, R.L., Lampert, P.W., Oldstone, M.B.A. 1982. «Virus persistence and recurring demyelination produced by a temperature-sensitive mutant of MHV-4». Nature, vol. 298, no. 5871, p. 279-298.

KOCH, N., Lauer, W., Habicht, J., Dobberstein, B. 1987. «Primary structure of the gene for the murine Ia antigen-associated invariant chains (Ii). An alternatively spliced exon encodes a cysteine-rich domain highly homologous to a repetitive sequence of thyroglobulin». EMBO J., vol. 6, no. 6, p. 1677-1683.

KOZWLOSKI, S., Corr, M., Takeshita, T., Boyd, L.F., Pendleton, C.D., Germain, R.N., Berzofsky, J.A., Margulies, D.H. 1992. «Serum angiotensin-1 converting enzyme activity processes a human immunodeficiency virus 1 gp160 peptide for presentation by major histocompatibility complex class 1 molecules». J. Exp. Med., vol. 175, no. 6, p. 1417-1422.

KRETZ-ROMMEL, A., Rubin, R.L. 2000. «Disruption of positive selection of thymocytes causes autoimmunity». Nat. Med., vol. 6, no. 3, p. 298-305.

KURTZKE, J.F. 1991. «Multiple sclerosis : changing times». Neuroepidemiology, vol. 10, no. 1, p. 1-8.

KURTZKE, 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.

KYUWA, S. et Stohlman, S.A. 1990. «Pathogenesis of a neurotropic murine coronavirus, strain JHM in the central nervous system of mice». Sem. Virol., vol. 1, p. 273-280.

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

LAEMMLI, U.K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». Nature, vol. 227, no. 259, p. 680-685.

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

LAI, M.M.C. et 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». Acta Neuropathol., vol. 24, no. 1, p. 76-85.

LANE, D.P. et Hoeffler, W.K. 1980. «SV40 large T shares an antigenic determinant with a cellular protein of molecular weight 68,000». Nature, vol. 288, no. 5787, p. 167-170.

LANE, T.E., Asensio, V.C., Yu, N., Paoletti, A.D., Campbell, I.L., Buchmeier, M.J. 1998. «Dynamic regulation of alpha- and beta- chemokine expression in the central nervous system during mouse hepatitis virus-induced demyelinating disease». J. Immunol., vol. 160, no. 2, p. 970-978.

LANE, T.E. et Buchmeier, M.J. 1997. «Murine coronavirus infection : a paradigm for virus-induced demyelinating disease». Trends Microbiol., vol. 5, no. 1, p. 9-14.

LANE, T.E., Liu, M.T., Chen, B.P., Asensio, V.C., Samawi, R.M., Paoletti, A.D., Campbell, I.L., Kunkel, S.L., Fox, H.S., Buchmeier, M.J. 2000. «A central role for CD4<sup>+</sup> T cells and RANTES in virus-induced central nervous system inflammation and demyelination». J. Virol., vol. 74, no. 3, p. 1415-1424.

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.

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

LAVI, E., Gilden, D.H., Highkin, M.K., Weiss, R. 1986. «The organ tropism of mouse hepatitis virus A59 in mice is dependent on dose and route of inoculation». Lab. Anim. Sci., vol. 36, no. 2, p. 130-135.

LAVI, E., Gilden, D.H., Wroblewska, Z., Rorke, L.B., Weiss, R. 1984. «Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus». Neurology, vol. 34, no. 5, p. 597-603.

LEHMANN, P.V., Forsthuber, T., Miller, A., Sercarz, E.E. 1992. «Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen». Nature, vol. 358, no. 6382, p. 155-157.

LEVIN, M.C., Lee, S.M., Kalume, F.Jr.F.C., Hasty, K.A., Callaway, J.C., Zunt, J., Desiderio, D.M., Stuart, J.M. 2002. «Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease». Nat. Med., vol. 8, no. 5, p. 509-513.

LI, H., Llera, A., Malchiodi, E.L., Mariuzza, R.A. 1999. «The structural basis of T cell activation by superantigens». Annu. Rev. Immunol., vol. 17, p. 435-466.

LIN, M.T., Hinton, D.R., Marten, N.W., Bergmann, C.C., Stohlman, S.A. 1999. «Antibody prevents virus reactivation within the central nervous system». J. Immunol., vol. 162, no. 12, p. 7358-7368.

LIN, M.Y., Stohlman, S.A., Hinton, D.R. 1997. «Mouse hepatitis virus is cleared from the central nervous system of mice lacking perforin-mediated cytotoxicity». J. Virol., vol. 71, no. 1, p. 383-391.

LIU, M.T., Chen, B.P., Oertel, P., Buchmeier, M.J., Armstrong, D., Hamilton, T.A., Lane, T.E. 2000. «The T cell chemoattractant IFN-inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease». J. Immunol., vol. 165, no. 5, p. 2327-2330.

LIU, M.T., Armstrong, D., Hamilton, T.A., Lane, T.E. 2001a. «Expression of Mig (monokine induced by interferon gamma) is important in T lymphocyte recruitment and host defense following viral infection of the central nervous system». J. Immunol., vol. 166, no. 3, p. 1790-1795.

LIU, M.T., Keirstead, H.S., Lane, T.E. 2001b. «Neutralization of the chemokine CXCL10 reduces the inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis». J. Immunol., vol. 167, no. 7, p. 4091-4097.

LO, W.F., Woods, A.S., DeCloux, A., Cotter, R.J., Metcalf, E.S., Soloski, M.J. 2000. «Molecular mimicry mediated by MHC class Ib molecules after infection with gram-negative pathogens». Nat. Med., vol. 6, no. 2, p. 215-218.

LOCK, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Ausitn, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S.J., Oksenberg, J.R., Raine, C.S., Heller, R., Steinman, L. 2002. «Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis». Nat. Med., vol. 8, no. 5, p. 500-508.

LOETSCHER, M., Gerber B., Loetscher, P., Jones, S.A., Piali, L., Lewis, I.C., Baggiolini, M., Moser, B. 1996. «Chemokine receptor specific for IP-10 and Mig: structure, function, and expression in activated T lymphocytes». J. Exp. Med., vol. 184, no. 3, p. 963-969.

LUPPI, P., Zanone, M.M., Hyoty, H., Rudert, W.A., Haluszczak, C., Alexander, A.M., Bertera, S., Becker, D., Trucco, M. 2000. «Restricted TCR V beta gene expression and enterovirus infection in type I diabetes : a pilot study». Diabetologia, vol. 43, no. 12, p. 1484-1497.

MANAKER, R.A., Piczak, C.V., Miller, A.A., Stanton, M.F. 1961. «A hepatitis virus complicating studies with mouse leukemia». J. Nat. Cancer Inst., vol. 27, p. 29-51.

MARRACK, P., Kappler, J., Kotzin, B. 2001. «Autoimmune disease : why and where it occurs». Nat. Med., vol. 7, no. 8, p. 899-905.

MARTEN, N.W., Hohman, R., Stohlman, S.A., Atkinson, R.D., Hinton, D.R., Bergmann, C.B. 2001. «Acute CNS infection is insufficient to mediate chronic T cell retention». Adv. Exp. Med. Biol., vol. 494, p. 349-354.

MARTEN, N.W., Stohlman, S.A., Bergmann, C.C. 2000. «Role of viral persistence in retaining CD8(+) T cells within the central nervous system». J. Virol., vol. 74, no. 17, p. 7903-7910.

MARTEN, N.W., Stohlman, S.A., Bergmann, C.C. 2001. «MHV infection of the CNS: mechanisms of immune-mediated control». Viral Immunol., vol. 14, no. 1, p. 1-18.

MARTENSON, R. 1984. «Myelin basic protein speciation». Prog. Clin. Biol. Res., vol. 146, p. 511-521.

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

MATTHEWS, A.E., Weiss, S.R., Shlomchik, M.J., Hannum, L.G., Gombold, J.L., Paterson, Y. 2001. «Antibody is required for clearance of infectious murine hepatitis virus A59 from the central nervous system, but not the liver». J. Immunol., vol. 167, no. 9, p. 5254-5263.

MCRAE, B.L., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., Miller, S.D. 1995. «Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis». J. Exp. Med., vol. 182, no. 1, p. 75-85.

MEHINDATE, K., Al-Daccak, R., Scall, T.J., Mourad, W. 1994. «Induction of chemokine gene expression by major histocompatibility complex class II ligands in human fibroblast-like synoviocytes. Different regulation by interleukin-4 and dexamethasone». J. Biol. Chem., vol. 269, no. 51, p. 32063-32069.

MERRIMAN, T.R. et Todd, J.A. 1995, «Genetics of autoimmune disease», Curr. Opin. Immunol., vol. 7, no. 6, p. 786-792.

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.

MILLER, S.D., Vanderlugt, C.L., Begolka, W.S., Pao, W., Yauch, R.L., Neville, K.L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A., Kim, B.S. 1997. «Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading». Nat. Med., vol. 3, no. 10, p. 1133-1136.

MINAMI, Y., Kono, T., Miyazaki, T., Taniguchi, T. 1993. «The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes». Annu. Rev. Immunol., vol. 11, p. 245-268.

MONACO, J.J. 1992. «Major histocompatibility complex-linked transport proteins and antigen processing». Immunol. Res., vol.11, no. 2, p. 125-132.

MOR, F. et Cohen, I.R. 1993. «Shifts in the epitopes of myelin basic protein recognized by Lewis rat T cells before, during and after the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis». J. Clin. Invest., vol. 92, no. 5, p. 2199-2206.

MOURAD, W., Mehindate, K., Schall, T.J., McColl. S.R. 1992. «Engagement of major histocompatibility complex class II molecules by superantigens induces inflammatory cytokine gene expression in human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes». J. Exp. Med., vol. 175, no. 2, p. 613-616.

MUIR, A., Ruan, Q., G., Marron, M.P., She, J.X. 1999. «The IDDMK(1,2)22 retrovirus is not detectable in either mRNA or genomic DNA from patients with type 1 diabetes». Diabetes, vol. 48, no. 1, p. 219-222.

MURALI-KRISHNA, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J., Ahmed, R. 1998. «Counting antigen-specific CD8 T cells : a reevaluation of bystander activation during viral infection». Immunity, vol. 8, no. 2, p. 177-187.

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.

NAKAGAWA, K. et Harrison, L.C. 1996. «The potential roles of endogenous retroviruses in autoimmunity». Immunol. Rev., vol. 152, p. 193-236.

NANDA, N.K., Arzoo, K.K., Getsen, H.M., Sette, A., Sercarz, E.E. 1995. «Recognition of multiple peptide cores by a single T cell receptor». J. Exp. Med., vol. 182, no. 2, p. 531-539.

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.

OHASHI, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. 1991. «Ablation of «tolerance» and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice». Cell, vol. 65, no. 2, p. 301-317.

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

OLDSTONE, M.B., Nerenberg, M., Southern, P., Preice, J., Lewicki, H. 1991. «Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model : role of anti-self (virus) immune response». Cell, vol. 65, no. 2, p. 319-331.

- OLSON, J.K., Croxford, J.L., Calenoff, M.A., Dal Canto, M.C., Miller, S.D. 2001. «A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis». J. Clin. Invest., vol. 108, no. 2, p. 311-318.
- OPDENAKKER, G., Van Damme, J. 1994. «Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases». Immunol. Today, vol. 15, no. 3, p. 103-107.
- ORIGUCHI, T., Eguchi, K., Kawabe, Y., Mizokami, A., Ida, H., Nagataki, S. 1995. «Synovial cells are potent antigen-presenting cells for superantigen, staphylococcal enterotoxin B (SEB)». Clin. Exp. Immunol., vol. 99, no. 3, p. 345-351.
- PALIARD, X., West, S.G., Lafferty, J.A., Clements, J.R., Kappler, J.W., Marrack, P., Kotzin, B.L. 1991. «Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis». Science, vol. 253, no. 5017, p. 325-329.
- PANITCH, H.S. 1994. «Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis». Ann. Neurol., vol. 36, S25-28.
- PANOUTSAKOPOULOU, V., Cantor, H. 2001. «On the relationship between viral infection and autoimmunity». J. Autoimmun., vol. 16, no. 3, p. 341-345.
- PAPPENHEIMNER, A.M. 1958. «Pathology of infection with the JHM virus». J. Nat. Can. Inst., vol. 20, p. 879-801.
- PARRA, B., Hinton, D.R., Marten, N.W., Bergmann, C.C., Lin, M.T., Yang, C.S., Stohlman, S.A. 1999. «IFN-gamma is required for viral clearance from central nervous system oligodendroglia». J. Immunol., vol. 162, no. 3, p. 1641-1647.
- PARRA, B., Lin, M.T., Stohlman, S.A., Bergmann, C.C., Atkinson, R., Hinton, D.R. 2000. «Contributions of Fas-Fas ligand interactions to the pathogenesis of mouse hepatitis virus in the central nervous system». J. Virol., vol. 74, no. 5, p. 2447-2450.
- PAROLI, M., Schiaffella, E., Di Rosa, F., Barnaba, V. 2000. «Persisting viruses and autoimmunity». J. Neuroimmunol., vol. 107, no. 2, p. 201-204.
- PERCY, D.H. et Williams, K.L. 1990. «Experimental Parker's coronavirus infection in Wistar rats». Lab. Anim. Care, vol. 40, no. 6, p. 603-607.
- PERLMAN, S. 1998. «Pathogenesis of coronavirus-induced infections : Review of pathological and immunological aspects». Adv. Exp. Med. Biol., vol. 440, p. 503-513.
- PERLMAN, S., Jacobsen, G., Afifi, A. 1989. «Spread of a neurotropic murine coronavirus into the CNS via the trigeminal and olfactory nerves». Virology, vol. 170, no. 2, p. 556-560.

PERLMAN, S. et Ries, D. 1987, «The astrocyte is a target cell in mice persistently infected with mouse hepatitis virus, strain JHM». Microb. Pathog., vol. 3, no. 4, p. 309-314.

PERRY, L.L., Barzaga-Gilbert, E., Trotter, J.L. 1991. «T cell sensitization to proteolipid protein in myelin basic protein-induced relapsing experimental allergic encephalomyelitis». J. neuroimmunol., vol. 33, no. 1, p. 7-15.

POWELL, H.C., Lampert, P.W. 1975. «Oligodendrocytes and their myelin-plasma membrane connections in JHM mouse hepatitis virus encephalomyelitis». Lab. Invest., vol. 33, no. 4, p. 440-445.

RANSOHOFF, R.M., Wei, T., Pavelko, K.D., Lee, J.C., Murray, P.D., Rodriguez, M. 2002. «Chemokine expression in the central nervous system of mice with a viral disease resembling multiple sclerosis: roles of CD4+ and CD8+ T cells and viral persistence». J. Virol., vol. 76, no. 5, p. 2217-2224.

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.

REES, J.H., Soudain, S.E., Gregson, N.A., Hughes, R.A.C. 1995. «*Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barré Syndrome». N. Engl. J. Med., vol. 333, no. 21, p. 1374-1379.

REICHERT, F. et Rotshenker, S. 1999. «Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis». Exp. Neurol., vol. 160, no. 2, p. 508-514.

RIESE, R.J., Mitchell, R.N., Villadangos, J.A., Shi, G.P., Palmer, J.T., Karp, E.R., De Sanctis, G.T., Ploegh, H.L., Chapman, H.A. 1998. «Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity». J. Clin. Invest., vol. 101, no. 11, p. 2351-2363.

ROBB, J.A., Bond, C.W., Leibowitz, J.L. 1979. «Pathogenic murine coronaviruses. III. Biological and biochemical characterization of temperatures-sensitive mutants of JHMV». Virology, vol. 94, no. 2, p. 385-399.

ROSE, L.M., Richards, T.L., Peterson, J. Petersen, R., Alvord, E.C. Jr. 1997. «Resolution of CNS lesions following treatment of experimental allergic encephalomyelitis in macaques with monoclonal antibody to the CD18 leukocyte integrin». Mult. Scler., vol. 2, no. 6, p. 259-266.

SADOVNICK, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D.W., Hashimoto, S.A., Warren, S., Murray, T.J. *et al.* 1993. «A population-based study on multiple sclerosis in twins : update». Ann. Neurol., vol. 33, no. 3, p. 281-285.

SAKAI, K., Namiwaka, T., Kunishita, T., Yamanouchi, K., Tabira, T. 1986. «Studies of experimental allergic encephalomyelitis by using encephalitogenic T cell lines and clones in euthymic and athymic mice». J. Immunol., vol. 137, no. 5, p. 1527-1531.

SALAZAR-MATHER, T.P., Hamilton, T.A., Biron, C.A. 2000. «A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense». J. Clin. Invest., vol. 105, no. 7, p. 985-993.

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 coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients». Neurology, vol. 32, no. 3, p. 292-295.

SANO, H., Hsu, D.K., Yu, L., Apgar, J.R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., Liu, F.T. 2000. «Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages». J. Immunol., vol. 165, no. 4, p. 2156-2164.

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.

SCHIFFENBAUER, J., Johnson, H.M., Butfiloski, E.J., Wegrzyn, L., Soos, J.M. 1993. «Staphylococcal enterotoxins can reactivate experimental allergic encephalomyelitis». Proc. Natl. Aca. Sci. USA, vol. 90, no. 8, p. 8543-8546.

SCHIFFENBAUER, J., Soos, J., Johnson, H. 1998. «The possible roles of bacterial superantigens in the pathogenesis of autoimmune disorders». Immunol. Today, vol. 19, no. 3, p. 117-120.

SHARIF, S., Arreaza, G.A., Zucker, P., Mi, Q.-S., Sondhi, J., Naidenko, O.V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T.L., Gombert, J.-M., Leite-de-Moraes, M., Gouarin, C., Zhu, R., Hameg, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Lepault, F., Lehuen, A., Bach, J.-F., Herbelin, A. 2001. «Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes». Nat. Med., vol. 7, no. 9, p. 1057-1062.

SHEIKH, K.A., Ho, T.W., Nachamkin, I., Li, C.Y., Cornblath, D.R., Asbury, A.K., Griffin, J.W., McKhann, G.M. 1998. «Molecular mimicry in Guillain-Barre syndrome» Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 845, p. 307-321.

SHERMAN, L.A., Burke, T.A., Biggs, J.A. 1992. «Extracellular processing of peptide antigens that bind class 1 major histocompatibility molecules». J. Exp. Med., vol. 175, no. 5, p. 221-226.

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.

SIMPSON, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., Woodroffe, M.N. 2000. «Expression of the interferon-gamma-inducible chemokine IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions». Neuropathol. Appl. Neurobiol., vol. 26, no. 2, p.133-142.

SINGH, A.K., Wilson, M.T., Hong, S., Olivares-Villagómez, D., Du, C., Stanic, A.K., Joyce, S., Sriram, S., Koezuka, Y., Van Kaer, L. 2001. «Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis». J. Exp. Med., vol. 194, no. 12, p. 1801-1811.

SMITH, A.L., Bottomly, K., Winograd, D.F. 1987. «Altered splenic T cell function of BALB/cByJ mice infected with mouse hepatitis virus or Sendai virus». J. Immunol., vol. 138, no. 10, p. 3426-3430.

SMITH, M.E. 2001. «Phagocytic properties of microglia in vitro: implications for a role in multiple sclerosis and EAE». Microsc. Res. Techn., vol. 54, p. 81-94.

SOILU-HANNINEN, M., Roytta, M., Salmi, A.A., Salonen, R. 1997. «Semliki Forest virus infection leads to increased expression of adhesion molecules on splenic T-cells and on brain vascular endothelium». J. Neurovirol., vol. 3, no. 5, p.350-360.

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. 1394-1397.

SORENSEN, O. Beushausen, S., Coulter-Mackie, M., Adler, R., Dales, S. 1987a. «In vivo and in vitro models of demyelinating disease. Factors influencing the disease process caused by coronavirus infection of rats». Dans : Viruses, Immunity and mental disorders. Éd. Kurstak, E. Lipowski, Z.J., Morozov, P.V. New York, Plenum Publishing Corp, p. 199-210.

SORENSEN, O. Saravani, A., Dales, S. 1987b. «*In vivo* and *in vitro* models of demyelinating disease. XVII. The infectious process in athymic rats inoculated with JHM virus». Microb. Pathogen, vol. 2, no. 2, p. 79-90.

SORENSEN, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., Frederiksen, J.L., Ransohoff, R.M. 1999. «Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients». J. Clin. Invest., vol. 103, no. 6, p.807-815.

STEINHAEUER, D.A. et Holland, J.J. 1986. «Direct method for quantitation of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA». J. Virol., vol. 57, no. 1, p. 219-228.

STEINMAN, L. 1996 «Multiple sclerosis : a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system». Cell, vol. 85, no. 3, p. 299-302.

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

STEINMAN, R.M., 1991. «The dendritic cell system and its role in immunogenicity». Annu. Rev. Immunol., vol. 9, p. 271-296.

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., Bergmann, C.C., Lin, M.T., Cua, D.J., Hinton, D.R. 1998. «CTL effector function within the central nervous system requires CD4<sup>+</sup> T cells». J. Immunol., vol. 160, no. 6, p. 2896-2904.

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

SUN, N., Grzybicki, D., Castro, R., Murphy, S., Perlman, S. 1995. «Activation of astrocytes in the spinal cord of mice chronically infected with a neurotropic coronavirus». Virology, vol. 213, no. 2, p. 482-493.

TAKÁCS, K. et Altmann, D.M. 1998. «The case against epitope spread in experimental allergic encephalomyelitis». Immunol. Rev., vol. 164, p. 101-110.

TALBOT, P. 1995. «Implication des virus dans la sclérose en plaques». Médecine/Sciences, vol. 11, p. 837-843.

TALBOT, P.J. 1997. «Virus-induced autoimmunity in multiple sclerosis : the coronavirus paradigm». Adv. Clin. Neurosci., vol. 7, p. 215-233.

TALBOT, P.J., Arnold, D., Antel, J.P. 2001. «Virus-induced autoimmune reactions in the CNS». Curr. Top. Microbiol. Immunol., vol. 253, p. 247-271.

TALBOT, P.J., Salmi, A.A., Knobler, R.L., Buchmeier, M.J. 1984. «Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities». Virology, vol. 132, no. 2, p. 250-260.

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.

TANIGUCHI, T. Ogasawara, K., Takaoka, A., Tanaka, N. 2001. «IRF family of transcription factors as regulators of host defense». Annu. Rev. Immunol., vol. 19, p. 623-655.

THOUGH, D.F., Borrow, P., Sprent, J. 1996. «Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type 1 interferon in vivo». Science, vol. 272, no. 5270, p.1947-1950.

TIAN, J., Gregory, S., Adorini, L. Kaufman, D.L. 2001. «The frequency of high avidity T cells determines the hierarchy of determinant spreading». J. Immunol., vol. 166, no. 12, p. 7144-7150.

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.

TOMPKINS, S.M. et Miller, S.D. 2002. «An array of possibilities for multiple sclerosis». Nat. Med., vol. 8, no. 5, p. 451-453.

TORRES, B.A., Johnson, H.M. 1998. «Modulation of disease by superantigens». Curr. Opin. Immunol., vol. 10, no. 4, p. 465-470.

TOURNE, S., Miyazaki, T., Oxenius, A., Klein, L., Fehr, T., Kyewski, B., Benoist, C., Mathis, D. 1997. «Selection of a broad repertoire of CD4+ T cells in H-2Ma0/0 mice». Immunity, vol. 7, no. 2, p. 187-195.

TROLLMO, C., Meyer, A.L., Steere, A.C., Hafler, D.A., Huber, B.T. 2001. «Molecular mimicry in Lyme arthritis demonstrated at the single cell level : LFA-1 $\alpha_L$  is a partial agonist for outer surface protein A-reactive T cells». J. Immunol., vol. 166, no. 8, p. 5286-5291.

TSUBATA, T., Honjo, T. 2000. «B cell tolerance and autoimmunity». Rev. Immunogenet., vol. 2, no. 1, p. 18-25.

TUOHY, V.K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J.A., Kinkel, P.R. 1999. «Regression and spreading of self-recognition during the development of autoimmune demyelinating disease», J. Autoimmun., vol. 13, no. 1, p. 11-20.

TUOHY, V.K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J.A., Johnson, J.M., Mathisen, P.M., Weinstock-Guttman, B. 1998. «The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis». Immunol. Rev., vol. 164, p. 93-100.

- UNUTMAZ, D., Pileri, P. Abrignani, S. 1994. «Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination». J. Exp. Med., vol. 180, no. 3, p. 1159-1164.
- VANDERLUGT, C.L., Neville, K.L., Nikceвич, 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.
- VANGUIRI, P. et Farber, J.M. 1990. «Identification of CRG-2. An interferon-inducible mRNA predicted to encode a murine monokine». J. Biol. Chem., vol. 265, no. 25, p. 15049-15057.
- WADA, Y. 2001 «Estimating the number of protein-coding genes of mouse genome». J. Animal genetics, vol. 29, no. 1, p. 17-19.
- WANG, F.I., Stohlman, S.A., Fleming, J.O. 1990. «Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated». J. Neuroimmunol., vol. 30, no. 1, p. 31-41.
- WATANABE, R., Wege, H., ter Meulen, V. 1983. «Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis». Nature, vol. 305, no. 5930, p. 150-153.
- WATTS, C. 1997. «Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules». Annu. Rev. Immunol., vol. 15, p.821-850.
- WEGE, H. 1995. «Immunopathological aspects of coronavirus infections». Springer Semin. Immunopathol., vol. 17, no. 2-3, p. 133-148.
- WHITNEY, L.W., Becker, K.G., Tresser, N.J., Caballero-Ramos, C.I., Munson, P.J., Prabhu, V.V., Trent, J.M., McFarland, H.F., Biddison, W.E. 1999. «Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays». Ann. Neurol., vol. 46, no. 3, p. 425-428.
- WHITNEY, L.W., Ludwin, S.K., McFarland, H.F., Biddison, W.E. 2001. «Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions». J. Neuroimmunol., vol. 121, no. 1-2, p. 40-48.
- WIJBURG, O.L., Heemserk, M.H., Boog, C.J., Van Rooijen, N. 1997. «Role of spleen macrophages in innate and acquired immune responses against mouse hepatitis virus strain A59». Immunology, vol. 92, no. 2, p. 252-258.
- WILLIAMSON, J.S.P. et Stohlman, S. 1990. «Effective clearance of mouse hepatitis virus from the CNS requires both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells». J. Virol., vol. 64, no. 9, p. 4590-4592.

WILLIAMSON, J., Sykes, S.P.K., Stohlman, S. 1991. «Characterization of brain infiltrating mononuclear cells during infection with mouse hepatitis virus strain JHM». J. Neuroimmunol., vol. 32, no. 3, p. 199-207.

WU, G.F., Dandekar, A.A., Pewe, L., Perlman, S. 2000. «CD4 and CD8 T cells have redundant but not identical roles in virus-induced demyelination». J. Immunol., vol. 165, no. 4, p. 2278-2286.

WU, G.F. et Perlman, S. 1999. «Macrophage infiltration, but not apoptosis, is correlated with immune-mediated demyelination following murine infection with a neurotropic coronavirus». J. Virol., vol. 73, no. 10, p. 8771-8780.

WUCHERPFENNIG, K.W. 2001. «Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents». J. Clin. Invest., vol. 108, no. 8, p.1097-1104.

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.

XUE, S. et Perlman, S. 1997. «Antigen specificity of CD4 T cell response in the central nervous system of mice infected with mouse hepatitis virus». Virology, vol. 238, p. 68-78.

YU, M., Johnson, J.M., Tuohy, V.K. 1996. «A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis : a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease». J. Exp. Med., vol. 183, no. 4, p. 1777-1788.

ZHAO, Z.S., Granucci, F., Yeh, L., Schaffer, P.A., Cantor, H. 1998. «Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection». Science, vol. 279, no. 5355, p. 1344-1347.