

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN  
VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

SOPHIE ÉKANDÉ

ÉTUDE DE L'INFECTION DE CELLULES NERVEUSES HUMAINES  
PAR LE CORONAVIRUS HUMAIN 229E

DECEMBRE 1993

Aucun homme ne peut rien nous révéler  
sinon ce qui repose déjà à demi endormi dans l'aube de notre connaissance.  
Pour tous ceux qui aiment les sciences,  
à Daniel,  
à mes parents,  
pour tout leur appui et leur amour.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
SOMMAIRE	xv
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. Historique	5
2. Classification	6
2.1. Relation antigénique entre les différents coronavirus	6
3. Structure et organisation	9
3.1. Protéines structurales	9
3.1.1. Protéine de surface (S)	9
3.1.2. Protéine de membrane (M)	12
3.1.3. Nucléoprotéine (N)	15
3.1.4. Hemagglutinine esterase	16
3.2. Protéines non structurales (ns)	17
3.2.1. Localisation des ARNm	17
3.2.2. Rôle des protéines non structurales	18
3.3. Lipides viraux	22
3.4. Génome	23
4. Réplication virale	24
4.1. Transcription des ARNm	26
4.2. Synthèse des protéines	27
4.3. Morphogénèse	28
5. Coronavirus et pathogénèses	28
5.1. Neurotropisme des coronavirus murins	30
5.2. Influence de la voie de l'inoculum	31
5.2.1. Inoculation intranasale	31
5.2.2. Inoculation intracérébrale	31
5.3. Influence de la souche virale	32
5.3.1. Importance de la protéine HE	32
5.3.2. Importance de la protéine S	33
5.4. Influence de l'hôte	33
5.4.1. Age	33
5.4.2. Statut immunitaire	34
5.4.3. Génotype	35
5.5. Susceptibilité différentielle des cellules nerveuses	35
5.6. Neurotropisme des coronavirus humains	37
6. Sclérose en plaques	40

6.1. Caractères pathologiques	40
6.2. Caractères cliniques	40
6.3. Les hypothèses étiologiques	41
6.3.1. Facteurs épidémiologiques	41
6.3.1.1. Distribution géographique	41
6.3.1.2. Études sur les migrations des peuples	42
6.3.2. Facteurs génétiques	43
6.3.3. Autres facteurs de susceptibilité	44
6.3.4. Les agents infectieux	46
MATÉRIEL ET MÉTHODES	48
1. Cellules	49
1.1. Lignées cellulaires	49
1.1.1. Fibroblastes	49
1.1.2. Cellules nerveuses	49
1.1.2.1. Neurones	49
1.1.2.2. Cellules gliales	50
1.2. Culture cellulaire	50
2. Virus	51
2.1. Souche virale	51
2.2. Production de virus	51
3. Radiomarquage métabolique des protéines virales	52
3.1. Concentration virale: précipitation au PEG	53
3.2. Purification sur gradients de densité	54
3.2.1. Semi-purification	54
3.2.2. Purification	55
4. Radio-immunoprécipitation	55
4.1. Tampon RIPA	55
4.2. Préparation de la protéine A-Sepharose	56
4.3. Préparation des anticorps monoclonaux	56
4.4. Préparation des antigènes viraux marqués au [ <sup>35</sup> S]	56
4.5. Immunoprécipitation	57
5. Analyse protéique sur gel polyacrylamide	58
5.1. Unité électrophorétique	58
5.2. Composition des gels et du tampon	58
5.2.1. Gel polyacrylamide 7,5 %	58
5.2.2. Gel de gradient continu de polyacrylamide 7-15%	59
5.3. Traitement des échantillons et électrophorèse	59
5.3.1. Traitement des échantillons	59
5.3.2. Électrophorèse	60
6. Anticorps monoclonaux	61
6.1. Description, quantification et digestion pepsinique	61
6.1.1. Anticorps monoclonaux anti-229E	61

	v
6.1.2. Anticorps monoclonal anti-RSV bovin	62
6.1.3. Précipitation au sulfate d'ammonium	62
6.1.4. Détermination de la concentration d'immunoglobulines	61
6.1.5. Production de fragments F(ab') <sub>2</sub>	64
6.1.5.1. Traitement à la pepsine	64
6.1.5.2. Cinétique de digestion	64
6.2. Chromatographie d'affinité	65
6.2.1. Dialyse	65
6.2.2. Chromatographie	65
7. Infection des cellules	67
7.1. Infection des cellules en vue d'un test d'immunofluorescence indirecte	67
7.1.1. Test d'immunofluorescence indirecte	68
7.2. Infection des cellules en vue d'un test de plaque et d'immunoperoxydase indirecte	69
7.2.1. Cinétique d'infection	70
7.2.2. Mesure de l'infectivité	71
7.2.2.1. Test de plages	71
7.2.2.2. Test d'immunoperoxydase indirecte	72
8. Test de compétition de liaison du virus en présence d'un anticorps anti-aminopeptidase N	74
8.1. Immunofluorescence	74
8.2. Radiomarquage métabolique	75
ANNEXE I	77
RÉSULTATS	80
1. Stock viral	81
2. Cellules	81
3. Détection des antigènes viraux par immunofluorescence indirecte	81
4. Digestion pepsinique	84
5. Détection des antigènes viraux par immunofluorescence indirecte en présence d'immunoglobulines complètes et de fragments F(ab') <sub>2</sub>	85
6. Fluorographie des protéines du HCV-229E marqués à la [ <sup>35</sup> S]méthionine	87
7. Spécificité de l'anticorps monoclonal 5-11H.6	87
8. Cinétiques de croissance virale sur les différentes lignées cellulaires	88
8.1. Titrage par plages de lyse	89
8.2. Titrage par test d'immunoperoxydase indirecte	90
9. Tests de compétition de liaison virale	92
9.1. Immunofluorescence indirecte	92
9.2. Liaison de virus radioactifs	94
DISCUSSION	191

CONCLUSION  
REMERCIEMENTS  
BIBLIOGRAPHIE

203  
206  
208

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I. Coronavirus: nom, hôtes naturels, infection	7
Tableau 1. Détection des antigènes viraux par IFI à 20h pi, moi=0,01, en présence des ascites 3-10H.5, 5-1C.4, 4-9H.5	95
Tableau 2. Détection des antigènes viraux par IFI à 20h pi, moi=0,1, en présence des ascites 3-10H.5, 5-1C.4, 4-9H.5	97
Tableau 3. Détection des antigènes viraux par IFI à 20h pi, moi=1, en présence des ascites 3-10H.5, 4-9H.5	99
Tableau 4. Détection des antigènes viraux par IFI à 40h pi, moi=1, en présence des ascites 3-10H.5, 5-1C.4, 4-9H.5	101
Tableau 5. Test de compétition de liaison sur le récepteur aminopeptidase N par IFI à 20h post-infection	173
Tableau 6. Test de compétition de liaison sur le récepteur aminopeptidase N par IFI à 40h post-infection	175
Tableau 7. Test de compétition de liaison sur le récepteur aminopeptidase N avec du virus radiomarqué à la [ <sup>35</sup> S]méthionine	189

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1.	Structures moléculaire et génomique des coronavirus	10
Figure 2.	Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée L132 en présence des anticorps monoclonaux 3-10H.5 et 2-E.5	103
Figure 3.	Cellules L132 non infectées en IFI	105
Figure 4.		
a.b.	Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée L132 en présence des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5	107
Figure 5.	Électrophorèse sur gel polyacrylamide 7,5% des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5 après 8h de digestion pepsinique	109
Figure 6.	Électrophorèse sur gel polyarylamide 7,5% des anticorps monoclonaux 2-E.5 après 9h et 10h de digestion pepsinique	111
Figure 7.		
c.d.	Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée L132 en présence des fragments F(ab') <sub>2</sub> des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5	113
Figure 8.	Cellules SK-N-SH non infectées en IFI	115
Figure 9.		
a.b.	Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée SK-N-SH en présence des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5	117
Figure 9.		
c.d.	Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée SK-N-SH en présence des fragments F(ab') <sub>2</sub> des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5	119
Figure 10.	Cellules H4 non infectées en IFI	121

Figure 11.		
a.b. Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée H4 en présence des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5		123
Figure 11.		
c.d. Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée H4 en présence des fragments F(ab') <sub>2</sub> des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5		125
Figure 12. Cellules MO3.13 non infectées en IFI		127
Figure 13		
a.b. Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée MO3.13 en présence des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5		129
Figure 13		
c.d. Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée MO3.13 en présence des fragments F(ab') <sub>2</sub> des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5		131
Figure 14. Cellules TE-671 non infectées en IFI		133
Figure 15		
c.d. Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée TE-671 en présence des fragments F(ab') <sub>2</sub> des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5		135
Figure 16. Cellules U-87 MG non infectées en IFI		137
Figure 17		
a.b. Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée U-87 MG en présence des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5		139
Figure 17		
c.d. Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée U-87 MG en présence des fragments F(ab') <sub>2</sub> des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5		141
Figure 18. Cellules U-373 MG non infectées en IFI		143

Figure 19	
a.b. Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée U-373 MG en présence des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5	145
Figure 19	
c.d. Détection des antigènes viraux par IFI sur la lignée U-373 MG en présence des fragments F(ab') <sub>2</sub> des anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5	147
Figure 20. Fluorographie des protéines du HCV-229E marquées à la [ <sup>35</sup> S]méthionine	149
Figure 21. Autoradiogramme des protéines du HCV-229E marquées à la [ <sup>35</sup> S]méthionine après immunoprécipitation avec l'anticorps 5-11H.6	151
Figure 22. Autoradiogramme des protéines du HCV-229E marquées à la [ <sup>35</sup> S]méthionine après immunoprécipitation avec l'anticorps 2-E.5	153
Figure 23. Cinétique de réplication sur les cellules L132 par test de plaques	155
Figure 24. Cinétique de réplication sur les cellules SK-N-SH par test de plaques	157
Figure 25. Test d'immunoperoxydase indirecte	159
Figure 26. Cinétique de réplication sur les cellules L132 par test d'immunoperoxydase indirecte	161
Figure 27. Cinétique de réplication sur les cellules SK-N-SH par test d'immunoperoxydase indirecte	163
Figure 28. Cinétique de réplication sur les cellules H4 par test d'immunoperoxydase indirecte	165
Figure 29. Cinétique de réplication sur les cellules MO3.13 par test d'immunoperoxydase indirecte	167

M	: glycoprotéine matricielle
MO3.13	: cellules oligodendrocytes humaines
MEM	: Earle's Minimum Essential Medium
MHV	: virus de l'hépatite murine
MOI (moi)	: multiplicité d'infection
N	: nucléoprotéine
ns	: non structurale
ORF	: cadre de lecture ouvert
PBS	: tampon salin phosphaté
PCR	: réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	: facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG	: polyéthylèneglycol
pi	: post-infection
p/v	: poids sur volume
RER	: réticulum endoplasmique rugueux
RNP	: ribonucléoprotéine
RIPA	: test de radioimmunoprécipitation
S	: glycoprotéine de surface (péplomère)
<sup>35</sup> S	: isotope du soufre 32
SDS	: dodécyl sulfate de sodium
SK-N-SH	: cellules de neuroblastomes humains

SNC	: système nerveux central
SP	: sclérose en plaques
TCR	: récepteur des cellules T
TCV	: coronavirus de la dinde
TE-671	: cellules de rhabdomyosarcome humain
TGEV	: virus de la gastroentérite transmissible porcine
TMEN	: tri-acide maléate, EDTA, NaCl
UFP/ml	: unité formatrice de plages par ml
U-373 MG	: cellule de glioblastome humain
U-87 MG	: cellule de glioblastome humain
v/v	: volume sur volume

## SOMMAIRE

Ce travail visait à vérifier la susceptibilité et la permissivité à l'infection du coronavirus 229E sur des cellules du SNC humain en culture continue.

Nous avons démontré une telle infection sur les neurones, oligodendrocytes et astrocytes en détectant les antigènes viraux sur les cellules infectées par le test d'immunofluorescence indirecte. Pour détecter ces antigènes viraux nous utilisons un anticorps monoclonal 5-11H.6, anti-HCV 229E, dont la spécificité n'a pu être mise en évidence par la méthode de radio-immunoprécipitation très probablement du fait de la difficulté à solubiliser les protéines virales dans des conditions optimales, sans pour autant en affecter les propriétés biologiques et conformationnelles.

Nous avons quantifié la production de particules virales infectieuses sur ces différentes lignées cellulaires en utilisant la méthode du test par plages de lyse. Suite à des problèmes techniques ne permettant plus de détecter des plages de lyse nous avons eu recours à une méthode alternative soit le titrage des antigènes viraux par immunoperoxydase indirecte.

Ce travail, d'autre part, nous a permis de mettre en évidence une activité Fc réceptrice pour les immunoglobulines de type G sur les cellules infectées par le HCV-229E.

Enfin des études préliminaires nous permettent de supposer que les cellules nerveuses humaines en culture continue pourraient utiliser le récepteur aminopeptidase N pour la phase initiale d'adsorption dans le cycle viral. Ceci a été mis en évidence par

compétition de liaison du virus avec un anticorps RBS anti-aminopeptidase N en utilisant d'une part le test d'immunofluorescence indirecte dans le cas des lignées de cellules nerveuses SK-N-SH, H4, U-87 MG et de la lignée de cellules de fibroblastes de poumon humain L132, et d'autre part, seulement dans le cas de la lignée de fibroblastes, par compétition de liaison du virus avec un anticorps RBS anti-aminopeptidase N par marquage radiactif des protéines virales.

**INTRODUCTION**

Les coronavirus appartiennent à un groupe de virus infectant un grand nombre d'espèces animales. Les pathologies associées à ces infections sont généralement respiratoires, gastrointestinales ou neurologiques. Les coronavirus humains, représentés par les souches prototypes OC43 et 229E (Macnaughton, 1980), sont les agents responsables d'un nombre considérable de rhumes (Wege *et al.*, 1982) et d'infections gastroentériques (Resta *et al.*, 1985; Battaglia *et al.*, 1987). Cependant, l'isolement de coronavirus à partir de coupes de cerveau de deux patients atteints de sclérose en plaques (Burks *et al.*, 1980), l'infection de primates avec cet isolat coronaviral résultant en une panencéphalite sous aiguë ou à une démyélinisation (Murray *et al.*, 1992b), et enfin, la détection du génome du coronavirus 229E à partir de coupes de cerveau provenant de l'autopsie de patients atteints de sclérose en plaques (Stewart *et al.*, 1992), suggèrent qu'il pourrait y avoir une association entre les coronavirus et des maladies démyélinisantes humaines. L'isolement de ces virus est souvent difficile, ainsi que leur propagation en culture de tissus, ceci étant probablement dû à la spécificité d'espèces dont ils font preuve ou encore à la restriction du tropisme tissulaire. Nous savons que les coronavirus humains se répliquent dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire, que des fibroblastes et des astrocytes de cerveau de souris sont susceptibles et productives en culture primaire pour la réplication du HCV-OC43 (Pearson et Mims, 1985). Enfin, une infection persistante du HCV-OC43 au niveau de glioblastomes et de rhabdomyosarcomes humains a aussi été rapportée (Collins et Sorensen, 1986). Par contre, le tropisme du

coronavirus 229E est beaucoup moins documenté, cependant, sa présence dans la substance grise et blanche du cerveau de patients atteints de sclérose en plaques (Stewart *et al.*, 1992) a poussé notre laboratoire à investiguer la susceptibilité de cellules nerveuses humaines en culture continue à l'infection du HCoV-229E. Dans notre étude nous voulons démontrer que des lignées continues de cellules neurales (neuroblastomes et glioblastomes) et gliales (astrocytes et oligodendrocytes) d'origine humaine peuvent porter des récepteurs spécifiques pour la souche 229E et être susceptibles à l'infection par ce virus. D'autre part nous voulons vérifier si ces cellules peuvent supporter un cycle productif de réplication virale. Ces travaux constituent une première étape dans la démonstration du neurotropisme des coronavirus humains.

100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Historique

Si l'on doit parler d'historique concernant les virus, il est indéniable de reconnaître les travaux de Pasteur comme un lien entre la notion de virus et la découverte ultérieure de leurs caractères particuliers, découverte qui fut réalisable à partir du moment où l'un des outils le plus indispensable à la science, le microscope électronique, fut expérimenté.

C'est par ce même biais qu'a commencé l'historique des coronavirus lorsque Schalk et Hawn en 1931 décrivaient une bronchite infectieuse aviaire qui se distinguait des autres maladies respiratoires trouvées chez le poulet. L'agent responsable de cette maladie fut caractérisé en microscopie électronique en 1937 par Beaudette et Hudson. D'autres groupes de coronavirus animaux furent découverts par la suite; par exemple, le virus de l'hépatite murine (MHV) (Cheever *et al.*, 1949; Gledhill et Andrewes 1951), et le virus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV) en 1946 (Doyle et Hutchings). Dans les années 1960, grâce à l'introduction des cultures d'organes, les coronavirus humains (Tyrrell et Bynoe, 1965; Hamre et Procknow, 1966; McIntosh *et al.*, 1967) ont fait leur apparition. C'est à ce moment qu'une relation entre les trois groupes de virus affectant les volailles, les souris et les porcs fut établie. Puis le nombre et l'importance des coronavirus animaux a augmenté rapidement avec la découverte de virus pouvant affecter un plus large spectre d'hôtes tels le rat, la dinde, le chien, le chat, et le bétail. Ces différents types de virus sont classifiés sur la base de plusieurs caractéristiques fondamentales qui sont, la taille variant de 120 à 160 nm de diamètre, leur pléomorphisme, leur labilité, le type de

### 3. Structure et organisation

Les virions des coronavirus sont sphériques, enveloppés, d'une taille variant de 80 à 160 nm de diamètre. Des structures en formes de projections de 20 nm de longueur recouvrent la totalité du virion (Sturman *et al.*, 1980) donnant au coronavirus l'apparence caractéristique d'une couronne (figure 1). Chez le TCV, ces projections sont de plus petites tailles (Dea et Tijssen, 1988). À l'intérieur de l'enveloppe réside une nucléocapside hélicoïdale de 6 à 8 nm que l'on peut extraire par traitement au NP-40 ou au Triton X-100 (Sturman *et al.*, 1977; Sturman *et al.*, 1980). La forme hélicoïdale de cette nucléocapside attire notre attention puisque ce type de nucléocapside est généralement associée à des virus possédant un génome à ARN de polarité négative (Lai, 1990) tandis que le génome des coronavirus est un ARN de polarité positive, les virus à ARN positifs étant généralement de symétrie icosahédrique. Ce détail pourrait avoir des implications fonctionnelles au niveau du mécanisme de synthèse de l'ARN des coronavirus (Lai, 1990).

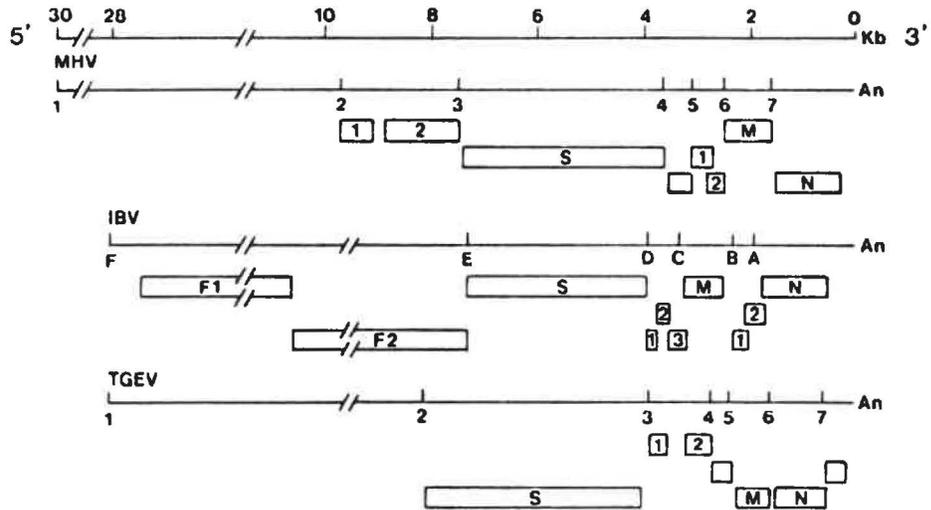
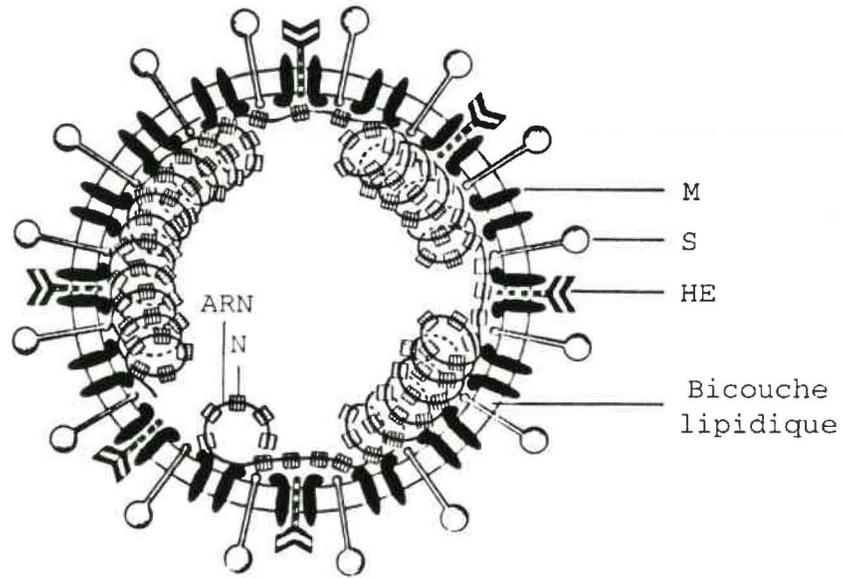
#### 3.1. Protéines structurales

Les coronavirus sont caractérisés par la présence de trois à quatre protéines structurales et une variété de fonctions sont attribuées à celles-ci.

##### 3.1.1. Protéine de surface (S)

Cette protéine S, anciennement nommée protéine E2 ou gp180, s'agence sous forme de projections sur l'enveloppe virale et confère aux particules l'aspect

FIGURE 1  
STRUCTURES MOLÉCULAIRE ET GÉNOMIQUE DES CORONAVIRUS



Légende: chiffres 1 à 7 et lettres A à F: nomenclature des ARN<sub>m</sub> correspondants.

coronaviriforme caractéristique. C'est une glycoprotéine de 180 kDa que l'on retrouve fréquemment clivée en deux protéines de 90 kDa chez la plupart des coronavirus (Cavanagh, 1983; Deregt *et al.*, 1987b; Sturman *et al.*, 1985). Chez le MHV, ce clivage médiatisé par des protéases cellulaires est requis pour initier l'infection virale (Sturman *et al.*, 1985), et il semble aussi que ce clivage, bien que variant d'une souche à l'autre, soit important pour initier l'activation de la fusion cellulaire (Frana *et al.*, 1985). Certains auteurs pensent que ce clivage associé au degré de glycosylation puisse être un facteur déterminant dans l'établissement d'une infection persistante qui, dans le cas des coronavirus murins, peut aboutir à une maladie démyélinisante du SNC. Chez d'autres coronavirus, comme le FIPV et le TGEV, la protéine S n'est pas clivée. Le gène de la protéine S est séquencé pour plusieurs souches: IBV (Binns *et al.*, 1985; Niester *et al.*, 1986; Binns *et al.*, 1986a), MHV-JHM (Schmidt *et al.*, 1987), MHV-A59 (Luytjes *et al.*, 1987), TGEV (Rasschaert et Laude, 1987; Jacobs *et al.*, 1987), FIPV (De Groot *et al.*, 1987), HCV-229E (Raabe *et al.*, 1990) et HCV-OC43 (Mounir et Talbot, 1993b). La séquence prédite de la protéine suggère qu'elle contient une séquence signal N-terminale et un domaine hydrophobe C-terminal contenu dans la membrane. On retrouve aussi des chaînes de sucres N-liés (Stern et sefton, 1982a; Sturman et Holmes, 1985). La protéine S est responsable de l'attachement du virus aux récepteurs sur les cellules cibles (Williams *et al.*, 1991; Delmas *et al.*, 1992; Yeager *et al.*, 1992). Dans le cas du MHV, elle se lie à un membre de la famille des antigènes carcinoembryonnaires, un récepteur de 110 kDa (Boyle *et al.*, 1987) et est donc indispensable pour la phase initiale du cycle d'infection.

Il semble que le HCV-229E se lie à l'aminopeptidase N (Yeager *et al.*, 1992). En ce qui concerne les autres rôles de la glycoprotéine S, on peut citer l'induction de la fusion cellulaire (Collins *et al.*, 1982; Vennema *et al.*, 1990), son intervention dans la production d'anticorps neutralisants (Collins *et al.*, 1982; Wege *et al.*, 1984; Spaan *et al.*, 1988; Daniel et Talbot, 1990), et son implication dans l'immunité cellulaire (Körner *et al.*, 1991, 1992). Des études portant sur des mutants du MHV-JHM sélectionnés pour leur résistance à des anticorps monoclonaux ont permis d'identifier des épitopes impliqués dans la neurovirulence. L'utilisation de peptides pour l'immunisation de souris, couvrant la séquence en acides aminés des résidus 993 à 1002 de la sous-unité S2 de la protéine S, a démontrée une haute production d'anticorps neutralisants qui protégeaient les souris d'une encéphalomyélite suite à une épreuve virale (Talbot *et al.*, 1988). Des rats inoculés avec le MHV-JHM, qui cause une encéphalomyélite sous-aiguë démyélinisante, produisent des cellules CD4+ spécifiques à la protéine S et qui protègent les nouveaux nés d'une infection avec une dose normalement létale de MHV-JHM (Körner *et al.*, 1991).

### 3.1.2. Protéine de membrane (M)

Cette deuxième protéine structurale, désignée protéine M ou selon l'ancienne nomenclature E1 ou gp23, est aussi une glycoprotéine intégrée à la membrane du virion. Les séquences nucléotidiques du gène de la protéine M du MHV-A59 et du MHV-JHM (Armstrong *et al.*, 1984; Pfeleiderer *et al.*, 1986), du IBV-Beaudette et du IBV-6/82

(Boursnell *et al.*, 1984; Binns *et al.*, 1986b), du BCV (Lapps *et al.*, 1987a), du TGEV (Laude *et al.*, 1987), du HCV-229E (Jouvenne *et al.*, 1990) et du HCV-OC43 (Mounir et Talbot, 1992) permettent d'estimer que cette protéine est constituée d'environ 225 à 245 acides aminés, avec une prédominance de résidus méthionine (Sturman, 1977). On retrouve essentiellement trois domaines: une partie hydrophile à l'extrémité N-terminale, contenant tous les oligosaccharides de la protéine représente environ 10% de la protéine et est exposée à la surface de la membrane; une section hydrophobe en hélice  $\alpha$  qui constitue la majorité de la protéine et traverse la membrane trois fois (Armstrong *et al.*, 1984; Rottier *et al.*, 1984; Rottier *et al.*, 1986), et finalement un troisième domaine qui correspond à la surface interne de l'enveloppe. Cette dernière partie n'a pas plus de propriétés hydrophiles que hydrophobes et peut interagir avec la nucléocapside du virion. Par contre, le domaine de M qui interagit avec la ribonucléoprotéine est inconnu (Sturman *et al.*, 1980). Cette interaction peut être le point cible pour l'assemblage des particules virales, étant donné que le bourgeonnement viral semble apparaître au site d'accumulation de la protéine M (Tooze *et al.*, 1984). La protéine M est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux et est ensuite transportée vers l'appareil de Golgi, où elle est glycosylée. Le degré de glycosylation de cette protéine varie, de même que le type de liens des sucres (O-liés ou N-liés) et le degré avec lequel les sucres N-liés riches en mannose sont convertis en sucres complexes. La glycosylation de M est O-liée chez les MHV, BCV, OC43 (Holmes *et al.*, 1981b; Deregt *et al.*, 1987b; Mounir et Talbot, 1992). Chez le MHV, l'analyse chimique des hydrates de carbonnes montre que la molécule

possède du galactose, de la N-acétyl glucosamine et de la N-acétyl galactosamine, ainsi que de l'acide neuraminique. Une telle composition de sucre prédit fortement des chaînes oligosaccharidiques O-liées sur la glycoprotéine virale (Niemann et Klenk, 1981a, 1981b). Chez le IBV, et le TGEV (Laude *et al.*, 1987; Stern et Sefton, 1982a), cette glycosylation est de type N-liée. Un site de N-glycosylation (Asn-5) et trois sites de O-glycosylation (Ser-2, thr-7, Thr-12) ont été trouvés près de la région N-terminale du HCV-229E en se basant sur la séquence prédite en acides aminées (Jouvenne *et al.*, 1990). La glycosylation est sensible à un traitement à la tunicamycine, ce qui laisse présumer que chez le HCV-229E cette protéine est au moins partiellement N-glycosylée (Arpin et Talbot 1988; Jouvenne *et al.*, 1993). Toujours en présence de tunicamycine chez le MHV et le IBV cette fois, il a été démontré que les virions étaient dépourvus de protéines S mais contenaient la RNP (Holmes *et al.*, 1981a; Rottier *et al.*, 1981; Stern et Sefton 1982a), ceci indiquant que la glycosylation de la protéine M est nécessaire à la maturation du virus. Des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine M peuvent avoir une activité neutralisante, mais seulement en présence du complément (Collins *et al.*, 1982). La possibilité que M puisse jouer d'autres rôles que l'on associe à la protéine S tel l'interaction du virion avec des récepteurs cellulaires, la production d'une réponse immunitaire cellulaire, et l'induction de la fusion cellulaire n'est pas écartée.

### 3.1.3. Nucléoprotéine (N)

La nucléoprotéine N est la protéine la plus abondante dans le virion et dans les cellules infectées. Cette accumulation lors de l'infection peut jouer un rôle pour déterminer le passage de la transcription à la réplication (Stohlman et Lai, 1979). Il s'agit d'une protéine de 382-455 acides aminés tel que prédit par l'analyse des séquences nucléotidiques du MHV souche A59 (Armstrong *et al.*, 1983) et JHM (Skinner et Siddell, 1983), de l'IBV Beaudette et M41 (Boursonnell *et al.*, 1985a), du TGEV (Kapke et Brian, 1986), du BCV (Lapps *et al.*, 1987b), du HCV souche OC43 (Kamahora *et al.*, 1989) et 229E (Schreiber *et al.*, 1989). Cette protéine est associée à l'ARN génomique pour former la nucléocapside hélicoïdale et possède une masse moléculaire de 50 à 60 kDa (Stohlman et Lai, 1979). Elle est relativement riche en arginine et en acide glutamique (Sturman, 1977) et est phosphorylée au niveau de résidus sérine par un enzyme ayant les caractéristiques d'une protéine kinase indépendante de l'AMP cyclique (Stohlman et Lai, 1979; Siddell *et al.*, 1981). Cependant il n'est pas encore connu si cet enzyme est codé par le virion ou s'il s'agit d'une protéine cellulaire séquestrée dans le virion. Parker et Masters, en 1990, ont démontré trois régions hautement conservées en considérant cinq souches de MHV. Ils supposent que ces régions devraient correspondre à des domaines fonctionnels. En effet, parmi ces régions, deux sont très basiques ce qui devrait faciliter la liaison avec l'ARN, tandis que la troisième région au niveau de l'extrémité C-terminale est acide. Cette protéine possède des épitopes immunodominants puisque le transfert de lymphocytes T CD4+ dirigés contre ces épitopes protège des rats inoculés

intracébralement par des doses létales de MHV-JHM d'une encéphalite aiguë (Körner *et al.*, 1991).

#### 3.1.4. Hémagglutinine estérase (HE)

Cette glycoprotéine HE, anciennement nommée E3 ou gp65 en regard à sa masse moléculaire de 65 kDa, est essentiellement retrouvée chez le BCV, HCV-OC43, HEV et TCV, mais jamais chez les coronavirus des groupes antigéniques 1 et 3 (Callebaut *et al.*, 1988; Callebaut et Pensaert, 1980; Dea et Tijssen, 1988; Deregt *et al.*, 1987a; Hogue et Brian, 1986). Le fait qu'il existe une certaine homologie entre la séquence nucléotidique de la HE du génome d'un coronavirus murin et la sous unité HA<sub>1</sub> de la glycoprotéine de l'influenza C suggère que ceci pourrait être le résultat d'une recombinaison du génome d'un coronavirus ancestral avec l'ARNm de la glycoprotéine de l'influenza C (De Groot, 1989; Luytjes *et al.*, 1988). Ceci peut s'expliquer par le mode particulier et unique de réplication qu'utilise ces virus. En effet, la production de recombinants entre coronavirus, ou entre coronavirus et un autre virus peut apparaître si l'ARN polymérase ARN-dépendante se lie à plusieurs brins d'ARN lors de la réplication. La HE du BCV et du HCV-OC43 se lie spécifiquement à des acides neuraminiques 9-O-acétylés sur la membrane des érythrocytes et autres cellules. Cette propriété d'hémagglutination et d'hémadsorption peut être utilisée pour identifier des cultures de cellules infectées. De plus, elle possède une activité acétyl estérase qui lui permet d'éluer des virus adsorbés sur les membranes des érythrocytes en détruisant les résidus d'acide neuraminique 9-O-

acétylés des surfaces membranaires (Vlasak *et al.*, 1988).

### 3.2. Protéines non structurales (ns)

En plus des gènes codant les protéines structurales, on retrouve sur le génome des coronavirus des cadres de lecture ouverts codant des protéines non structurales. Ces cadres de lecture ouverts varient à la fois en nombre et dans la position qu'ils occupent dans le génome selon la souche virale considérée (Spaan *et al.*, 1988; Lai, 1990).

De façon générale, le plus grand de ces gènes codant des protéines non structurales est situé à l'extrémité 5' du génome et code l'ARN polymérase ARN dépendante (Pachuk *et al.*, 1989; Soe *et al.*, 1987b).

#### 3.2.1. Localisation des ARNm codant pour des protéines non structurales

Chez le HCV-229E on retrouve deux ARNm, l'ARNm4 qui possède deux cadres de lecture ouverts et l'ARNm5 qui possède un seul cadre de lecture ouvert (Jouvenne *et al.*, 1992). Cependant peu d'études concluantes ont été réalisées quant à l'expression de ces gènes ou à l'analyse des produits d'expression de ces gènes.

On retrouve chez les espèces IBV, TGEV, MHV et HCV-OC43 trois cadres de lecture ouverts entre les gènes codant les protéines structurales S et M et pour le BCV quatre cadres de lecture ouverts entre les gènes des protéines structurales S et M. De plus, pour l'IBV, on retrouve deux cadres de lecture ouverts additionnels entre M et N (Bournsnell *et al.*, 1987b), un cadre de lecture ouvert en aval du gène de la protéine N du

TGEV (Kapke et Brian, 1986; Kapke *et al.*, 1988), un cadre de lecture ouvert en amont du gène codant la protéine HE du MHV (Lai, 1990) du BCV (Abraham *et al.*, 1990; Cox *et al.*, 1989) et du HCV-OC43 (Mounir et Talbot, 1992). Un trait intéressant pour le BCV (Abraham *et al.*, 1990), le MHV-A59 (Armstrong *et al.*, 1983) et le HCV-OC43 (Senanayake *et al.*, 1992) est la présence d'un cadre de lecture ouvert situé à l'intérieur du gène codant la protéine N, bien que pour le HCV-OC43 ce cadre de lecture ne semble pas être fonctionnel lors de la traduction étant donné qu'il ne possède pas de codon d'initiation.

### 3.2.2. Rôle des protéines non structurales

Ces dernières années, nombre de chercheurs se sont penchés sur le rôle éventuel que certaines de ces protéines non structurales pourraient jouer dans le cycle de réplication virale.

Pour le MHV, parmi les trois cadres de lecture situés entre S et M, deux d'entre eux (ORF<sub>4</sub> et ORF<sub>5</sub>) codent respectivement deux petites protéines de 10 à 15 kDa que l'on identifie dans les cellules suite à une infection (Ebner *et al.*, 1988; Leibowitz *et al.*, 1988). À l'extrémité 5' du gène HE se trouve un troisième cadre de lecture ouvert (ORF<sub>6</sub>) qui code un polypeptide de 30 kDa qui ne possède ni site de N-glycosylation ni les caractères d'une protéine de membrane (Luytjes *et al.*, 1988; Shieh *et al.*, 1989). Cependant, la séquence prédite en acide aminés de la protéine du gène ns<sub>2</sub> pourrait lui attribuer un rôle dans la réplication virale (Luytjes *et al.*, 1988). Cette supposition vient récemment d'être

remise en question par Schwarz *et al.*(1990) qui concluent que ce gène n'est pas essentiel pour la réplication virale dans des cultures de cellules en lignées continues. Cependant, un parallèle pourrait être fait avec la protéine HE qui elle aussi chez certaines souches du MHV n'était pas fonctionnelle pour la réplication virale et ce malgré les indications de sa fonction acétyl estérase (Vlasak *et al.*, 1988).

En fait, il serait possible que la fonction de certaines protéines non structurales ne se manifeste que sur des cellules en culture primaire ou tout simplement *in vivo*.

Chez le TGEV, quatre cadres de lecture ouverts codant des protéines non structurales ont été déduits, deux d'entre eux sont exprimés sur le même ARNm, l'ARNm3 (Rasschaert *et al.*, 1987; Kapke *et al.*, 1988; Britton *et al.*, 1989). Ce cadre de lecture ouvert n'existe pas chez tous les variants du TGEV (Wesley *et al.*, 1990) et donc ne semble pas être indispensable pour la réplication virale. Le cadre de lecture ouvert (ORF<sub>4</sub>) code un polypeptide hydrophobe, dont Godet *et al.*(1992) rapportent l'expression dans des cellules infectées et sur les virions. Ils concluent qu'il code un nouveau polypeptide structural associé au virion qui existe chez toutes les autres espèces coronavirales, au niveau du cadre de lecture 5 du HCV, 5b du MHV, 6 du BCV, 3c de l'IBV ainsi que chez le FIPV, soit de façon toujours adjacente au gène qui code la protéine M. Le rôle spéculé du produit de ce gène se manifesterait au niveau de l'assemblage ou du relargage du virion.

Un dernier cadre de lecture est localisé en aval du gène N de BCV et TGEV (Kapke et Brian, 1986; Rasschaert *et al.*, 1987; Britton *et al.*, 1988). En ce qui concerne

le BCV, un cadre de lecture 2 (ORF<sub>2</sub>), situé en amont du gène codant la protéine HE a été identifié et code une protéine de 32 kDa (Cox *et al.*, 1989). Il existe des similitudes entre cette protéine et la protéine ns<sub>2</sub> du MHV. En 1991, Cox *et al.* démontrent que la protéine ns<sub>2</sub> est localisée dans le cytosol de cellules infectées et qu'il s'agit d'une phosphoprotéine. Des protéines non structurales phosphorylées chez d'autres virus à ARN de polarité positive sont impliquées dans la réplication virale (De Groot *et al.*, 1990; Hardy *et al.*, 1990), ce qui suggère un tel rôle dans le cas présent. Cependant, il n'est pas encore déterminé si cette protéine est une protéine essentielle pour la croissance du virus et de ce fait il est impossible de déterminer sa fonction *in vitro* comme c'est le cas pour la protéine ns<sub>2</sub> du MHV-JHM.

Chez l'IBV, on retrouve six espèces majeures d'ARNm dans l'expression du génome. Le troisième ARNm sous génomique nommé ARNm D comporte trois cadres de lecture ouverts (Bournell *et al.*, 1985) qui codent des polypeptides de 6,7, 7,4 et 12,4 kDa. Le gène de l'ARNm D, code un polypeptide de 12,4 kDa qui présente une région hydrophobe de 21 acides aminés près de son extrémité N-terminale qui est encadrée par des régions hydrophiles, ce qui suggère qu'il pourrait s'agir d'une protéine transmembranaire avec une partie de la molécule exposée de chaque côté de la membrane (Smith *et al.*, 1990). Malgré deux sites de N-glycosylation à l'extrémité N-terminale, il ne semble pas que cette protéine soit glycosylée et ce d'autant plus qu'un traitement à la tunicamycine soit sans effet.

Enfin, en ce qui concerne le HCV-OC43 il existe une grande similitude avec le

BCV quand on compare l'analyse nucléotidique de leur ARN génomique (Gerna *et al.*, 1981; Lapps et Brian, 1985), l'immunoprécipitation en utilisant des antisérums spécifiques aux protéines virales (Hogue *et al.*, 1984) mais aussi lorsqu'on se base sur les séquences des gènes codant les protéines N, M, S et HE du HCV-OC43 (Kamahora *et al.*, 1989; Mounir et Talbot, 1992, 1993b; Zhang *et al.*, 1992). Cependant le tropisme de ces deux virus est très différent de même que le type d'hôte infecté. Le point d'intérêt pour expliquer ces tropismes différents serait la différence majeure trouvée entre les protéines non structurales du BCV et du HCV-OC43 au niveau des ARNm 5 et 5-1 (Mounir et Talbot, 1993a) codant des protéines de 12,9 et 9,5 kDa respectivement. Les fonctions de ces protéines sont inconnues mais d'après leur séquence en acides aminés elles pourraient être impliquées dans l'assemblage, ou jouer un rôle dans la réplication (Bournsell et Brown, 1984; Skinner et Siddell, 1985; Skinner *et al.*, 1985; Abraham *et al.*, 1990; Leibowitz *et al.*, 1988). En amont de ces gènes codant des protéines non structurales, chez le BCV, se trouve un ARNm 4 possédant deux cadres de lecture ouverts codant deux protéines de 4,9 et 4,8 kDa (Abraham *et al.*, 1990) et inexistantes chez le HCV-OC43, bien que l'on retrouve en faible quantité l'ARNm 4 dans des cellules infectées (Mounir et Talbot, 1993a). Un trait intéressant est la présence d'une séquence leader tronquée dans le gène de l'ARNm 4 de HCV-OC43 qui pourrait être le résultat d'une recombinaison entre les ARNs.

La fonction de la plupart des produits de gènes codant des protéines non structurales n'est pas élucidée. Tous ces résultats font l'objet d'études quelquefois

controversées mais sont peut-être une porte d'entrée prometteuse pour élucider le rôle de ces protéines. Certaines d'entre elles participeraient probablement à la synthèse de l'ARN viral, à l'assemblage du virus, ou pourraient être responsables de l'arrêt de la synthèse d'ARNm pour la production d'un ARN génomique qui va être destiné à l'encapsidation du virion. Finalement un rôle essentiel dans le tropisme ou la réplication virale *in vivo* est suggéré.

### 3.3. Lipides viraux

La composition lipidique des particules coronavirales n'a jamais été étudiée en détail. De toute évidence la composition chimique de ces lipides viraux reflète la composition des membranes des cellules dans lesquelles s'est faite la croissance du virus puisque c'est à partir des membranes cellulaires que se forme l'enveloppe virale lors du bourgeonnement des virions et leur relâchement dans le milieu externe. Cependant, la composition lipidique de l'enveloppe peut varier par rapport à celle des cellules hôtes; c'est ainsi que Pike et Garwes en 1977 ont démontré que la quantité de cholestérol et d'acide gras chez le TGEV était moindre que celle des membranes cytoplasmiques des cellules dans lequel le virus avait été produit. Le rôle de ces lipides reste encore à être élucidé; on pense à l'affinité de la protéine S ainsi que de la capsid virale à s'associer à certains types de membranes. Il a été remarqué que lorsque l'enveloppe dérive des membranes intracellulaires des cellules-hôtes, le virus est mieux protégé de la solubilisation par des sels biliaires et d'autres détergents par rapport aux enveloppes

provenant des membranes plasmidiques des cellules. Ceci est caractéristique de la composition lipidique des coronavirus à tropisme entérique qui doivent se protéger des sels biliaires et autres composés chimiques (Sturman et Holmes, 1983).

### 3.4. Génome

Le génome des coronavirus est une molécule d'ARN non segmenté dont le poids moléculaire varie de  $6 \times 10^6$  à  $8 \times 10^6$  daltons (Lai et Stholman, 1978; Lomniczi *et al.*, 1977; Wege *et al.*, 1978). Sur cette molécule on retrouve une coiffe en 5' et une queue polyadénylée d'environ 100 nucléotides en 3' (Lai *et al.*, 1981; Yogo *et al.*, 1977). L'ARN de polarité positive, est infectieux dès sa transfection sur une lignée cellulaire susceptible. Aucun ARN à polarité négative n'a été détecté dans le virion (Lai *et al.*, 1981). Cet ARN génomique est considérablement plus grand que n'importe quel ARN viral connu. En effet, le génome de la famille des paramyxovirus est celui dont la taille est directement inférieure à celle des coronavirus et n'est pourtant seulement que de 14 kb! La séquence complète de l'ARN génomique de l'IBV (Bournsnel *et al.*, 1987a) détermine un ARN de 27,6 kb et celui du MHV est de 32 kb (Baker *et al.*, 1990; Pachuk *et al.*, 1989). L'existence d'ARN viraux de si grande taille est surprenante du fait que ceci pourrait occasionner de grandes fréquences d'erreur au moment de la synthèse d'ARN génomique à partir de l'ARN lors de la réplication (Holland *et al.*, 1982). Ceci explique sûrement pourquoi les coronavirus utilisent un mécanisme unique de synthèse de l'ARN. L'analyse des séquences des ARN viraux révèle qu'il existe au moins dix cadres de

lecture ouverts, certains correspondant à des ARNm distincts (figure 1). Les coronavirus semblent avoir six à huit ARNm séparés qui codent des protéines structurales et non structurales. De façon générale, l'ordre des gènes chez toutes les espèces de coronavirus est similaire, sauf que l'ordre des gènes 4 et 5 de l'IBV est inversé quand comparé à d'autres coronavirus. Le TGEV contient probablement un gène additionnel (gène 7) à l'extrémité 3' pourvu d'un petit cadre de lecture ouvert et d'un ARNm correspondant (Denis et Brian, 1982, Kapke *et al.*, 1986). Le MHV, le TCV, le BCV et le HCV-OC43, contiennent un gène additionnel qui code la protéine HE. Les génomes de l'IBV et du MHV contiennent environ 200 à 500 nucléotides d'une séquence non-traduite à l'extrémité 5' (Boursonnell *et al.*, 1987a; Pachuk *et al.*, 1989; Soe *et al.*, 1987a). Chez toutes les espèces on retrouve le gène 1 qui occupe les deux tiers du génome (17-23 kb) et qui code des protéines non structurales incluant l'ARN polymérase. Les 60 à 70 nucléotides terminaux sont appelés séquence leader et sont transposés à l'extrémité 5' de chaque ARNm (Brown *et al.*, 1987; Lai *et al.*, 1984; Spaan *et al.*, 1983). Ces séquences leader sont importantes dans la régulation et la transcription de l'ARN génomique et des ARNm sous génomiques. À chaque région intergénique, il y a une séquence consensus d'environ huit à dix nucléotides (Budzilowicz *et al.*, 1985; Shieh *et al.*, 1987) qui est importante pour la transcription des gènes situés en aval.

#### 4. Réplication virale

La réplication virale commence à partir du moment où le virus s'adsorbe sur un

récepteur cellulaire et pénètre dans la cellule. Le type de cellules susceptibles à l'infection chez les coronavirus reflète très étroitement le tropisme cellulaire ainsi que tissulaire de ces virus. La première phase de pénétration étant effectuée par la liaison au récepteur viral, le virus pénètre par viropexie suivie de la fusion de l'enveloppe virale avec l'endosome (Krzystyniak et Dupuy, 1984; Mizzen *et al.*, 1985). Cependant l'entrée du virus par fusion cellulaire n'est pas écartée (Kooi *et al.*, 1991). Dès que le génome viral est relâché à l'intérieur des cellules, des événements biochimiques subséquents prennent part au cycle de réplication et cela entièrement dans le cytoplasme. Les fonctions nucléaires ne sont apparemment pas requises pour la croissance des coronavirus (Brayton *et al.*, 1982; Wilhelmsen *et al.*, 1981), bien que Evans remarquait en 1980 que l'IBV pouvait nécessiter certaines fonctions nucléaires. La réplication commence quand il y a synthèse de l'ARN polymérase ARN dépendante, codée par le virus. Cette enzyme n'est pas apportée par la particule virale mais est plutôt synthétisée *de novo* à partir de l'ARN génomique entrant. Ainsi, dès le tout début de l'infection virale la réplication de l'ARN des coronavirus requiert la synthèse continue de protéines (Mathy *et al.*, 1983; Sawicki et Sawicki, 1986). Cette ARN polymérase ARN dépendante transcrit le génome entrant sur toute sa longueur (Lai *et al.*, 1982) ainsi que des ARN sous génomiques et de polarité négative (Sawicki et Sawicki, 1990; Sethna *et al.*, 1989) qui vont à leur tour servir de gabarits pour la synthèse d'ARNm sous génomiques et génomique. Le pourcentage de ces ARNm à polarité négative est faible, de 1 à 2%.

#### 4.1. Transcription des ARN messagers

La transcription de ces ARNm peut être catalysée par une autre ARN polymérase ARN dépendante qui est soit une forme modifiée de la première ARN polymérase ou tout simplement une nouvelle enzyme (Brayton *et al.*, 1982). La synthèse d'ARN spécifique des coronavirus est étudiée en présence d'actinomycine D, qui inhibe la synthèse d'ARN de la cellule hôte. Quelques heures après l'infection, la synthèse d'ARN coronavirus peut être détectée. La vaste majorité de ces ARN sont des ARNm polyadénylés, qui peuvent généralement être séparés en six à huit espèces, dont le poids moléculaire varie de  $0,6 \times 10^6$  à plus de  $8 \times 10^6$  (Lai *et al.*, 1981; Leibowitz *et al.*, 1981; Spaan *et al.*, 1981; Stern et Kennedy, 1980). Ces ARN sont nommés de un à sept par ordre décroissant de taille. Le plus grand ARN messager (ARNm 1) correspond à la taille de l'ARN génomique, le reste des ARN messagers sont de tailles inférieures. La portion 3' est commune à tous les ARNm (Cheley *et al.*, 1981; Lai *et al.*, 1981; Leibowitz *et al.*, 1981; Spaan *et al.*, 1982; Weiss et Leibowitz, 1983). Chaque ARNm possède la séquence nucléotidique de l'ARNm plus petit en plus de séquences additionnelles à l'extrémité 5'. À l'exception du plus petit ARNm, tous sont donc potentiellement polycistroniques. *In vivo* il a été remarqué que seulement la portion en 5' qui ne se chevauche pas avec l'ARNm de taille inférieure est traduite (Jacobs *et al.*, 1986; Siddell, 1983; Stern et Sefton, 1984), ce qui veut dire que fonctionnellement ces ARNm sont monocistroniques. Les ARNm sont ensuite utilisés pour la synthèse des protéines structurales et non structurales.

#### 4.2. Synthèse des protéines

La synthèse de la glycoprotéine S se fait sur les polysomes du réticulum endoplasmique rugueux (RER) et la glycosylation s'effectue de manière cotraductionnelle. Les sucres sont transportés par un intermédiaire, le dolichol phosphate sur des résidus asparagine de la chaîne polypeptidique (Klenk et Rott, 1980). Puis la protéine est transportée du RER à l'appareil de Golgi où les enzymes cellulaires modifient les oligosaccharides et ajoutent des résidus d'acide gras à la protéine (Schmidt, 1982; Stern et Sefton, 1982b). La protéine est ensuite soit incorporée dans le virion soit transportée vers la membrane cytoplasmique où son expression rend les cellules susceptibles à la lyse et permet aussi la fusion cellulaire (Sturman et Holmes, 1984). La protéine M est synthétisée sur les polysomes du RER. La O-glycosylation apparait après la synthèse du peptide (Nieman *et al.*, 1982). Dans la cellule infectée, la protéine M est transportée vers l'appareil de Golgi où elle s'accumule tandis qu'on la retrouve en faible quantité au niveau de la membrane cytoplasmique (Holmes *et al.*, 1981b; Sturman et Holmes 1983). La protéine N est synthétisée sur les ribosomes du cytoplasme de la cellule hôte et interagit avec l'ARN génomique pour former la nucléocapside. L'accumulation des protéines structurales du virus est un pré-requis pour l'assemblage des particules virales et peut aussi être le signal pour déterminer la fin de synthèse d'ARNm pour la production d'un ARN génomique qui va être destiné à l'encapsidation du virion.

### 4.3. Morphogenèse

L'assemblage des particules virales est probablement initié par l'interaction entre l'ARN génomique du virion et des protéines telle la protéine N, formant ainsi la nucléocapside. Cette interaction peut d'ailleurs engendrer d'autres activations entre les protéines virales, telle que la liaison des protéines N et M (Sturman *et al.*, 1980) ou les protéines et l'ARN. Puis la nucléocapside virale se lie aux membranes périnucléaires du réticulum endoplasmique (Dubois-Dalcq *et al.*, 1982; Massalski *et al.*, 1981). C'est lors de ce processus qu'est acquise la bicouche lipidique, la protéine S et la protéine HE. Les particules matures sont transportées vers l'appareil de Golgi et éventuellement relâchées à l'extérieur des cellules. Une étape finale de maturation du virus apparaît probablement au niveau extracellulaire lorsque la protéine S est clivée par des protéases cellulaires en deux sous unités liées par des ponts dissulfures (Frana *et al.*, 1985). Ce clivage est requis seulement pour certains coronavirus.

### 5. Coronavirus et pathogénèses

Les coronavirus sont l'agent de nombreuses maladies tant chez l'humain que chez les animaux. On retrouve des infections sous-cliniques telles des rhinites, des entérites, des hépatites, des encéphalomyélites, ces dernières pouvant être létales pour l'hôte infecté. Cependant, la réplication est limitée initialement aux épithéliums respiratoires et entériques. Le trait caractéristique des infections coronavirales est la spécificité d'espèces, une souche virale infectant seulement un type d'hôte. Chez l'humain les coronavirus sont

responsables de 15 à 35% des infections aiguës du tractus respiratoire et on retrouve chez une majorité de la population infantile une séroconversion aux antigènes coronaviraux ce qui souligne la haute prévalence des infections causées par ces virus apparemment endémiques (McIntosh, 1990; Chambon *et al.*, 1987). Leur implication dans l'étiologie de maladies plus graves comme des pneumonies, périmyocardites, méningites et radiculites (Riski et Hovi, 1980), ainsi qu'entériques chez les nouveau-nés et les enfants âgés de moins d'un an (Resta *et al.*, 1985; Battaglia *et al.*, 1987) leur attribue une importance médicale significative. En laboratoire, le virus d'intérêt est le MHV dont la plupart des souches produisent des infections respiratoires tandis que certaines souches sont entérotropes (Barthold, 1986). Chez les souches à tropisme respiratoire, on retrouve des infections qui débutent généralement dans le tractus respiratoire et qui sont vite contrôlées par le système immunitaire. Cependant, chez des souris génétiquement susceptibles ou immunodéficientes, on assiste à une virémie et à une invasion lymphatique au niveau des viscères et du cerveau, causant une hépatite, une encéphalite et la mort. La dissémination de l'infection des coronavirus murins vers de multiples autres foyers (foie, cerveau, macrophages et lymphocytes) démontre le potentiel polytrophe des coronavirus en général. C'est ainsi que par le biais d'observations sur des modèles expérimentaux animaux il a été démontré que les coronavirus murins pouvaient causer des maladies démyélinisantes du système nerveux central (SNC) dont les lésions histopathologiques ressemblent à celles d'une maladie démyélinisante chez l'humain; la sclérose en plaques (SP).

### 5.1. Neurotropisme des coronavirus murins

La plupart des souches de MHV infectent les muqueuses du tractus respiratoire supérieur (nasal), pour se disséminer rapidement vers de multiples autres organes. L'autre biotype de coronavirus murin est entérique: l'infection est restreinte à la muqueuse intestinale avec peu de dissémination dans les autres tissus. Ces souches entérotropes diffèrent significativement du MHV respiratoire dans le comportement biologique mais ne peuvent pas être différenciées antigéniquement ou génétiquement. Le MHV-JHM a été originalement isolé en 1949 de souris qui présentaient une paralysie des membres et une démyélinisation (Cheever *et al.*, 1949; Bailey *et al.*, 1949). Ces pathologies induites par l'infection du MHV-JHM chez des animaux susceptibles font de lui un excellent modèle expérimental pour explorer les processus de démyélinisation induits par un virus. D'autres modèles animaux impliquant les rongeurs avec le virus de Theiler et le virus Sindbis ont contribué à l'étude de ces maladies neurologiques. Cependant, chacun de ces virus démontre des différences fondamentales dans sa stratégie de réplication, le type d'hôte et les pathogénèses. Il a ainsi été démontré que plusieurs facteurs, incluant la souche virale, la voie et la dose de l'inoculum, l'âge, le génotype et le statut microbiologique de la souris pouvaient influencer l'infection du MHV et donc la pathogénèse associée à cette infection. De plus, une relation peut être établie entre le type de cellules nerveuses infectées et les signes cliniques de la maladie.

## **5.2. Influence de la voie de l'inoculum**

### **5.2.1. Inoculation intranasale**

Après infection, le MHV-JHM atteint le cerveau par le biais des nerfs trijumeaux et olfactifs, pour rapidement atteindre les structures neuroanatomiques reliées à ces nerfs (Perlman *et al.*, 1990). Ceci apparaît même en présence des anticorps maternels qui généralement limitent l'invasion extracellulaire (Perlman *et al.*, 1989). Une même progression par le nerf olfactif a aussi été démontrée chez des souris infectées par le MHV-A59 (Lavi *et al.*, 1988). Chez les souris asymptomatiques le virus est localisé dans la moelle épinière au niveau des parties motrices et antérieures et à un moindre degré au niveau des parties dorsales et dorsolatérales. Bien que l'infection parte de sites spécifiques, le développement de troubles neurologiques dépend de l'augmentation de la réplication virale qui apparaît à des sites primaires (Perlman *et al.*, 1988). L'habilité qu'ont ces virus à se propager par la voie neurale chez les rongeurs suggère la possibilité que les coronavirus peuvent emprunter une route similaire pour des infections humaines.

### **5.2.2. Inoculation intracérébrale**

En laboratoire, après une inoculation intracérébrale du MHV-JHM, les souris présentent une encéphalite aboutissant à la mort de 95% de la population avec une infection prédominante au niveau des neurones, alors que 5% des souris qui survivent à l'infection vont présenter des lésions chroniques au niveau de la substance blanche du SNC qui correspondent à une démyélinisation dans le cerveau et la moelle épinière due

majoritairement à l'infection des cellules gliales (Perlman *et al.*, 1990).

### **5.3. Influence de la souche virale**

De nombreuses études utilisant la souche neurotrope MHV-JHM démontrent que le tropisme cellulaire d'un mutant thermosensible se manifeste particulièrement au niveau des oligodendrocytes dont l'infection se traduit par une démyélinisation récurrente et une persistance virale avec présence de virus infectieux douze mois post-infection (Knobler *et al.*, 1982). Par contre, le type sauvage infecte principalement les neurones et ne cause pas de démyélinisation. Le rôle des protéines structurales semble être déterminant pour le type de tropisme cellulaire et donc les maladies conséquentes à ces infections (Erlich *et al.*, 1987).

#### **5.3.1. Importance de la protéine HE**

Des variations dans l'expression de la protéine HE du MHV-JHM pourraient contribuer à la pathogenèse virale. Chez des souches de MHV isolées d'un même stock original l'expression de la protéine HE corrèle avec le type de pathogénicité en terme de virulence et de tropisme cellulaire quand on les injecte intracérébralement chez la souris. En effet, lorsque le JHM exprime fortement la protéine HE, les cellules cibles de l'infection sont les cellules neurales de la substance grise alors que dans le cas d'une expression plus faible de la protéine HE, le JHM infecte principalement les cellules gliales de la substance blanche (Yokomori *et al.*, 1992). Il est à souligner que cette protéine est

exprimée chez la plupart des souches neurotropes alors que son expression est perdue chez la plupart des souches hépatotropes (Yokomori *et al.*, 1991).

### 5.3.2. Importance de la protéine S

Comme déjà mentionné au chapitre 3, la protéine S est impliquée dans l'attachement du virus et dans la fusion cellulaire. Ainsi il est normal de penser que des changements structuraux de cette protéine puissent altérer l'habilité du virus à infecter certains types de cellules. La protéine S retrouvée dans le cerveau de rat Wistar Furth infectés par le JHM et présentant des signes histopathologiques d'une maladie démyélinisante est codée par un ARNm ayant subi une délétion par rapport au même ARNm du type sauvage. La variation de la protéine entre le virus variant et le type sauvage s'accompagne de différences au niveau des propriétés biologiques de ces virus et plus particulièrement par le type de la maladie occasionnée lors de l'infection. Le site d'isolement de ces virus après une inoculation intracérébrale varie soit au niveau du cerveau pour le type sauvage soit au niveau de la moelle épinière pour le type variant (Jackson *et al.*, 1984; Morris *et al.*, 1989).

## 5.4. Influence de l'hôte

### 5.4.1. Age

Chez des rats co-sanguins, durant la première semaine de la vie, une inoculation intracérébrale avec une dose adéquate cause irrémédiablement une encéphalite aiguë

alors que l'infection virale à un temps plus tardif, donc en présence d'un système immunitaire adéquat, induit le développement d'une maladie démyélinisante chronique (Sorensen *et al.*, 1982). De même lorsque des rats Wistar Furth âgés de 2 jours sont inoculés intracérébralement avec la souche JHM, la plupart de ceux-ci meurent à l'intérieur d'une semaine d'une encéphalite aiguë (Sorensen *et al.*, 1986). Quand ces mêmes rats sont inoculés à l'âge de 10 jours, ils ne développent généralement pas de symptômes avant deux ou quatre semaines post-inoculation (Jackson *et al.*, 1984; Parham *et al.*, 1986). La pathologie retrouvée dans ce cas est une maladie démyélinisante chronique caractérisée par une paralysie des membres (Sorensen *et al.*, 1980; Jackson *et al.*, 1984; Parham *et al.*, 1986). Cependant il existe une association étroite entre l'âge et le statut immunitaire de l'hôte.

#### 5.4.2. Statut immunitaire

Une jeune souris, lorsqu'inoculée avec une dose appropriée de MHV-JHM, va invariablement développer une encéphalomyélite aiguë fatale. Cependant la maladie peut être prévenue si on utilise un mutant viral ou si on administre des anticorps monoclonaux neutralisants avant l'inoculation ou si les souris sont allaitées par des femelles immunisées (Buchmeier *et al.*, 1984; Dalziel *et al.*, 1986; Perlman *et al.*, 1987; Fleming *et al.*, 1986, 1989).

### 5.4.3. Génotype

La résistance de certaines souches de souris est l'exemple classique de l'importance du génotype de l'hôte pour déterminer la susceptibilité à l'infection virale. Des souches susceptibles telles BALB/c sont rapidement tuées par des souches virulentes de MHV, qui se répliquent dans les épithéliums respiratoires et intestinaux, le foie, et pour certaines souches le cerveau et la moelle épinière. Il existe des souches semi-susceptibles comme C3H, pour lesquelles la réplication virale est plus limitée au niveau de ces tissus et les animaux guérissent suite à cette infection. La souche SJL/J est profondément résistante à la réplication du MHV *in vivo* et ne démontre aucun signe d'infection suivant une inoculation à des doses qui infectent normalement d'autres souches de souris (Boyle *et al.*, 1987). On retrouve le même type de résistance chez les souches de souris A/J (Tardieu *et al.*, 1986).

### 5.5. Susceptibilité différentielle des cellules nerveuses

Dans des cultures primaires de cellules nerveuses de rats, les oligodendrocytes peuvent être des cellules-cibles dans l'infection avec le JHM tandis que les astrocytes ne le sont pas (Beushausen et Dales, 1985). Une telle spécificité dans les cellules gliales murines n'est pas trouvée (Wilson *et al.*, 1986). De plus, plusieurs observations indiquent que l'état de différenciation des oligodendrocytes dérivés de rats peut être important dans le fait que l'hôte pourrait contrôler la réplication virale dans des régions de la matière blanche et ainsi influencer le développement de maladies démyélinisantes (Beushausen

et Dales, 1985; Beushausen *et al.*, 1987). Les conditions de culture et les interactions cellules-cellules qui contrôlent la survie, la prolifération, et la différenciation des cultures primaires de cellules de rats, influencent aussi l'établissement d'une infection par le MHV-JHM. La différenciation des oligodendrocytes est un facteur important dans le contrôle de la multiplication du MHV-JHM. Lorsqu'on travaille dans des conditions de culture qui favorisent la croissance des neurones, on observe une augmentation de la multiplication du MHV-JHM, ce qui traduit l'importance des neurones dans l'établissement d'une infection en présence du MHV-JHM. Lors de la morphogenèse des oligodendrocytes, on remarque la présence d'un facteur PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) qui permet la différenciation des cellules mères en oligodendrocytes qui à leur tour deviennent des cellules cibles pour l'infection. Lors de la pathogenèse on peut supposer que les neurones sont les cellules-cibles initiales de l'infection, qu'ils permettent d'amplifier l'inoculum viral et sa dissémination au travers d'autres cellules-cibles du système nerveux central. La maladie démyélinisante apparaît à partir du moment où les cellules sécrétrices de la protéine basique de la myéline sont à leur tour infectées, soit à un stade bien particulier du développement (une semaine post-natal) et plus particulièrement, la période *in vivo* où la myélinisation est la plus active (Sorensen *et al.*, 1982). C'est donc la maladie neurologique qui apparaît tardivement, impliquant la lyse des oligodendrocytes et une faible infection des neurones, alors que dans le cas de l'encéphalomyélite aiguë ce sont les neurones qui sont le site préférentiels de la répllication virale (Knobler *et al.*, 1981a, b). La forme démyélinisante de la maladie

suggère une persistance virale au niveau du SNC. Des études ont démontré que des métabolites cellulaires qui affectent le niveau intracellulaire de l'AMPc pouvaient amener le virus à se répliquer beaucoup moins efficacement (Beushausen et Dales 1985; Robbins et Rapp, 1980; Yoshikawa et Yamanouchi, 1984). Chez le MHV-JHM l'élévation de la concentration de l'AMPc de façon irréversible bloque la réplication au niveau de cultures primaires d'oligodendrocytes de rats et de souris. Cependant, ce contrôle de l'AMPc sur la réplication virale est propre à chaque type de virus et au type cellulaire particulier impliqué.

#### 5.6. Neurotropisme des coronavirus humains

La présence de particules coronaviriformes dans des cellules inflammatoires périvasculaires, au niveau de lésions de tissus cérébraux provenant d'autopsies de patients atteints de sclérose en plaques (Tanaka *et al.*, 1976), marque le début de l'intérêt du potentiel neurotrope des coronavirus humains. Les coronavirus humains représentés par deux sérotypes OC43 et 229E sont associés à des infections du système respiratoire et possiblement entérique chez l'humain. Leur implication dans des maladies neurologiques ne fut pas suspectée puisqu'il n'avait jamais été montré qu'ils pouvaient infecter le SNC de primates ou d'humains. Cependant, le modèle murin neurotrope est un appui favorable pour suggérer que leur présence dans le SNC chez l'humain n'est pas insignifiante. L'emphase de cette pensée s'est accentuée avec les découvertes subséquentes: Gerdes *et al.*, 1981, isolent deux coronavirus SK et SD de tissus cérébraux de patients atteints de

SP. Ils démontrent une réaction sérologique croisée de ces deux souches avec la souche humaine OC43 et la souche murine A59, bien qu'ils soient plus antigéniquement et génétiquement reliés au coronavirus murin (Fleming *et al.*, 1988; Weiss, 1983). Le risque d'une contamination de laboratoire avec une souche murine est suspecté, cependant 85% d'une population humaine possède des anticorps dirigés contre ces isolats SD et SK, ce qui renforce leur origine humaine. Pour rendre ces résultats plus pertinents, il était intéressant de vérifier la présence d'antigènes viraux ou d'acides nucléiques à partir de tissus provenant de patients atteints de SP et les comparer avec des prélèvements de tissus de personnes saines. En 1990, Murray et collaborateurs détectent la présence d'ARN coronaviral dans des tissus du SNC humain en utilisant une sonde d'ADN complémentaire préparée à l'aide de l'ARN purifié du CV-SD. Ils observent que la quantité d'ARN viral est significativement plus élevée chez les patients atteints de SP par rapport aux patients sains ou atteints d'autres maladies neurologiques. Plus tard Murray *et al.* (1992a) observent la présence d'antigènes viraux à l'aide d'un sérum anti MHV-A59 au niveau des plaques où la démyélinisation est encore active et plus particulièrement au niveau des cellules qui sont positives pour la présence d'ARN viraux. Tous ces résultats suggèrent que les coronavirus sont capables d'infecter des tissus du SNC humain. Ces virus peuvent porter quelques différences par rapport au coronavirus humain prototype qui cause des maladies du système respiratoire supérieur puisque les génomes détectés dans les tissus de patients atteints de SP hybrident plus fortement avec les sondes provenant de l'extrémité 3' du génome murin; une autre possibilité étant que les virus humains neurotropes soient le

résultat d'une recombinaison des génomes murins-humains coronaviraux (Murray *et al.*, 1992a). Il est intéressant de noter que le génome de l'isolat de Burks partageant des similitudes avec le génome du coronavirus murin prototype est capable d'induire la maladie chez des primates susceptibles à l'infection (Murray *et al.*, 1992b) ce qui rapproche les résultats établis sur les modèles murins avec le modèle humain. Au niveau du tropisme cellulaire, les études de Pearson et Mims (1985), démontrent une susceptibilité des fibroblastes et des astrocytes de cerveaux de souris à l'infection avec la souche OC43. De plus, une persistance virale a été démontrée au niveau de glioblastomes et de rhabdomyosarcomes humains (Collins et Sorensen, 1986). L'implication du coronavirus humain 229E dans une infection du SNC est mise en évidence par les travaux de Stewart *et al.* (1992) utilisant la méthode de "polymerase chain reaction" (PCR) pour la détection de l'ARN viral au niveau de tissus de la matière grise et blanche prélevé par autopsie chez des patients atteints de sclérose en plaques. Une étude similaire est réalisée au niveau des lymphocytes périphériques. Les résultats révèlent la présence du génome du HCV-229E à la fois dans la substance blanche et grise du SNC, tandis que l'amorce spécifique au HCV-OC43 n'amplifie aucun génome suggérant son absence au niveau de ces tissus nerveux et cellules. Il est intéressant de noter que l'amorce utilisée dans ce dernier cas donne des résultats qui sont en accord avec les méthodes d'hybridation effectuées par Sorensen *et al.* (1986). Cependant elle n'amplifie pas l'ARN du MHV-A59 et donc diffère de la sonde utilisée par Murray *et al.* (1992a). En conclusion à toutes ces études il est difficile de ne pas suspecter le neurotropisme des coronavirus humains et leur implication

dans des pathologies du SNC et plus particulièrement la sclérose en plaques.

## 6. Sclérose en plaques

La sclérose en plaques est une maladie démyélinisante du SNC chez l'humain. Comme la plupart des maladies démyélinisantes, l'étiologie est encore inconnue. Les caractères pathologiques de la maladie décrits par Cruveilhier en 1935, et la description clinique établie par le médecin français Jean Martin Charcot en 1872 restent toujours d'actualité.

### 6.1. Caractères pathologiques

La maladie se caractérise par une démyélinisation périaxiale, c'est à dire une destruction de la myéline, tandis que les axones restent relativement intacts (Allen et Brankin, 1993).

### 6.2. Caractères cliniques

Les patients présentent initialement une neurite optique qui disparaît par la suite. Après une période variant d'un patient à l'autre de quelques semaines à quelques années, la maladie fait sa réapparition. Le patient a du mal à s'exprimer et manifeste des tremblements lors de la coordination des mouvements; la vision devient double, la sensation est moins précise et on observe une mauvaise coordination des mouvements (Noronha et Arnason, 1992). Après une période initiale d'exacerbation et de rémission, plusieurs

patients vont s'acheminer vers une phase progressive et chronique de la maladie alors que d'autres se retrouvent dans la phase progressive de la maladie dès le premier signe clinique, tandis qu'une faible proportion se sont stabilisés après une ou plusieurs attaques. Le degré des atteintes neurologiques varie considérablement d'un patient à l'autre et il est impossible de prédire l'évolution et la sévérité de la maladie chez les patients.

### **6.3. Les hypothèses étiologiques**

L'étiologie de la sclérose en plaques n'est pas définie. Les nombreuses hypothèses jusqu'alors proposées doivent pouvoir expliquer plusieurs traits de la maladie pour être validées. Tout d'abord le cycle de la maladie, l'anomalie du taux élevé d'immunoglobulines G dans le liquide céphalo-rachidien, la distribution des plaques de sclérose dans le cerveau et la diffusion de la maladie dans le SNC et à la périphérie de la rétine. Il est possible que plusieurs facteurs soient impliqués dans la pathogenèse.

#### **6.3.1. Facteurs épidémiologiques**

##### **6.3.1.1. Distribution géographique**

Des études épidémiologiques démontrent une distribution géographique avec une haute incidence de la maladie dans les climats tempérés. Les zones de hautes fréquences incluent le Nord de l'Europe, le Sud du Canada, le Nord des Etats-Unis, le Sud de la Nouvelle Zélande, le Sud Est de l'Australie (Kurtzke, 1983). Les femmes sont plus sujettes à la maladie que les hommes, les races blanches sont plus susceptibles que les races noires

et c'est une maladie rare chez les asiatiques (Kurtzke *et al.*, 1973).

#### **6.3.1.2. Études sur les migrations des peuples**

Après la seconde guerre mondiale, il a été démontré que la majorité des patients atteints de la SP en Afrique du Sud étaient des immigrants provenant du Royaume Uni et du Nord de l'Europe. Cependant ils représentaient moins de 10% de la population totale. Pour les natifs, les Afrikaans ("white Afrikaan-speaking natives") la prévalence était de 3/100,000, et 11/100,000 pour les "white English-speaking natives" et 50/100,000 pour les immigrants en provenance du Nord de l'Europe (Dean, 1970). La migration vers une zone de faible incidence avant l'âge de 15 ans, diminue le risque de développer la SP et des personnes immigrants après l'âge de 15 ans conservent le même pourcentage de risque qu'ils avaient dans leur pays d'origine (Dean et Kurtzke, 1971). Il existe moins de données concernant les migrations de zones à faible risque vers des zones à haut risque. Des études portant sur des personnes se déplaçant de zones à faible incidence des pays du Commonwealth vers l'Angleterre semblent garder le même taux bas de risque (Dean *et al.*, 1976), mais l'analyse de ces résultats est difficile du fait que plusieurs facteurs rentrent en compte: l'âge de la personne au moment de l'immigration, le temps de séjour dans le nouveau pays et les différences raciales.

### 6.3.2. Facteurs génétiques

Des études portant sur des jumeaux homozygotes comparés à des jumeaux dizygotes et à des individus provenant des mêmes parents démontrent une association de 26%, 2,3% et 1,9% respectivement avec la sclérose en plaques, ce qui suppose que des facteurs génétiques contrôlent la maladie (Ebers *et al.*, 1986). L'association génétique de la maladie se fait en association avec les antigènes de classe II de type HLA-DR2, et plus spécifiquement au niveau des haplotypes DR15, DQ6, Dw2 (Jersild *et al.*, 1973; Marcadet *et al.*, 1985). Ces antigènes de classe II chez l'humain sont impliqués dans la présentation d'antigènes étrangers. Cependant il peut arriver que le système immunitaire reconnaisse des "antigènes du soi" et une réaction auto-immune anormale est alors déclenchée. C'est l'aspect auto-immun de la maladie et particulièrement contre la protéine basique de la myéline.

Dans deux modèles animaux, l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) et l'encéphalomyélite murine de Theiler, qui sont des maladies résultant d'une infection virale, on observe que la susceptibilité des animaux à la maladie est associée avec les gènes qui codent pour le récepteur des cellules T (TCR) (Steinman, 1991; Melvold *et al.*, 1987). Cependant, les études portant sur l'association de la sclérose en plaques avec certaines classes de récepteurs T sont controversées. Il semble qu'il y ait un réarrangement préférentiel des gènes  $\nu$  du TCR au niveau de cellules T qui répondent à différents épitopes de la protéine basique de la myéline (Wucherpfennig *et al.*, 1991; Kotzin *et al.*, 1991). D'autres études révèlent un réarrangement préférentiel des gènes

v du TCR avec un nombre restreint de transcrits des gènes v<sub>α</sub> 8, 9, 10, 12, et 16 dans les plaques de démyélinisation dans le cerveau de patients atteints de SP (Oksenberg *et al.*, 1991). Au contraire, d'autres études révèlent qu'il n'y a pas d'association entre le polymorphisme des lignées germinales qui codent pour le récepteur des cellules T et la susceptibilité à la SP (Fugger *et al.*, 1990), et d'autres démontrent qu'il n'y a pas de réarrangement préférentiel des gènes v du TCR dans des clones de cellules T réactifs à la protéine basique de la myéline (Martin *et al.*, 1991). Des études récentes suggèrent qu'il puisse y avoir une interaction de facteurs génétiques et exogènes. Les études d'importance particulière concernent le contrôle génétique et la fonction du système immunitaire, et les interactions immunitaires avec les virus.

### 6.3.3. Autres facteurs de susceptibilité

Les hypothèses proposées pour expliquer la sclérose en plaques peuvent être cataloguées comme suit: infectieuse, autoimmune, la combinaison des deux, métabolique ou toxique. Cependant, aucune de ces hypothèses n'a été entièrement explorée.

La possibilité qu'il s'agisse d'une maladie infectieuse a été suggérée par diverses études. Des travaux ont mis en évidence la présence d'anticorps anti-viraux comme ceux contre le virus de la rougeole dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (Adams et Imagawa, 1962), des anticorps contre les virus de l'herpès simplex, des oreillons, de la rubéole (Norrby *et al.*, 1974), du rétrovirus HTLV-I (Gessain *et al.*, 1985) et des coronavirus (Salmi *et al.*, 1982). D'autres travaux ont rapporté la présence d'antigènes

viraux, par exemple des coronavirus (Murray *et al.*, 1992), ou de génomes viraux persistants. De plus, des modèles expérimentaux faisant appel à des virus comme le coronavirus murin et le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler, ont particulièrement contribué à démontrer des mécanismes de démyélinisation induits par des infections virales. On y a par exemple démontré l'infection cytopathique des oligodendrocytes, la cytolysse des oligodendrocytes induite par une réaction immunitaire, une attaque de la myéline par réaction immunitaire contre les antigènes viraux, la formation de complexes immuns des antigènes viraux et des anticorps de l'hôte avec le complément causant des troubles secondaires et enfin une auto-immunité contre la myéline induite par un mimétisme moléculaire entre un court peptide dont la séquence est similaire à la fois sur une protéine virale et celle de la myéline.

Pour que cette hypothèse infectieuse soit valide, il reste à confirmer la présence de certains isolats viraux à partir de tissus ainsi que la présence de particules ressemblant à des virus dans les tissus pour que cette hypothèse du caractère infectieux de la maladie soit validé.

Le caractère auto-immun de la maladie s'appuie sur des études portant sur la dérégulation du système immunitaire. La prédisposition génétique et les modèles expérimentaux ne manquent pas pour supporter cet aspect de la maladie. Cependant l'aspect auto-immun de la maladie ne peut pas être considéré tout seul car dans bien des cas les auto-antigènes ne sont pas toujours identifiables. Enfin, l'hypothèse d'une combinaison d'une affection infectieuse et autoimmune demeure toujours plausible.

#### 6.3.4. Les agents infectieux

Plusieurs pathogènes ont été cités dans le passé en association avec la SP: protozoaires, bactéries, spirochètes et mycoplasmes. Les études concernant l'identification et l'isolement de ces organismes n'ont pas été confirmées et certaines de ces observations peuvent maintenant être interprétées comme artefact. Cependant, l'hypothèse la plus probable implique les virus.

De nombreux virus ont été associés à la sclérose en plaques tels les virus de la rougeole, rubéole, oreillons, rage, influenza de type C, respiratoire syncycial, flavivirus, T-lymphotrope type 1, cytomégalovirus, Epstein-Barr, variole, herpès simplex, varicelle et coronavirus. Cependant, un certains nombres d'études sont restées sans suite soit en l'absence de confirmation ou que la détection de ces virus dans les tissus du SNC de patients atteints de SP ait échouée. C'est le cas par exemple du virus de la rougeole, des oreillons, et de la rubéole (Godec *et al.*, 1992), de l'herpès simplex (Nicoll *et al.*, 1992). Toutefois, l'absence de détection de ces virus n'est pas une observation suffisante pour les écarter dans la pathogenèse de la maladie. En effet d'autres possibilités doivent être considérées: le virus peut persister dans le SNC sous la forme latente ou intégrée ou de façon alternative à un faible taux de telle sorte que certaines méthodes ne soient pas assez sensibles pour les détecter. Dans ce dernier cas, il serait impossible de détecter les acides nucléiques viraux ou les antigènes viraux dans les tissus. De plus il se peut que le virus ait été présent à un temps précoce de la maladie et ait pu être éliminé par le système immunitaire. Sa persistance ne serait alors plus nécessaire pour continuer le processus de

démyélinisation et dans ce cas aussi il serait peu probable de retrouver l'agent causal de la maladie.

Enfin, il a été suggéré à partir de certains résultats impliquant le virus de la rougeole, l'adénovirus et les coronavirus, que les virus pourraient périodiquement atteindre le cerveau par la voie sanguine et que leurs interactions pathologiques avec l'endothélium vasculaire ou les astrocytes périvasculaires pourraient endommager la barrière sang-cerveau et initier de nouvelles lésions (Kirk, 1990).

En conclusion, bien que l'implication de virus dans la pathogenèse de la SP soit circonstancielle, le profil de l'association de la maladie avec l'infection virale est constant. En effet, une infection virale directe du SNC est régulièrement impliquée et souvent associée à une réponse immunitaire dans le cas de plusieurs virus (Allen et Brankin, 1993).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

## **1. CELLULES**

### **1.1. Lignées cellulaires**

#### **1.1.1. Fibroblastes**

Des cellules embryonnaires de poumons humains, L132, ont été utilisées pour toute notre étude. C'est sur cette lignée cellulaire que le virus a été adapté à se répliquer. Ainsi, elles ont servi de support pour la production d'un stock viral en vue de l'infection des cellules, de contrôle positif pour détecter la présence d'antigènes viraux exprimés au niveau des cellules sensibles, et au titrage des particules virales infectieuses produites sur cette lignée mais aussi sur les autres lignées de cellules nerveuses décrites ci-dessous.

#### **1.1.2. Cellules nerveuses**

À l'exception de la lignée d'oligodendrocytes, toutes les lignées de cellules nerveuses humaines utilisées au cours de ce projet proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, E.U.).

##### **1.1.2.1. Neurones**

Nous avons travaillé avec la lignée SK-N-SH (ATCC # HTB 11) qui provient de neuroblastomes humains, et la lignée H4 (ATCC # HTB 148 ) provenant de neurogliomes humains.

### 1.1.2.2. Cellules gliales

Les astrocytes sont représentées par les lignées U-87 MG (ATCC # HTB 14 ) et U-373 MG (ATCC # HTB 17) originant de glioblastomes humains. Les oligodendrocytes de la lignée MO3.13, sont des oligodendrocytes humains immortalisés par fusion avec des cellules de la lignée TE-671 originant d'un rhabdomyosarcome humain. Ces lignées nous ont été gracieusement fournies par l'intermédiaire du docteur Neil. R. Cashman (Institut de neurologie de Montréal, Université Mc Gill).

### 1.2. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires sont cultivées dans des flacons de polystyrène de 25, 75, ou 150 cm<sup>2</sup> (Corning Glass Works, Corning, N.Y, E.U.) et incubées dans des étuves contenant une atmosphère humide (Forma Scientific U.S.) à 37°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. Deux fois par semaine, les cellules confluentes sont soumises à un traitement à la trypsine 0,05% (p/v) dans de la saline phosphatée ("Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline") à un pH de 7,4 de façon à briser les liens intercellulaires entre les cellules et le plastique. Les cellules sont réensemencées dans de nouveaux flacons à des concentrations de :

- 100,000 cellules/ml pour les lignées L132, H4, MO3.13, TE-671, U-87 MG, U-373 MG.

- 200,000 cellules/ml pour la lignée SK-N-SH.

Les fibroblastes de poumons humains sont maintenues dans un milieu de croissance

composé de " Earle's Minimum Essential Medium " (MEM) et de milieu 199 de Hanks (GIBCO, Grand Island, N.Y., USA) dans des proportions de un pour un (v/v), auquel est ajouté 1.7% (v/v) de bicarbonate de sodium (GIBCO), 5% (v/v) de sérum de veau foetal (P.A Biologicals CO, Sydney, Australia) et 2 mM de L-glutamine (Gibco). Ce dernier composé étant graduellement dégradé, il est réajouté lorsque le milieu est âgé de plus de deux mois. Quant aux cellules nerveuses en lignée continue, elles sont maintenues dans du "Dulbecco's Modified Earle's Medium " (DMEM) (GIBCO) supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau foetal.

## **2. VIRUS**

### **2.1. Souche virale**

La souche de coronavirus humain de sérotype 229E utilisée au cours de ce travail a été obtenue de l'American Type Culture Collection. Lorsque reçu, le virus a été adapté à se répliquer sur la lignée L132 par passages successifs à l'aveugle, puis titré par test de plages (matériel et méthodes section 4.1.2.) sur cette même lignée. Pour ce travail, nous avons utilisé un stock viral représentant le quatrième passage (P4). Son titre infectieux était de  $1,7 \times 10^8$  unités formatrices de plage par ml (UFP/ml) (cf matériel et méthodes section 2.2.).

### **2.2. Production de virus**

Afin d'obtenir un volume important de virus pour les expériences futures, nous

utilisons 63 pétris de polystyrène de 150 x 15 mm (NUNC) contenant une monocouche de cellules L132. Lorsque le feuillet cellulaire est à 50% confluent, le milieu de croissance est vidangé et l'inoculum viral (P3, production du passage 3) est ajouté à un indice de multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 dans un volume final de 3 ml. Suite à une période d'adsorption d'une heure à 33°C (température optimale pour la réplication virale) et 5% de CO<sub>2</sub>, avec agitation lente à toutes les dix minutes, du milieu de croissance pour la lignée cellulaire L132 est ajouté (12 ml/pétri). Ces cellules infectées sont incubées à 33°C pendant 48 heures. Le milieu de culture est recueilli, clarifié par centrifugation à 10,000 g pendant vingt minutes (9,500 rpm, rotor JA-10, centrifugeuse J2-21 M, Beckman). Le surnageant subit une ultracentrifugation à 100,000 g pendant deux heures (33,000 rpm, Rotor Ty 50.2, centrifugeuse 25-75, Beckman). Le culot obtenu est resuspendu dans 15 ml de milieu de culture pour les cellules L132 dont la concentration de sérum de veau foetal est réduite à 1% (v/v). Enfin, cette production virale (P4) est aliquotée en des fractions de 1.5 ml et conservée à - 70°C jusqu'à son utilisation.

### **3. RADIOMARQUAGE MÉTABOLIQUE DES PROTÉINES VIRALES**

Pour la production de virus radioactifs, un flacon de 150 cm<sup>2</sup> (Corning) contenant 2x10<sup>7</sup> cellules L132, ayant déjà subit dix huit passages ont été infectées avec le coronavirus 229E (P4) à une multiplicité d'infection de 1. Le milieu de croissance utilisé lors de cette infection ne contient que 1% (v/v) de sérum de veau foetal. Le contact virus-cellules se fait dans un faible volume de 3 ml de façon à faciliter l'adsorption, pendant 2

heures à 33°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> et avec agitation mécanique à toutes les dix minutes. Puis, douze ml de milieu sont ajoutés pour une incubation de deux heures. Le feuillet est rincé et quinze ml de milieu MEM (GIBCO) déprivé de méthionine, et contenant 2 mM de L-glutamine, et 1% (v/v) de sérum de veau dialysé est ajouté pour une heure. Dans ce même milieu 5 mCi [<sup>35</sup>S] L-méthionine (ICN, California, E.U.) sont ajoutés pour deux heures. Enfin 0,3 µg/ml de méthionine non radioactive (GIBCO), et 1% (v/v) de sérum de veau foetal sont ajoutés. Quarante trois heures post-infection, le surnageant contenant les particules virales produites et ayant incorporées la méthionine [<sup>35</sup>S] est récolté.

### **3.1. Concentration virale: précipitation au polyéthylène glycol 8000 (PEG)**

Le milieu de la culture cellulaire infectée est recueilli puis centrifugé à basse vitesse (10,000 g, 20 minutes) (10,000 rpm, rotor JA-17, centrifugeuse J2-21 M, Beckman) pour éliminer les débris cellulaires. Par la suite, le virus est concentré par précipitation au PEG (Sigma, St Louis, E.U.) à une concentration finale 10% (p/v) supplémenté de NaCl 0,5M sous une agitation modérée pendant toute la nuit à 4°C. Une centrifugation de 30 minutes à 10,000 g, 4°C (9,500 rpm, rotor JA-10, centrifugeuse J2-21 M, Beckman) permet de sédimenter les particules virales marquées au <sup>35</sup>S. Elles sont resuspendues dans un volume minimal (1/30 du volume initial) de tampon TMEN (50 mM Tris-acide maléate, pH 6.2, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl) (Daniel et Talbot, 1987).

[S] est purifié sous l'effet de deux

Nycodenz<sup>®</sup> [5- (N-2, 3-dihydroxypropyl)

ific Corp., Westbury, N.Y., E.U.).

10% (8 ml) (p/v) de Nycodenz<sup>®</sup> préparé

lacé dans un tube de type Ultra-Clear

Le concentré viral est déposé sur ce

gation à 148,000 g pendant 2 heures, à

-75, Beckman). Après migration dans le

le coussin de 50% (p/v) Nycodenz<sup>®</sup>. Le

teur de fraction, et percé à sa partie

n de 26 gouttes/tube (Microfractionneur

angé avec 5 ml de liquide à scintillation

E. U.) et la radioactivité est déterminée

compteur à scintillation (Packard). Les

activité sont combinées et réparties en

st de compétition de liaison (cf matériel

n est retenue pour une purification plus

### 3.2. Purification sur gradients de densité

Le virus marqué à la méthionine [ $^{35}\text{S}$ ] est purifié sous l'effet de deux ultracentrifugations successives sur gradients de Nycodenz<sup>®</sup> [5- (N-2, 3-dihydroxypropyl) iso-phthalamide], (Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, N.Y., E.U.).

#### 3.2.1. Semi-purification

Un gradient discontinu de 50% (2 ml) et 10% (8 ml) (p/v) de Nycodenz<sup>®</sup> préparé en utilisant du tampon TMEN à pH 6,2 est placé dans un tube de type Ultra-Clear (Beckman Instruments, Palo Alto, Ca, E.U.). Le concentré viral est déposé sur ce gradient et le tout est soumis à une ultracentrifugation à 148,000 g pendant 2 heures, à 4°C (35,000 rpm, rotor SW41, centrifugeuse LS-75, Beckman). Après migration dans le gradient, les particules virales se stabilisent sur le coussin de 50% (p/v) Nycodenz<sup>®</sup>. Le tube de gradient est alors placé sur un collecteur de fraction, et percé à sa partie inférieure. Le fractionnement est effectué à raison de 26 gouttes/tube (Microfractionneur Gilson). Un microlitre de chaque fraction est mélangé avec 5 ml de liquide à scintillation Aquasol-2 (NEN Research Products, Boston, MA, E.U.) et la radioactivité est déterminée en dpm (désintégrations par minute) à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard). Les fractions qui exhibent le plus haut taux de radioactivité sont combinées et réparties en deux fractions; une fraction est retenue pour le test de compétition de liaison (cf matériel et méthodes section 8 ) tandis que l'autre fraction est retenue pour une purification plus complète.

### 3.2.2. Purification

Pour cette dernière étape le virus semi-purifié est déposé sur un gradient continu formé après juxtaposition de couches de 50% (2 ml), 40% (2), 30% (2ml), 20% (2ml), 10% (2ml) (p/v) de Nycodenz<sup>®</sup> et soumis aux mêmes étapes que précédemment sauf que l'ultracentrifugation est appliquée toute la nuit à 148,000 g (35,000 rpm, rotor SW41, centrifugeuse L5-75, Beckman). Les fractions retenues sont pour une partie dialysées contre du bicarbonate d'ammonium 0,05 M, pH 7,4 et lyophilisées dans un lyophilisateur " Speed Vac Concentrator " (Savant Instruments Inc., Farmingdale, N.Y., E.U.), puis conservées à -70°C en vue de l'analyse protéique subséquente par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. L'autre fraction est resuspendue dans du PBS pour la détermination de la spécificité de l'anticorps monoclonal anti-229E (cf matériel et méthodes section 6).

## 4. RADIO IMMUNOPRÉCIPITATION (RIPA)

Cette expérience à été réalisée dans le but de déterminer la spécificité de l'anticorps monoclonal 5-11H.6 utilisé pour les tests d'immunofluorescence (cf matériel et méthodes section 7.1.1).

### 4.1. Tampon RIPA

Le tampon utilisé est composé de: Tris-HCl pH 8,0 100 mM, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 5 mM, phénylméthyl-sulfonyl-fluoride (PMSF) 1mM, Triton X-100 2% (v/v)

ainsi que 1% (v/v) d'Aprotinin (Sigma).

#### **4.2. Préparation de la protéine A-Sepharose**

Nous avons utilisé la protéine A-Sepharose CL-4B (Pharmacia LKB, Biotechnology AB, Uppsala, Suède), réhydratée dans du tampon RIPA à 10% (p/v) pendant dix minutes.

#### **4.3. Préparation des anticorps monoclonaux**

L'anticorps monoclonal 5-11H.6 ainsi que le contrôle ascite 653 dont la production s'est faite à partir des cellules myélomateuses P3X63-AG8.653 (ATCC# CRL 1580), donc ne contenant aucune immunoglobuline spécifique aux protéines virales sont couplés à la protéine A-Sepharose par le biais des fragments Fc des immunoglobulines de façon à faciliter la précipitation des complexes anticorps-antigènes viraux lors des étapes ultérieures du test. Ainsi dix  $\mu$ l des deux ascites sont déposés en duplicata dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant 50  $\mu$ l de protéine-A Sepharose 10% (p/v). Les échantillons sont mélangés et placés à température ambiante pendant deux heures sous agitation constante. Puis les billes sont précipitées par centrifugation à 2,000 rpm pendant 5 minutes (centrifugeuse 5415 C, Eppendorf) et lavées à trois reprises avec un ml de tampon RIPA pour être resuspendues dans un volume final de 60  $\mu$ l.

#### **4.4. Préparation des antigènes viraux marqués au $^{35}$ S**

Dans le but de se débarrasser de toute forme d'impureté qui pourrait réagir avec

les billes de Sepharose couplées aux anticorps (cf matériel et méthodes section 4.3.) lors de l'étape d'immunoprécipitation (cf matériel et méthodes section 4.5.), des billes de protéine A-Sepharose présentes dans 300  $\mu$ l d'une suspension 10% (p/v) (cf matériel et méthodes section 4.2.) sont amenées au culot par centrifugation pendant 5 minutes à 2,000 rpm (Eppendorf). Elles sont ensuite resuspendues dans 100  $\mu$ l (210,000 dpm) d'antigènes viraux radioactifs sous forme de virus concentré (cf matériel et méthodes section 3.1.) ou purifié (cf matériel et méthodes section 3.2.2.). Le mélange est incubé pendant une heure, sous agitation constante à température ambiante. Une centrifugation de 2,000 rpm (Eppendorf) est appliquée pendant 5 minutes de façon à sédimenter les billes de Sepharose et conserver l'antigène présent dans le surnageant.

#### 4.5. Immunoprécipitation

Les antigènes viraux clarifiés sont mis en contact avec les 60  $\mu$ l d'anticorps couplés à la protéine A- Sepharose (cf matériel et méthodes section 4.3.) pendant deux heures, à température ambiante, sous agitation constante. Le mélange est alors lavé trois fois dans du tampon RIPA et centrifugé à chaque lavage à 2,000 rpm (Eppendorf). Le dernier lavage est effectué à 14,000 rpm (Eppendorf) pendant 5 minutes. Puis le culot est resuspendu dans 36  $\mu$ l de tampon d'échantillon pour SDS-PAGE (cf annexe 1). Le tout est bouilli pendant 2 minutes puis recentrifugé à 14,000 rpm (Eppendorf) de façon à se débarrasser des billes de Sepharose. Le surnageant est analysé sur gel de gradient de polyacrylamide (cf matériel et méthodes section 5.2.2).

## **5. ANALYSE PROTÉIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE**

### **5.1. Unité électrophorétique**

L'unité électrophorétique "Mini-PROTEAN II Dual Slab Cell" (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, E.U.), est assemblée et utilisée selon les directives du manufacturier. Les plaques de verre séparées par des barres d'espacement graissées de 1,5 mm d'épaisseur sont employées. Les puits sont formés à l'aide d'un peigne à 10 ou 15 dents de 1.5 mm d'épaisseur et peuvent contenir au maximum 54  $\mu$ l ou 32  $\mu$ l d'échantillon chacun. Les plaques de verre ont été préalablement lavées à l'eau savonnée, rincées et trempées dans une solution de 70% (v/v) éthanol de façon à se débarrasser de toute impureté.

### **5.2. Composition des gels et du tampon**

Les électrophorèses sont effectuées sur gel de polyacrylamide 7,5% ou sur gel de gradient continu 7-15% en présence de SDS ("Sodium Dodecyl Sulfate"), en milieu réducteur ou non-réducteur. La technique utilisée est celle de Laemmli (1970) avec ses modifications. La composition des solutions et des tampons nécessaires à l'analyse par électrophorèse est donnée en annexe 1.

#### **5.2.1. Gel polyacrylamide 7,5%**

Brièvement, le gel de séparation 7,5% (p/v) d'acrylamide qui permet de séparer les protéines sur la base de leur masse moléculaire est coulé entre les plaques de verre et

polymérisé sous l'effet de l'interaction entre le persulfate d'ammonium et le TEMED (N,N,N',N'-tétra-méthyléthylènediamine, Bio-Rad) avec le mélange acrylamide-bis-acrylamide (30% T, 2,67% C) en moins d'une heure. Pendant la polymérisation le gel est recouvert d'une mince couche de SDS 10% (v/v) pour éviter l'assèchement. Puis on lave à l'eau distillée, et on assèche soigneusement avec du papier buvard. Le gel de regroupement 4% (p/v) d'acrylamide qui permet le regroupement des protéines de l'échantillon au début de l'électrophorèse est coulé, le peigne formant les puits est inséré délicatement en évitant la formation de bulles d'air et lorsque le gel est polymérisé le peigne est retiré et on peut charger les échantillons.

### **5.2.2. Gel de gradient continu de polyacrylamide 7-15%**

Huit ml d'un gel de séparation 7% sont déposés dans le réservoir attribué d'un séparateur de gel, huit ml de gel de séparation 15% sont déposés dans l'autre réservoir. Le gradient est formé au fur et à mesure que le mélange sous agitation magnétique des deux gels est pompé à un débit de 450 (pompe Hoefer Scientific, Richmond, CA, U.S.) pour se déverser entre les plaques de verre. Les autres manipulations sont telles que citées plus haut (cf matériel et méthodes section 5.2.1.).

## **5.3. Traitement des échantillons et électrophorèse**

### **5.3.1. Traitement des échantillons**

Les échantillons d'électrophorèse sont préparés en mélangeant un volume de

tampon d'échantillon avec un volume de la solution de protéines à analyser. Pour l'analyse des anticorps anti-229E et anti-RSV bovin ainsi que des fragments F(ab'), de ces mêmes immunoglobulines, une solution de tampon d'échantillon est utilisée dans des conditions non-réductrices c'est à dire en absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, tandis qu'en ce qui concerne l'analyse des protéines virales pour le test de radioimmunoprécipitation les protéines virales sont analysées dans des conditions réductrices soit en présence de tampon d'échantillon contenant du  $\beta$ - mercaptoéthanol. Le tout est placé dans un bain bouillant (100 °C) durant 2 minutes pour permettre la dénaturation des protéines.

### 5.3.2. Électrophorèse

Après la polymérisation complète du gel de regroupement, les puits sont rincés successivement à l'eau et au tampon d'électrophorèse. La cassette contenant le gel est ensuite installée dans la cuvette à électrophorèse. Les échantillons sont déposés à l'aide d'une seringue Hamilton. Entre les puits contenant les protéines à analyser est déposé un volume adéquat de tampon d'échantillon dilué dans du PBS (1:1, v/v). Pour chaque gel, un mélange de protéines de poids moléculaires connus est déposé dans un puits. La migration est effectuée à 120 Volts durant 45 minutes à l'aide d'un générateur de courant ( Hoffer Scientific Instruments, San Francisco, CA, U.S.). Les plaques sont ensuite démontées et le gel fixé pendant au moins une heure dans une solution contenant 10% d'acide acétique, 40% de méthanol. Dans le cas de l'analyse des immunoglobulines anti-229E et anti-RSV bovin, le gel est coloré au bleu de Coomassie pendant une heure puis

décoloré jusqu'à l'obtention d'une révélation adéquate des protéines. Pour une fluorographie, le gel est fixé puis traité au Enlightning (New England Nuclear, Dupont Canada Inc., Lachine, Québec, Canada) pendant 15 minutes. Après l'un ou l'autre de ces traitements, les gels sont séchés dans un sécheur de gel à air chaud (Bio-Rad modèle SE11225B) sous pression réduite pendant 60 minutes. Le gel est conservé tel quel dans le cas des protéines révélées au bleu de Coomassie tandis que le gel traité pour fluorographie est exposé (quelques heures à quelques jours à  $-70^{\circ}\text{C}$ ) à des films Kodak X-Omat AR XA2 en présence d'écran intensifiant. Ces films sont ensuite développés dans un processeur (Kodak X-OMAT M20).

## **6. ANTICORPS MONOCLONAUX**

Pour les tests d'immunofluorescence indirecte (matériel et méthodes section 7.1.1.) nous avons utilisé divers anticorps monoclonaux.

### **6.1. Description, quantification et digestion pepsinique**

#### **6.1.1. Anticorps monoclonaux anti-229E**

Ces anticorps ont été produits dans notre laboratoire à partir de souris BALB/c immunisées avec le coronavirus humain 229E. Ils se nomment 5-11H.6, 5-1C.4, 4-9H.5 et 3-10H.5. Ce dernier est une immunoglobuline M et les autres des immunoglobulines G<sub>1</sub>. Des ascites ont servi à notre travail.

### **6.1.2. Anticorps monoclonal anti-RSV Bovin**

Cet anticorps d'isotype IgG<sub>1</sub> nommé 2-E.5, nous a gracieusement été offert sous forme d'ascite par le laboratoire du docteur Michel Trudel de l'Institut Armand Frappier, Université du Québec. Il a servi de contrôle isotypique pour les anticorps monoclonaux anti-229E.

### **6.1.3. Précipitation au sulfate d'ammonium**

Cette méthode nous a permis de concentrer des anticorps selon le principe suivant: les protéines en solution forment des liaisons hydrogènes avec l'eau. Lorsqu'on ajoute une forte concentration de sel, tel que le sulfate d'ammonium, les ions chargés compétitionnent avec les immunoglobulines pour la liaison avec les molécules d'eau. Le résultat d'une telle dualité est une diminution de la solubilité des protéines permettant leur précipitation. Nous avons utilisé le sulfate d'ammonium à 50% de saturation et à pH 7,4. L'incubation avec les ascites des deux anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5 s'est faite durant toute la nuit à 4°C sous agitation constante. La précipitation est suivie d'une centrifugation à 10,000 g (rotor JA.14, 10,000 rpm, centrifugeuse Beckman), pendant trente minutes à 4°C. Les échantillons sont resuspendus dans 2 ml de tampon PBS à pH 7,0 et dialysés contre ce même tampon.

### **6.1.4. Détermination de la concentration d'immunoglobulines**

La concentration des anticorps monoclonaux des ascites 5-11H.6 et 2-E.5 a été

déterminée par un test d'immunodiffusion radiale sur des plaques de verres. Sur chaque plaque est coulé 5 ml d'agarose (SeaKem) 1% (p/v) dans du PBS additionné de 1% (v/v) d'antisérum anti-IgG 7S (ICN). Après solidification l'agarose est percé de trous équidistants. Dix  $\mu$ l d'une IgG<sub>1</sub> standard (Cappell, Organon Teknika, Westchester, E.U.) sont appliqués sur les puits à des dilutions de 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64 (v/v) dans du PBS. Dix  $\mu$ l des ascites contenant l'anticorps monoclonal de concentration inconnue et dilué 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128 dans du PBS sont aussi déposés dans les puits de deux autres plaques. Les plaques sont incubées à température ambiante en chambre humide pendant 24 heures. Les plaques sont alors lavées dans du PBS et montées en sandwich selon l'ordre suivant: une plaque de verre, du papier essuie main, un film de support pour gel acrylamide (Gelbond PAG, FMC, Rockland, Maine, E.U.) dont on recouvre le côté hydrophobe avec le gel d'agarose, deux papiers filtres (Whatman, Maidstone, England), du papier essuie main, une plaque de verre, un poids d'environ 3 kg. Après quinze minutes à température ambiante, les membranes sur lesquelles sont adsorbées les gels d'agarose sont rincées trois fois dans du PBS pendant quinze minutes chaque fois. Puis ils sont séchés à l'air froid et colorés au bleu de Coomassie jusqu'à obtention de l'intensité désirée. La concentration de l'anticorps est déterminée par interpolation sur une courbe standard des surfaces des cercles de précipitation en fonction de la concentration d'immunoglobuline standard.

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

Les anticorps monoclonaux 5-11H.6 et 2-E.5 ont subi un traitement à la pepsine de façon à générer des fragments F(ab')<sub>2</sub>.

#### **6.1.5.1. Traitement à la pepsine**

Les anticorps ont été dilués dans du PBS de façon à obtenir une concentration finale de 1 mg/ml. Pour chacun des anticorps, deux aliquots de 500  $\mu$ l ont été ajustés à un pH de 3,5 et de 4,0 respectivement, avec du tampon citrate 0,1 M pH 3,0. La pepsine (Sigma) est ajoutée à une concentration de 100 Unités/mg d'anticorps. La pepsine était préalablement dissoute dans du tampon citrate 0,1 M pH 3,5 ou 4,0.

#### **6.1.5.2. Cinétique de digestion**

À toutes les heures, soit de une heure à huit heures après l'addition de la pepsine, 20  $\mu$ l de chaque échantillon d'anticorps à pH 3,5 sont prélevés. La digestion pepsinique est prolongée 10 heures pour l'ascite 2-E.5. La réaction est arrêtée en incorporant 1/10 du volume de tampon Tris-HCl 3 M, pH 8,8. L'efficacité de digestion est vérifiée sur gel de polyacrylamide 7,5% (p/v) en conditions non-réductrices (cf matériel et méthodes section 5).

## 6.2. Chromatographie d'affinité

Les conditions optimales pour la digestion pepsinique des anticorps monoclonaux ayant été déterminées, les aliquots contenant une forte majorité de fragments  $F(ab')_2$  ont été purifiés par adsorption spécifique des fragments Fc des immunoglobulines non-digérées, ainsi que des fragments Fc résiduels. Cette adsorption s'est faite sur colonne de protéine A.

### 6.2.1. Dialyse

Les fragments  $F(ab')_2$  sont dialysés trois fois (24 heures/dialyse) contre du tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5 contenant du NaCl 3M. Le volume de chaque tampon de dialyse est de 1500 fois supérieur au volume de l'aliquote considéré. Des membranes à dialyse dont le poids moléculaire d'exclusion est de 12 à 14 000 (Spectrapor; Spectrum, Houston, Texas, E.U.) sont utilisées.

### 6.2.2. Chromatographie

Lors de notre étude nous avons utilisé une colonne de protéine A dans des conditions de teneur en sel élevée de façon à augmenter l'affinité de nos anticorps. La protéine A est une molécule de 42,000 daltons originant des parois cellulaires des bactéries *Staphylococcus aureus* et dont la particularité est de pouvoir fixer les fragments Fc des immunoglobulines. Après avoir hydraté 0,8 g de protéine A- Sepharose CL-4B (Pharmacia) dans 20 ml de tampon phosphate pH 7,0 0,02 M pendant 15 minutes, le

tampon est décanté et 20 ml de tampon sont à nouveau ajoutés. Puis le tout est versé dans une colonne (Bio-Rad) de 1 cm de diamètre et préalablement lavée avec 25 ml de tampon phosphate 0,02 M, pH 7,0, puis avec le tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8,5 additionné de NaCl 3M pendant 30 minutes. Les fragments  $F(ab')_2$  à purifier sont déposés sur la colonne et adsorbés pendant une heure. La colonne est ensuite lavée avec le tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8,5 en présence de 3M NaCl. Cette fraction de lavage est récupérée à l'aide d'un collecteur de fractions (Gilson microfractionator FC 203) à raison de 80 gouttes/tube. Ces fractions sont analysées par un détecteur d'absorbance (ISCO UA-5, Lincoln, Nebraska E.U.) ajusté à 280 nm pour traduire la présence de protéines. Ces protéines sont rassemblées et soigneusement conservées puisqu'elles représentent toutes les protéines n'ayant pas pu se fixer à la protéine A par leur fragment Fc, donc particulièrement les fragments  $F(ab')_2$ . Puis la colonne est soumise à un traitement avec du tampon citrate pH 3,0 de façon à éluer les fragments Fc résiduels et les IgG<sub>1</sub> non-digérées qui se sont adsorbées sur la protéine A couplée aux billes de Sepharose. Ceci est réalisé à un débit de 150 gouttes /tube. La colonne est à nouveau lavée pendant 40 minutes avec du tampon Tris-HCl 0,05N pH 8,5. Les échantillons sont par la suite concentrés avec de l'Aquacide IV (gel de polyacrylamide, Calbiochem, La Jolla, E.U.) puis dosés au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 280 nm. Les concentrations des fragments  $F(ab')_2$  sont de 0,2 mg/ml pour un total de 5ml de l'anticorps 5-11H.6 et de 0,082 mg/ml pour un total de 10 ml de l'anticorps 2-E.5.

continues de cellules nerveuses à l'infection

tion d'antigènes viraux (immunofluorescence

particules virales infectieuses (test de plages et

st d'immunofluorescence indirecte

le détecter les antigènes viraux exprimés dans

29E. Des flacons de polystyrène de 25 cm<sup>2</sup>

des différentes lignées cellulaires (L132, SK-

3, TE 671) en croissance dans leurs milieux de

les sont resuspendues dans du milieu nutritif à

dans un volume égal de suspension virale à

trices de plages par ml de façon à obtenir une

0,01 respectivement. Les tubes contenant les

tes MOI sont placés sur la glace sous faible

les cellules infectées ne soient déposées sous

plaques à immunofluorescence de douze puits

préalablement lavées à l'éthanol 70% (v/v),

Pasteur (400°F, 2 heures). De même, des

is diluées dans le milieu de culture adéquat à

## 7. INFECTION DES CELLULES

La susceptibilité des diverses lignées continues de cellules nerveuses à l'infection virale a été mesurée d'une part par détection d'antigènes viraux (immunofluorescence indirecte), d'autre part par la détection de particules virales infectieuses (test de plages et d'immunoperoxydase indirecte).

### 7.1. Infection des cellules en vue d'un test d'immunofluorescence indirecte

Ce test a été effectué dans le but de détecter les antigènes viraux exprimés dans les cellules infectées par le virus HCV-229E. Des flacons de polystyrène de 25 cm<sup>2</sup> contenant les feuillets cellulaires confluent des différentes lignées cellulaires (L132, SK-N-SH, H4, U-87 MG, U-373 MG, MO3.13, TE 671) en croissance dans leurs milieux de culture respectifs sont trypsinés. Les cellules sont resuspendues dans du milieu nutritif à raison de  $1,5 \times 10^6$  cellules par ml et diluées dans un volume égal de suspension virale à  $1,5 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^5$ , ou  $1,5 \times 10^4$ , unités formatrices de plages par ml de façon à obtenir une multiplicité d'infection (MOI) de 1, 0,1, ou 0,01 respectivement. Les tubes contenant les cellules en présence du virus aux différentes MOI sont placés sur la glace sous faible agitation sur table magnétique avant que les cellules infectées ne soient déposées sous forme de gouttes de 25  $\mu$ l sur des microplaques à immunofluorescence de douze puits (Flow, ICN Biomedicals, Ohio, E.U.) préalablement lavées à l'éthanol 70% (v/v), rincées à l'eau puis stérilisées au four Pasteur (400°F, 2 heures). De même, des microplaques de cellules non-infectées mais diluées dans le milieu de culture adéquat à

une concentration finale identique à celle des cellules infectées, c'est à dire  $0,75 \times 10^6$  cellules par ml, sont préparées. Les microplaques dont les puits contiennent les différentes lignées cellulaires non-infectées ou infectées à différentes MOI sont incubées dans des pétris de verre stériles dans une atmosphère humide à  $33^\circ\text{C}$  et 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$ , pendant 20 heures ou 40 heures post infection. Puis les feuillets cellulaires sont rincées dans du PBS et les cellules sont fixées par immersion pendant 30 minutes à  $-20^\circ\text{C}$  dans de l'acétone préalablement refroidie. Les microplaques sont ensuite séchées à l'air libre.

#### 7.1.1 Test d'immunofluorescence indirecte

Les cellules infectées par le coronavirus 229E expriment dans leur cytoplasme et à leur surface des protéines virales. Pour détecter ces antigènes nous avons ajouté les immunoglobulines complètes de différents anticorps monoclonaux anti-viraux à des dilutions de 1/10, 1/50 ou 1/100, ou les fragments  $\text{F(ab')}_2$ , de l'anticorps monoclonal spécifique 5-11H.6 à une concentration de 0,45 mg/ml sur les différents feuillets cellulaires testés (cf matériel et méthodes section 6.1.5. ). Comme contrôle positif nous avons utilisé la lignée de cellules L132 que nous savons être sensible et permissive à l'infection virale. Les contrôles négatifs consistent en des immunoglobulines complètes ou des fragments  $\text{F(ab')}_2$ , de l'anticorps monoclonal anti-RSV bovin, dans ce cas aussi à une concentration de 0,45 mg/ml (cf matériel et méthodes section 6.1.5 ). Cet anticorps est de même isotype que l'anticorps anti-coronavirus et sert donc de contrôle isotypique. Enfin, pour nous assurer de l'absence d'un signal non-spécifique, nous avons appliqué ces

deux anticorps sur les feuillets des cellules non-infectées. Après 2 heures de contact à température ambiante en chambre humide, les lames à puits multiples sont rincées trois fois dans du PBS. Un deuxième anticorps est alors ajouté à une concentration de 1/100: il s'agit de fragments F(ab')<sub>2</sub> d'un anticorps anti-immunoglobuline de souris produit chez la chèvre. Cet anticorps est conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), qui lorsqu'il est associé au complexe antigène-anticorps est détecté par une coloration brillante jaune-vert émise sous lumière bleue à 490 nm. Cette coloration traduit la présence des immunoglobulines monospécifiques et couplées aux antigènes viraux exprimés dans les cellules infectées. L'incubation est d'une heure à température ambiante, en chambre humide. Les lames sont ensuite lavées trois fois dans du PBS et sont trempées pendant 10 minutes soit dans de l'eau, soit dans du bleu d'Evans à 0,003% (p/v) qui permet de colorer les cellules non infectées en rouge. Le colorant est préparé à 1% dans de l'eau distillée et filtré. Pour augmenter la résolution lors de l'observation sous un microscope à lampe de mercure un montage lame-lamelle est effectué en déposant une goutte de glycérol/PBS (1/10, v/v) au centre de la microplaque sur laquelle on applique une lamelle de verre.

## **7.2. Infection des cellules en vue d'un test de plaque et d'immunoperoxydase indirecte**

Cette expérience a été réalisée dans le but de détecter la production de particules virales infectieuses extracellulaires et intracellulaires. Pour ce, chaque lignée cellulaire (fibroblastes et neurales) sont respectivement mises en culture dans trente et un flacons de polystyrène de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) à 37°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> dans une atmosphère humide.

Le milieu de croissance est approprié à chacune des lignées cellulaires utilisées (cf. matériel et méthodes section 1.2.). Lorsque les cellules L132 atteignent une confluence d'environ 50%, et que les lignées nerveuses sont à environ 80% de confluence, le milieu nutritif est vidangé et les différentes lignées cellulaires exposées au virus à une MOI de 1 dans un volume final de 500  $\mu$ l. L'adsorption virale est effectuée (cf. matériel et méthodes section 2.2, la durée cependant est de deux heures). L'aliquote viral initial est enlevé par succion à l'aide d'une pipette Pasteur et les feuillets cellulaires infectés sont délicatement rincés avec le milieu de croissance adéquat pour être finalement recouverts de 2,5 ml de milieu et incubés à la température optimale de croissance du virus (33°C), 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, dans une étuve contenant une atmosphère humide.

### 7.2.1. Cinétique d'infection

À toutes les deux heures, jusqu'à soixante heures post-infection, le milieu de culture contenant les particules virales extracellulaires produites est délicatement prélevé et aliquoté en des fractions de 0,5 ml dans des fioles de 1,5 ml (NUNC, Roskilde, Danemark) et congelé à -70°C. Le feuillet cellulaire est rincé deux fois et soumis à trois cycles de congélation (-70°C), décongélation (température ambiante) en présence de 2,5 ml de milieu nutritif adéquat. Les lysats cellulaires sont recueillis dans des tubes de polystyrène de 15 ml (Corning) et clarifiées par une centrifugation de 7 minutes à 1,500 rpm (centrifugeuse PR-6, IEC) et aliquotées comme précédemment.

## **7.2.2. Mesure de l'infectivité**

### **7.2.2.1. Test de plages**

Les particules virales extracellulaires et intracellulaires ont été quantifiées selon la méthode de tests de plages. Des cellules L132 sont déposées à une concentration de 100,000 cellules/ml dans des plateaux à six puits de 36 mm de diamètre (Flow Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). La croissance est réalisée en chambre humide à 37°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. Lorsque les feuilletts sont confluent, le milieu de croissance est vidangé et remplacé par un échantillon de 250 µl par puits de suspensions virales extracellulaires ou intracellulaires préalablement dispersées dans un bain sonicateur (Bransonic 12, Branson Cleaning Equipment Company, Shelton, CT, E.U.) pendant 30 secondes. Pour chaque échantillon on a procédé à des dilutions décimales suffisantes pour permettre la lecture ultérieure des plages. Ces dilutions sont faites dans le milieu de croissance cellulaire choisi pour la lignée L132. Le contact virus-cellules est à nouveau réalisé à 33°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> pendant deux heures avec agitation lente à toutes les dix minutes. L'inoculum viral est délicatement aspiré, le feuillet est recouvert d'un milieu nutritif solide composé d'agarose (Seakem). Ce milieu nutritif solide est préparé en mélangeant des volumes égaux de milieu de croissance concentré deux fois et d'agarose 3,0 % (p/v) dans de l'eau distillée maintenue liquide à 45°C. Les plateaux sont par la suite incubés pendant sept jours dans les conditions optimales de réplication virale. Puis les cellules sont fixées avec 9,25% (v/v) de formaldéhyde dans du PBS et colorées au cristal

violet (0,1% (p/v) cristal violet et 2% (v/v) éthanol dans du PBS. Le nombre d'unités formatrices de plages/ml correspond au nombre moyen de plages multiplié par la dilution et multiplié par quatre. Le facteur 4 ramène le titre infectieux par ml puisque 250  $\mu$ l ont été inoculés. Le résultat est ensuite multiplié par un facteur de correction qui correspond au titre de la production virale du HCV-229E à passage 5, soit  $5,5 \times 10^5$  UFP/ml sur le titre viral de cette même production mais titrée dans les mêmes conditions que les cinétiques testées.

#### **7.2.2.2. Test d'immunoperoxydase indirecte**

L'infectivité des productions virales extracellulaires et intracellulaires produites sur la lignée L132, ainsi que sur les lignées de cellules nerveuses sont testées sur des feuillets de cellules de la lignée L132 à environ 100% de confluence mis en culture sur des plateaux à 96 puits (NUNC) en milieu nutritif liquide à une concentration de 100,000 ou 200,000 cellules par ml. Le milieu est vidangé puis remplacé par un échantillon de 110  $\mu$ l par puits de suspensions virales extracellulaires ou intracellulaires préalablement dispersées dans un bain sonicateur (Branson 12, Branson Cleaning Equipment Company, Shelton, CT, E.U.) pendant 30 secondes. Pour chaque échantillon on a procédé à des dilutions décimales suffisantes pour permettre la lecture ultérieure du test soit de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  pour les productions des lignées MO3.13 (intracellulaire), U-373 (intracellulaire et extracellulaire), et TE-671 (intracellulaire) et de  $10^{-3}$  à  $10^{-8}$  pour les productions de MO3.13 et TE-671 (extracellulaires) et de H4, L132 et SK-N-SH (intracellulaires et

extracellulaires). Ces dilutions sont faites dans le milieu de croissance cellulaire choisi pour la lignée L132. Le contact virus-cellules est réalisé à 33°C, dans une étuve humide, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> pendant deux heures et 110 µl de milieu de culture est ajouté. Après 5 jours d'incubation, les feuillets cellulaires sont fixés au méthanol 100% contenant 1% (v/v) de peroxyde d'hydrogène 30% pendant 30 minutes. Les plateaux sont rincés au PBS, puis 100 µl de l'ascite 5-11H.6 dilué 1/500 sont ajoutés à chaque puits pendant deux heures à 37°C dans une étuve humide contenant 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. Les plateaux sont rincés trois fois au PBS et 100 µl d'un anticorps de chèvre conjugué à la peroxydase de raifort dirigé contre les IgG de souris (KPL, Rockwood, Ontario, CAN.) sont ajoutés à la dilution 1/1000 pendant deux heures à 37°C dans une étuve sans CO<sub>2</sub>. Les puits sont rincés trois fois avec du PBS et 100 µl de substrat composé d'une solution de 100 ml de PBS contenant 0,025 g de 3,3-diaminobenzidine (Sigma) et 30 µl de peroxyde d'hydrogène 30%. La réaction d'immunoperoxydase est arrêtée avec de l'eau. Le titre viral est calculé en utilisant la méthode de Kärber:

$$DICT_{50} = \Delta - \delta ( S - 0,5 ) / \text{volume de l'inoculum}$$

où  $\Delta$  =  $-\log_{10}$  de la dernière dilution décimale montrant 100% de réaction positive

$\delta$  =  $-\log_{10}$  du facteur de dilution

S = somme des cupules montrant une réaction positive, incluant celles de la dilution montrant 100% de positivité.

Les titres viraux sont multipliés par un facteur de correction qui correspond au titre de la production virale du HCV-229E à passage 5, soit  $10^{5.5}$  DICT<sub>50</sub> sur le titre viral de cette même production mais titrée dans les mêmes conditions que les cinétiques testées.

## **8. Test de compétition de liaison du virus en présence d'un anticorps anti-amino peptidase N.**

Ce test a été réalisé dans le but de vérifier si le coronavirus humain 229E utilisait comme récepteur l'aminopeptidase N pour amorcer son cycle de réplication dans les cellules nerveuses. Ainsi un anticorps monoclonal murin nommé RBS (Yeager *et al.*, 1992) nous a gracieusement été offert par le docteur Kathryn Holmes (Department of Pathology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, E.U.). Cet anticorps dirigé contre l'aminopeptidase N est utilisé en compétition avec le virus pour le site de liaison.

### **8.1. Immunofluorescence**

Les différentes lignées cellulaires à une concentration de  $1,5 \times 10^6$  cellules par ml sont mises en suspension et prétraitées avec l'anticorps RBS dilué 1/10 (v/v) dans du milieu de culture ou l'ascite contrôle qui provient de la sécrétion d'hybridomes de cellules myéloïdes leucémiques HL60 (Yeager *et al.*, 1992) dilué 1/10 (v/v) ou avec du milieu de culture pendant une heure à température ambiante. Le virus est rajouté à une multiplicité d'infection de 1 et le contact se fait pendant une heure, à 33°C, 5% (v/v) de

CO<sub>2</sub>, dans une étuve humide avec agitation à toutes les dix minutes. Chaque échantillon est déposé à raison de 25 µl par puits sur une plaque à immunofluorescence et incubés à 33°C, 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, dans une étuve humide pendant 20 ou 40 heures. Le test d'immunofluorescence indirecte se poursuit comme décrit dans la section 7.1.1., sauf que les anticorps monospécifiques anti-229E proviennent de l'ascite 3-10H.5 et que dans le cadre de cette expérience il n'est pas nécessaire d'utiliser un contrôle isotypique.

## 8.2. Radiomarquage métabolique.

Les différentes lignées cellulaires (fibroblastes et neurales) sont mises en culture dans des pétris à six puits de 36 mm de diamètre (Flow). Lorsque les différents feuillets sont à 70% de confluence, les cellules sont mises en contact en duplicata avec 250 µl d'anticorps RBS dilué 1/10 (v/v) dans du milieu de culture ou 250 µl d'ascite contrôle qui provient de la sécrétion d'hybridomes de cellules myéloïdes leucémiques HL60 ou 250 µl de milieu de culture. Après une heure de contact à 4°C avec agitation lente sur table basculante, 90,000 dpm de virus semi-purifié marqué au <sup>35</sup>S (cf matériel et méthode section 3.2.1.) sont déposés dans chacun des puits et l'adsorption est réalisée à 4°C sous faible agitation pendant une heure. Les feuillets cellulaires en contact avec l'anticorps RBS, l'ascite contrôle ou le milieu cellulaire et ensuite incubés avec le virus marqué au <sup>35</sup>S sont rincés 6 fois avec du PBS et resuspendus avec 500 µl de NaOH 1N, de façon à disperser le feuillet cellulaire. Chaque échantillon est récupéré puis mis en contact avec 5 ml d'Aquasol-2 (NEN). L'adsorption de virus radiomarqués est quantifiée par comptage

radioactif (Packard). Le pourcentage de particules virales liées en présence de l'anticorps anti-récepteur est calculé de la façon suivante: Taux de radioactivité sur les cellules prétraitées/ Taux de radioactivité sur les cellules infectées. Ce qui nous permet de calculer le pourcentage d'inhibition: % d'inhibition = 100% - % de particules liées en présence de l'anticorps RBS.

## ANNEXE 1

### ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE

#### SOLUTIONS MÈRES

##### A.

Acrylamide/bis (30% T\*, 2,67% C\*\*)

87,6 g acrylamide (29,2 g/100 ml)

2,4 g N'N'-bis-méthylène-acrylamide (0,8 g/100 ml)

ramener à 300 ml avec de l'eau distillée. Filtrer et conserver à 4 °C à la noirceur.

##### B.

1,5 M Tris HCl, pH 8,8

27,23 g Tris base (18,15 g/100 ml)

environ 80 ml d'eau distillée

ajuster le pH à 8,8 avec du HCl 1N. Ramener à 150 ml avec de l'eau distillée et  
conserver à 4 °C

##### C.

0,5 M Tris HCl, pH 6,8

6 g Tris base

ajouter environ 60 ml d'eau distillée

ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 1N et ramener à 100 ml avec de l'eau distillée.

Conserver à 4°C

##### D. 10% (p/v) SDS

10 g dissout dans 100 ml d'eau

**E. Tampon d'échantillon 2 X**

0.1 M Tris HCl pH 6,8

2% (p/v) SDS

2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol (omis dans des conditions non réductrices)

20% (v/v) glycérol

0,006% (p/v) bromophénol bleu

**F. Tampon de migration 5 X, pH 8,3**

Tris base, 9g

Glycine 43,2g

SDS 3g

ramener à 600 ml avec de l'eau distillée et conserver à 4 °C. Pour utilisation diluer 60 ml 5X avec 240 ml d'eau distillée.

**PRÉPARATION DU GEL DE SÉPARATION 7,5% (10 ml)**

H<sub>2</sub>O distillée 4,85 ml

B. 2,5 ml

D. 100  $\mu$ l

A. 2,5 ml

10% (p/v) persulfate d'ammonium (préparé le jour même) 50  $\mu$ l

TEMED (N,N,N',N'-tetra-méthyléthylènediamine) 5  $\mu$ l

**PRÉPARATION DU GEL DE SÉPARATION 15% (10 ml)**

H<sub>2</sub>O distillée 2,35 ml

B. 2,5 ml

D. 100  $\mu$ l

A. 5 ml

10% (p/v) persulfate d'ammonium (préparé le jour même) 50  $\mu$ l

TEMED 5  $\mu$ l

#### **PRÉPARATION DU GEL DE REGROUPEMENT 4% (10 ml)**

H<sub>2</sub>O distillée 6,1 ml

C. 2,5 ml

D. 100  $\mu$ l

A. 1,3 ml

10% (p/v) persulfate d'ammonium (préparé le jour même) 50  $\mu$ l

TEMED 10  $\mu$ l

#### **COLORANT DE GEL**

0,1 % (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

40% (v/v) méthanol

10% (v/v) acide acétique glacial

#### **DÉCOLORANT DE GEL**

40% (v/v) méthanol

10% (v/v) acide acétique glacial

\* % T =  $(g \text{ acrylamide} + g \text{ bis-acrylamide}) / \text{volume total} \times 100$

\*\* % C =  $(g \text{ bis-acrylamide}) / (g \text{ acrylamide} + g \text{ bis acrylamide}) \times 100$

---

**RÉSULTATS**

### **1. Stock viral**

Pour l'étude de l'infection des cellules nerveuses humaines avec le HCV-229E, nous avons travaillé avec un stock viral semi-purifié produit sur la lignée de fibroblastes de poumons humains, L132. Le titre viral du HCV-229E au quatrième passage sur cette lignée cellulaire en culture continue est de  $1,7 \times 10^8$  UFP/ml.

### **2. Cellules**

Parmi les cellules sur lesquelles s'appuient ce projet on retrouve les fibroblastes de poumons humains de la lignée L132. Le virus HCV-229E est adapté à se répliquer sur ces cellules. Pour cette raison elles sont notre contrôle positif pour la détection des antigènes viraux exprimés dans les cellules susceptibles au virus, ainsi que pour l'évaluation de la permissivité au virus (production de virus infectieux) par rapport à toutes les lignées cellulaires utilisées lors de ce travail. Les cellules dont la susceptibilité et la permissivité à l'infection virale sont à déterminer se composent de neurones, d'astrocytes, et d'oligodendrocytes.

### **3. Détection des antigènes viraux par immunofluorescence indirecte**

La mise en évidence de la production d'antigènes viraux au sein des cellules infectées est réalisée par la culture des différentes lignées cellulaires sur des microplaques à immunofluorescence en présence et en absence du virus. Les conditions de travail permettant de visualiser l'expression des antigènes viraux pour les différentes lignées

cellulaires infectées sont déterminées en respectant divers paramètres tels: la multiplicité d'infection, le temps d'incubation après infection, la spécificité des ascites contenant les anticorps monoclonaux anti-coronavirus 229E produits chez la souris et dont le titre en test ELISA varie de l'un par rapport à l'autre. Après 20 et 40 heures post-infection, les feuilletts cellulaires en croissance sur les microplaques sont fixés à l'acétone de façon à perméabiliser les membranes des cellules. Pour le test d'immunofluorescence indirecte, les anticorps monoclonaux provenant des ascites 4-9H.5, 5-1C.4, 5-11H.6 contenant des immunoglobulines de type IgG<sub>1</sub> et de l'ascite 3-10H.5 contenant des immunoglobulines de type M, sont utilisés. À ces anticorps monospécifiques sont ajoutés des fragments F(ab')<sub>2</sub> d'anticorps anti-souris conjugués à de l'isothiocyanate de fluorescéine. Les Tableaux 1, 2, 3, 4 et 5 traduisent la présence des antigènes viraux que l'on visualise en notant le degré de luminosité apparaissant au niveau des cellules infectées selon une échelle d'intensité numérique variant de 0 (intensité minimale) à 4 (intensité maximale), dépendant de l'anticorps utilisé et des cellules infectées. En fonction du temps d'incubation et de la multiplicité d'infection utilisés dans chaque cas, on observe une variation du nombre de cellules infectées que nous quantifions par le pourcentage de cellules fluorescentes sur un tapis cellulaire. À la suite de ces expériences préliminaires, la présence de bruit de fond traduisant une fluorescence non spécifique avec les ascites 4-9H.5 et 5-1C.4 nous a menés à utiliser les ascites 3-10H.5 et 5-11H.6 pour les études suivantes. De même, nous avons choisi d'optimiser le nombre de cellules infectées en utilisant une multiplicité d'infection de 1, ainsi que de fixer le temps d'incubation à 40

heures pour les expériences futures. Nous avons donc démontré la susceptibilité de toutes les lignées cellulaires à l'infection par la souche 229E de toutes les lignées cellulaires. Les neurones (SK-N-SH, H4) semblent être autant susceptibles à l'infection que les cellules témoins L132 utilisées si on se fie au pourcentage de cellules exprimant les antigènes viraux. Par contre les oligodendrocytes (MO3.13) ainsi que les astrocytes (U-87 MG, U-373 MG) expriment à un faible degré les antigènes coronaviraux. Pour interpréter ces résultats, il nous fallait présenter des témoins négatifs. Nous avons choisi dans un premier temps de vérifier l'absence de fluorescence sur les cellules non infectées de façon à bien s'assurer que les immunoglobulines de l'ascite utilisé ne réagissaient pas de façon non spécifique sur un constituant cellulaire. Pour toutes les lignées cellulaires aucun signal positif n'a été observé à cet égard avec les ascites 3-10H.5 et 5-11H.6. Pour vérifier la spécificité de nos anticorps monoclonaux aux antigènes coronaviraux exprimés sur les cellules infectées, nous avons utilisé comme contrôle isotypique un anticorps monoclonal provenant de l'ascite 2-E.5 contenant des immunoglobulines anti-RSV bovin de type IgG<sub>1</sub>, soit de même isotype que les anticorps monoclonaux 4-9H.5, 5-1C.4 et 5-11H.6. À notre grande surprise nous avons observé un signal positif sur les cellules infectées (Figure 2b), tandis qu'aucune fluorescence n'apparaissait sur les cellules non infectées. Le contrôle isotypique devait ensuite être testé en parallèle avec des anticorps anti-coronavirus 229E du même isotype. Les ascites 5-1C.4 et 4-9H.5 donnant un bruit de fond trop élevé, nous avons décidé d'utiliser l'ascite 5-11H.6. La Figure 3 montre la réactivité des cellules L132 non infectées en présence des anticorps anti-coronaviraux. la même réaction avec

les anticorps anti-RSV bovin était aussi négative, démontrant l'absence de protéines virales. Les Figures 4a et 4b correspondent au test d'immunofluorescence indirecte sur les cellules L132 infectées pendant 40 heures avec le HCV-229E (MOI=1). En présence des ascites 5-11H.6 (anti-coronaviral) et 2-E.5 (anti-RSV bovin), et après coloration des lames au bleu Evans qui colore en rouge les cellules non infectées on observe une fluorescence au niveau des cellules infectées et testées pour la présence d'antigènes viraux avec les deux types d'immunoglobulines dont celles de l'ascite 5-11H.6 sont spécifiques aux protéines coronavirales tandis que celles provenant de l'ascite 2-E.5 ne le sont pas.

#### 4. Digestion pepsinique

Pour vérifier l'hypothèse de la présence d'une activité Fc réceptrice sur les cellules infectées qui expliquerait la réactivité du contrôle isotypique (Figure 4b), les immunoglobulines des ascites 5-11H.6 et 2-E.5 sont soumises à une digestion pepsinique à un pH de 3,5 pendant huit heures, de façon à produire des fragments  $F(ab')_2$ . L'efficacité de la digestion est évaluée par migration des deux ascites sur un gel de polyacrylamide 7,5 %. Après huit heures de digestion on observe sur la Figure 5 la migration d'un volume d'ascite 5-11H.6 contenant des immunoglobulines complètes (rangée 2), un échantillon de la digestion pepsinique des anticorps provenant de l'ascite 5-11H.6 anti-HCV 229E (rangée 3) dont on observe seulement une bande de migration qui correspond à la masse moléculaire de fragments  $F(ab')_2$ , soit environ 110 kDa. Sur la rangée 4 apparaît l'échantillon de la digestion pepsinique des anticorps de l'ascite 2-E.5

anti-RSV bovin. On observe dans ce cas deux bandes de migration: une aux environs de 150 kDa qui représente la masse moléculaire d'une immunoglobuline complète et une autre bande plus intense à environ 110 kDa pour la présence majoritaire de fragments  $F(ab')_2$ . Dans ce cas il semble donc que la digestion soit incomplète. Nous avons donc soumis à cet ascite une digestion enzymatique de 9 heures et 10 heures à pH 3,5. La Figure 6 illustre le résultat d'une telle digestion. La rangée 2 présente la migration de fragments  $F(ab')_2$  de 110 kDa après 9 heures de digestion des anticorps de l'ascite 2-E.5, tandis qu'à 10 heures de digestion apparait un nouveau composé d'environ 50 kDa qui correspond à la masse moléculaire de fragments Fab. Par la suite, les fragments des digestions pepsiniques sont purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A. Les échantillons sont ensuite dialysés et la concentration est déterminée par immunodiffusion radiale. La quantité de fragments  $F(ab')_2$  pour les tests d'immunofluorescence subséquents est fixée à 0,45 mg/ml, ce qui correspond à la concentration de l'ascite 5-11H.6 dilué 1/100 lors des expériences préliminaires.

##### **5. Détection des antigènes viraux par immunofluorescence indirecte en présence d'immunoglobulines complètes et de fragments $F(ab')_2$**

Nous avons soumis les cellules de la lignée contrôle L132 à un test d'immunofluorescence indirecte après 40 heures d'incubation des cellules en présence du virus à une multiplicité d'infection de 1 en utilisant pour la détection des antigènes viraux les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines spécifiques aux antigènes coronaviraux (ascite

5-11H.6) et celles du contrôle négatif isotypique (ascite 2-E.5). Sur la Figure 7c on observe la présence des antigènes viraux qui fluorescent en jaune et traduisent la reconnaissance des sites antigéniques par les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines anti-coronavirales. Par contre, tel que démontré à la Figure 7d, les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines du contrôle isotypique ne reconnaissent pas les antigènes coronaviraux. Les cellules provenant des différentes lignées cellulaires nerveuses sont testées dans les mêmes conditions que les cellules L132. La Figure 8 représente les cellules de la lignée SK-N-SH de neuroblastomes humains en absence d'une infection virale et sur lesquelles aucun antigène n'est reconnu par les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines des ascites 5-11H.6. Sur les Figures 9a et 9b, on observe des cellules qui fluorescent fortement en présence de l'ascite 5-11H.6, tandis qu'un bruit de fond non négligeable est observé en présence des immunoglobulines de l'ascite 2-E.5. Par contre, en présence des fragments  $F(ab')_2$ , les antigènes viraux ne sont détectés qu'avec l'ascite 5-11H.6 (Figures 9c et 9d). Les neurogliomes humains de la lignée H4, sont représentés sur les Figures 10 (cellules non infectées), 11a et 11b où les antigènes viraux des cellules infectées sont révélés en présence des immunoglobulines complètes des ascites 5-11H.6 et 2-E.5 respectivement, et les Figures 11c et 11d cellules infectées où les antigènes viraux sont révélés en présence des fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines des ascites 5-11H.6 et 2-E.5 respectivement. Les mêmes expériences sont réalisées pour les cellules gliales, soit la lignée d'oligodendrocytes humains MO3.13 (Figures 12 et 13), les astrocytes provenant de glioblastomes humains (lignées U-87 MG: Figures 16 et 17; U-373 MG: Figures 18 et

19). Pour la lignée d'oligodendrocytes un contrôle supplémentaire est nécessaire puisque ces cellules sont le résultat d'une fusion entre une cellule oligodendritique avec une cellule tumorale (lignée TE-671: Figures 14 et 15) qui confère l'immortalisation à la lignée MO3.13.

#### **6. Fluorographie des protéines du HCV-229E marquées à la [<sup>35</sup>S] méthionine**

Des cellules L132 sont infectées avec le coronavirus 229E à une multiplicité d'infection de 1 et à une température de 33°C. À 4 heures post-infection, le milieu de culture est déprivé de méthionine pendant une heure, puis 5mCi de L-[<sup>35</sup>S]méthionine sont ajoutés pour deux heures. À 43 heures post-infection, le surnageant est prélevé, clarifié et le virus est précipité au PEG et purifié sur gradient discontinu et continu de Nycodenz<sup>®</sup>. Les fractions retenues sont dialysées contre du bicarbonate d'ammonium 0,05 M, pH 7,4. L'électrophorèse des échantillons est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970) (gel de séparation: gradient 15 à 7% d'acrylamide, gel de regroupement: 4%) dans des conditions non réductrices. Le gel est fixé et révélé par fluorographie après une exposition de 20 jours. Les principaux polypeptides observés sont visualisés sur la Figure 20, rangées 2, 3, 4 et correspondent à des masses moléculaires variant de 92-90 kDa, 68kDa, 30-50 et 23-25 kDa.

#### **7. Spécificité de l'anticorps monoclonal 5-11H.6**

Nous voulons déterminer la protéine virale contre lequel réagit notre anticorps

monospécifique. Pour cela nous avons utilisé la méthode d'immunoprécipitation couplée à l'analyse des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide sur un gradient 15-7%. Les anticorps monoclonaux sont couplés à la protéine A-Sepharose, puis le complexe est mis en présence d'antigènes viraux marqués à la [<sup>35</sup>S]méthionine et concentrés au PEG. Après précipitation, le complexe antigènes-(anticorps-protéine A) est resuspendu dans du tampon d'échantillon pour électrophorèse en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. La migration électrophorétique étant terminée le gel est fixé et traité pour fluorographie. Le profil électrophorétique est présenté sur la Figure 21 après 3 jours d'exposition. La Figure 22 représente les mêmes antigènes viraux mais précipités avec les immunoglobulines et les fragments F(ab')<sub>2</sub> provenant de l'ascite contrôle 2-E.5.

#### **8. Cinétiques de croissance virale sur les différentes lignées cellulaires.**

Nous voulons vérifier si les lignées de cellules nerveuses qui sont susceptibles à l'infection par le HCV-229E, tel que démontré par détection des antigènes viraux, peuvent supporter une réplication virale et donner naissance à de nouvelles particules virales infectieuses. Les virions sont produits en infectant à une multiplicité d'infection de 1 les feuillet cellulaires de la lignée L132 à 50% de confluence et les feuillet cellulaires des cellules nerveuses à 80% de confluence. À toutes les deux heures post-infection le surnageant de culture est recueilli et le feuillet cellulaire est rincé puis soumis à des cycles de congélation et décongélation. Les particules virales extracellulaires et intracellulaires sont aliquotées et conservées pour le titrage.

### 8.1. Titrage par plages de lyse

L'infectivité des productions virales extracellulaires et intracellulaires produites sur la lignée L132, ainsi que sur la lignée SK-N-SH sont testées sur des feuillets cellulaires confluents à 100% de cellules de la lignée L132 en culture sur des plateaux à 6 puits en milieu nutritif gélifié. Après 7 jours d'incubation à 33°C, les tapis cellulaires sont colorés au cristal violet et les plages de lyse sont comptées. La Figure 23 illustre les productions de particules virales infectieuses extracellulaires et intracellulaires sur la lignée contrôle de fibroblastes humains. On observe une quantité similaire au niveau de la production de particules virales intracellulaires et extracellulaires pour un même temps donné, avec une augmentation progressive du titre viral au cours des premières heures d'incubation, suivie d'une phase plateau dont le titre viral maximum est atteint vers 40 heures post-infection et se situe aux environs de  $2,8 \times 10^6$  UFP/ml. À 60 heures post infection on observe à nouveau une augmentation du titre viral. Les particules virales infectieuses produites sur la lignée de neuroblastomes humains, SK-N-SH sont quantifiées et illustrées sur la Figure 24. On distingue trois phases; une phase ascendante de 0 à 20 heures, une phase plateau de 20 à 40 heures dont les titres maximum se situent aux environs de  $6,6 \times 10^7$  UFP/ml, et le début d'une phase descendante jusqu'à 54 heures suivie d'une reprise de la production virale. Dans ce cas à nouveau on observe une quantité égale de particules virales infectieuses tant au niveau intracellulaire qu'au niveau extracellulaire.

## 8.2. Titrage par test d'immunoperoxydase indirecte

Pour des raisons inconnues, il nous a été impossible d'obtenir des plages pour la quantification du HCV-229E à partir d'un certain moment. Nous avons donc mis au point une procédure alternative.

L'infectivité des productions virales extracellulaires et intracellulaires produites sur la lignée L132, ainsi que sur les lignées de cellules nerveuses sont testées sur des feuillets cellulaires à 100% de confluence de cellules de la lignée L132 en culture sur des plateaux à 96 puits en milieu nutritif liquide. Après 5 jours d'incubation à 33°C, les feuillets cellulaires sont fixés et la réaction d'immunoperoxydase est effectuée en ajoutant l'anticorps monospécifique anti-HCV-229E sur les feuillets cellulaires, suivi d'un anticorps conjugué à la peroxydase de raifort qui réagira avec le substrat composé de diaminobenzidine et de peroxyde d'hydrogène. Les Figures 25a et 25b représentent respectivement la cupule d'un plateau contenant des feuillets cellulaires de cellules L132 non infectés (Figure 25a) et des feuillets cellulaires infectés (Figure 25b) après un test d'immunoperoxydase indirecte. La cellule pointée sur la Figure 25b est infectée par le HCV-229E dont les antigènes sont reconnus par les anticorps monoclonaux de l'ascite 5-11H.6. Les immunoglobulines conjuguées à la peroxydase de raifort ont reconnues les IgG de souris et la réaction enzymatique a eu lieu en présence du substrat laissant apparaître une coloration marron sur les cellules cibles. En ce qui concerne la lignée L132 la courbe de cinétique sur la Figure 26 apparait en dents de scie bien que le profil général soit une augmentation progressive du titre infectieux jusqu'à 42 heures pour la production

extracellulaire et 34 heures pour la production intracellulaire. Puis on observe une baisse drastique du titre viral de la production extracellulaire qui remonte progressivement à 46 heures. À partir de 46 heures on observe un parallélisme entre la courbe de la production extracellulaire avec celle de la production intracellulaire, alors que de 2 à 40 heures on observe un antagonisme c'est à dire qu'une augmentation de l'un est accompagné par une diminution de l'autre, et vice-versa. Pour les cellules de neuroblastomes humains (Figure 27) de la lignée SK-N-SH on retrouve la courbe caractéristique représentée par 3 phases; la phase ascendante de 2 à 20 heures, la phase plateau jusqu'à 40 heures suivie d'une baisse qui tend vers la hausse à la fin de la cinétique. Cependant bien qu'on observe des titres élevés, soit près de  $10^{10}$  DICT<sub>50</sub>/ml pour la production extracellulaire, on observe que les titres de la production intracellulaire sont de 100 à 1000 fois moindre pour un même temps donné. Pour la lignée H4 (Figure 28), on observe une augmentation des titres viraux des productions intracellulaires et extracellulaires à partir de 10 heures post-infection et dont le maximum de production de particules virales est d'environ  $10^8$  DICT<sub>50</sub>, suivie d'une phase plateau jusqu'à 58 heures post-infection. En ce qui concerne les cellules gliales on peut noter une baisse considérable des titres viraux par rapport aux productions observées au sein des cellules neurales, mais la courbe de cinétique conserve grossièrement le même profil que les précédentes. La production virale au sein de la lignée d'oligodendrocytes sur la Figure 29 présente cependant de grandes variations à partir de 18 heures post-infection avec une alternance de diminution et d'augmentation du titre viral. La lignée contrôle TE-671 de cellules tumorales (qui ont servi à la fusion avec

les oligodendrocytes) présente une cinétique d'infection beaucoup moins stable avec des titres viraux 100 fois plus faibles que ceux de la lignée d'oligodendrocytes (Figure 30). Enfin, la Figure 31 représente la cinétique d'infection de la lignée d'astrocytes U-373 MG; on observe le parallèle de la production virale extracellulaire et intracellulaire mais la progression dans l'augmentation du titre viral se fait en dents de scie comme dans le cas de la production des particules virales de la lignée L132 bien que les titres dans le cas des astrocytes est faible (maximum de  $10^{4.5}$  DICT<sub>50</sub>/ml).

## 9. Tests de compétition de liaison virale

Au cours de ces travaux, le récepteur cellulaire utilisé par le HCV-229E pour l'infection de cellules épithéliales provenant du tractus respiratoire a été identifié. Pour vérifier si le HCV-229E utilise comme récepteur viral l'aminopeptidase N lors de son cycle de réplication dans les lignées utilisées, nous avons préalablement traité ces différentes lignées cellulaires avec l'anticorps anti-aminopeptidase N et vérifié l'effet sur l'infection (test d'immunofluorescence) ou l'attachement (test de liaison).

### 9.1. Immunofluorescence indirecte

Dans ce cas l'anticorps anti-aminopeptidase N ou un anticorps contrôle non-spécifique sont utilisés à une dilution de 1/10 pendant une heure à température ambiante. Puis le virus est rajouté à une multiplicité d'infection de 1 et le contact est poursuivi à 33 °C, 1 heure, avec agitation à toutes les dix minutes. Chaque échantillon est par la suite

déposé sur des puits de plaques à immunofluorescence et incubés à 33 °C pendant 20 et 40 heures. Le test se poursuit comme décrit dans la section 3 sauf que les anticorps anti-229E proviennent de l'ascite 3-10H.5 et que dans ce cas il n'est pas nécessaire d'utiliser un ascite contrôle. Le Tableau 5 regroupe les différentes lignées cellulaires infectées avec le HCV-229E à une MOI de 1 et dont la recherche pour les antigènes viraux s'est faite après 20 heures d'incubation. Comme contrôle négatif, nous avons choisi les cellules non infectées. On estime que l'expression des antigènes viraux est proportionnelle à la quantité de récepteurs disponibles sur les cellules lorsque celles-ci sont soit directement mises en contact avec les virions soit préalablement traitées avec un anticorps qu'on présume être dirigé contre le récepteur viral. Nous notons le pourcentage de cellules exprimant les antigènes viraux et l'intensité de la fluorescence obtenue. L'expression d'antigènes viraux est plus faible lorsque les cellules sont préalablement traitées avec un anticorps anti-aminopeptidase N, alors que, sauf pour les cellules H4, en présence d'un ascite ne contenant pas d'anticorps dirigés contre un constituant cellulaire, on retrouve des pourcentages de cellules infectées similaires aux cellules non pré-traitées et directement infectées avec le virus. Sur le Tableau 6, des résultats similaires sont présentés après une infection de 40 heures sauf en ce qui concerne la lignée L132, le pré-traitement avec l'anticorps anti-récepteur ne semble pas influencer l'expression des antigènes viraux. Ces résultats sont visualisés sur les Figures 32, 33, 34 et 35 où sont représentées les cellules des lignées L132, SK-N-SH, H4, et U-87 MG, respectivement, toutes étant à 40 heures post-infection.

## 9.2. Liaison de virus radioactifs

Les différentes lignées cellulaires sont mises en culture dans des pétris à 6 puits et lorsqu'elles ont atteints 70% de confluence, elles sont mises en contact pendant une heure à 4°C avec l'anticorps RBS ou l'ascite contrôle à une dilution de 1/20. L'adsorption du virus radiomarqué à la [<sup>35</sup>S] méthionine se fait à 4°C. La quantité de virus adsorbé en présence ou en absence d'un compétiteur pour le site de liaison est évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation.

Pour chaque type de lignées cellulaires est défini le taux de radioactivité exprimé en DPM et qui correspond à la quantité de particules virales adsorbées sur les cellules. On détermine la quantité de particules virales liées lorsque les cellules sont directement infectées ou pré-traitées avec un anticorps anti-aminopeptidase N ainsi qu'avec un anticorps contrôle non spécifique. Sur le tableau 7, on observe un pourcentage d'inhibition moyen de 36% pour la liaison du virus au récepteur sur les cellules L132 en présence de l'anticorps RBS. Pour les autres lignées cellulaires des résultats préliminaires et non reportés démontrent, pour la lignée neurale SK-N-SH un pourcentage d'inhibition de 33%, tandis que pour les cellules de la lignées H4, la présence de l'anticorps RBS dans ces conditions expérimentales ne semble pas affecter la liaison du virus sur le récepteur cellulaire. Des problèmes techniques n'ont pas permis de déterminer si une compétition pour le récepteur cellulaire se manifestait pour les lignées gliales MO3.13 et U-87 MG en présence de l'anticorps RBS. Cependant pour le lignée TE-671 la compétition de la liaison virale pour le récepteur cellulaire est faible en présence de l'anticorps spécifique.

Tableau 1: Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte. Multiplicité d'infection: 0,01. Temps post-infection: 20 heures. Sur la première colonne sont présentées les cellules infectées. Sur la troisième colonne sont désignés les différents ascites utilisés lors de ce test et sont indiqués, sur la première rangée de cette colonne l'intensité de la réactivité du test et sur la deuxième rangée le pourcentage de cellules infectées.

CELLULES INFECTÉES	ASCITES (DILUTION)	3-10H.5 (1/10)	5-1C.4 (1/10)	4-9H.5 (1/10)
L132		1+ 2,2%	1/4+ 2,2%	1+1/2 2,2%
SK-N-SH		1+1/2 35%	1/4+ 35%	1/2+ 35%
MO3.13		- 0%	- 0%	- 0%
TE-671		- 0%	- 0%	- 0%
U-87 MG		- 0%	- 0%	- 0%
U-373 MG		- 0%	- 0%	- 0%

Tableau 2: Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte. Multiplicité d'infection: 0,1. Temps post-infection: 20 heures. Sur la première colonne sont présentées les cellules infectées. Sur la troisième colonne sont désignés les différents ascites utilisés lors de ce test et sont indiqués, sur la première rangée de cette colonne l'intensité de la réactivité du test et sur la deuxième rangée le pourcentage de cellules infectées.

CELLULES INFECTÉES	ASCITES (DILUTION)	3-10H.5 (1/10)	5-1C.4 (1/10)	4-9H.5 (1/10)
L132		1+ 2%	1/4+ 2%	1+1/2 2%
SK-N-SH		- 0%	- 0%	- 0%
H4		1+ 1%	1/2+, bf* 1%	1+ 1%
MO3.13		1+ 0,5%	- 0%	1+ 0,5%
TE-671		- 0%	- 0%	- 0%
U-87 MG		1/4+ 3%	1/4+ 3%	1/4+ 3%
U-373 MG		bf %ND*	bf %ND	bf %ND

NOTE: \*= bruit de fond dû à une fluorescence non-spécifique  
 \*\*= non déterminé

Tableau 3: Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte. Multiplicité d'infection: 1. Temps post-infection: 20 heures. Sur la première colonne sont présentées les cellules infectées. Sur la troisième colonne sont désignés les différents ascites utilisés lors de ce test et sont indiqués, sur la première rangée de cette colonne l'intensité de la réactivité du test et sur la deuxième rangée le pourcentage de cellules infectées.

CELLULES INFECTÉES	ASCITES (DILUTION)	3-10H.5 (1/10)	4-9H.5 (1/10)
L132		1/2 <sup>+</sup> 45%	1+ 45%
SK-N-SK		2+ 90%	2+, bf* 90%
H4		1+ 20%	1+ 20%
MO3.13		1+, bf 3,5%	1+ 3,5%
TE-671		1+ 3%	1/2 <sup>+</sup> 3%
U-87 MG		2+ 3%	0+ 0%
U-373 MG		1/2 <sup>+</sup> 2%	0+ 0%

NOTE: \*= bruit de fond dû à une fluorescence non-spécifique

Tableau 4: Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte. Multiplicité d'infection: 1. Temps post-infection: 40 heures. Sur la première colonne sont présentées les cellules infectées. Sur la troisième colonne sont désignés les différents ascites utilisés lors de ce test et sont indiqués, sur la première rangée de cette colonne l'intensité de la réactivité du test et sur la deuxième rangée le pourcentage de cellules infectées.

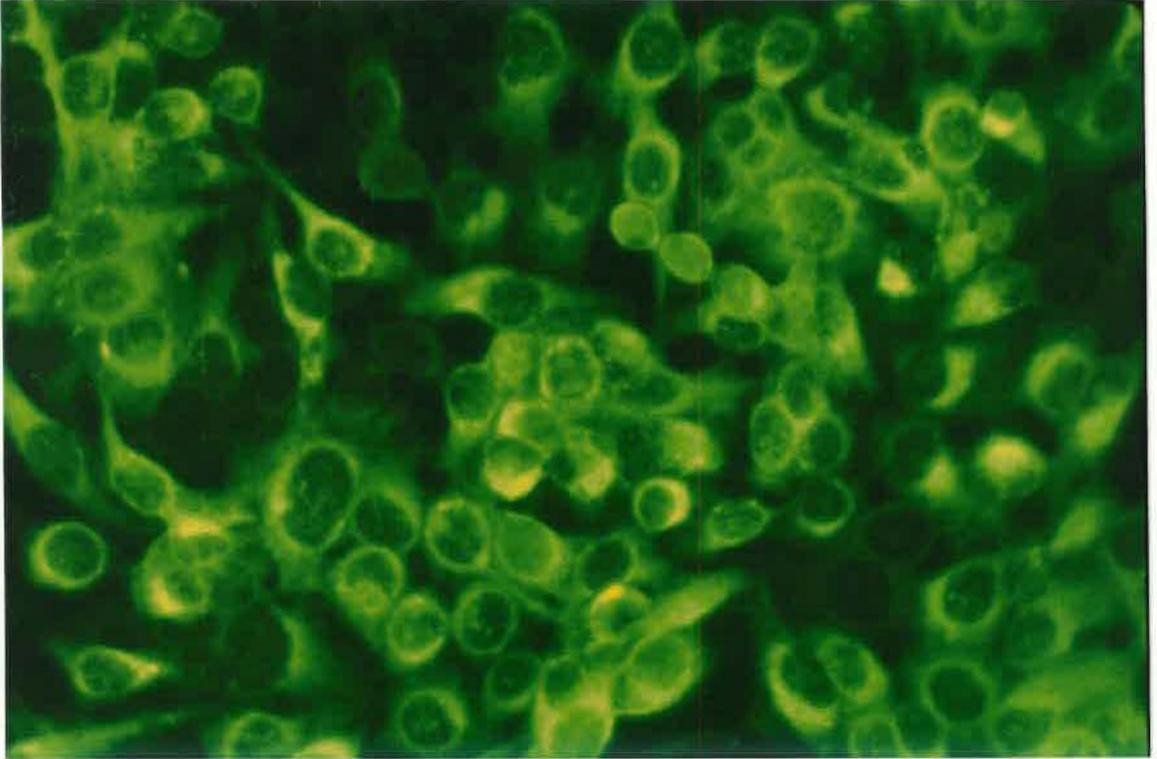
CELLULES	ASCITES	5-1C.4 DILUTIONS				
		3-10H.5	5-1C.4		4-9H.5	
		1/10	1/10	1/50	1/100	1/10
L132		3+	3+	2+	1/4+, bf*	3+
		90	35	35	FAIBLE	90
SK-N-SK		3+	3+ <sub>1/2</sub>	3+ <sub>1/2</sub>	3+	3+
		100	95	95	100	95
H4		2+	2+, bf	2+	1/4+	3+
		45	45	45	FAIBLE	45
MO3.13		2+ <sub>1/2</sub>	2+	1+ <sub>1/2</sub> bf	2+ bf	2+ <sub>1/2</sub>
		5	2	5	5	5
TE-671		2+ <sub>1/2</sub>	1+ <sub>1/2</sub>	2+ bf	2+ bf	2+ <sub>1/2</sub>
		3	3	3	3	3
U-87 MG		2+ <sub>1/2</sub> bf	1+	ND**	ND	0+
		1	2	ND	ND	0
U-373 MG		3+	3+	1/4+	1/4+	1+ <sub>1/2</sub> bf
		20	15	ND	ND	15

NOTE: \*= bruit de fond dû à une fluorescence non-spécifique  
 \*\*= non déterminé

Figure 2. Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte sur des cellules de fibroblastes de poumons humains (L132) infectées à une MOI de 1 et à 40 heures post-infection.

- a) cellules traitées avec l'anticorps anti-229E de l'ascite 3-10H.5
- b) cellules traitées avec l'anticorps anti-RSV bovin de l'ascite 2-E.5.

A



B

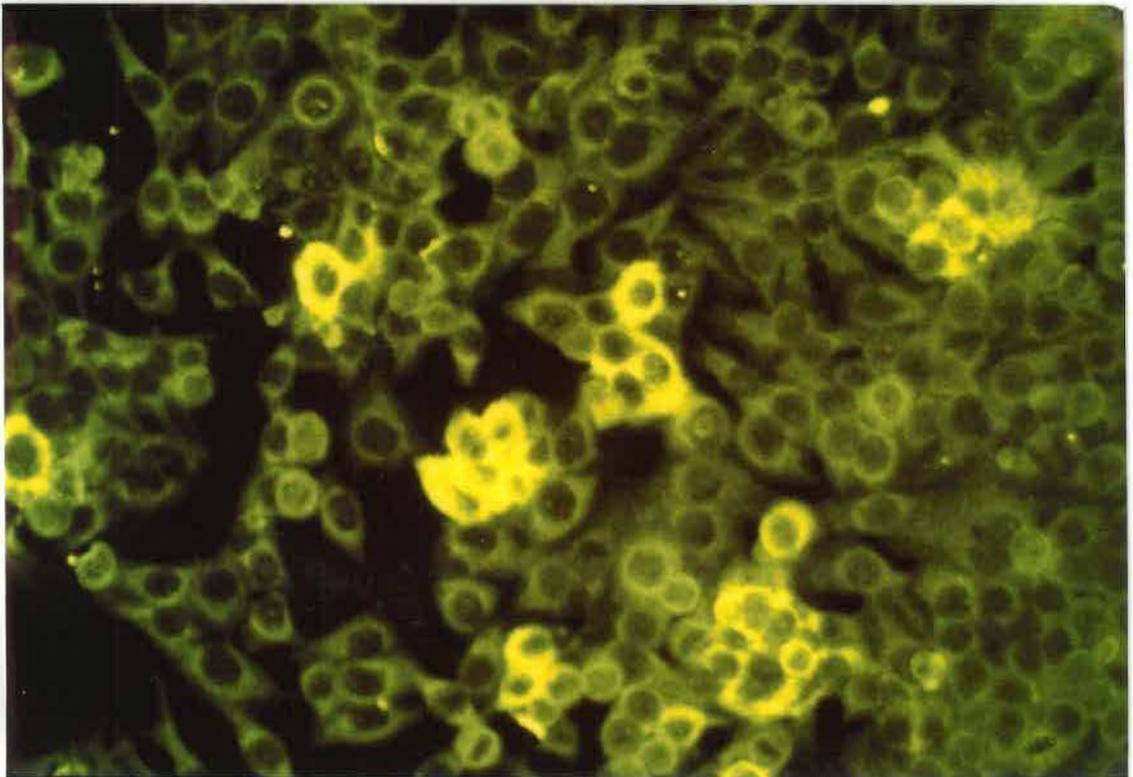


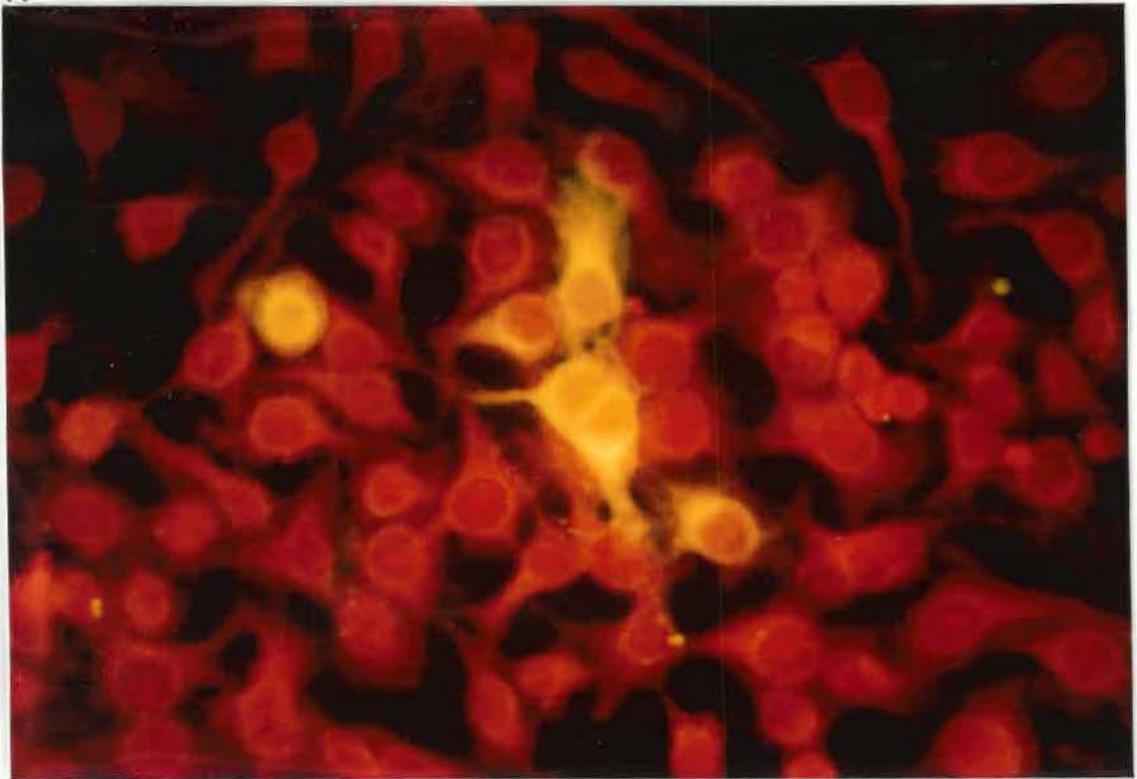
Figure 3. Cellules L132 non infectées et traitées avec les fragments  $F(ab')_2$  des anticorps 5-11H.6 pour le test d'immunofluorescence indirecte.



Figure 4. Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte sur des cellules de fibroblastes de poumons humains (L132) infectées à une MOI de 1 et à 40 heures post- infection. Après coloration au beu d'Evans (0,003%),

- a) cellules traitées avec l'anticorps anti-229E de l'ascite 5-11H.6
- b) cellules traitées avec l'anticorps anti-RSV bovin de l'ascite 2-E.5.

A



B

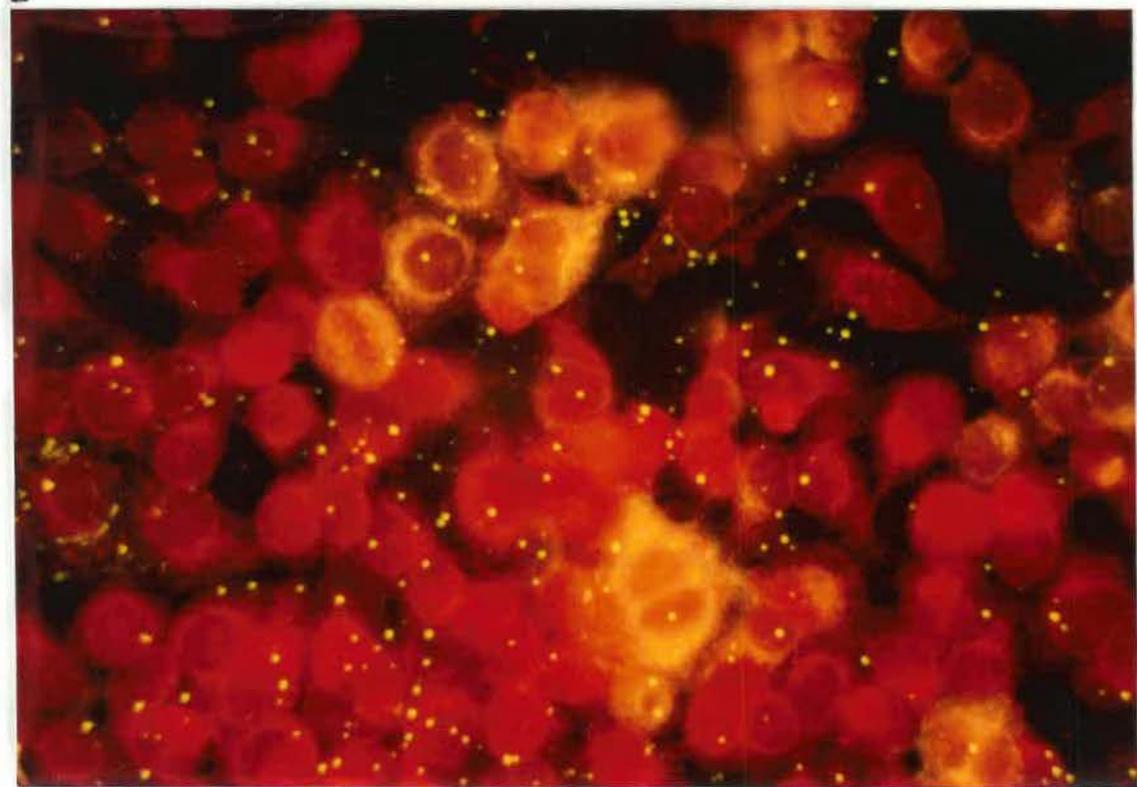


Figure 5. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7,5% des anticorps monoclonaux des ascites 5-11H.6 et 2-E.5 après une digestion de 8 heures à la pepsine sous un pH de 3,5.

Puits: 1) marqueurs standards de masse moléculaire (kDa)  
2) immunoglobuline G<sub>1</sub> de l'anticorps anti-HCV-229E provenant de l'ascite 5-11H.6 (>116 kDa)  
3) immunoglobuline G<sub>1</sub> de l'anticorps anti-HCV-229E provenant de l'ascite 5-11H.6 après digestion pepsinique (116 kDa)  
4) immunoglobuline G<sub>1</sub> de l'anticorps anti-RSV bovin provenant de l'ascite 2-E.5 après digestion pepsinique (>116 kDa, 110 kDa).

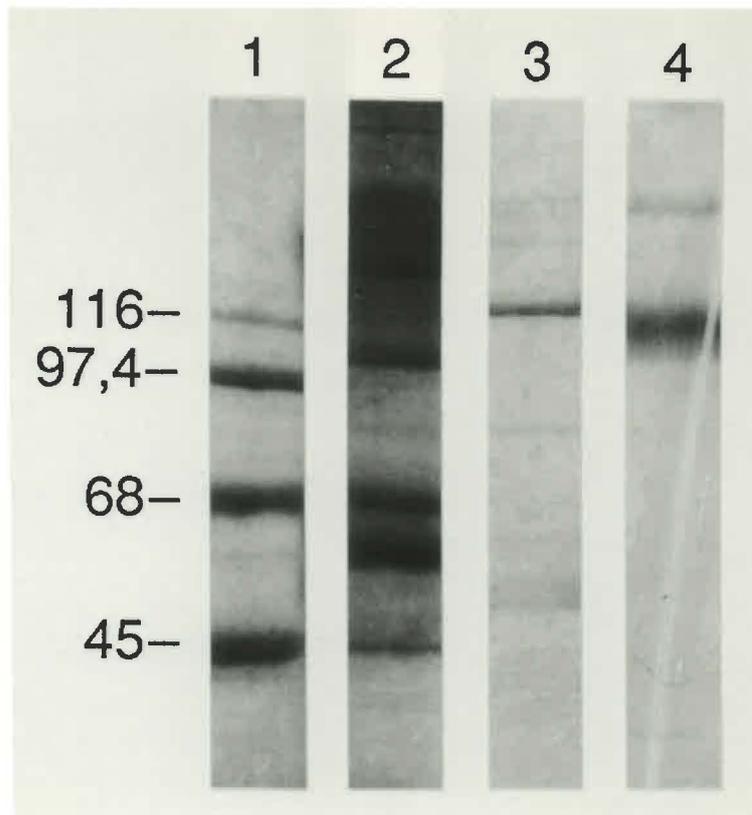


Figure 6. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7,5% des anticorps monoclonaux de l'ascite 2-E.5 à 9 et 10 heures de digestion pepsinique sous un pH de 3,5.

Puits: 1) marqueurs standards de masse moléculaire (kDa)  
2) immunoglobulines G<sub>1</sub> de l'anticorps anti-RSV bovin provenant de l'ascite 2-E.5 après une digestion pepsinique de 9 heures à un pH de 3,5 (106 kDa)  
3) immunoglobulines G<sub>1</sub> de l'anticorps anti-RSV bovin provenant de l'ascite 2-E.5 après une digestion pepsinique de 10 heures à un pH de 3,5 (110, 56 kDa).

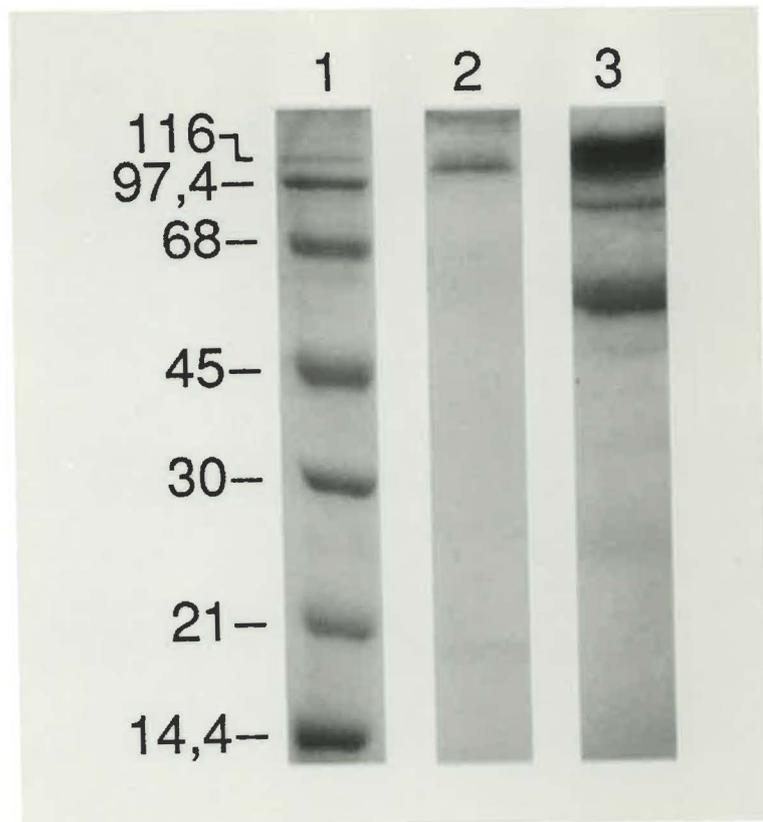
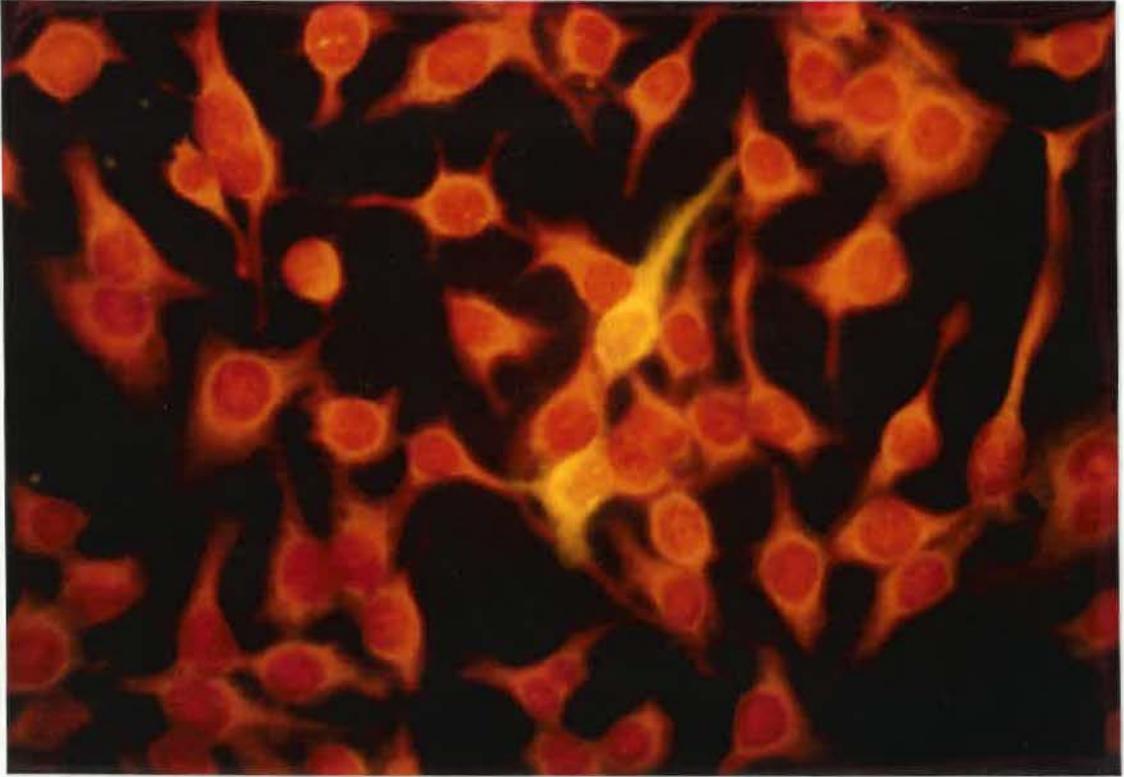


Figure 7. Détection des antigènes coronaviraux par immunofluorescence indirecte sur les cellules L132 infectées et traitées par,

c) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 5-11H.6

d) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 2-E.5.

C



D

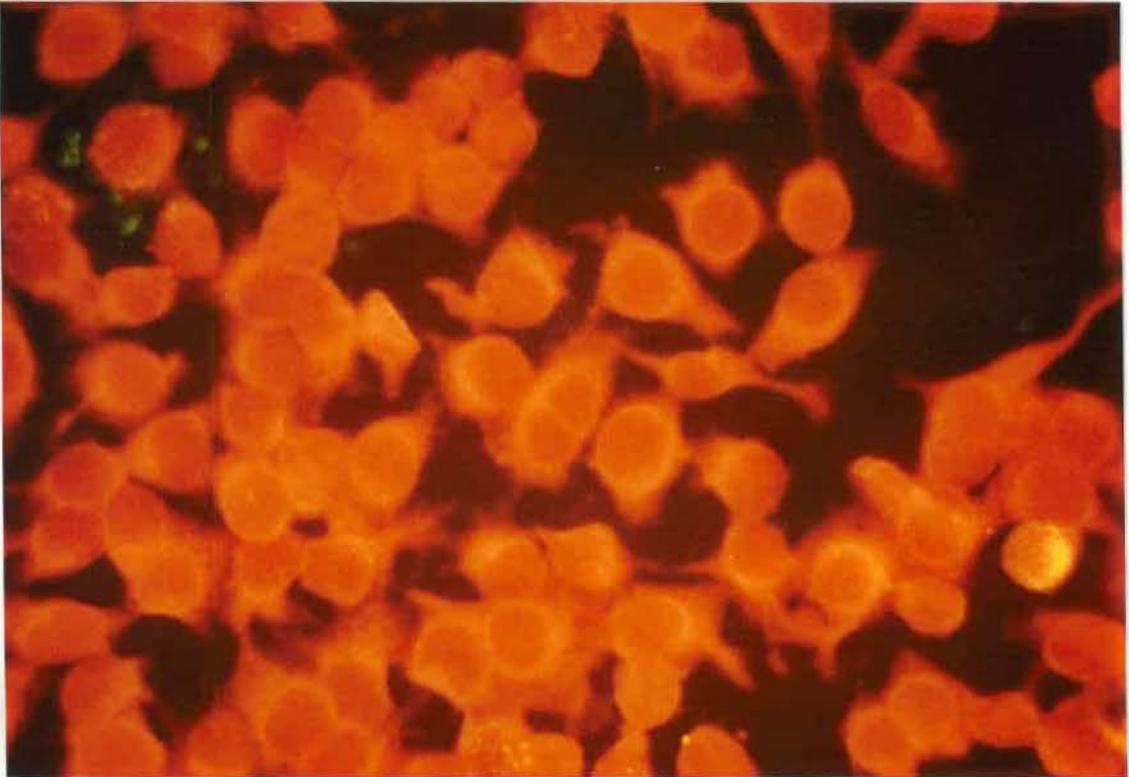


Figure 8. Cellules SK-N-SH non infectées et traitées avec les fragments  $F(ab')_2$  des anticorps 5-11H.6 pour le test d'immunofluorescence indirecte.

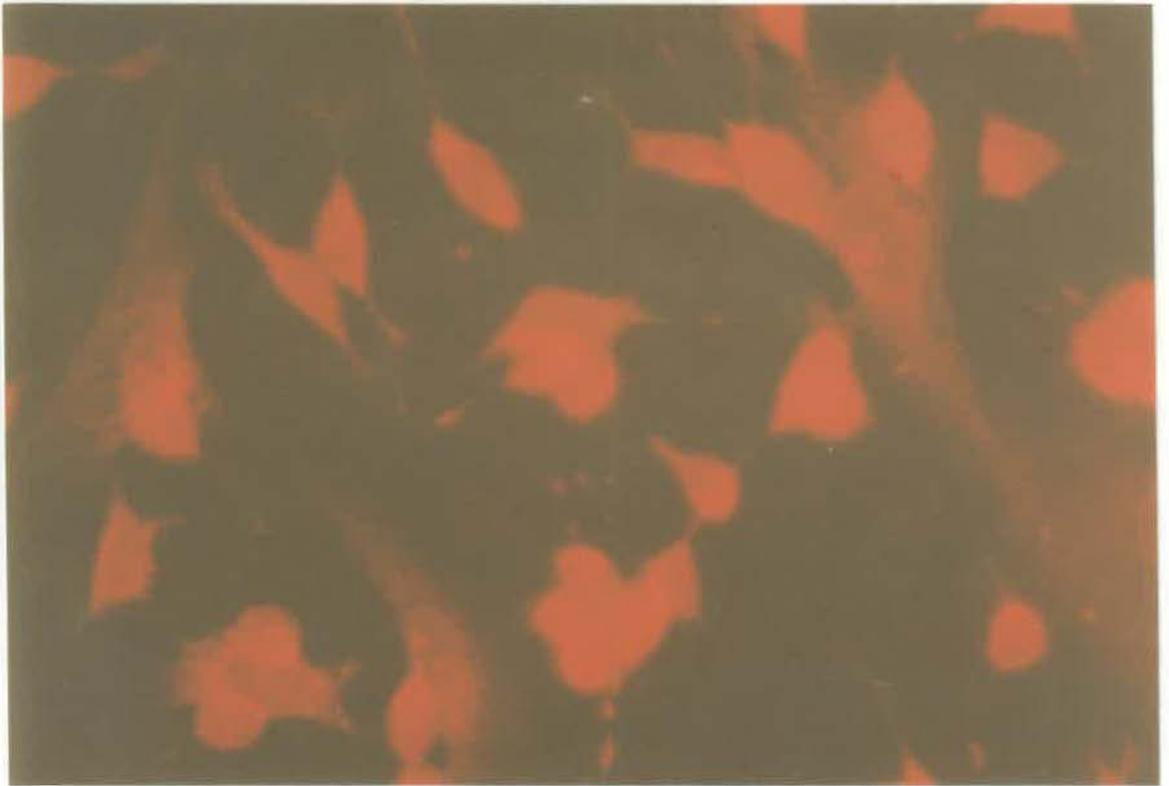
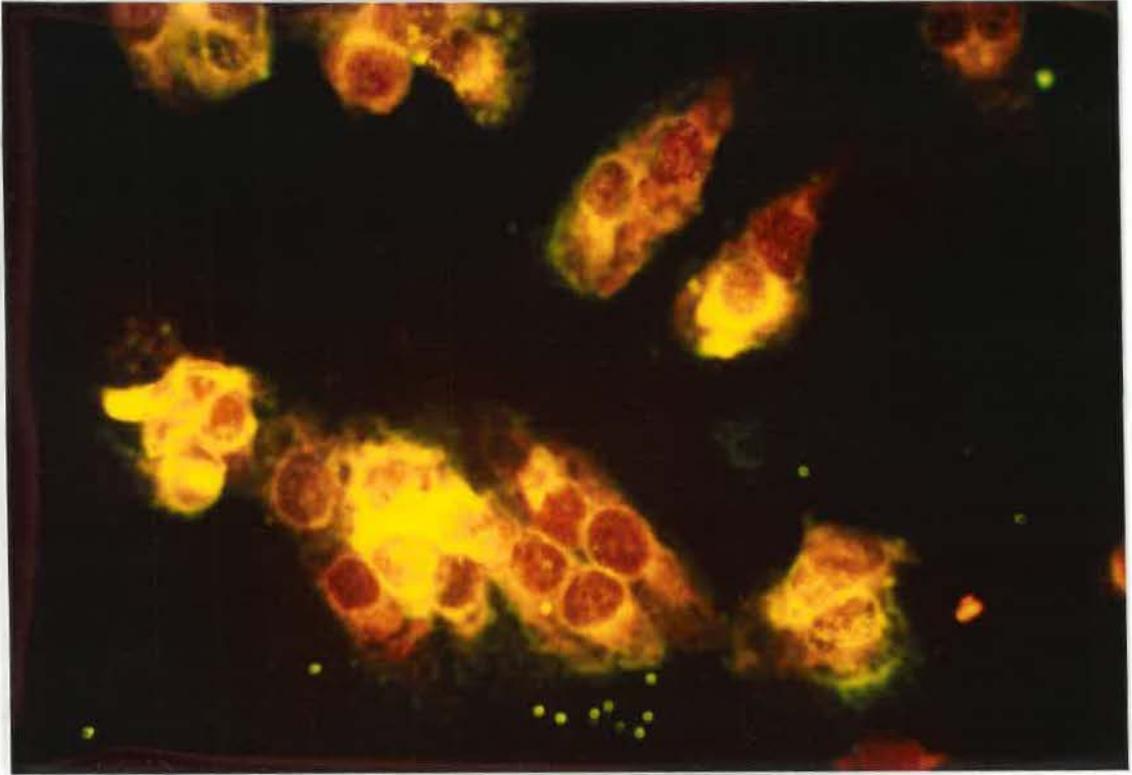


Figure 9. Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte sur des cellules provenant de neuroblastomes humains (SK-N-SH) infectées à une MOI de 1 et à 40 heures post-infection. Après coloration au bleu d'Evans (0,003%),

a) cellules traitées avec l'anticorps anti-229E de l'ascite 5-11H.6

b) cellules traitées avec l'anticorps anti-RSV bovin de l'ascite 2-E.5.

A



B

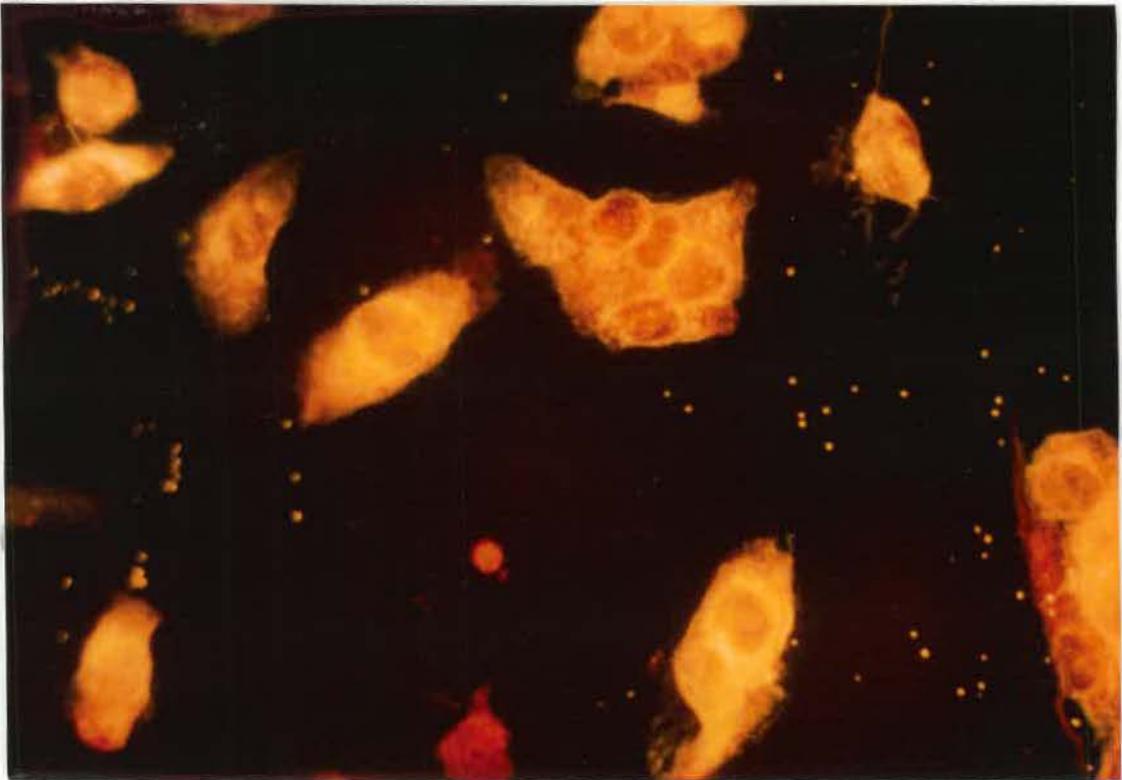
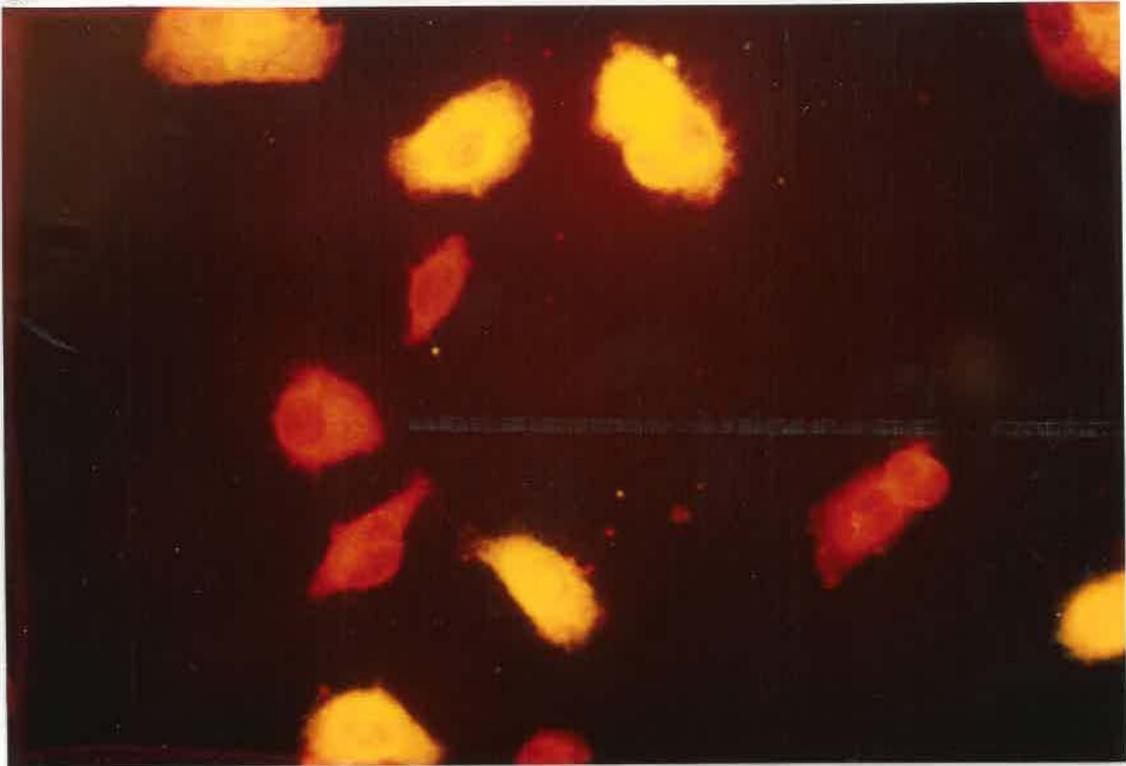


Figure 9. Détection des antigènes coronaviraux par immunofluorescence indirecte sur les cellules provenant de neuroblastomes humains (SK-N-SH) infectées et traitées par,

c) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 5-11H.6

d) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 2-E.5.

C



D

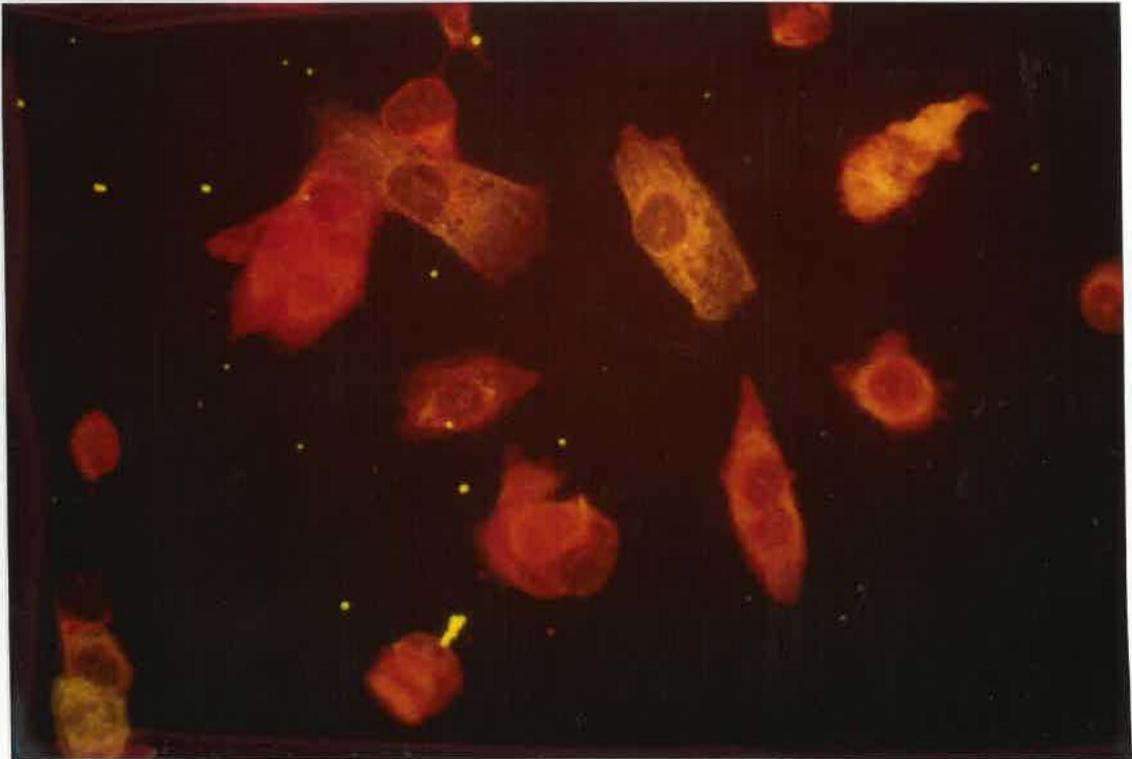


Figure 10. Cellules H4 non infectées et traitées avec les fragments  $F(ab')_2$  des anticorps 5-11H.6 pour le test d'immunofluorescence indirecte.

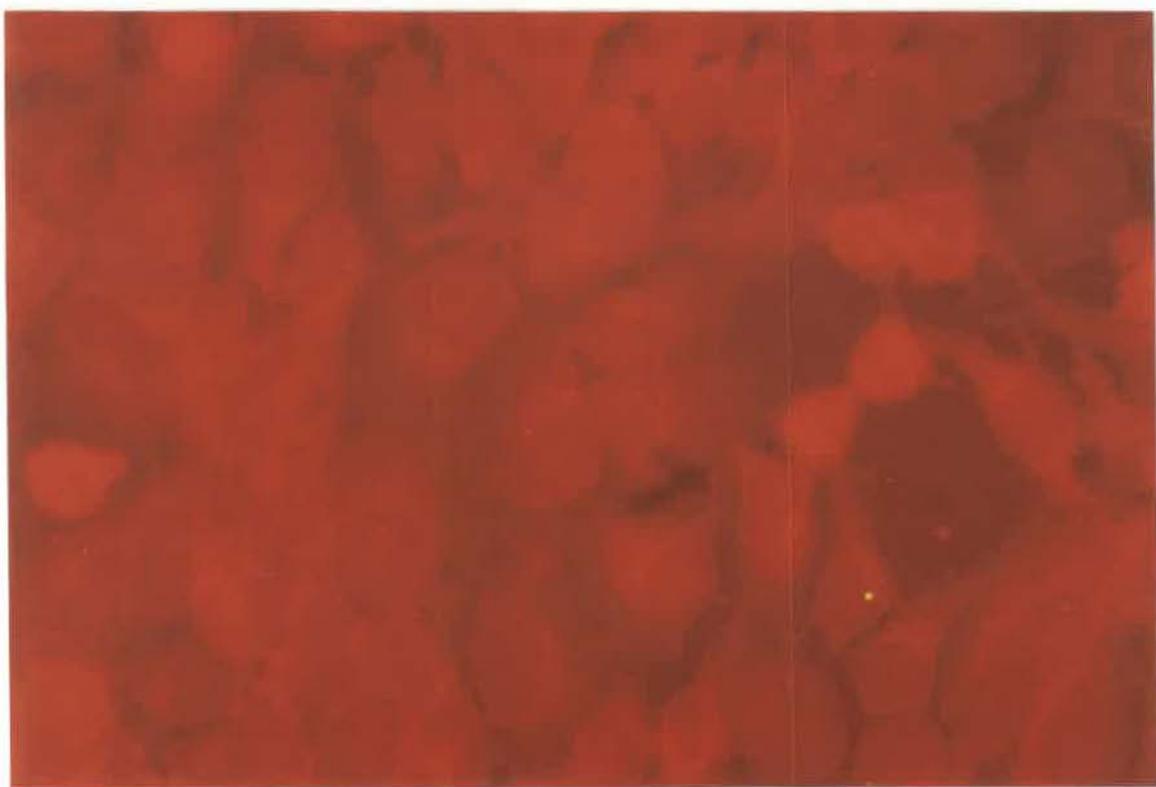
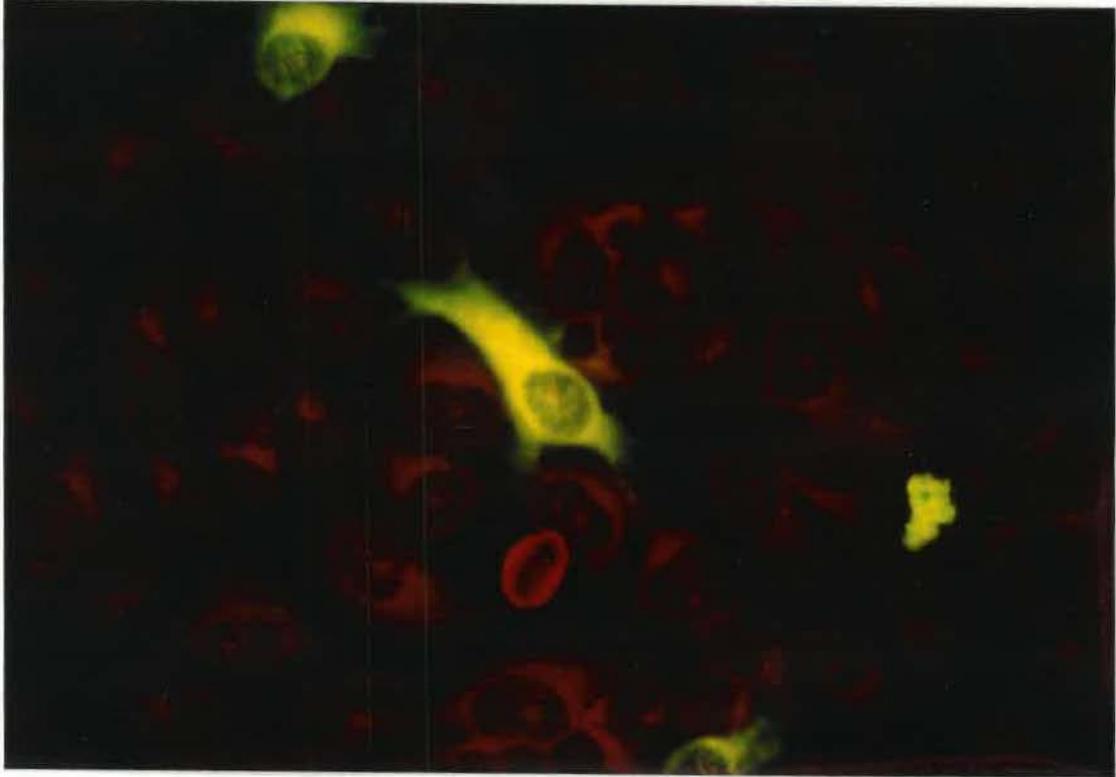


Figure 11. Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte sur des cellules provenant de neurogliomes humains (H4) infectées à une MOI de 1 et à 40 heures post- infection. Après coloration au bleu d'Evans (0,003%),

- a) cellules traitées avec l'anticorps anti-229E de l'ascite 5-11H.6
- b) cellules traitées avec l'anticorps anti-RSV bovin de l'ascite 2-E.5.

A



B

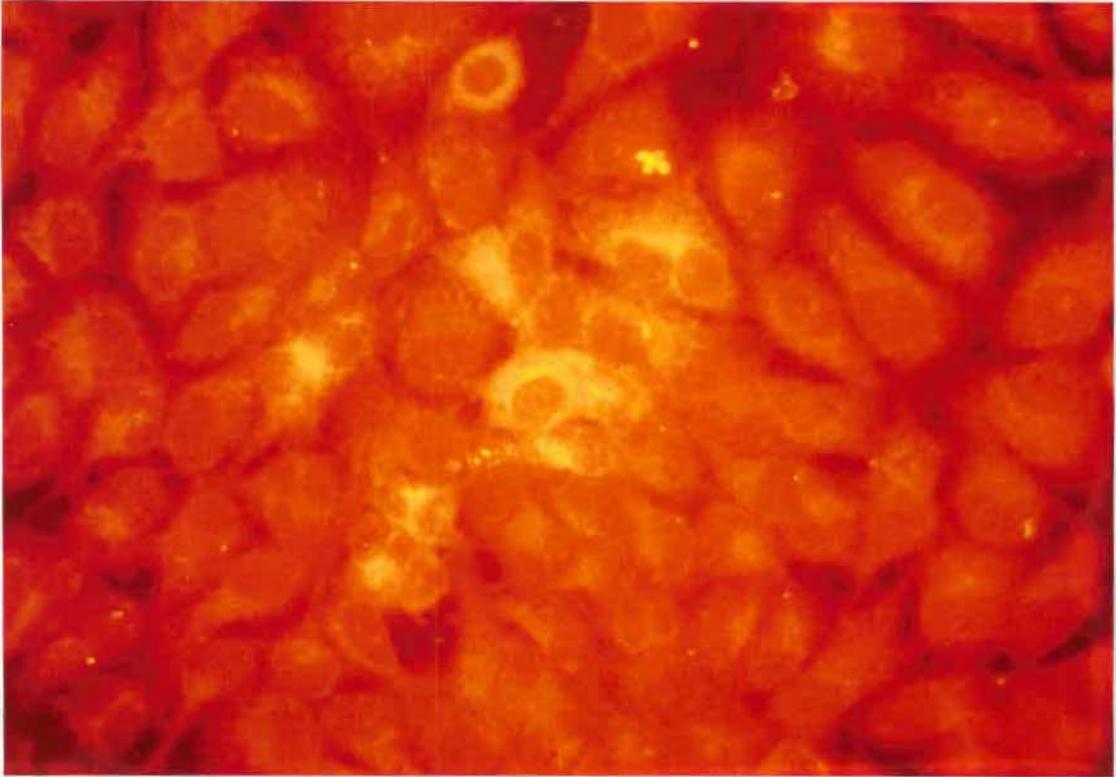
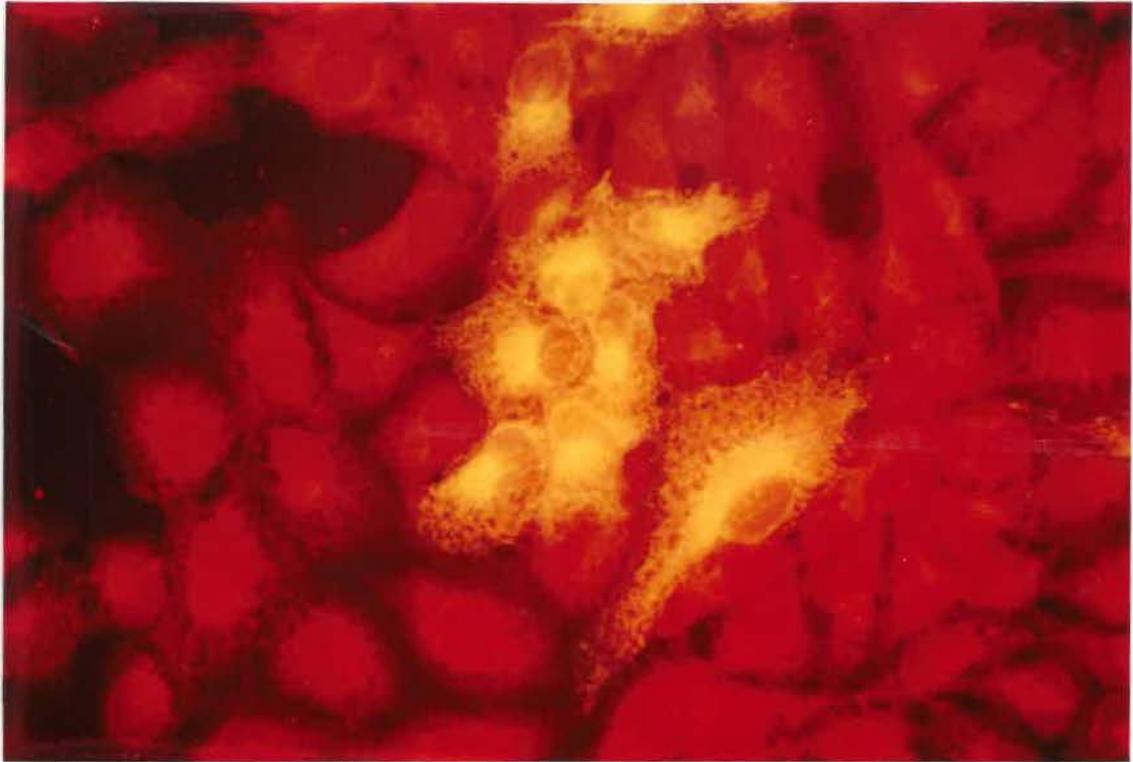


Figure 11. Détection des antigènes coronaviraux par immunofluorescence indirecte sur les cellules provenant de neurogliomes humains (H4) infectées et traitées par,

- c) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 5-11H.6
- d) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 2-E.5.

C



D

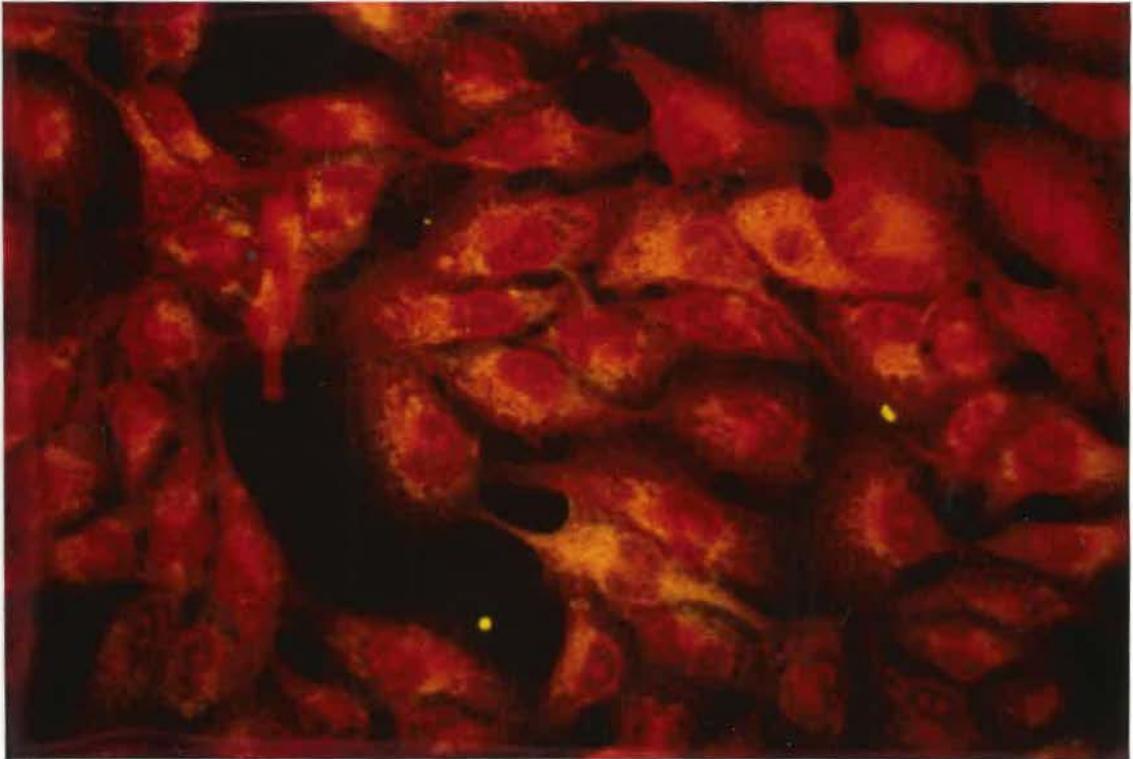


Figure 12. Cellules M03.13 non infectées et traitées avec les fragments  $F(ab')_2$  des anticorps 5-11H.6 pour le test d'immunofluorescence indirecte.

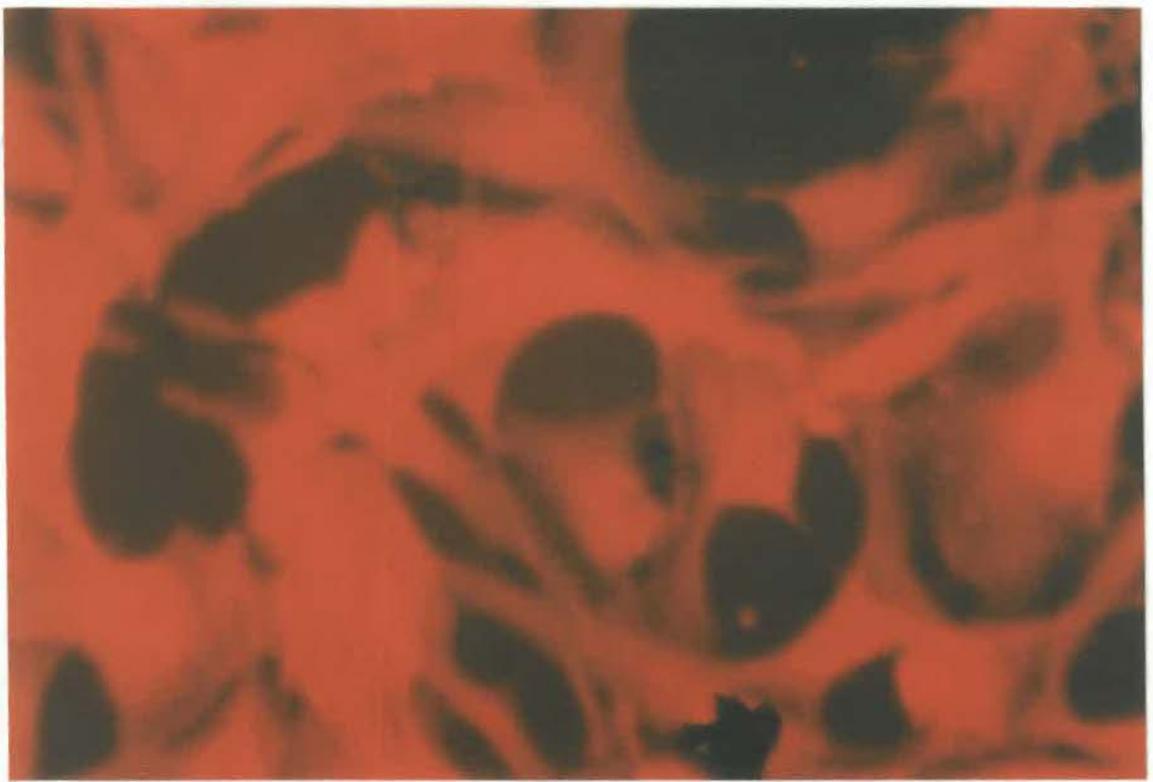
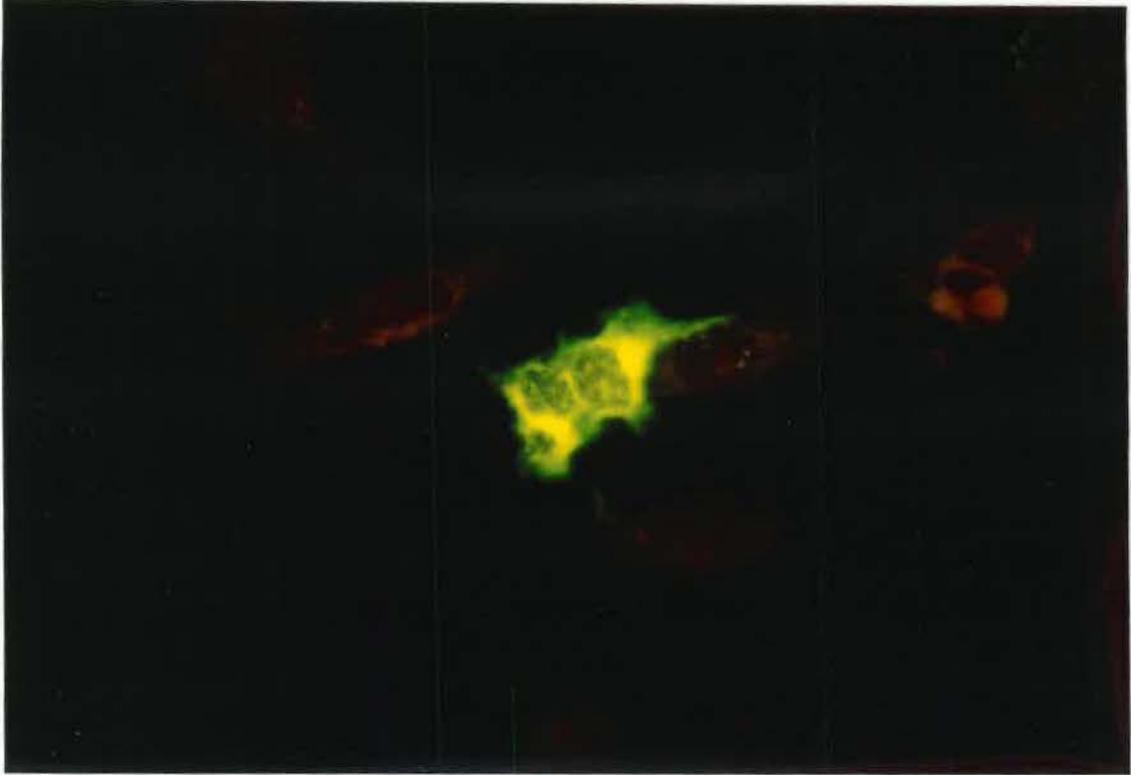


Figure 13. Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte sur des cellules oligodendrocytes humaines (MO3.13) infectées à une MOI de 1 et à 40 heures post-infection. Après coloration au bleu d'Evans (0,003%),

- a) cellules traitées avec l'anticorps anti-229E de l'ascite 5-11H.6.
- b) cellules traitées avec l'anticorps anti-RSV bovin de l'ascite 2-E.5.

A



B

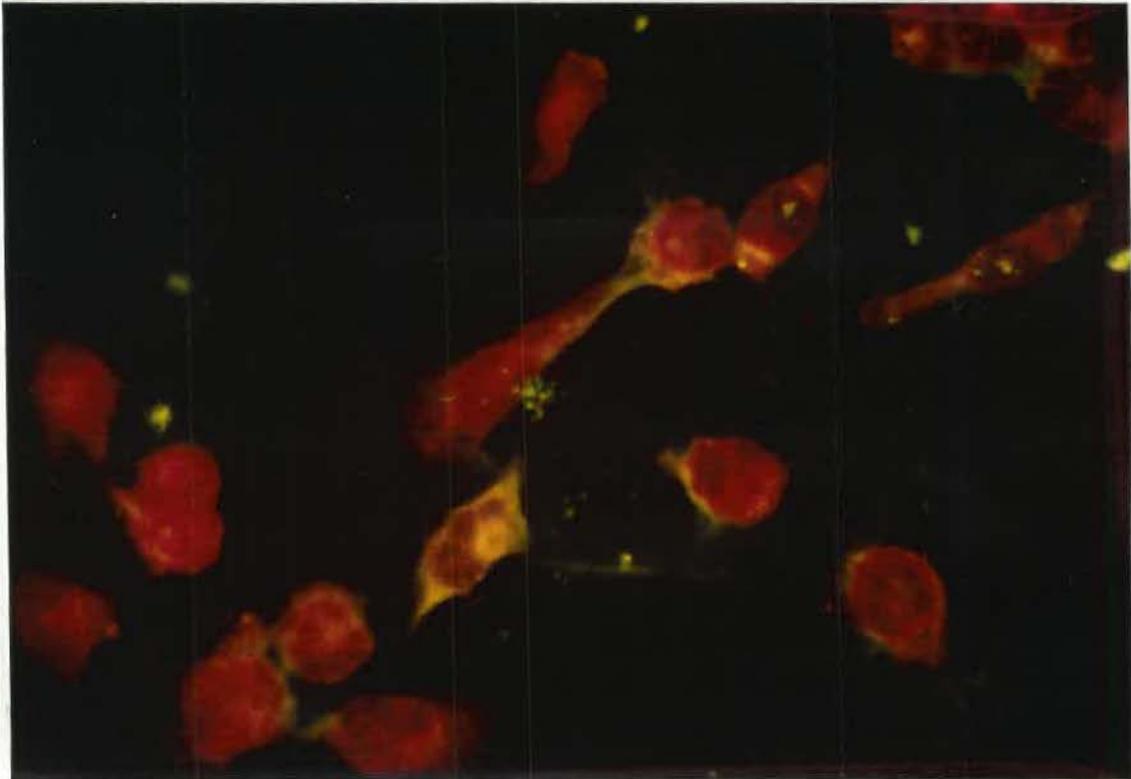
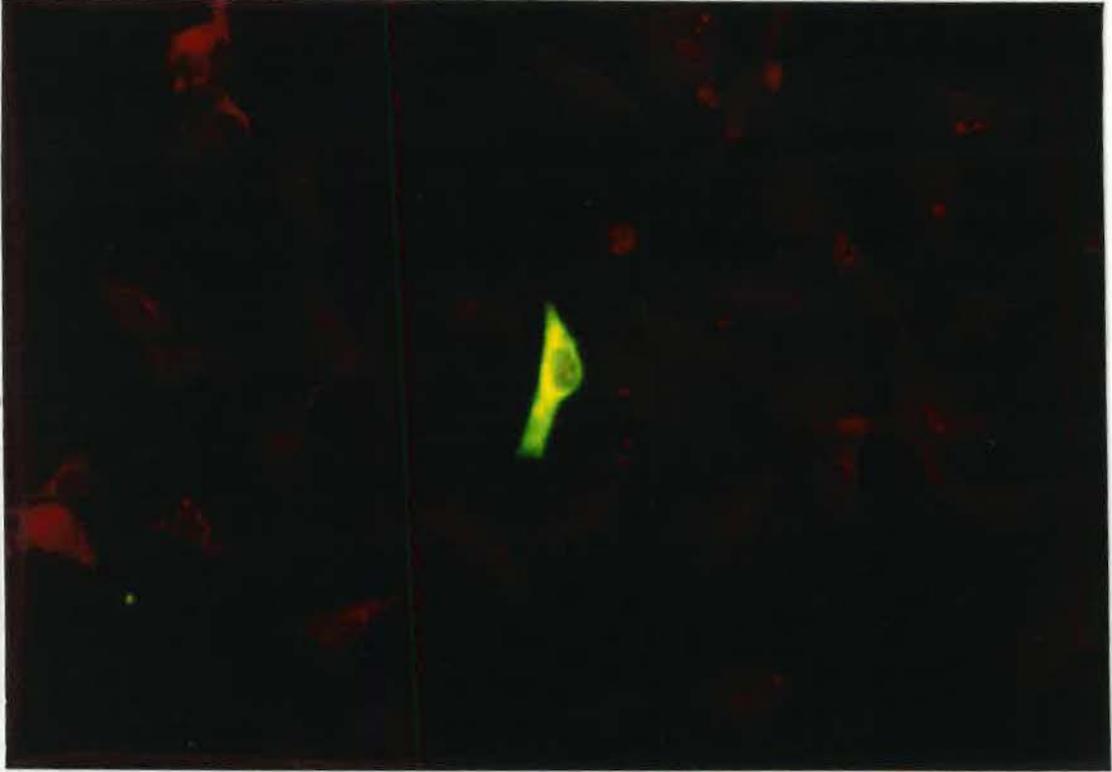


Figure 13. Détection des antigènes coronaviraux par immunofluorescence indirecte sur les cellules d'oligodendrocytes humains (MO3.13) infectées et traitées par,

- c) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 5-11H.6
- d) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 2-E.5.

C



D



Figure 14. Cellules TE-671 non infectées et traitées avec les fragments  $F(ab')_2$  des anticorps 5-11H.6 pour le test d'immunofluorescence indirecte.

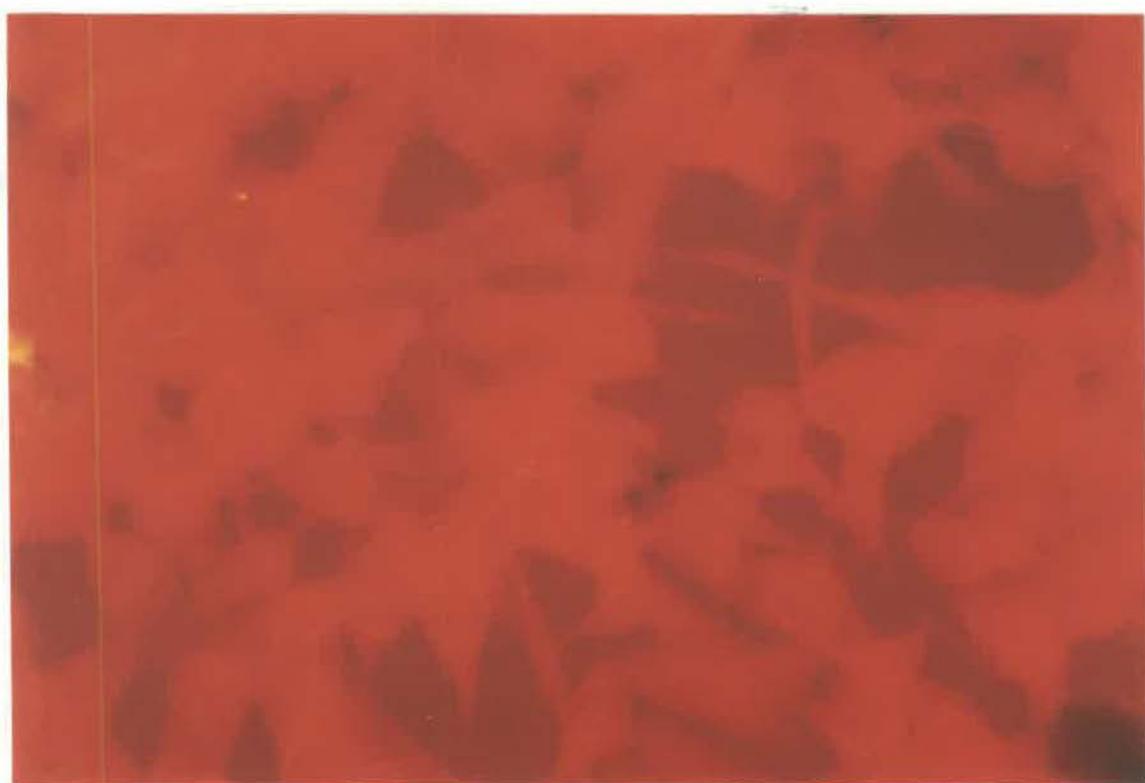
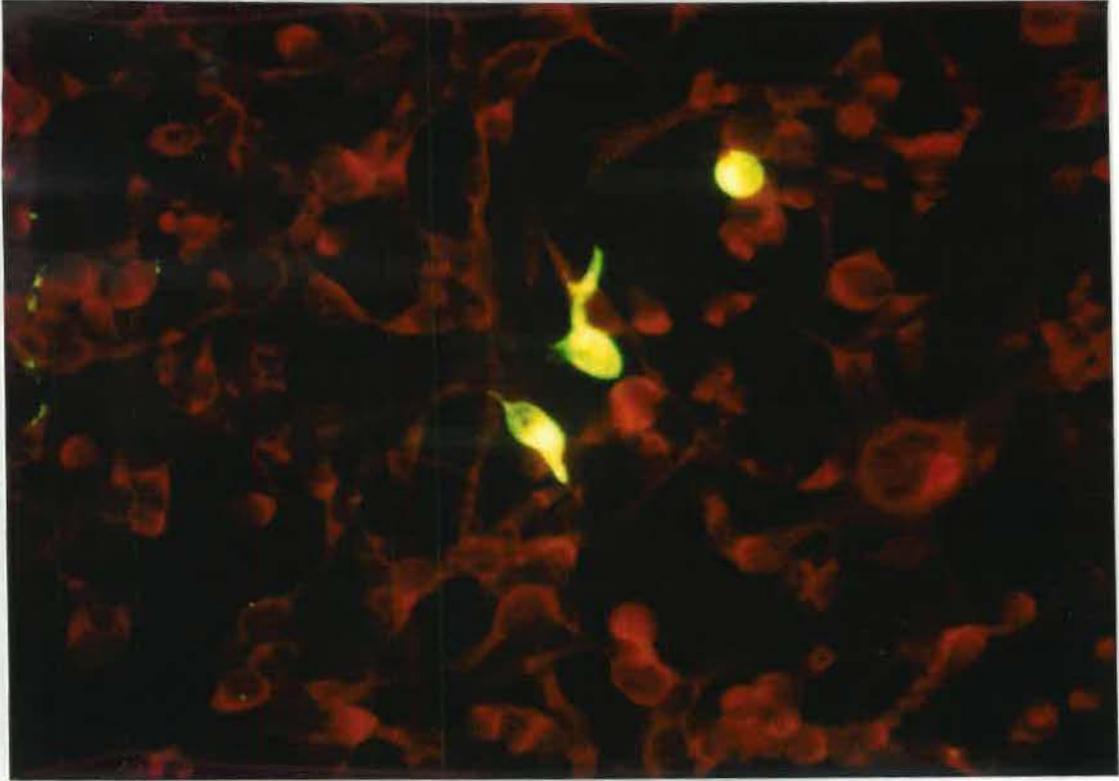


Figure 15. Détection des antigènes coronaviraux par immunofluorescence indirecte sur les cellules provenant de rhabdomyosarcome humain (TE-671) infectées et traitées par,

- c) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 5-11H.6
- d) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 2-E.5.

C



D

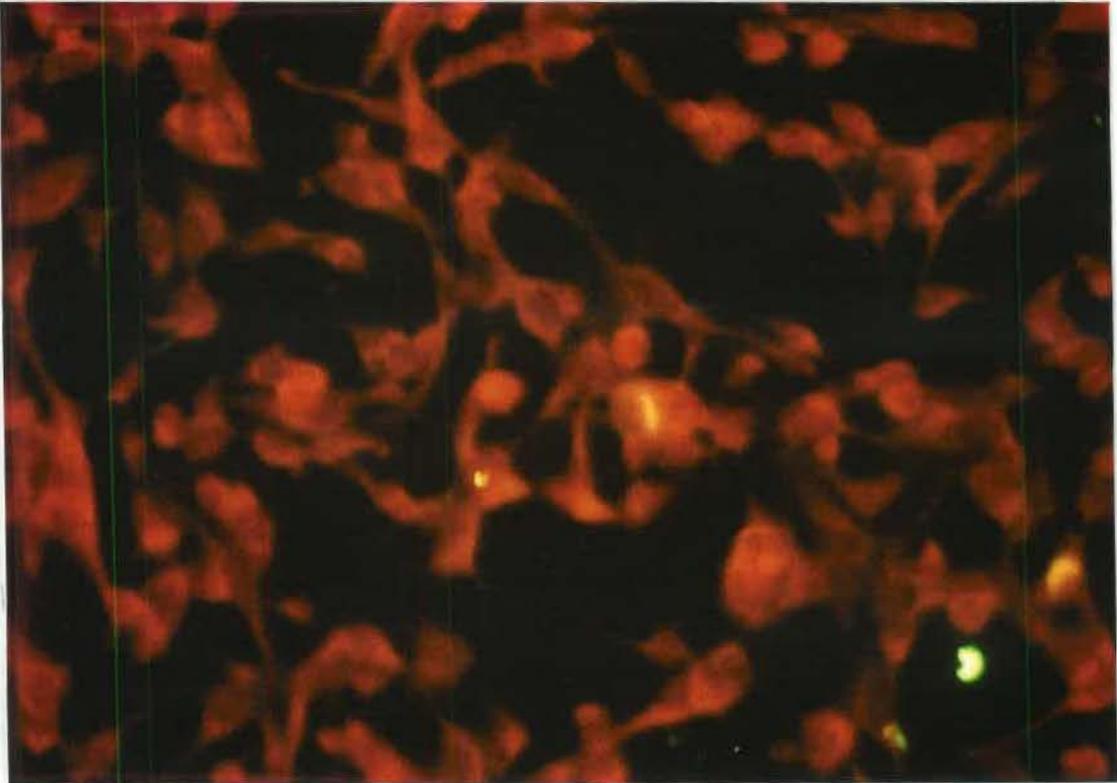


Figure 16. Cellules U-87 MG non infectées et traitées avec les fragments  $F(ab')_2$  des anticorps 5-11H.6 pour le test d'immunofluorescence indirecte.

100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200

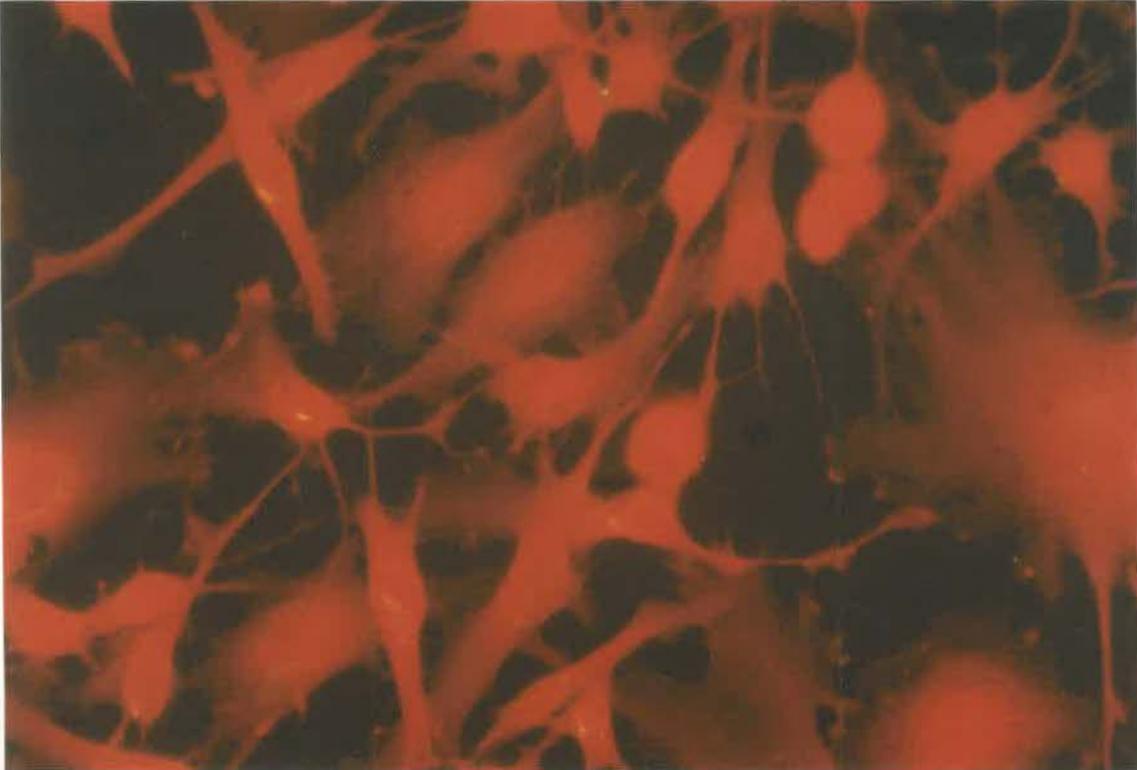
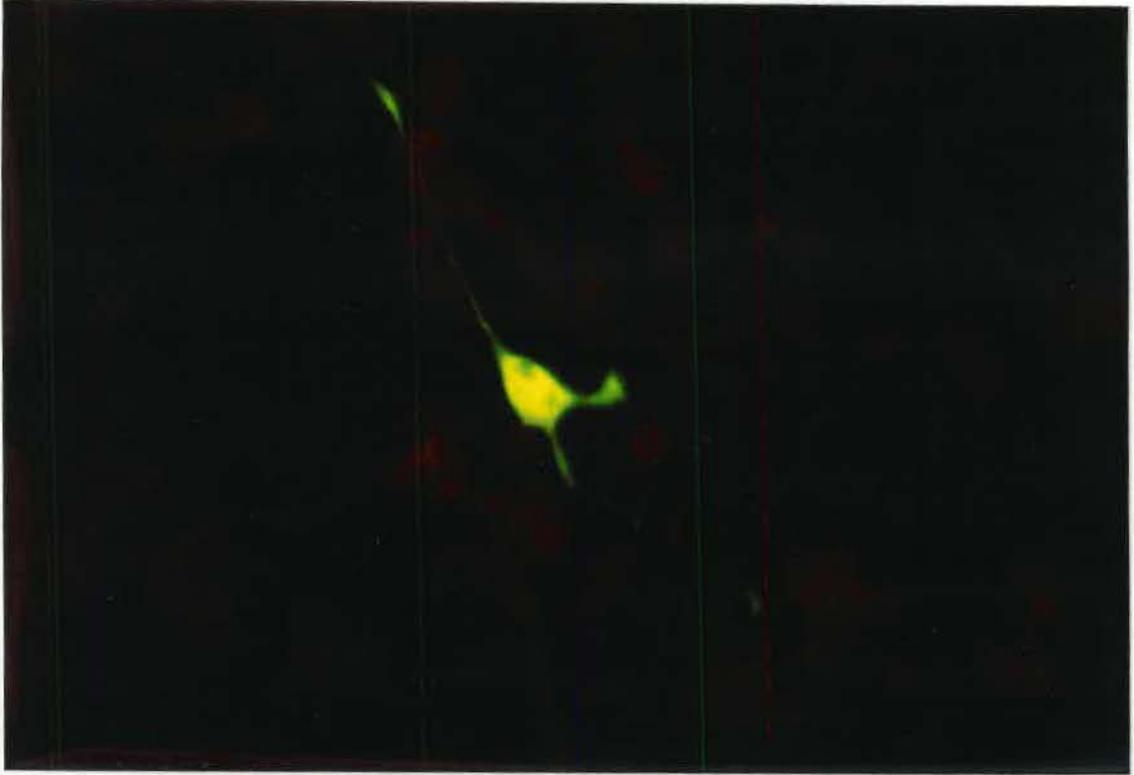


Figure 17. Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte sur des cellules provenant de glioblastomes humains (U-87 MG) infectées à une MOI de 1 et à 40 heures post-infection. Après coloration au bleu d'Evans (0,003%),

- a) cellules traitées avec l'anticorps anti-229E de l'ascite 5-11H.6
- b) cellules traitées avec l'anticorps anti-RSV bovin de l'ascite 2-E.5.

A



B

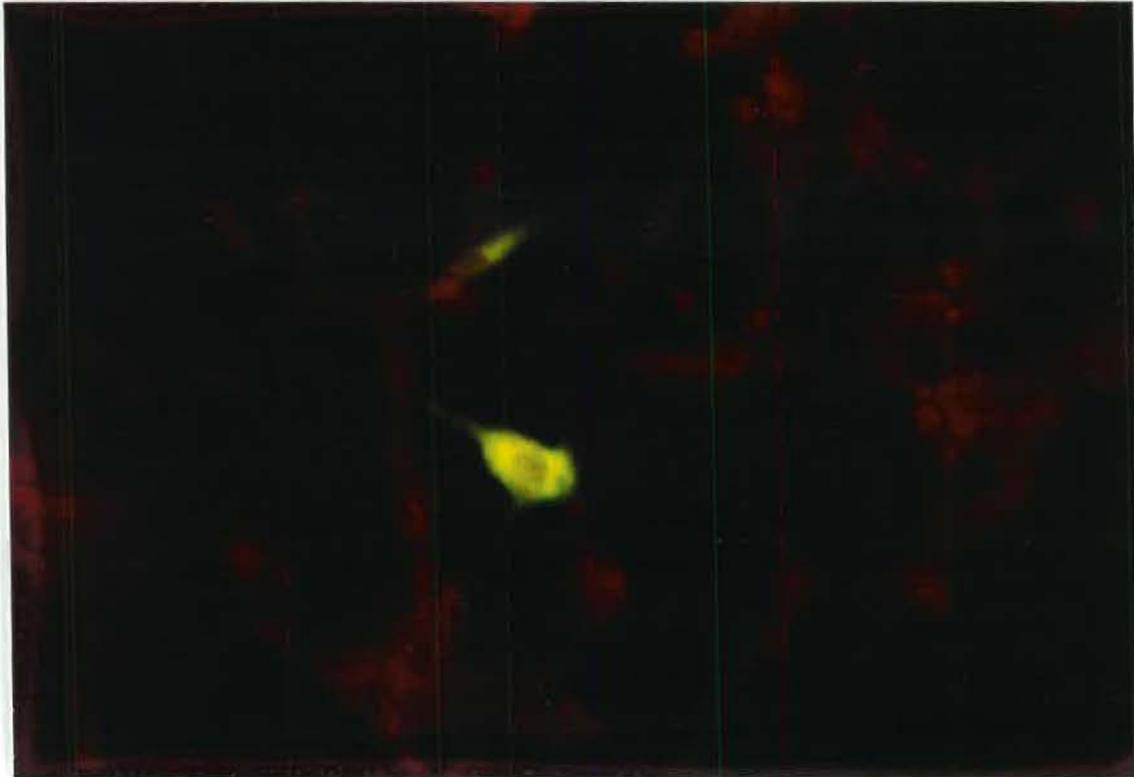
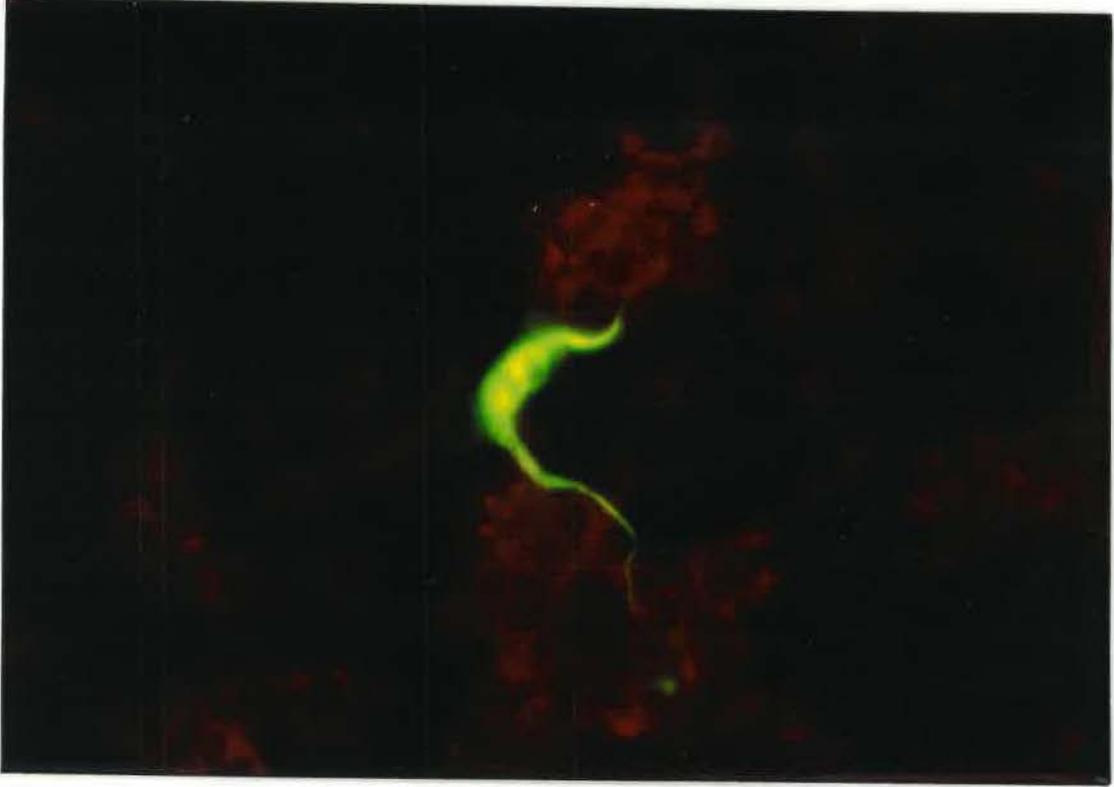


Figure 17. Détection des antigènes coronaviraux par immunofluorescence indirecte sur les cellules provenant de glioblastomes humains (U-87 MG) infectées et traitées par,

- c) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 5-11H.6
- d) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 2-E.5.

C



D

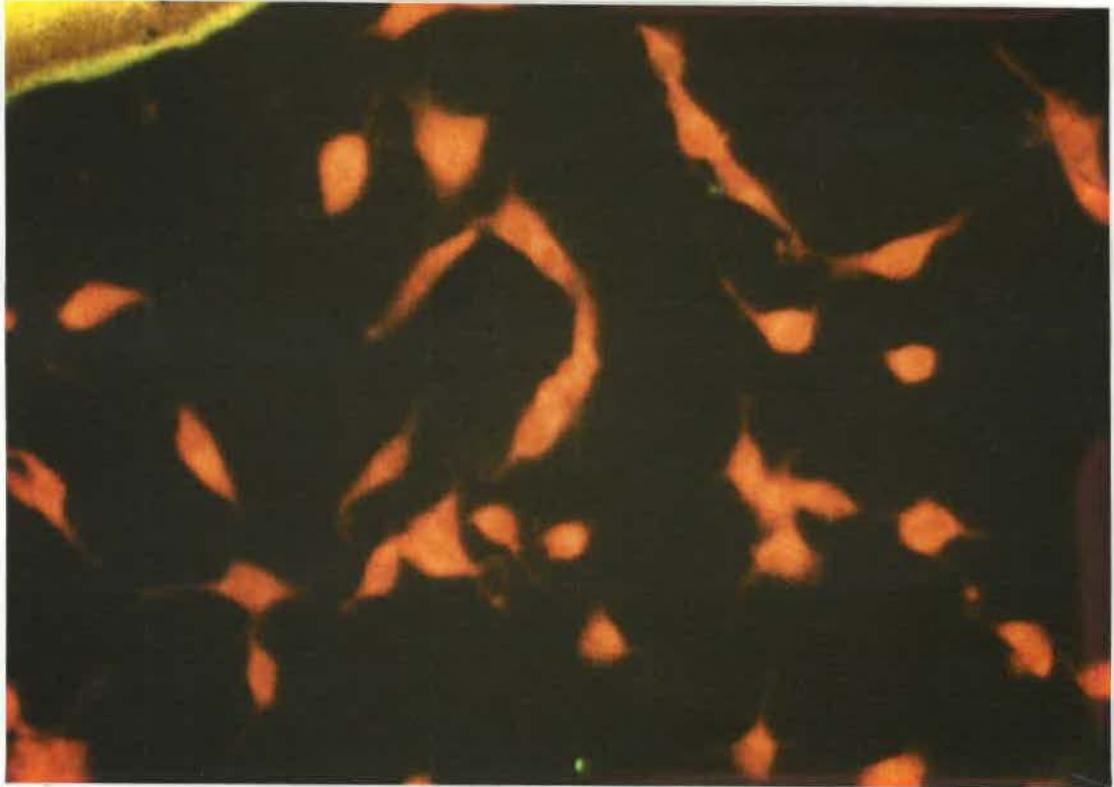


Figure 18. Cellules U-373 MG non infectées et traitées avec les fragments  $F(ab')_2$  des anticorps 5-11H.6 pour le test d'immunofluorescence indirecte.

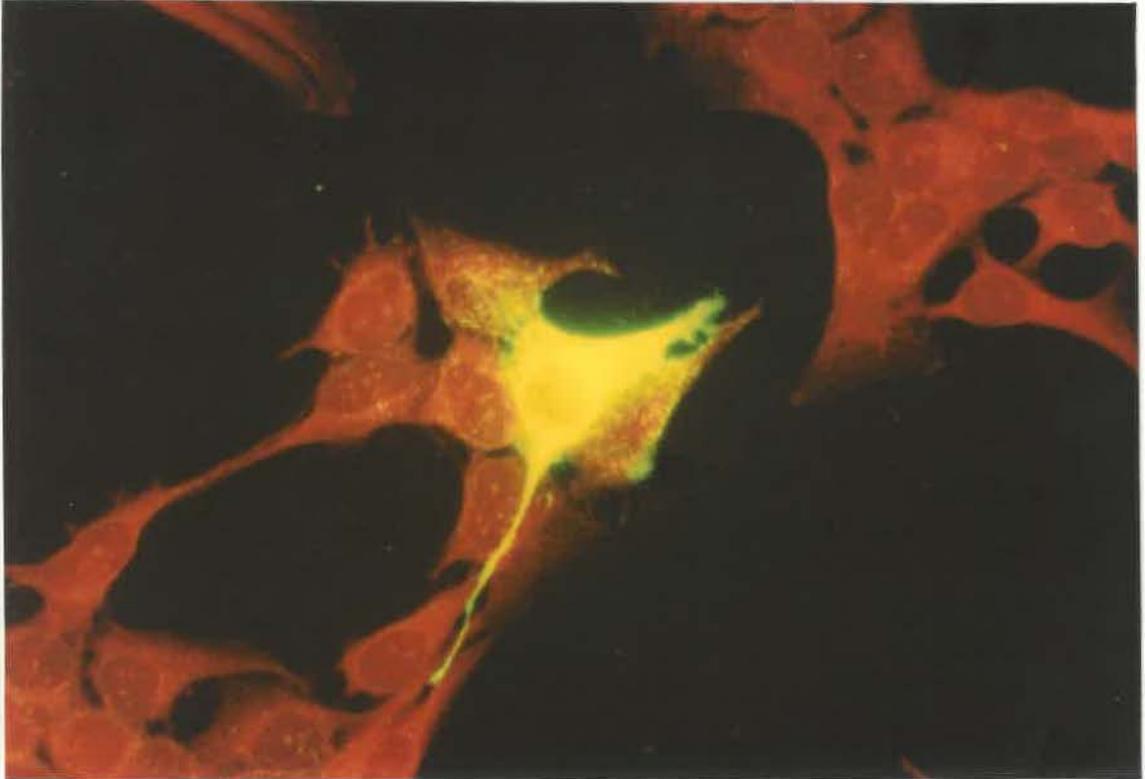
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200



Figure 19. Détection des antigènes viraux du HCV-229E par immunofluorescence indirecte sur des cellules provenant de glioblastomes humains (U-373 MG) infectées à une MOI de 1 et à 40 heures post-infection. Après coloration au bleu d'Evans (0,003%),

- a) cellules traitées avec l'anticorps anti-229E de l'ascite 5-11H.6
- b) cellules traitées avec l'anticorps anti-RSV bovin de l'ascite 2-E.5.

A



B

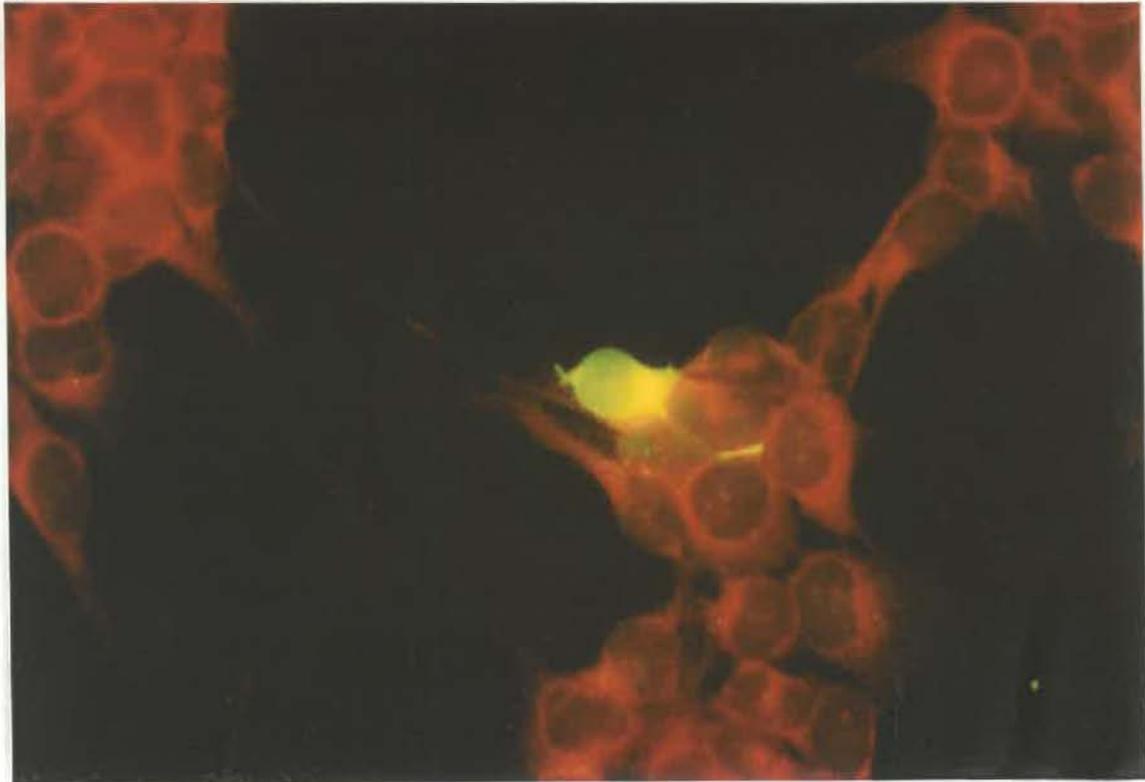
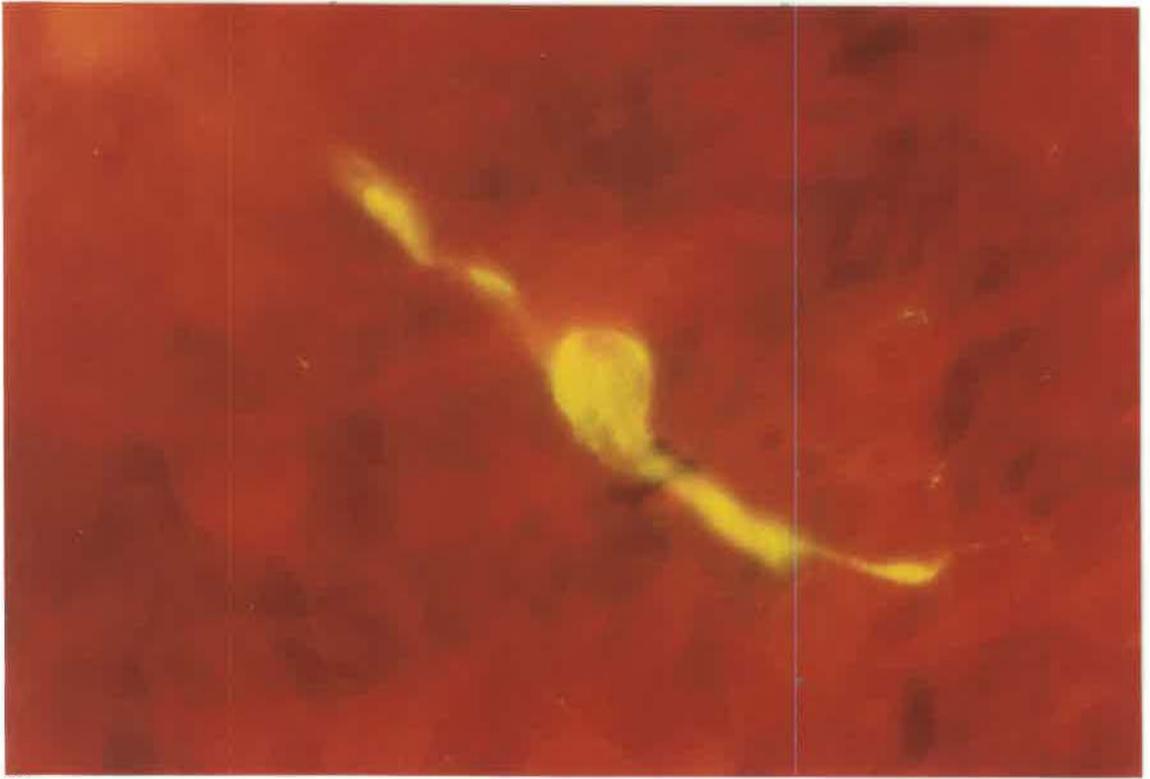
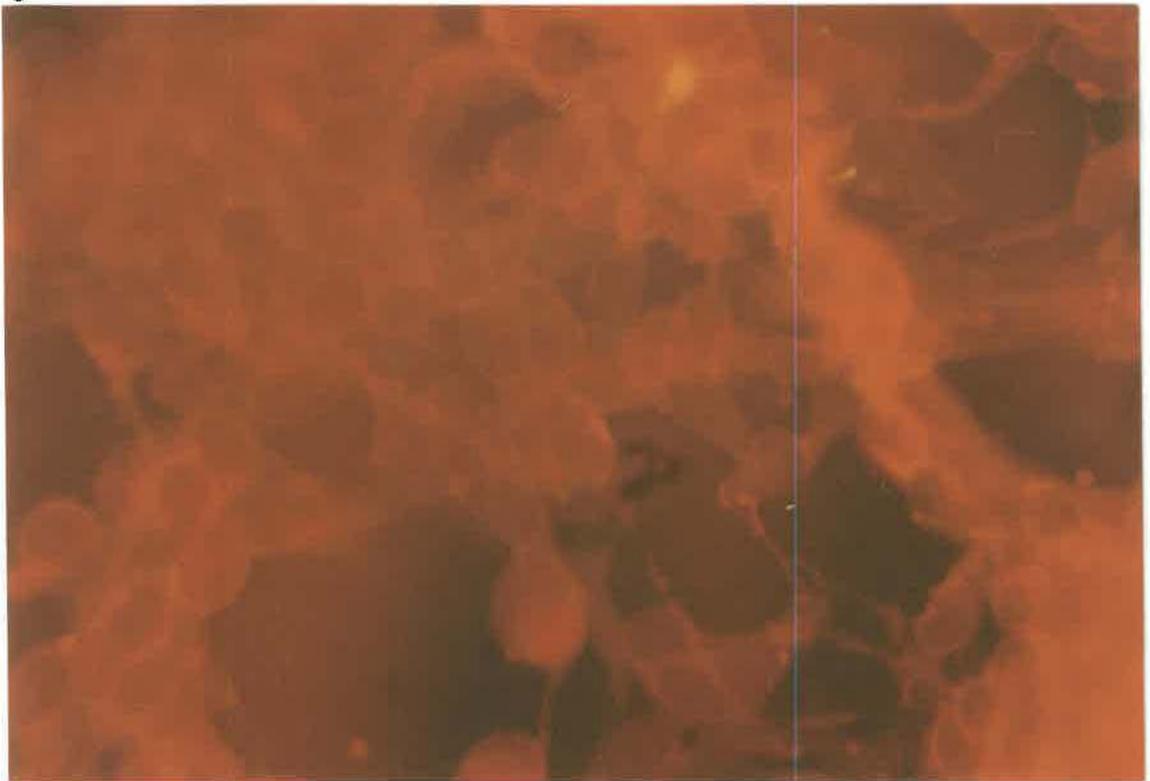


Figure 19. Détection des antigènes coronaviraux par immunofluorescence indirecte sur les cellules provenant de glioblastomes humains (U-373 MG) infectées et traitées par,

- c) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 5-11H.6
- d) les fragments  $F(ab')_2$  des immunoglobulines de l'ascite 2-E.5.



C



D

Figure 20. Fluorographie des protéines du HCV-229E marquées à la [<sup>35</sup>S]méthionine.

Temps d'exposition du gel= 20 jours

Puits: 1) marqueurs standards de masse moléculaire (kDa)  
2) virus purifié (145, 105, 95, 65, 45-50, 26 kDa)  
3) virus semi-purifié (105, 65, 26 kDa)  
4) virus précipité au polyéthylèneglycol (105, 65, 26 kDa).

Les bandes à 95 et 45-50 kDa correspondent à du matériel non spécifique.



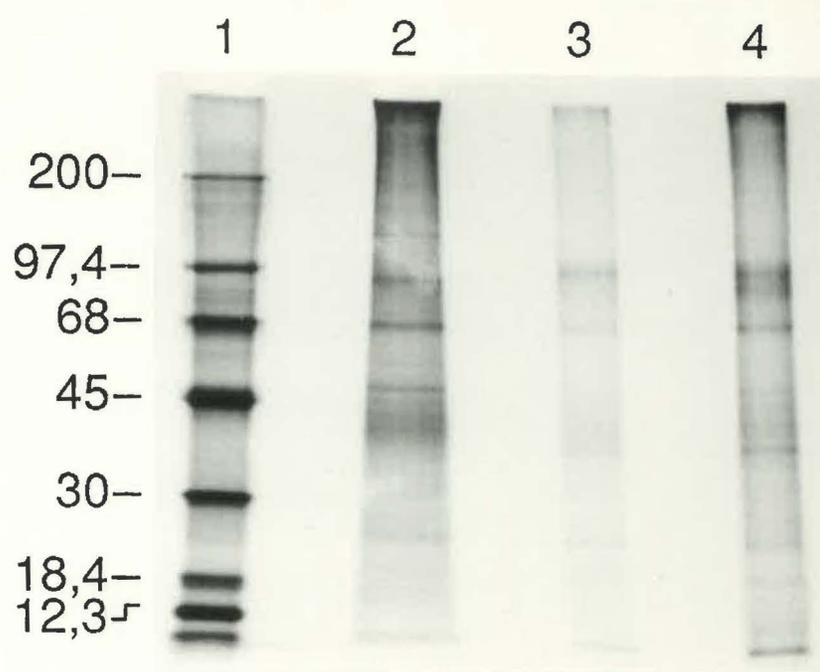


Figure 21. Autoradiogramme des protéines virales marquées au [ $^{35}\text{S}$ ]méthionine après immunoprécipitation.

- Puits:
- 1) marqueurs de masse moléculaire (kDa)
  - 2) protéines virales marquées et immunoprécipitées avec les IgG<sub>1</sub> complètes de l'ascite 5-11H.6 (75, 55 kDa)
  - 3) protéines virales marquées et immunoprécipitées avec les fragments F(ab')<sub>2</sub> des IgG<sub>1</sub> de l'ascite 5-11H.6 (75, 55 kDa)
  - 4) protéines virales marquées et immunoprécipitées avec l'ascite provenant des cellules myélomateuses 653.

Dans les puits 2, 3 et 4, on retrouve du matériel non spécifique à 40-45 kDa.

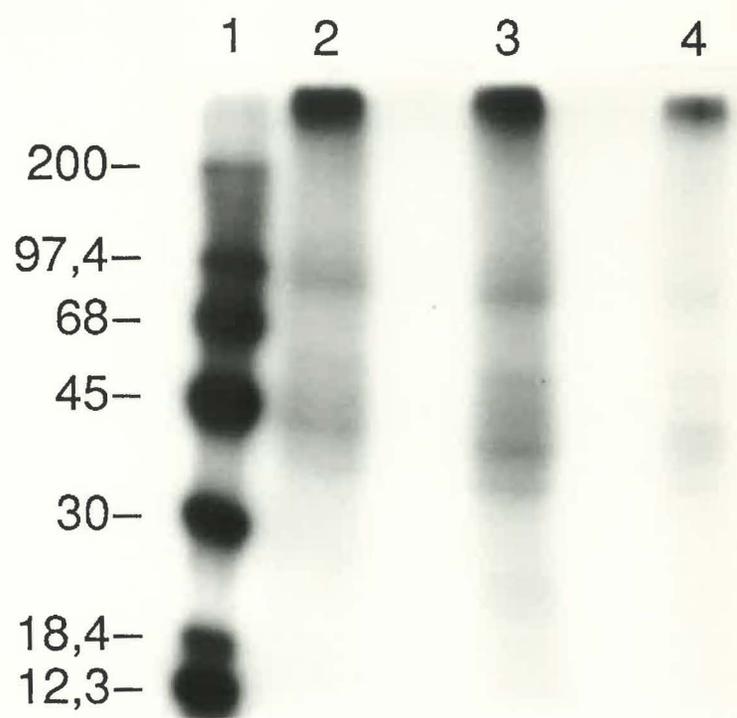


Figure 22. Autoradiogramme des protéines virales marquées au [<sup>35</sup>S]méthionine après immunoprécipitation.

- Puits:
- 1) marqueurs de masse moléculaire (kDa)
  - 2) protéines virales marquées et immunoprécipitées avec les IgG<sub>1</sub> complètes de l'ascite 2-E.5 (75 et 43 kDa)
  - 3) protéines virales marquées et immunoprécipitées avec les fragments F(ab')<sub>2</sub> des IgG<sub>1</sub> de l'ascite 2-E.5 (75 et 43 kDa).

Dans les puits 2 et 3, on retrouve du matériel non spécifiques à 40-45 kDa.



Figure 23: Cinétique de réplication à 33 °C du HCV-229E intracellulaire et extracellulaire produit sur les cellules L132 et titré par la méthode de test de plages sur les cellules L132.

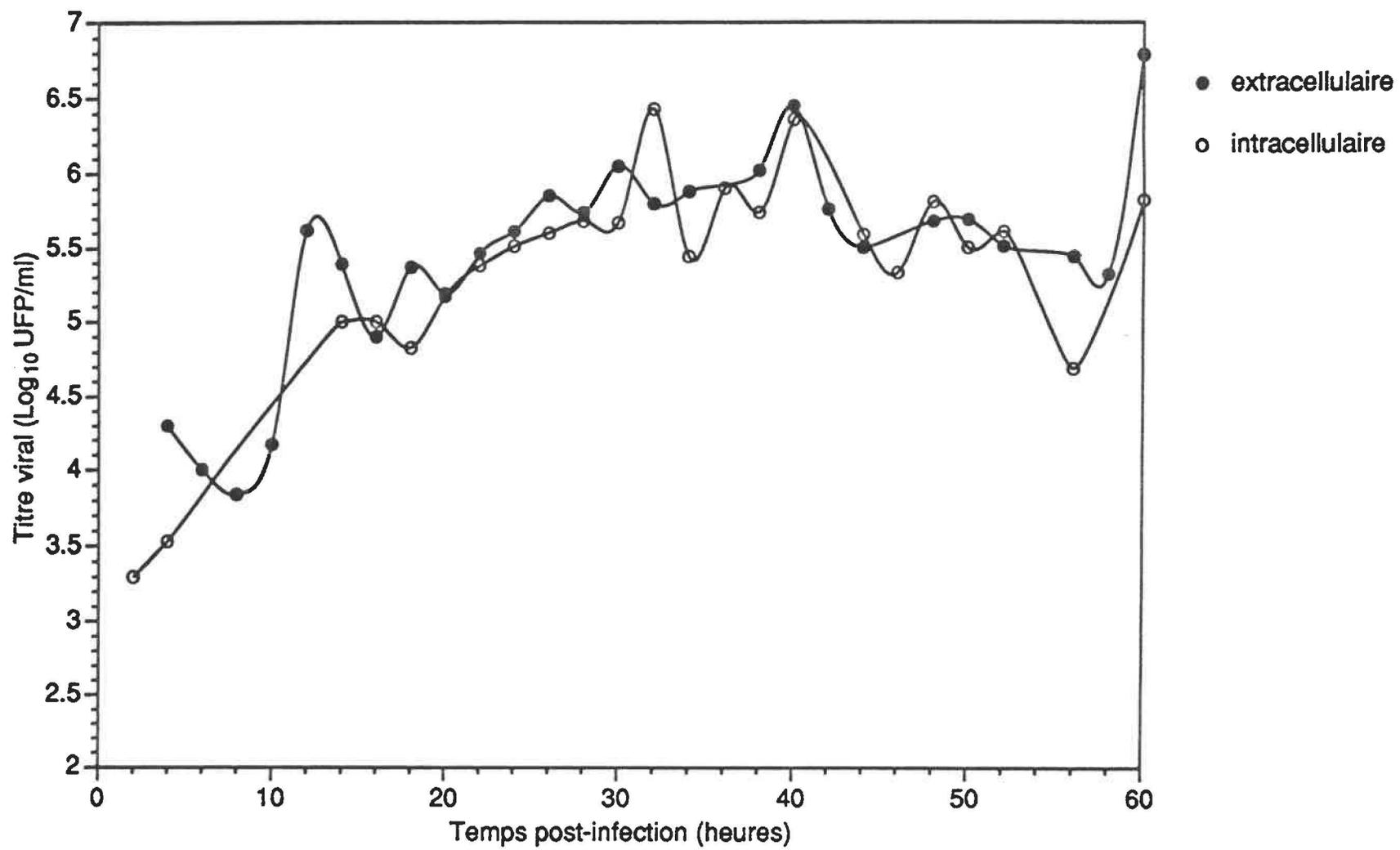


Figure 24: Cinétique de répllication à 33 °C du HCV-229E intracellulaire et extracellulaire produit sur les cellules SK-N-SH et titré par la méthode de tests de plages sur les cellules L132.

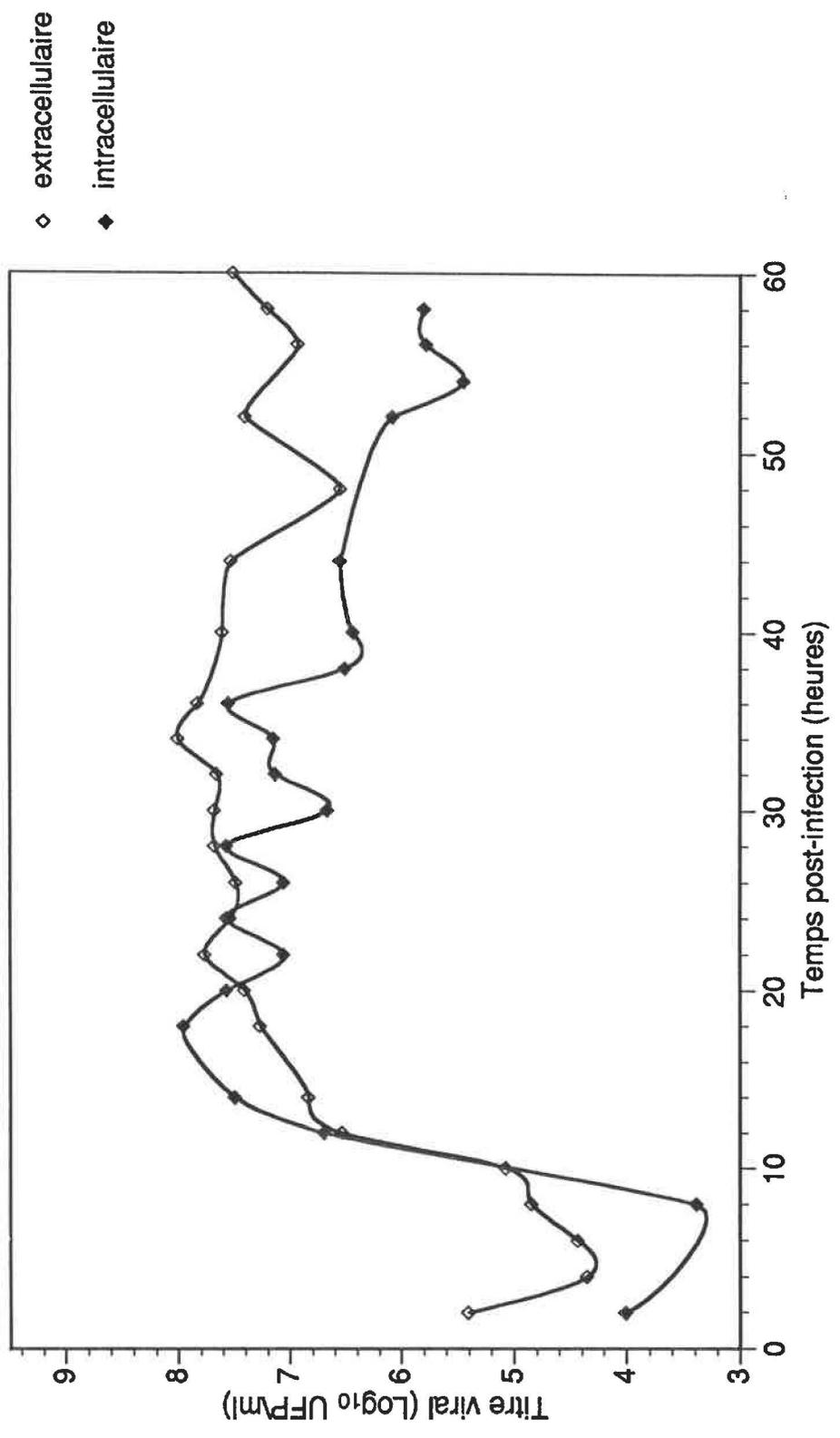


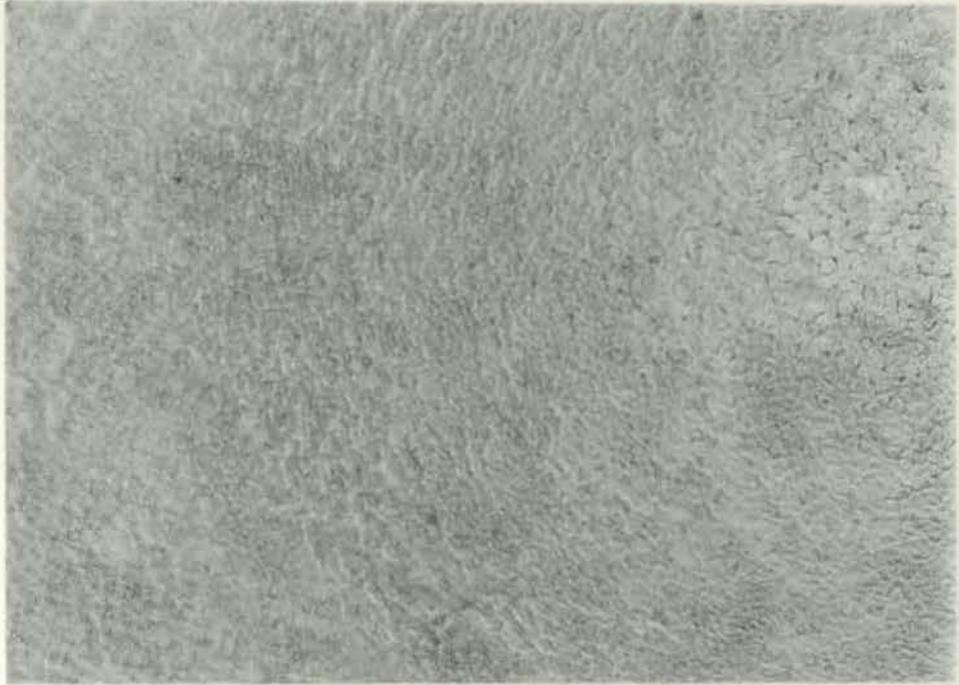
Figure 25: Test d'immunoperoxydase indirecte

a) cupule de cellules non infectées

b) cupule de cellules infectées

la flèche désigne une cellule infectée sur laquelle  
la réaction d'immunoperoxydase a eu lieu.

A



B

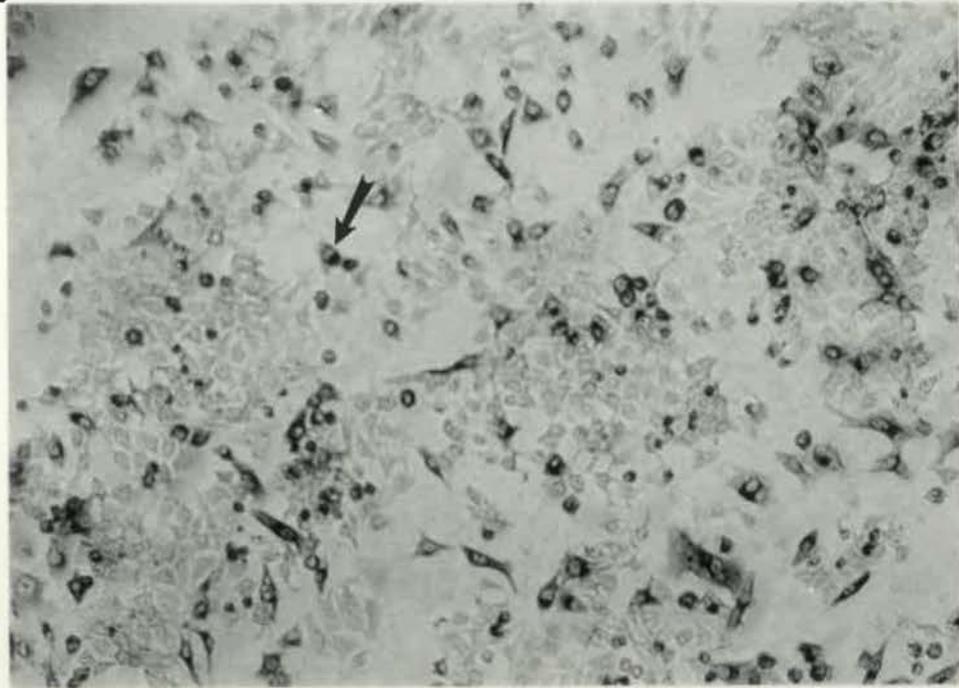


Figure 26: Cinétique de réplication à 33 °C du HCV-229E intracellulaire et extracellulaire produit sur les cellules L132 et titré par la méthode d'immunoperoxydase indirecte après 5 jours d'infection sur les cellules L132.

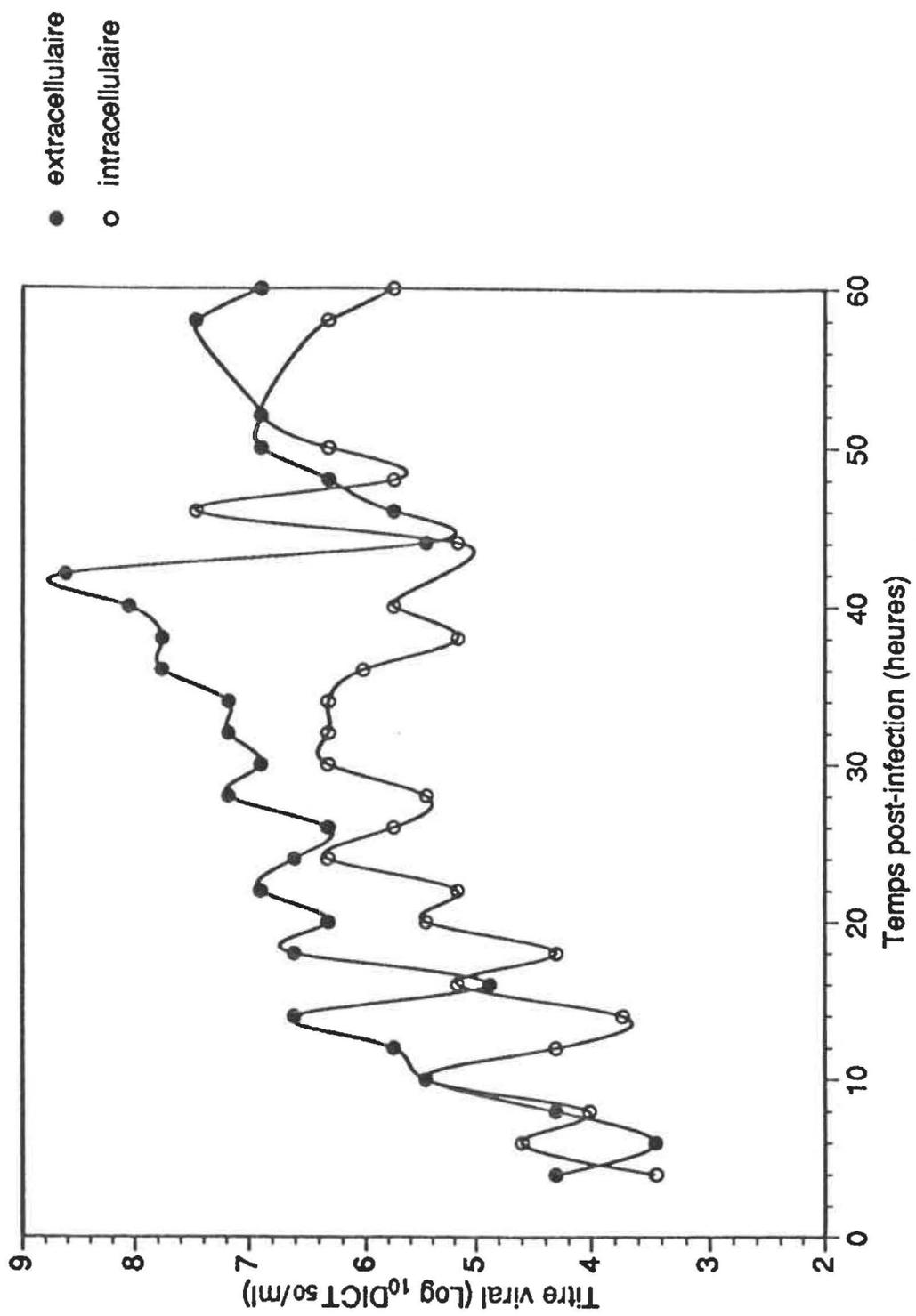


Figure 27: Cinétique de réplication à 33 °C du HCV-229E intracellulaire et extracellulaire produit sur les cellules SK-N-SH et titré par la méthode d'immunoperoxydase indirecte après 5 jours d'infection sur les cellules L132.

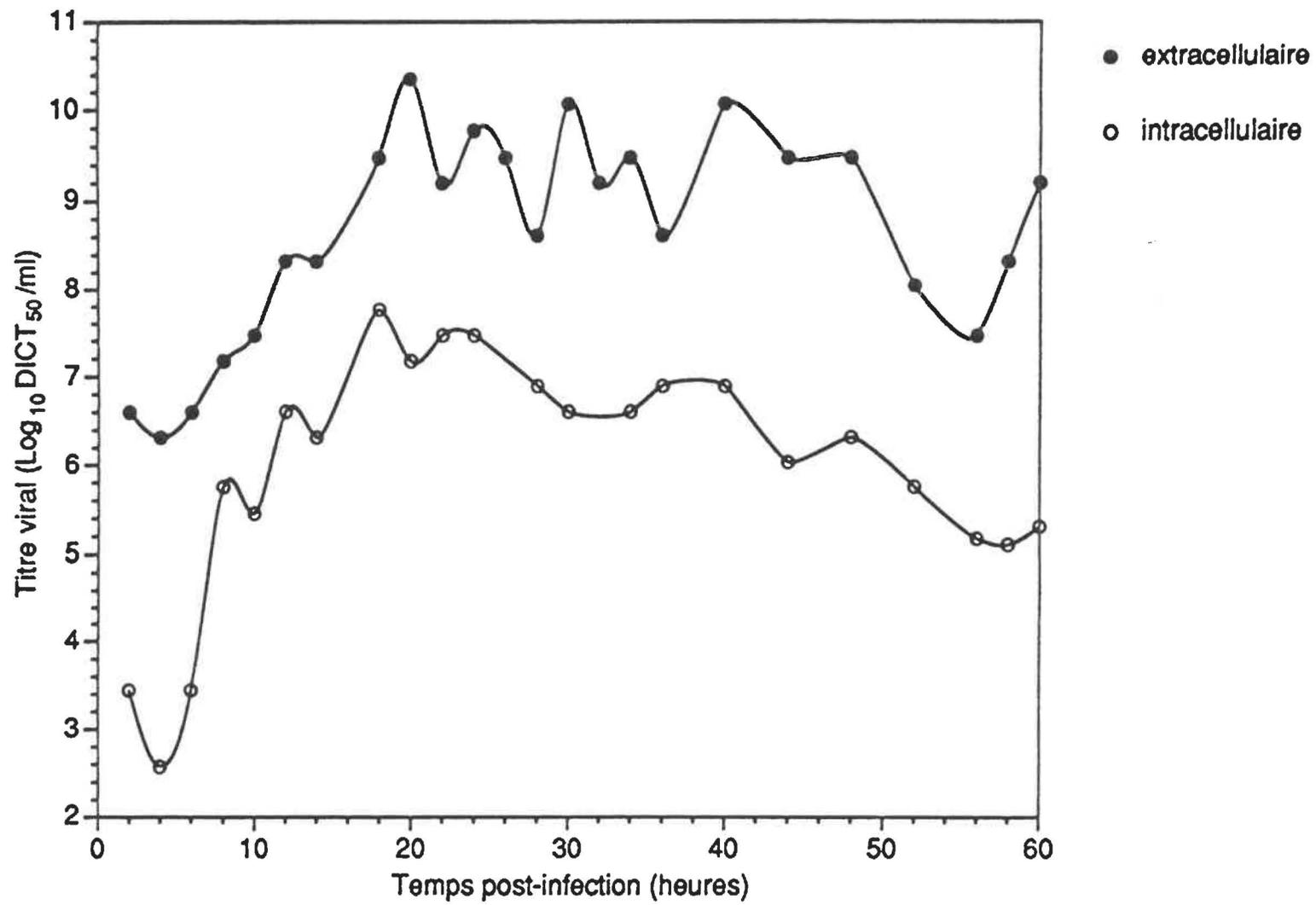


Figure 28: Cinétique de répllication à 33 °C du HCV-229E intracellulaire et extracellulaire produit sur les cellules H4 et titré par la méthode d'immunoperoxydase indirecte après 5 jours d'infection sur les cellules L132.

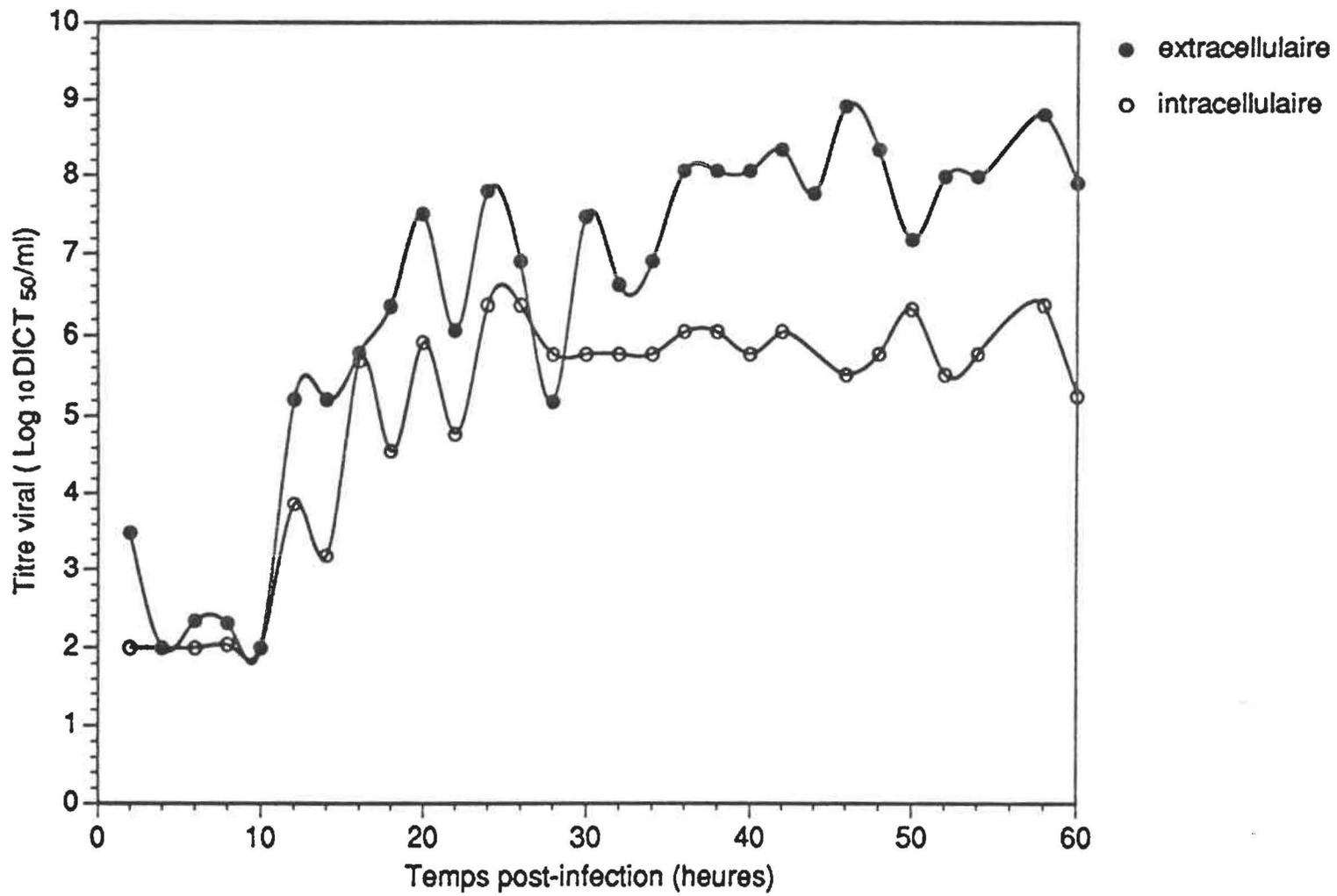


Figure 29: Cinétique de réplication à 33 °C du HCV-229E intracellulaire et extracellulaire produit sur les cellules MO3.13 et titré par la méthode d'immunoperoxydase indirecte après 5 jours d'infection sur les cellules L132.

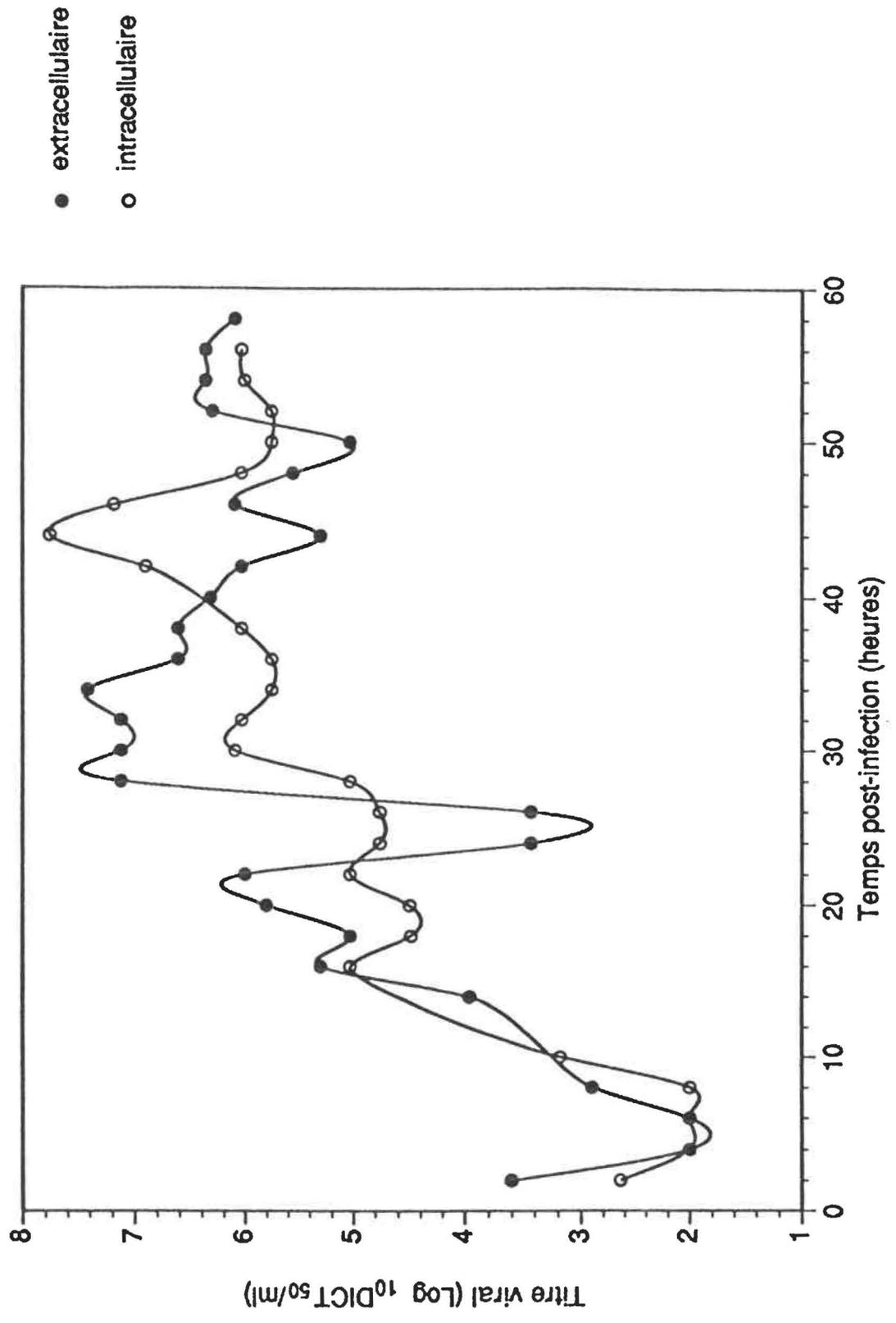


Figure 30: Cinétique de réplication à 33 °C du HCV-229E intracellulaire et extracellulaire produit sur les cellules TE-671 et titré par la méthode d'immunoperoxydase indirecte après 5 jours d'infection sur les cellules L132.

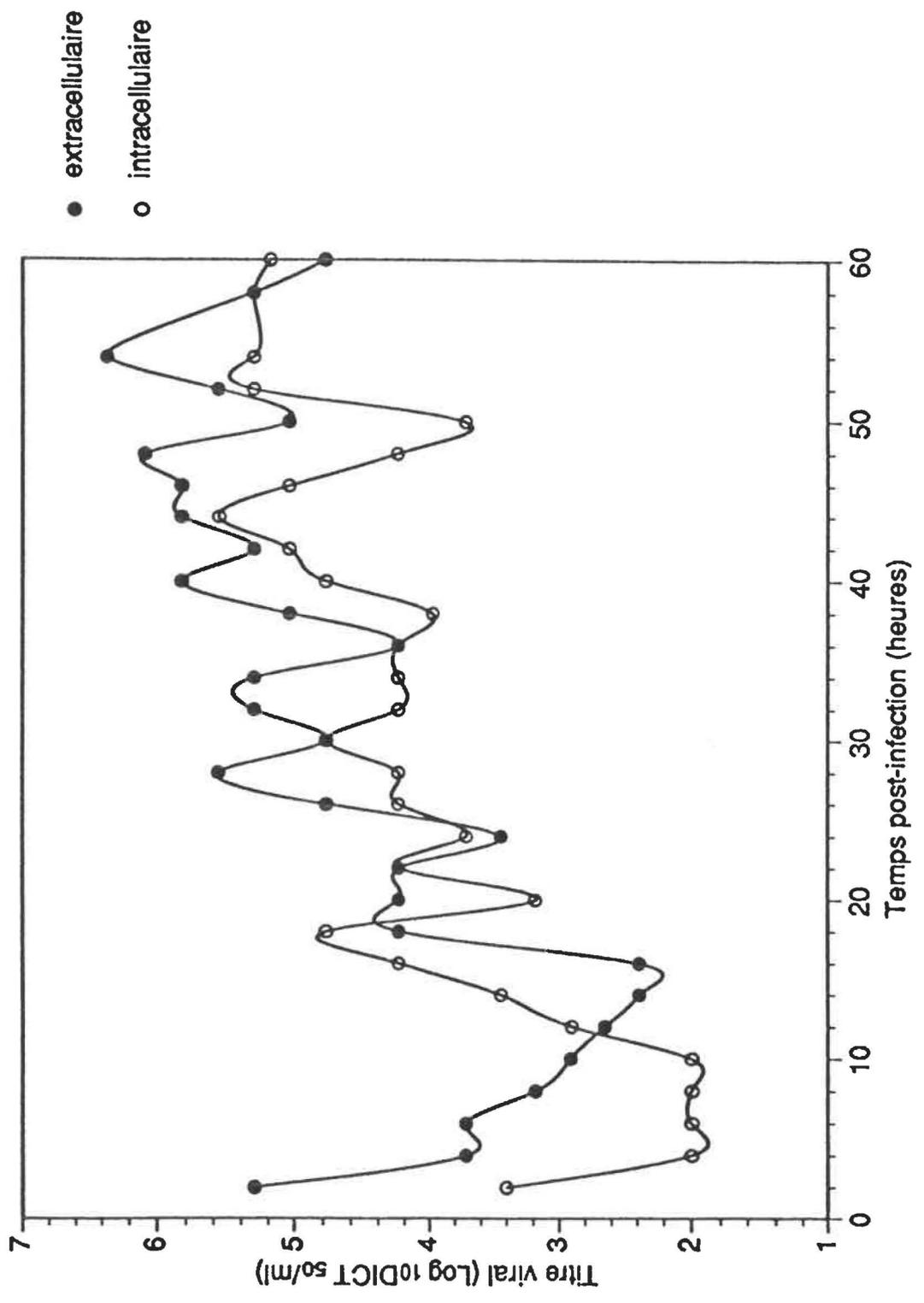


Figure 31: Cinétique de réplication à 33 °C du HCV-229E intracellulaire et extracellulaire produit sur les cellules U-373 MG et titré par la méthode d'immunoperoxydase indirecte après 5 jours d'infection sur les cellules L132.

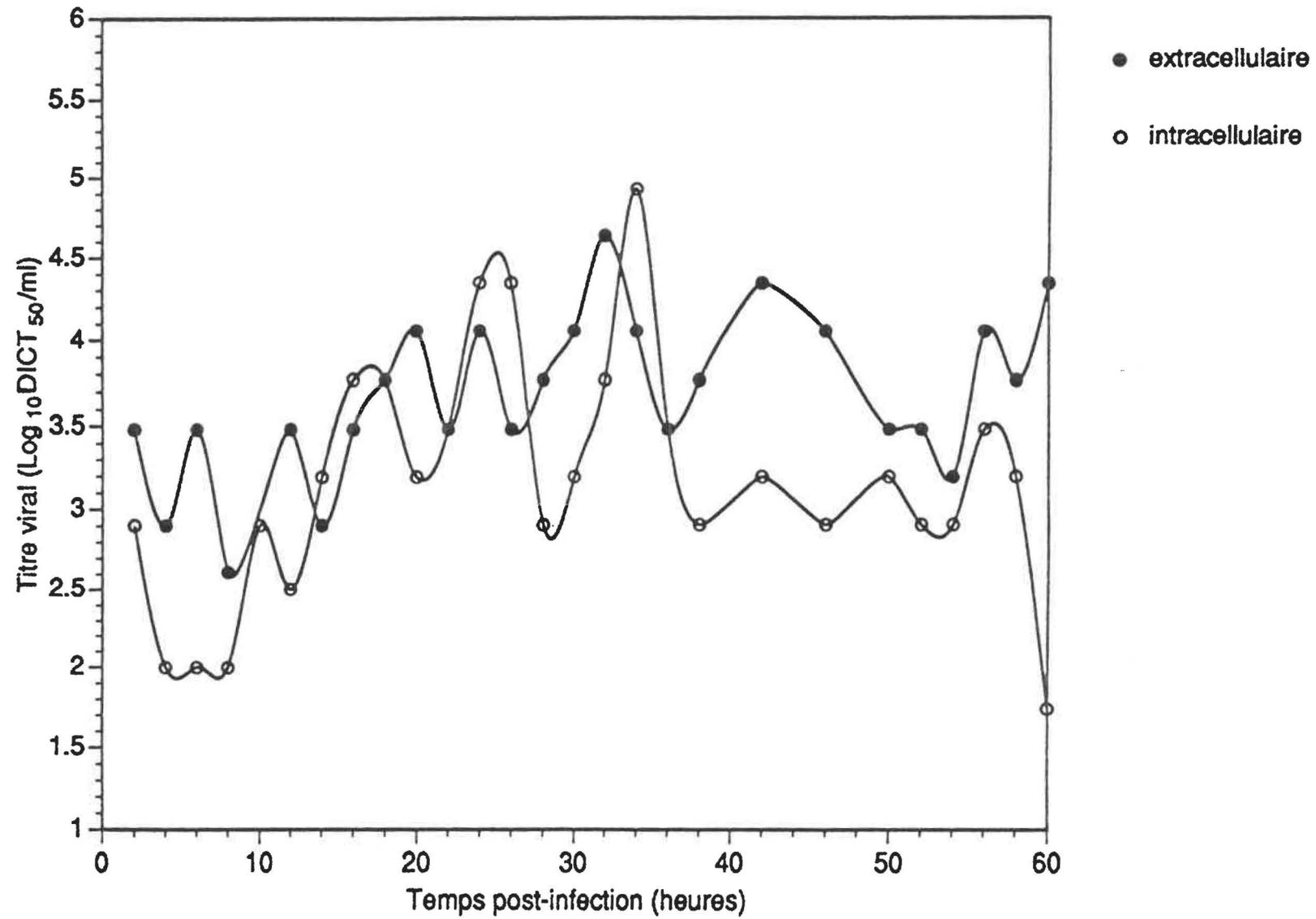


Tableau 5: Comparaison de la liaison virale sur les différentes lignées cellulaires en présence et en absence d'un anticorps anti-récepteur et par rapport à un anticorps contrôle (non spécifique). Les différentes lignées sont soumises à un test d'immunofluorescence indirecte à 20 heures post-infection pour la présence des antigènes viraux. L'anticorps anti-HCV-229E provient de l'ascite 3-10H.5.

Les cellules exprimant les antigènes viraux sont quantifiées en pourcentage selon un degré de luminosité variant de 0 (intensité minimale) à 4 (intensité maximale).

CELLULES	NON	INFECTÉES	PRÉ-TRAITÉES	
	INFECTÉES		AC.RBS	AC. NON SPÉCIFIQUE + INFECTÉES
L132	0% faible bf*	70% 2 <sub>1/2</sub>	10% 1 <sub>1/2</sub>	80% 2+
SK-N-SH	0% faible bf	75% 2+	50% 1 <sub>1/2</sub>	80% 2+
H4	0% faible bf	10% 2 <sub>1/2</sub>	4% 1+	4% 1 <sub>1/2</sub>
MO3.13	0%	résultat non disponible		0% 4% 1 <sub>1/2</sub>
U-87 MG	0% faible bf	3% 2+, bf	0% bf	3% 2+, bf

NOTE: bf\* = bruit de fond dû à une fluorescence non spécifique

Tableau 6: Comparaison de la liaison virale sur les différentes lignées cellulaires en présence et en absence d'un anticorps anti-récepteur et par rapport à un anticorps contrôle (sans spécificité).

Les différentes lignées sont soumises à un test d'immunofluorescence indirecte à 40 heures post-infection pour la présence des antigènes viraux. L'anticorps anti-HCV-229E provient de l'ascite 3-10H.5.

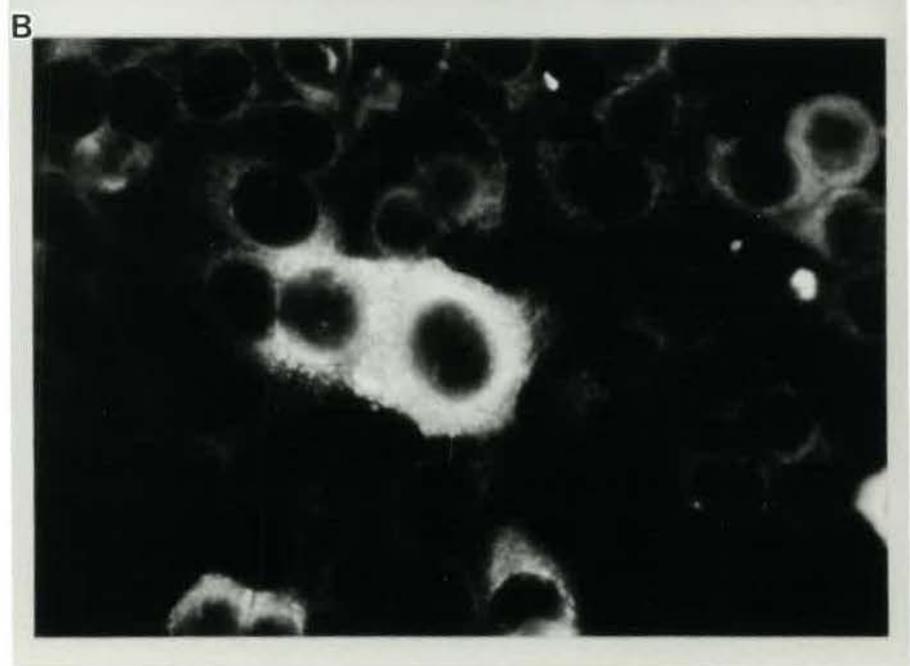
Les cellules exprimant les antigènes viraux sont quantifiées en pourcentage selon un degré de luminosité variant de 0 (intensité minimale) à 4 (intensité maximale).

CELLULES	NON INFECTÉES	INFECTÉES	PRÉ-TRAITÉES	
			AC.RBS	AC. NON SPÉCIFIQUE + INFECTÉES
L132	0%	80-90% 3 <sup>+</sup> <sub>1/2</sub>	80% 3 <sup>+</sup> <sub>1/2</sub>	100% 3 <sup>+</sup> <sub>1/2</sub>
SK-N-SH	0%	100% 2+	2% 2+	50% 3+
H4	0%	20% 3+	10% 1 <sup>+</sup> <sub>1/2</sub>	15% 2 <sup>+</sup> <sub>1/2</sub>
MO3.13	0%	5% 2+	2% 1+	3% 3+
U-87 MG	0% bf*	5% 3+, bf	0% bf	1% 1 <sup>+</sup> <sub>1/2</sub> , bf

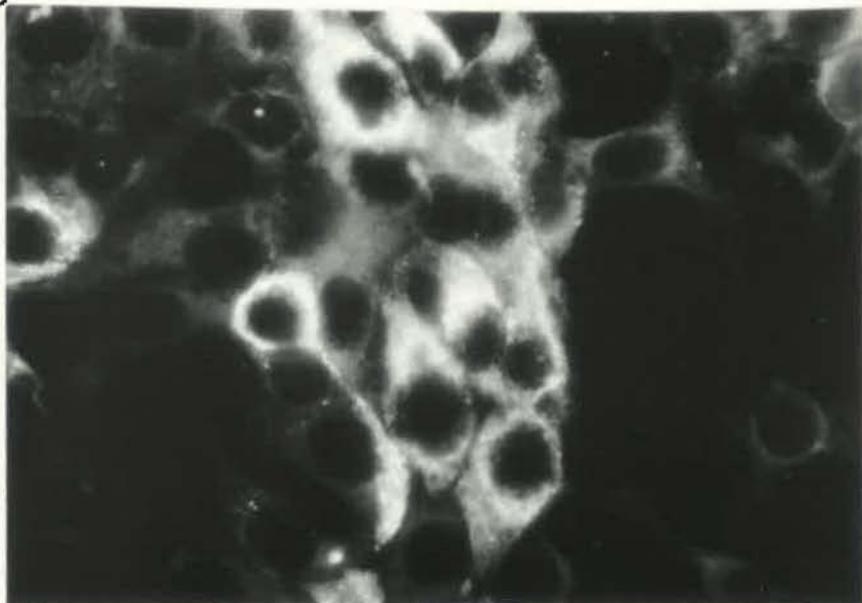
NOTE: bf\* = bruit de fond dû à une fluorescence non spécifique

Figure 32: Test de compétition de liaison du HCV-229E sur le site aminopeptidase N par immunofluorescence indirecte à 40 heures post-infection.

- a) cellules L132 non infectées
- b) cellules L132 infectées à une MOI de 1
- c) cellules L132 prétraitées avec l'anticorps RBS dilué 1/10, puis infectées à une MOI de 1
- d) cellules L132 prétraitées avec un anticorps contrôle, puis infectées à une MOI de 1.



C



D

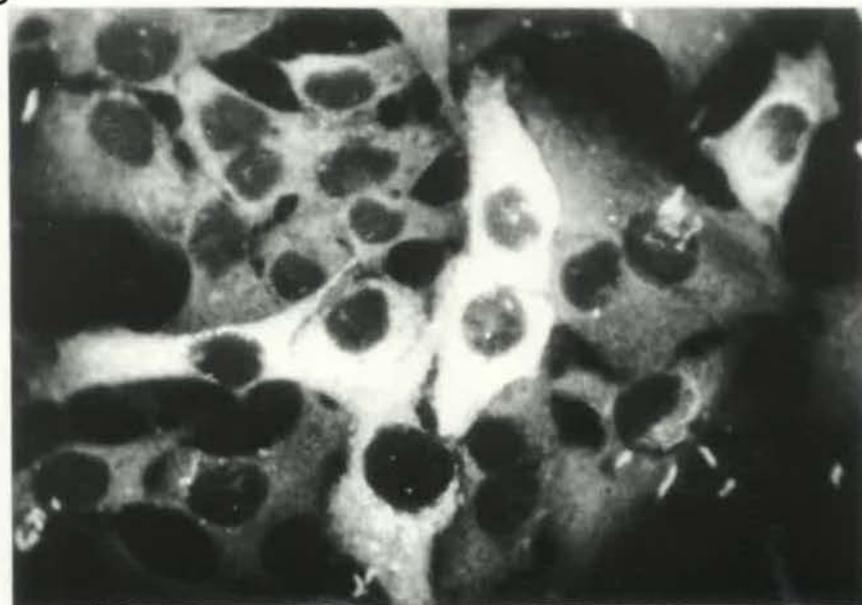
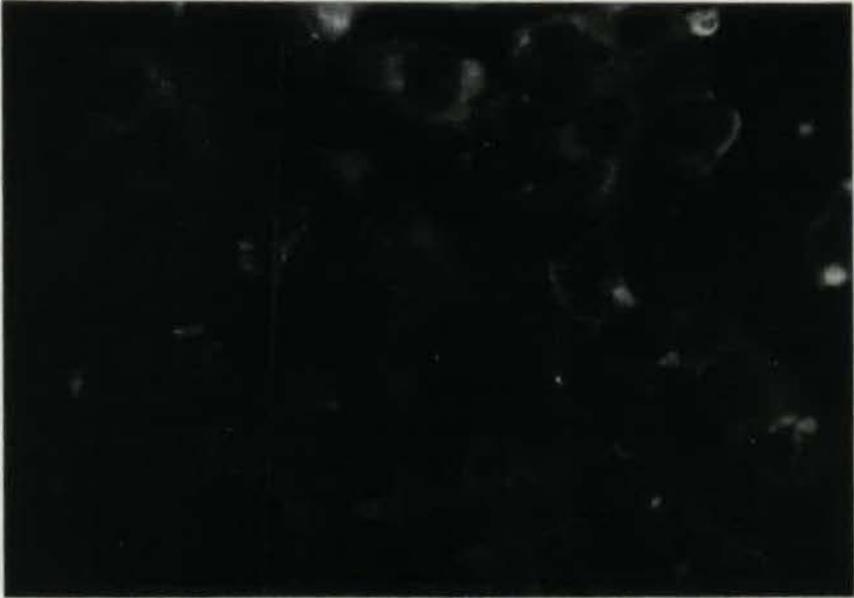


Figure 33: Test de compétition de liaison du HCV-229E sur le site aminopeptidase N par immunofluorescence indirecte à 40 heures post-infection.

- a) cellules SK-N-SH non infectées
- b) cellules SK-N-SH infectées à une MOI de 1
- c) cellules SK-N-SH prétraitées avec l'anticorps RBS dilué 1/10, puis infectées à une MOI de 1
- d) cellules SK-N-SH prétraitées avec un anticorps contrôle, puis infectées à une MOI de 1.

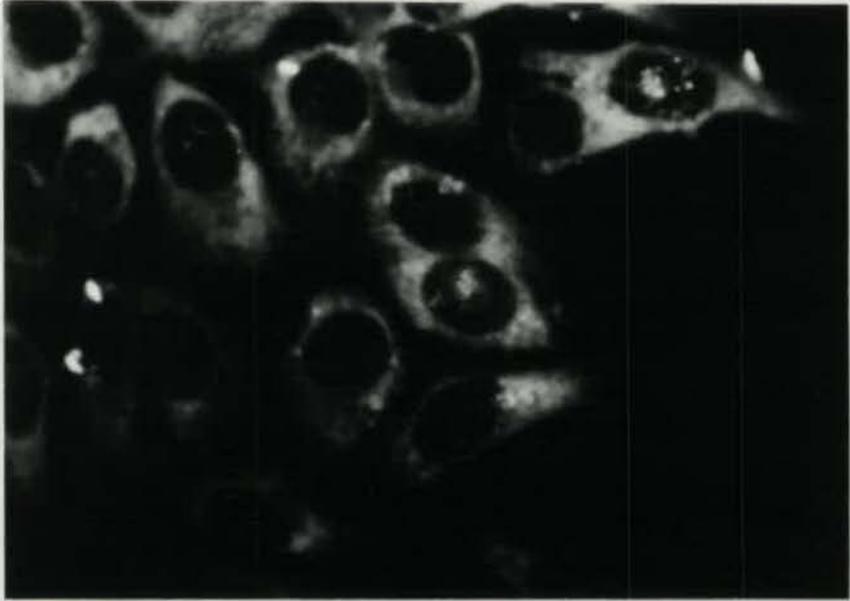
A



B



C



D

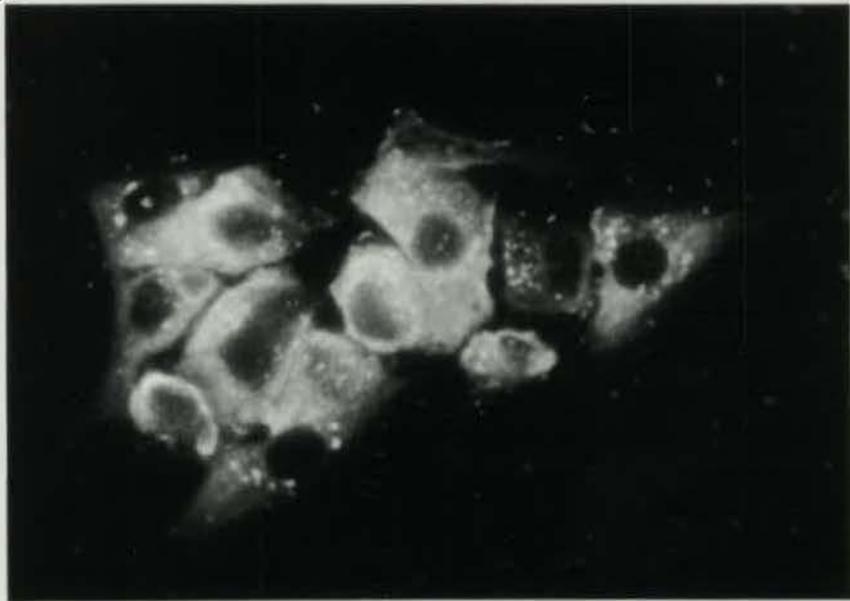
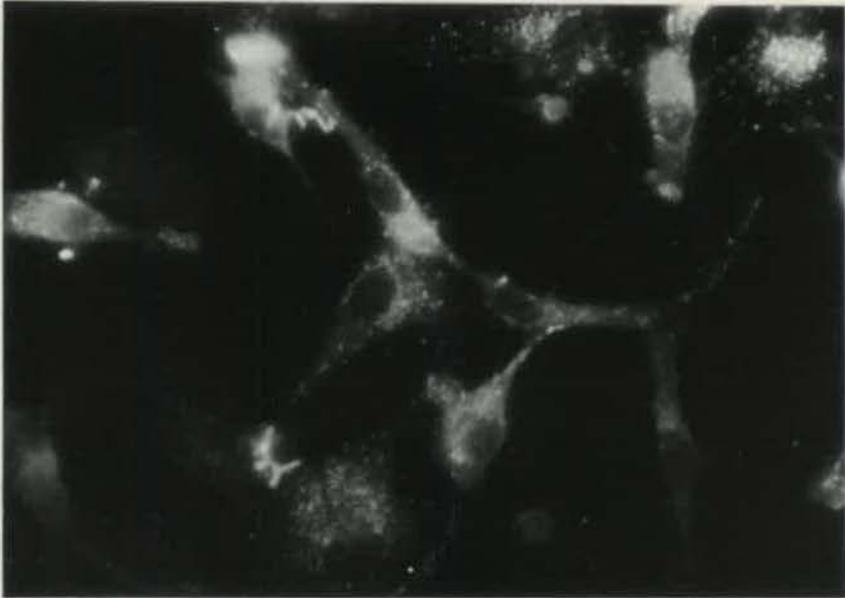


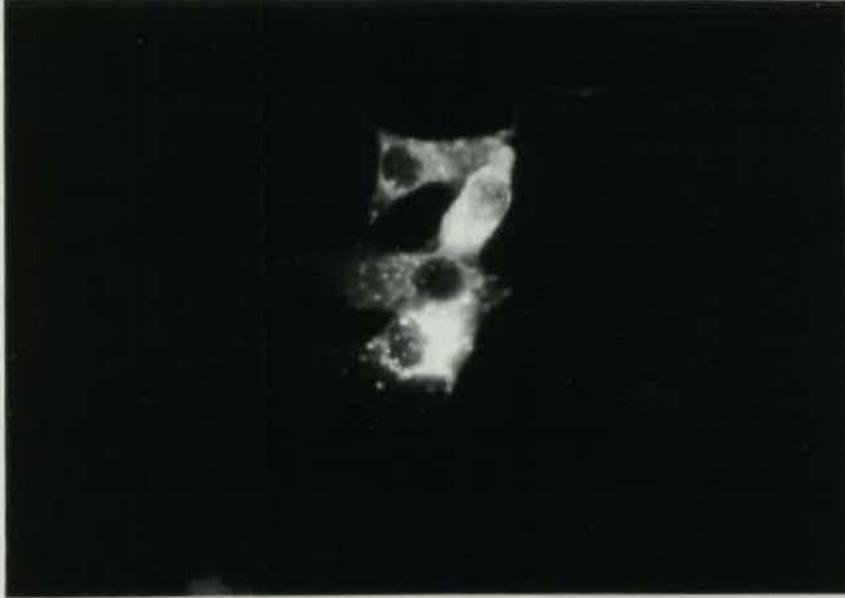
Figure 34: Test de compétition de liaison du HCV-229E sur le site aminopeptidase N par immunofluorescence indirecte à 40 heures post-infection.

- a) cellules H4 non infectées
- b) cellules H4 infectées à une MOI de 1
- c) cellules H4 prétraitées avec l'anticorps RBS dilué 1/10, puis infectées à une MOI de 1
- d) cellules H4 prétraitées avec un anticorps contrôle, puis infectées à une MOI de 1.

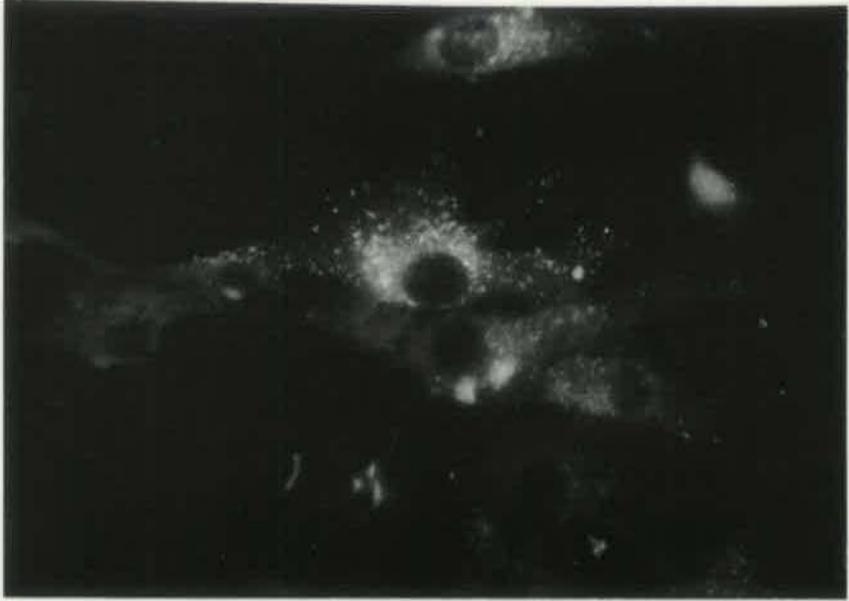
A



B



C



D

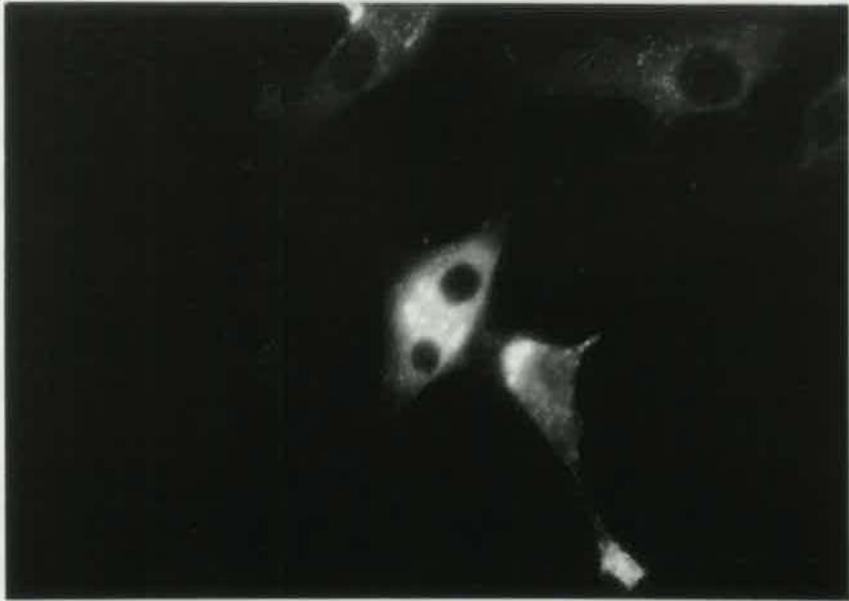
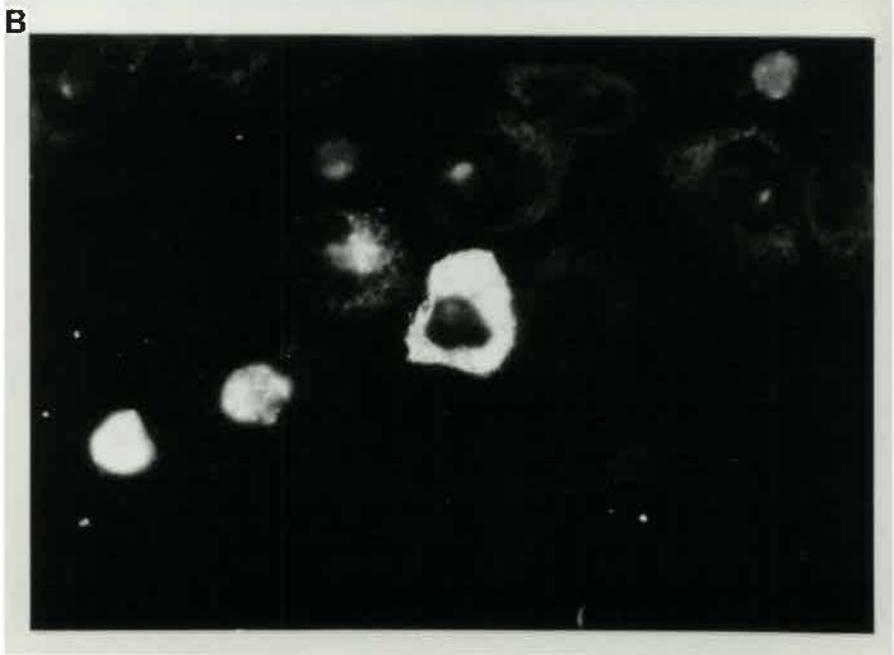
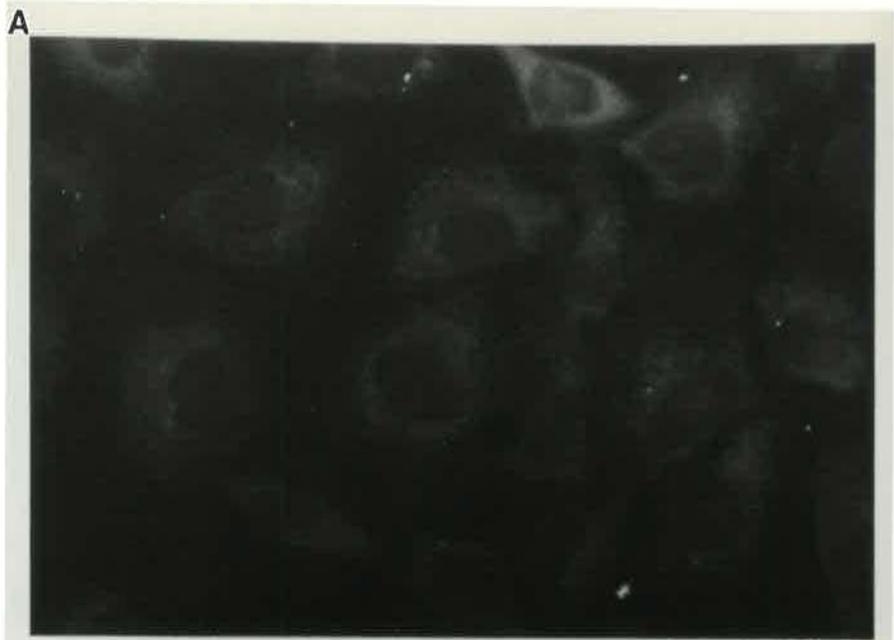
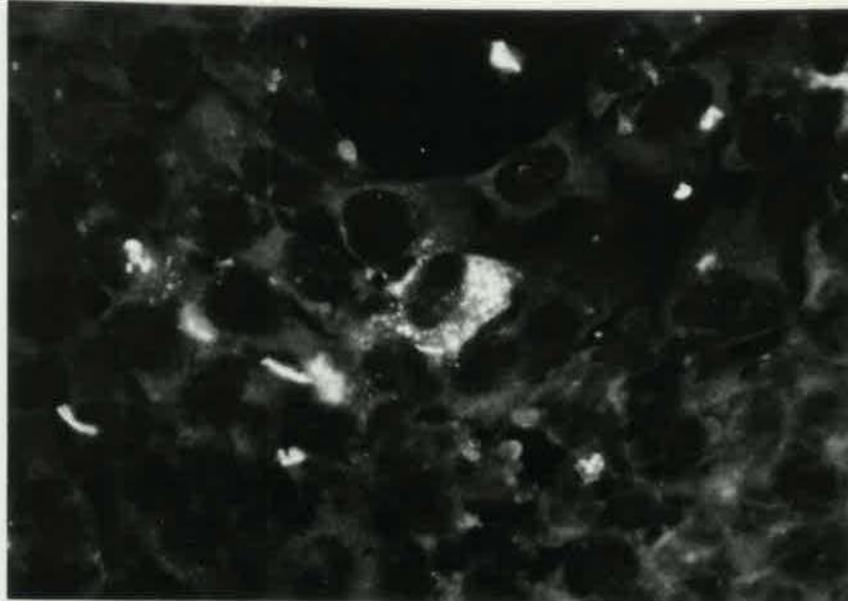


Figure 35: Test de compétition de liaison du HCV-229E sur le site aminopeptidase N par immunofluorescence indirecte à 40 heures post-infection.

- a) cellules U-87 MG non infectées
- b) cellules U-87 MG infectées à une MOI de 1
- c) cellules U-87 MG prétraitées avec l'anticorps RBS dilué 1/10, puis infectées à une MOI de 1
- d) cellules U-87 MG prétraitées avec un anticorps contrôle, puis infectées à une MOI de 1.



C



D

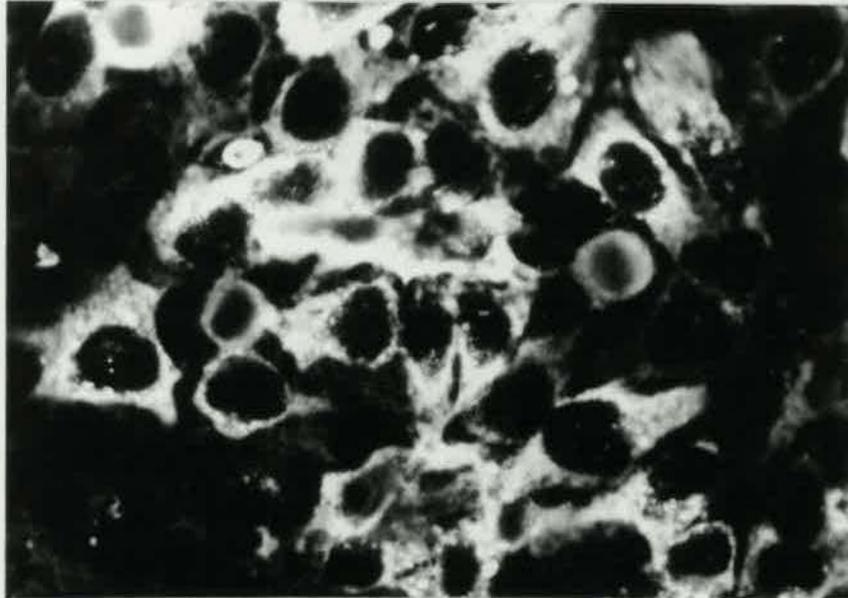


Tableau 7: Test de compétition de liaison du virus radiomarqué à la [<sup>35</sup>S] méthionine au récepteur cellulaire en présence et en absence de l'anticorps RBS anti-aminopeptidase N. Le taux de virus radio-marqué et fixé au récepteur cellulaire est exprimé en DPM.

CELLULES	INFECTÉES	PRÉTRAITÉES		% INHIBITION
		AC. RBS	AC. NON SPÉCIFIQUE + INFECTÉES	
L132	6380	4864	NON DÉTERMINÉ	24
	97830	62741	118714	36

DISCUSSION

L'infection de cellules nerveuses humaines par le HCV-229E n'est pas documentée. Cependant chez les modèles murins présentant une encéphalomyélite chronique avec des plaques de démyélinisation dans le cerveau et la substance blanche après une infection coronavirale, on observe que les cellules cibles à l'infection virale sont les neurones et les cellules gliales. Le rôle possible des coronavirus humains dans des maladies neurologiques et plus particulièrement la sclérose en plaques nous a poussé à vérifier si certaines cellules du système nerveux central chez l'humain pouvaient être susceptibles à l'infection coronavirale. Étant donné que le tropisme des coronavirus observé *in vivo* se reflète en culture cellulaire *in vitro* (Knobler *et al.*, 1981; Lamontagne *et al.*, 1989; Pasick et Dales, 1991), ce projet de recherche a fait appel à des lignées continues de cellules nerveuses humaines en culture *in vitro*.

Des cellules humaines provenant de cellules différenciées tumorales conservent certaines caractéristiques des cellules mères non-tumorales. Ainsi, les cellules tumorales d'origine neurale démontrant des propriétés de cellules neuronales ou gliales sont un outil intéressant pour amorcer l'étude du neurotropisme du HCV-229E sur des cellules humaines.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence la présence d'antigènes viraux à la surface des cellules ainsi qu'au niveau intracytoplasmique en utilisant un test d'immunofluorescence indirecte dont la sensibilité nous permet de détecter une infime quantité d'antigènes viraux.

L'expression des protéines virales est maximale lorsqu'on infecte les cellules

nerveuses à une multiplicité d'infection de 1, ce qui permet de cibler un plus grand nombre de cellules pour l'infection et de détecter une plus grande quantité d'antigènes exprimés. Le pourcentage de cellules exprimant l'antigène est maximal à 40 heures post-infection, ce qui sous entend que l'anticorps anti-viral utilisé lors de notre test reconnaît une protéine virale dont l'expression est maximale à 40 heures post-infection. Ceci peut être corrélé avec les cinétiques de réplication virale pour lesquelles nous avons observé que de façon générale la production de particules virales infectieuses est maximale aux environs de 40 heures post-infection. Comme pour la plupart des virus à ARN, les coronavirus se répliquent dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'expression des protéines virales se fait donc au niveau du cytoplasme et certaines protéines virales sont présentées à la surface de la cellule hôte infectée. C'est d'ailleurs ce que nous avons observé dans tous les cas de cellules infectées après avoir détecté un anticorps monoclonal antiviral avec un deuxième anticorps couplé à de l'isothiocyanate de fluorescéine. Toutefois, les différentes lignées cellulaires expriment les antigènes viraux à des degrés variables. Ceci ne traduit cependant pas la quantité de particules virales infectieuses produites puisque nous ne pouvons pas comparer les courbes de réplication virale avec le pourcentage de cellules exprimant les antigènes viraux à un même temps post-infection et ceci plus particulièrement avec la lignée d'oligodendrocytes MO3.13. En effet à 40 heures post-infection sur cette lignée, on observe que seulement 5% des cellules expriment l'antigène viral, alors que pour ce même temps nous avons une production de particules virales infectieuses intracellulaires de  $10^6$  DICT<sub>50</sub>/ml. Sur la lignée contrôle L132 de fibroblastes

de poumons humain, on retrouve 75% de cellules exprimant les antigènes viraux pour un titre de production intracellulaire relativement similaire soit  $10^{5.7}$  DICT<sub>50</sub>/ml à 40 heures post-infection. Une telle différence dans le pourcentage de cellules exprimant les antigènes viraux laisse supposer que, lors du test d'immunofluorescence indirecte sur les cellules L132, des antigènes provenant de matériel non infectieux ont été quantifiés en plus des antigènes viraux incorporés dans des particules virales infectieuses. En ce qui concerne la lignée d'astrocytes U-87 MG, nous avons observé que 5% des cellules exprimaient les antigènes viraux; ce résultat peut être comparé à ceux de Collins et Sorensen (1986) qui ont démontré que 1 à 10% de ces mêmes cellules infectées de façon persistante avec le OC43 exprimaient les antigènes viraux.

Lors de ces expériences d'immunofluorescence indirecte nous avons démontré que les cellules infectées avec le HCV-229E pouvaient lier les immunoglobulines de type G par la portion Fc de cette molécule. Une activité Fc réceptrice sur des cellules infectées a déjà été mise en évidence par Oleszak et Leibowitz (1990) avec le coronavirus MHV-JHM. Nous avons observé un bruit de fond non-spécifique sur les cellules infectées lorsque nous utilisons un anticorps de type G sans aucune spécificité pour les protéines du coronavirus, et ce bruit de fond n'apparaissait pas sur les cellules non-infectées. Après digestion pepsinique de nos immunoglobulines, nous avons obtenu des fragments F(ab')<sub>2</sub>, avec lesquels nous avons repris le test d'immunofluorescence indirecte pour la détection des antigènes viraux. Les anticorps anti-229E reconnaissaient les antigènes viraux, tandis que les anticorps du contrôle isotypique ne réagissaient plus. Cette observation nous

suggère que le HCV-229E, comme le MHV-JHM (Oleszak et Leibowitz, 1990) et le virus herpès de type 1 (Watkins, 1964; Yasuda et Milgram, 1968) induisent sur les cellules infectées une activité Fc réceptrice qui ne se retrouve pas dans les cellules non-infectées. Ce phénomène est observé particulièrement sur les lignées de fibroblastes L qui ne possèdent pas de transcrit pour le gène du récepteur Fc $\gamma$  (Ravetch *et al.*, 1986). L'activité Fc réceptrice dans le cas du MHV-JHM est générée par l'expression de la protéine de surface S dont la portion N-terminale présente un mimétisme moléculaire avec le récepteur Fc $\gamma$  des immunoglobulines. Dans le cas d'une infection coronavirale *in vivo* dans le SNC de l'humain, une telle activité Fc réceptrice aurait de grandes répercussions au niveau immunitaire par la présentation d'un complexe immun aux cellules effectrices faisant ainsi le lien entre une réponse immunitaire humorale et cellulaire.

Nous avons voulu connaître la spécificité de l'anticorps monoclonal 5-11H.6 que nous avons utilisé pour les tests d'immunofluorescence indirecte, et pour les tests d'immunoperoxydase indirecte. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de radio-immunoprécipitation dont les deux étapes les plus importantes sont la solubilisation des protéines virales marquées au [ $^{35}$ S] en absence de SDS de façon à préserver la structure tridimensionnelle des protéines et la précipitation d'une de ces protéines lorsque couplée avec l'anticorps monospécifique. Le profil électrophorétique du HCV-229E marqué au [ $^{35}$ S] est constitué de trois polypeptides distincts dont les masses moléculaires sont de 26, 65, 105 kDa. Lorsque le virus est purifié, on retrouve une quatrième bande à 145 kDa décrite par Macnaughton (1980). Après l'immunoprécipitation, nous avons observé que

deux protéines virales migraient à 75 kDa, ce qui représente la forme monomérique de la protéine de surface S qui est souvent clivée de manière post-traductionnelle en deux sous-unités dont la masse moléculaire varie de 60 à 100 kDa; la deuxième protéine migre à 55 kDa ce qui représente la masse moléculaire de la phosphoprotéine de la nucléocapside N, que l'on retrouve généralement entre 45 et 55 kDa. On retrouve un polypeptide non structural ou provenant d'une contamination par des protéines cellulaires à 40 kDa qui correspond à celui rapporté par Arpin et Talbot (1988). Ces résultats ne sont donc pas concluants puisqu'il semble que notre anticorps immunoprécipite deux protéines structurales du HCV-229E, ce qui est théoriquement impossible puisque cet anticorps provient de la sécrétion clonale d'un hybridome. Ces résultats traduisent probablement une mauvaise solubilisation des protéines qui se sont agglomérées et précipitent en même temps que le complexe immun. De plus l'anticorps du contrôle isotypique présente un profil électrophorétique comportant deux bandes à 75 kDa et 43 kDa ce qui rend difficile l'interprétation de ces résultats.

Nous avons démontré que les lignées cellulaires du système nerveux humain pouvaient être susceptibles à l'infection puisque dans tous les cas on retrouve à 40 heures post-infection, pour une MOI de 1, les antigènes viraux, malgré que les cellules ne présentent aucun effet cytopathique. Cependant la susceptibilité des cellules à l'infection virale n'implique pas nécessairement la permissivité des cellules à l'infection, c'est à dire la production et le relargage de nouvelles particules infectieuses. Pour cela nous avons établi une cinétique de croissance virale du HCV-229E au niveau des différentes lignées

neurales (SK-N-SH, H4, MO3.13, TE-671, U-373 MG) et non neurale (L132). Dans notre laboratoire, nous avons adapté le HCV-229E sur la lignée de fibroblastes de poumon humain L132 et titrons le virus par la méthode de test de plages sur cette même lignée cellulaire. Cependant, les coronavirus sont des virus reconnus pour leur variabilité en culture cellulaire et la non reproductibilité des résultats est un problème auquel nous devons souvent faire face. Ainsi, pour une raison qui nous échappe encore, les cellules L132 ne nous ont plus permis de titrer le virus par test de plages, après maints tests effectués avec succès. Aucune plage de lyse ne pouvait plus être observée. Nous avons évalué un à un les divers paramètres utilisés lors de cette technique soit le temps de contact virus-cellules que nous avons augmenté d'une heure, le temps d'incubation post-infection de 8 et 9 jours au lieu de 7 jours initialement, la composition en protéine de notre milieu (augmentation de 5% de la quantité de sérum de veau fœtal additionné), ainsi que la valeur en glucose du milieu en comparant le milieu DMEM avec le milieu MEM/Hanks 199 (1:1) et le type de milieu gélosé utilisé comme immobilisant. Nous n'avons cependant pas réussi à obtenir des plages dont le diamètre pouvait nous permettre une lecture fiable des titres viraux. En dépit de cela, les cellules L132 conservaient leur susceptibilité à l'infection du HCV-229E, tel que mis en évidence par l'expression des antigènes viraux que nous pouvions visualiser par test d'immunofluorescence indirecte. Nous avons même pu au sein de ces cellules produire des particules coronavirales infectieuses. Alors comment expliquer la perte de lyses au niveau des cellules infectées?

Il est évident que nos cellules en culture ne reflètent pas les fonctions

physiologiques *in vivo*. Les fibroblastes humains sont de façon prédominante euploïdes en culture et ne donnent jamais naissance à des lignées cellulaires continues, alors que des fibroblastes provenant de tumeurs humaines deviennent aneuploïdes en culture et donnent naissance à des cultures continues dont l'habilité à croître continuellement reflète aussi leur capacité à des variations génétiques faisant suite à une sélection subséquente. Une partie des fonctions différenciées de ces cellules disparaît, laissant place à une cellule non spécialisée. Peut-être qu'une de ces fonctions était primordiale pour que le virus puisse établir un cycle lytique lors de sa réplication. Une autre possibilité serait que notre virus à la suite des traitements de conservation, puis aux cycles de congélation et de décongélation lors des manipulations a subi une mutation qui modifie la fin du cycle viral soit la lyse de la cellule infectée. Une fois ce projet de recherche terminé, il a été possible de retrouver des plages de lyses causées par HCV-229E sur les cellules L132 en utilisant un milieu gélifié différent, ce qui invalide ces dernières hypothèses, bien que la réapparition ne fut de courte durée...

Nous avons décidé de reprendre les expériences de titrage en utilisant la méthode de marquage par des anticorps suivie d'une réaction d'immunoperoxydase. Nous avons observé une augmentation de 100 à 1000 fois des titres viraux obtenus par le test d'immunoperoxydase indirecte sur les lignées SK-N-SH et L132 par rapport aux titres obtenus par la méthode des plages. Cependant, la cinétique de croissance de ce virus dans les différents types cellulaires reste caractéristique et ressemble de très près à la courbe de croissance virale sur la lignée cellulaire de L132 obtenue par Chaloner-Larson et

Jonhson-Lussenburg (1981). Entre 0 et 8 heures post-infection on remarque que la concentration en virus intracellulaire diminue considérablement, elle réapparaît par la suite pour atteindre sa valeur de départ. Ce temps définit la durée de la phase éclipse qui traduit la décapsidation des virions et la libération de leur acide nucléique au sein des cellules infectées. Un phénomène similaire, bien que moins marqué, est observé avec la concentration en virus extracellulaire qui traduit l'internalisation des particules virales parentales et la faible production virale du fait que nous sommes en tout début du cycle. Puis, le titre de virus intracellulaire augmente continuellement dans la culture infectée avec une production parallèle de virions dans le milieu de culture. Ceci est une caractéristique du cycle viral des coronavirus dans lequel on retrouve toujours un partage de moitié du virus total entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire, d'où un temps de latence très court ou pratiquement inexistant qui se distingue des virus à ADN comme les poxvirus pour lesquels le relargage du virus est si faible que leur temps de latence est souvent plus long que la durée complète de leur cycle de multiplication. Jusqu'à 18-20 heures post-infection, nous assistons à une multiplication virale exponentielle qui devient linéaire jusqu'à 58 heures. Puis, dans le cas de la production sur les cellules SK-N-SH et L132, on note une légère remontée à la fin du cycle tandis qu'au niveau des autres cellules on observe une baisse de la production virale bien que les titres restent élevés.

De façon générale nous pouvons observer que les neurones sont très permissifs au 229E. Une inoculation intranasale et intracérébrale du coronavirus murin à des souris susceptibles aboutit à une infection prédominante au niveau des neurones. Bien qu'il existe

une différence entre les cellules en culture et leur contrepartie *in vivo* du fait de la dissociation des cellules d'une structure tridimensionnelle pour une propagation sur un substrat en deux dimensions, que les caractéristiques d'interaction cellulaires spécifiques sont perdues et qu'à l'environnement de culture manque aussi plusieurs composants systémiques impliqués *in vivo* dans la régulation homéostatique, principalement ceux du SN et du système endocrinien, il doit être accepté que plusieurs fonctions spécialisées sont exprimées en culture ce qui fait que ce modèle est apprécié et peut-être un outil valide pour corréler l'habilité qu'ont les coronavirus murins à se propager par la voie neurale chez les rongeurs avec la possibilité que les coronavirus humains peuvent emprunter une route similaire pour des infections humaines.

Les cellules MO3.13 sont aussi productives de particules infectieuses même si cette lignée résulte de la fusion d'une cellule tumorale, elle aussi permissive au coronavirus, avec l'oligodendrocyte. Malgré tout, l'infection plus prononcée des cellules MO3.13 par rapport aux cellules de la lignée TE-671 est compatible à une susceptibilité des oligodendrocytes à l'infection virale.

La lignée d'astrocyte U-373 MG, bien que positive pour la présence d'antigènes, n'est pas une lignée très productive. Ceci était remarqué aussi dans des cultures primaires d'un foetus humain âgé de 16 semaines (Pearson et Mims, 1985).

Au terme de ces expériences le but de notre projet est atteint. Nous venons de démontrer que diverses cellules du SNC humain en culture continue, qu'elles soient de type nerveuses, oligodendrocytes ou astrocytes, sont susceptibles à l'infection par le

coronavirus humain 229E et qu'elles sont capables de supporter une réplication virale productive.

Sachant que la présence ou l'absence de récepteurs spécifiques à la surface des cellules peuvent influencer le tropisme tissulaire des virus, nous avons voulu vérifier si le récepteur pour le HCV-229E dans nos lignées cellulaires en culture continue est l'aminopeptidase N, une molécule identique au CD13, un antigène de surface des cellules myéloïdes (Look *et al.*, 1989). Cette molécule joue le rôle de récepteur pour le coronavirus TGEV (Delmas *et al.*, 1992), le coronavirus humain de souche 229E, mais pas pour la souche OC43 (Yeager *et al.*, 1992). L'aminopeptidase N est une protéase dont la fonction biologique est de cliver divers peptides que l'on retrouve à différents niveaux dans de nombreux tissus (Kenny et Maroux, 1982). On a récemment démontré que la molécule CD13 servait aussi de récepteur pour un virus très différent, le cytomégalovirus humain (Söderberg *et al.*, 1993). Cette molécule jouant le rôle de récepteur est exprimée sur une variété de cellules, notamment les granulocytes, les macrophages, les cellules épithéliales de rein, poumon et intestin (Noren *et al.*, 1986; Matsas *et al.*, 1985), mais aussi, trait intéressant, sur les membranes synaptiques préparées à partir de cellules du SNC (Look *et al.*, 1989). La présence du récepteur cellulaire pour le HCV-229E dans ces cellules suggère une susceptibilité possible de ces cellules à l'infection. Nous avons voulu dans un premier temps vérifier si le récepteur cellulaire pour l'infection virale au niveau de la lignée de cellules de fibroblastes de poumons humains que nous utilisons comme contrôle positif pour nos expériences était la métalloprotéine aminopeptidase N. Pour cela l'anticorps RBS (Yeager *et al.*, 1992) immunoprécipitant la métalloprotéine a été utilisé

dans des tests de compétition de liaison du virus. Par marquage radioactif, nous avons observé une baisse de 31% de la liaison virale sur la lignée de fibroblastes L132 en présence de l'anticorps RBS anti-récepteur. Du fait que l'aminopeptidase N se retrouve aussi sur les membranes synaptiques, il était intéressant de vérifier la présence et l'utilisation d'un tel récepteur pour les cellules nerveuses utilisées. Nous proposons des résultats préliminaires dans cette étude utilisant la méthode d'immunofluorescence indirecte dans un test de compétition de liaison. Le virus semble utiliser l'aminopeptidase N pour la liaison au niveau des cellules de fibroblastes de poumon, des deux lignées de neuroblastomes, ainsi que sur les lignées de cellules gliales MO3.13 et U-87 MG. Toutefois une étude plus poussée serait nécessaire et intéressante pour confirmer ces résultats préliminaires et mettre en évidence le rôle d'un tel récepteur cellulaire.

Il faut toutefois garder à l'esprit qu'un virus peut utiliser une molécule réceptrice alternative dans différents tissus, ce qui a été mis en évidence pour le MHV-JHM qui utilise le mmCGM1 ("murine CEA gene family member") (Dveksler *et al.*, 1991) pour les infections hépatiques et intestinales. Cette molécule n'est pas détectée dans le cerveau (Williams *et al.*, 1991) qui est l'organe cible pour plusieurs souches neurotropes de coronavirus murins (Sorensen *et al.*, 1973). A ce niveau on retrouve la mmCGM2 qui peut servir de récepteur (Yokomori et Lai, 1992). Ainsi le MHV peut utiliser au moins deux molécules différentes comme récepteur dans différents types de cellules.

CONCLUSION

Les buts de ce travail consistaient à démontrer la susceptibilité et la permissivité à l'infection coronavirale du HCV-229E de cellules du systèmes nerveux en culture continue.

Toutes les lignées sur lesquelles porte cette étude sont susceptibles à l'infection tel que démontré par la présence d'antigènes viraux en utilisant la méthode d'immunofluorescence indirecte sur les cellules infectées. De plus lorsque les cellules sont infectées elles expriment à leur surface des antigènes viraux dont certains miment la fonction du récepteur Fc des immunoglobulines de classe G.

Nous avons observé une forte permissivité des cellules neurales de la lignée SK-N-SH et H4 à l'infection virale puisque les titres de particules virales infectieuses produites atteignent près de  $10^{10}$  et  $10^{8.5}$  DICT<sub>50</sub>/ml respectivement. Les oligodendrocytes de la lignée MO3.13 supportent efficacement une réplication virale, le maximum de production de particules virales infectieuses étant de  $10^7$  DICT<sub>50</sub>/ml, tandis que les astrocytes de la lignée U-373 MG sont faiblement permissives à l'infection coronavirale.

Enfin les résultats préliminaires obtenus lors de tests de compétition de liaison du virus avec un anticorps RBS anti-aminopeptidase N, suggèrent que la métallo-protéine aminopeptidase N est le récepteur viral sur les lignées de fibroblastes de poumons humain L132, les lignées de cellules neurales SK-N-SH, H4 et les astrocytes de la lignée U-87 MG.

Cette étude est une première étape dans la détermination du tropisme cellulaire du

coronavirus humain 229E au niveau de cellules du système nerveux humain et de son implication dans la sclérose en plaques, une maladie démyélinisante du SNC. Elle nécessite l'appui de certains travaux comme l'infection de cellules nerveuses en culture primaire par le HCV-229E, l'hybridation *in situ* du génome de ce même virus sur des tissus frais de façon à déterminer le ou les sites préférentiels de réplication virale et enfin la confirmation de l'amplification du génome du coronavirus dans des coupes de cerveaux de patients atteints de SP par la méthode de séquençage.

**REMERCIEMENTS**

Je remercie sincèrement le directeur de l'Institut Armand Frappier ainsi que le directeur du centre de recherche en virologie, pour avoir accepté ma candidature au programme de maîtrise en virologie-immunologie et pour m'avoir fait bénéficier de l'infrastructure nécessaire à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier d'une manière toute particulière le Dr Pierre Talbot qui a accepté la direction de ce projet de recherche, dont la collaboration et l'enseignement furent des plus enrichissants. Je tiens de plus à lui adresser ma profonde reconnaissance pour sa sympathie, sa patience, son humeur agréable, sa compassion et son support financier sans lequel ce projet n'aurait pu être réalisé.

Mes remerciements vont également aux professeurs et au personnel technique du centre de recherche de viro-immunologie qui ont contribué à la réussite de ce travail, en particulier Madame Francine Lambert pour son concours technique des plus apprécié, monsieur André Levac du Service des Arts graphiques pour l'assistance obtenue au cours de ces années, madame Monique St-Jean pour le précieux temps alloué à l'élaboration de la liste de références ... et le personnel de la bibliothèque pour l'aide apportée à la recherche de documents bibliographiques.

**BIBLIOGRAPHIE**

- ABRAHAM, S., T.E. KIENZLE, W.E. LAPPS et D.A. BRIAN. 1990 Aug. Sequence and expression analysis of potential nonstructural proteins of 4.9, 4.8, 12.7, and 9.5 kDa encoded between the spike and membrane protein genes of the bovine coronavirus. *Virology* 177(2): 488-95.
- ADAMS, J.M. et D.T. IMAGAWA. 1962. Measles antibodies in multiples sclerosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111: 562-566.
- ALLEN, I. et B. BRANKIN. 1993 Mar. Pathogenesis of multiple sclerosis--the immune diathesis and the role of viruses. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 52(2): 95-105.
- ARMSTRONG, J., H. NIEMANN, S. SMEEKENS, P. ROTTIER et G. WARREN. 1984 Apr. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature* 308(5961): 751-2.
- ARMSTRONG, J., S. SMEEKENS et P. ROTTIER. 1983 Feb. Sequence of the nucleocapsid gene from murine coronavirus MHV-A59. *Nucleic Acids Research* 11(3): 883-91.
- ARPIN, N. et P.J. TALBOT. 1988 Oct. Identification et caractérisation des protéines structurales du coronavirus humain 229E. Thèse. Institut Armand-Frappier
- BAILEY, O.T., A.M. PAPPENHEIMER, F.S. CHEEVER et J.B. DANIELS. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. II. Pathology. *Journal of Experimental Medicine.* 90: 195-212.
- BAKER, S.C., N. LA MONICA, C.K. SHIEH et M.M. LAI. 1990. Murine coronavirus gene 1 polyprotein contains an autoproteolytic activity. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 276: 283-9.
- BARTHOLD, S.W., D.S. BECK et A.L. SMITH. 1986. Mouse hepatitis virus nasoencephalopathy is dependent upon virus strain and host genotype. *Archives of Virology* 91(3-4): 247-56.
- BATTAGLIA, M., N. PASSARANI, A. DI MATTEO et G. GERNA. 1987 Jan. Human enteric coronaviruses: further characterization and immunoblotting of viral proteins. *Journal of Infectious Diseases* 155(1): 140-3.
- BEAUDETTE, F.R. et C.B. HUDSON. 1937. Cultivation of the virus of infectious

- bronchitis. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 90: 51-60.
- BEUSHAUSEN, S. et S. DALES. 1985 Feb. In vivo and in vitro models of demyelinating disease. XI. Tropism and differentiation regulate the infectious process of coronaviruses in primary explants of the rat CNS. *Virology* 141 (1): 89-101.
- BEUSHAUSEN, S., S. NARINDRASORASAK, B.D. SANWAL et S. DALES. 1987 Dec. In vivo and in vitro models of demyelinating disease: activation of the adenylate cyclase system influences JHM virus expression in explanted rat oligodendrocytes. *Journal of Virology* 61 (12): 3795-803.
- BINNS, M.M., M.E. BOURSNELL, D. CAVANAGH, D.J. PAPPIN et T.D. BROWN. 1985 Apr. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *Journal of General Virology* 66 (4): 719-26.
- BINNS, M.M., M.E. BOURSNELL, F.M. TOMLEY et D.K. BROWN. 1986a Dec. Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. *Journal of General Virology* 67 (12): 2825-31.
- BINNS, M.M., M.E. BOURSNELL, F.M. TOMLEY et T.D. BROWN. 1986b jul. Nucleotide sequence encoding the membrane protein of the IBV strain 6/82. *Nucleic Acids Research* 14 (13): 5558.
- BOURSNELL, M.E., M.M. BINNS, I.J. FOULDS et T.D. BROWN. 1985a Mar. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology* 66 (3): 573-80.
- BOURSNELL, M.E., M.M. BINNS et T.D. BROWN. 1985b Oct. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: three open reading frames in the 5' unique region of mRNA D. *Journal of General Virology* 66 (10): 2253-8.
- BOURSNELL, M.E., T.D. BROWN, I.J. FOULDS, P.F. GREEN, F.M. TOMLEY et M.M. BINNS. 1987a. The complete nucleotide sequence of avian infectious bronchitis virus: analysis of the polymerase-coding region. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 218: 15-29.
- BOURSNELL, M.E., T.D. BROWN, I.J. FOULDS, P.F. GREEN, F.M. TOMLEY et M.M. BINNS. 1987b Jan. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology* 68 (1): 57-77.
- BOURSNELL, M.E., T.D. BROWN et M.M. BINNS. 1984. Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. *Virus Research* 1 (4): 303-13.

- BOURSNELL, M.E. et T.D. BROWN. 1984 Jul-Aug. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: a 195-base open reading frame encoded by mRNA B. *Gene* 29 (1-2): 87-92.
- BOYLE, J.F., D.G. WEISMILLER et K.V. HOLMES. 1987 Jan. Genetic resistance to mouse hepatitis virus correlates with absence of virus-binding activity on target tissues. *Journal of Virology* 61 (1): 185-9.
- BRADBURNE, A.F.. 1970. Antigenic relationships amongst coronaviruses. *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung* 31 (3):352-64.
- BRAYTON, P.R., M.M. LAI, C.D. PATTON et S.A. STOHLMAN. 1982 Jun.Characterization of two RNA polymerase activities induced by mouse hepatitis virus. *Journal of Virology* 42 (3): 847-53.
- BRITTON, P., R.S. CARMENES, K.W. PAGE, D.J. GARWES et F. PARRA. 1988 Jan. Sequence of the nucleoprotein gene from a virulent British field isolate of transmissible gastroenteritis virus and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 2 (1): 89-99.
- BRITTON, P., C. LOPEZ OTIN, J. MARTIN ALONSO et F. PARRA. 1989. Sequence of the coding regions from the 3.0 kb and 3.9 kb mRNA. Subgenomic species from a virulent isolate of transmissible gastroenteritis virus. *Archives of Virology* 105 (3-4): 165-78.
- BROWN, T.D., M.E. BOURSNELL et M.M. BINNS. 1984 Aug. A leader sequence is present on mRNA A of avian infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology* 65 (8): 1437-42.
- BUCHMEIER, M.J., H.A. LEWICKI, P.J. TALBOT et R.L. KNOBLER. 1984 Jan. Murine hepatitis virus-4 (strain JHM)-induced neurologic disease is modulated in vivo by monoclonal antibody. *Virology* 132 (2): 261-70.
- BUDZILOWICZ, C.J., S.P. WILCZYNSKI et S.R. WEISS. 1985 Mar. Three intergenic regions of coronavirus mouse hepatitis viru strain A59 genome RNA contain a common nucleotide sequence that is homologous to the 3' end of the viral mRNA leader sequence. *Journal of Virology* 53 (3): 834-40.
- BURKS, J.S., B.L. DEVALD, L.D. JANKOVSKY et J.C. GERDES. 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science*. 209: 933-934.

- CALLEBAUT, P., I. CORREA, M. PENSAERT, G. JIMENEZ et L. ENJUANES. 1988 Jul. Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *Journal of General Virology* 69 (7): 1725-30.
- CALLEBAULT, P.E. et M.B. PENSAERT. 1980 May. Characterization and isolation of structural polypeptides in haemagglutinating encephalomyelitis virus. *Journal of General Virology* 48 (1): 193-204.
- CAVANAGH, D.. 1983 Dec. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. *Journal of General Virology* 64 (12): 2577-83.
- CAVANAGH, D. et M.C. HORZINEK. 1993. Genus Torovirus assigned to the Coronaviridae [news]. *Archives of Virology* 128 (3-4): 395-6.
- CHALONER LARSSON, G. et C.M. JOHNSON-LUSSENBURG. 1981. Establishment and maintenance of a persistent infection of L132 cells by human coronavirus strain 229E. *Archives of Virology* 69 (2): 117-29.
- CHAMBON, J.P., M. RIBET, P. QUANDALLE, F. GUERRIN, B. GOSSELIN, H. GSTACH et F.R. PRUVOT. 1987 Apr. Splenic complications of chronic pancreatitis. Clinical and experimental study. [French]. *Journal De Chirurgie* 124 (4): 253-7.
- CHEEVER, F.S., J.B. DANIELS, A.M. PAPPENHEIMER et O.T. BAILEY. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. I. Isolation and biologic properties of the virus. *Journal of Experimental Medicine*. 90: 181-194.
- CHELEY, S., R. ANDERSON, M.J. CUPPLES, E.C. CHAN et V.L. MORRIS. 1981 Jul. Intracellular murine hepatitis virus-specific RNAs contain common sequences. *Virology* 112 (2): 596-604.
- COLLINS, A.R., R.L. KNOBLER, H. POWELL et M.J. BUCHMEIER. 1982 Jun. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* 119 (2): 358-71.
- COLLINS, A.R. et O. SORENSEN. 1986 Dec. Regulation of viral persistence in human glioblastoma and rhabdomyosarcoma cells infected with coronavirus OC43. *Microbial Pathogenesis* 1 (6): 573-82.
- COX, G.J., M.D. PARKER et L.A. BABIUK. 1991 Nov. Bovine coronavirus nonstructural protein ns2 is a phosphoprotein. *Virology* 185 (1): 509-12.

- COX, G.J., M.D. PARKER et L.A. BABIUK. 1989 Jul. The sequence of cDNA of bovine coronavirus 32K nonstructural gene. *Nucleic Acids Research* 1989 Jul 17 (14): 5847.
- DALZIEL, R.G., P.W. LAMPERT, P.J. TALBOT et M.J. BUCHMEIER. 1986 Aug. Site-specific alteration of murine hepatitis virus type 4 peplomer glycoprotein E2 results in reduced neurovirulence. *Journal of Virology* 59 (2): 463-71.
- DANIEL, C. et P.J. TALBOT. 1987. Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A59. *Archives of virology* 96: 241-248.
- DANIEL, C. et P.J. TALBOT. 1990. Protection of mice from lethal coronavirus MHV-A59 infection by monoclonal affinity-purified spike glycoprotein. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 276: 205-10.
- DE GROOT, R.J. 1989. A molecular study of feline infectious peritonitis virus. Utrecht, The Netherlands: University of Utrecht: 67-88.
- DE GROOT, R.J., W.R. HARDY, Y. SHIRAKO et J.H. STRAUSS. 1990 Aug. Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *Embo Journal* 9 (8): 2631-8.
- DE GROOT, R.J., LENSTRA. J.A., W. LUYTJES, H.G. NIESTERS, M.C. HORZINEK, B.A. VAN DER ZEIJST et W.J. SPAAN. 1987. Sequence and structure of the coronavirus peplomer protein. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 218: 31-8.
- DEA, S. et P. TIJSSEN. 1988. Identification of the structural proteins of turkey enteric coronavirus. *Archives of Virology* 99 (3-4): 173-86.
- DEAN, G.. 1970 Jul. The multiple sclerosis problem. *Scientific American* 223 (1): 40-6
- DEAN, G. et J.F. KURTZKE. 1971 Sep. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *British Medical Journal* 3 (777): 725-9.
- DEAN, G., H. MCLOUGHLIN, R. BRADY, A.M. ADELSTEIN et J. TALLETT-WILLIAMS. 1976 Apr. Multiple sclerosis among immigrants in Greater London. *British Medical Journal* 1 (6014): 861-4.
- DELMAS, B., J. GELFI, R. L'HARIDON, L.K. VOGEL, H. SJOSTROM, O.NOREN et H. LAUDE. 1992 Jun. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357 (6377): 417-20.

- DENNIS, D.E. et D.A. BRIAN. 1982 Apr. RNA-dependent RNA polymerase activity in coronavirus- infected cells. *Journal of Virology* 42 (1): 153-64.
- DEREGT, D. et L.A. BABIUK. 1987a Dec. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus: characteristics and topographical mapping of neutralizing epitopes on the E2 and E3 glycoproteins. *Virology* 161 (2): 410-20.
- DEREGT, D., M. SABARA et L.A. BABIUK. 1987b Nov. Structural proteins of bovine coronavirus and their intracellular processing. *Journal of General Virology* 68 (11): 2863-77.
- DOYLE, L.P. et L.M. HUTCHINGS. 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 108 : 257-259.
- DUBOIS-DALCQ, M.E., E.W. DOLLER, M.V. HASPEL et K.V. HOLMES. 1982 Jun. Cell tropism and expression of mouse hepatitis viruses (MHV) in mouse spinal cord cultures. *Virology* 119 (2): 317-31.
- DVEKSLER, G.S., M.N. PENSIERO, C.B. CARDELLICHIO, R.K. WILLIAMS, G.S. JIANG, K.V. HOLMES et C.W. DIEFFENBACH. 1991 Dec. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *Journal of Virology* 65 (12): 6881-91.
- EBERS, G.C., D.E. BULMAN, A.D. SADOVNICK, D.W. PATY, S. WARREN, W. HADER, T.J. MURRAY, T.P. SELAND, P. DUQUETTE, T. GREY *et al.*. 1986 Dec. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *New England Journal of Medicine* 315 (26): 1638-42.
- EBNER, D., T. RAABE et S.G. SIDDELL. 1988 May. Identification of the coronavirus MHV-JHM mRNA 4 product. *Journal of General Virology* 69 (5): 1041-50.
- ERLICH, S.S., J.O. FLEMING, S.A. STOHLMAN et L.P. WEINER. 1987 Aug. Experimental neuropathology of chronic demyelination induced by a JHM virus variant (DS). *Archives of Neurology* 44 (8): 839-42.
- FLEMING, J.O., F.A. EL ZAATARI, W. GILMORE, J.D. BERNE, J.S. BURKS, S.A. STOHLMAN, W.W. TOURTELLOTTE et L.P. WEINER. 1988 Jun. Antigenic assessment of coronaviruses isolated from patients with multiple sclerosis. *Archives of Neurology* 45 (6): 629-33.
- FLEMING, J.O., R.A. SHUBIN, M.A. SUSSMAN, N. CASTEEL et S.A. STOHLMAN. 1989 Jan. Monoclonal antibodies to the matrix (E1) glycoprotein of mouse hepatitis

- virus protect mice from encephalitis. *Virology* 168 (1): 162-7.
- FLEMING, J.O., M.D. TROUSDALE, F.A. EL-ZAATARI, S.A. STOHLMAN et L.P. WEINER. 1986 Jun. Pathogenicity of antigenic variants of murine coronavirus JHM selected with monoclonal antibodies. *Journal of Virology* 58 (3): 869-75.
- FRANA, M.F., J.N. BEHNKE, L.S. STURMAN et K.V. HOLMES. 1985 Dec. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. *Journal of Virology* 56 (3): 912-20.
- FUGGER, L., M. SANDBERG-WOLLHEIM, N. MORLING, L.P. RYDER et A. SVEJGAARD. 1990. The germline repertoire of T-cell receptor beta chain genes in patients with relapsing/remitting multiple sclerosis or optic neuritis. *Immunogenetics* 31 (4): 278-80.
- GERDES, J.C., I. KLEIN, B.L. DEVALD et J.S. BURKS. 1981 Apr. Coronavirus isolates SK and SD from multiple sclerosis patients are serologically related to murine coronavirus A59 and JHM and human coronavirus OC43, but not to human coronavirus 229E. *Journal of Virology* 38 (1): 231-8.
- GERNA, G., P.M. CEREDA, M.G. REVELLO, E. CATTANEO, M. BATTAGLIA et M.T. GERNA. 1981 May. Antigenic and biological relationships between human coronavirus OC43 and neonatal calf diarrhoea coronavirus. *Journal of General Virology* 54 (1): 91-102.
- GESSAIN, A., F. BARIN, J.C. VERNANT, O. GOUT, L. MAURS, A. CALENDER et G. DE THE. 1985 Aug. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2 (8452): 407-10.
- GLEDHILL, A.W. et C.H. ANDREWES. 1951. A hepatitis virus of mice. *Br. J. Exp. Pathol.* 32 : 559-568.
- GODEC, M.S., D.M. ASHER, R.S. MURRAY, M.L. SHIN, L.W. GREENHAM, C.J. J.R. GIBBS et D.C. GAJDUSEK. 1992 Sep. Absence of measles, mumps, and rubella viral genomic sequences from multiple sclerosis brain tissue by polymerase chain reaction. *Annals of Neurology* 32 (3): 401-4.
- GODET, M., R. L'HARIDON, J.F. VAUTHEROT et H. LAUDE. 1992 Jun. TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology* 188 (2): 666-75.
- HAMRE, D. et J.J. PROCKNOW. 1966 Jan. A new virus isolated from the human

respiratory tract. Proceedings of the Society For Experimental Biology & Medicine 121 (1): 190-3.

HARDY, W.R., Y.S. HAHN, R.J. DE GROOT, E.G. STRAUSS et J.H. STRAUSS. 1990 Jul. Synthesis and processing of the nonstructural polyproteins of several temperature-sensitive mutants of Sindbis virus. *Virology* 177 (1): 199-208.

HASONY, H.J. et M.R. MACNAUGHTON. 1982 Feb. Serological relationships of the subcomponents of human coronavirus strain 229E and mouse hepatitis virus strain 3. *Journal of General Virology* 58 (2): 449-52.

HOGUE, B.G. et D.A. BRIAN. 1986 Aug. Structural proteins of human respiratory coronavirus OC43. *Virus Research* 5 (2-3): 131-44.

HOGUE, B.G., B. KING et D.A. BRIAN. 1984 Aug. Antigenic relationships among proteins of bovine coronavirus, human respiratory coronavirus OC43, and mouse hepatitis coronavirus A59. *Journal of Virology* 51 (2): 384-8.

HOLLAND, J., K. SPINDLER, F. HORODYSKI, E. GRABAU, S. NICHOL et S. VANDEPOL. 1982 Mar. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215 (4540): 1577-85.

HOLMES, K.V., E.W. DOLLER et J.N. BEHNKE. 1981a. Analysis of the functions of coronavirus glycoproteins by differential inhibition of synthesis with tunicamycin. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 142 : 133-4

HOLMES, K.V., E.W. DOLLER et L.S. STURMAN. 1981b Dec. Tunicamycin resistant glycosylation of coronavirus glycoprotein: demonstration of a novel type of viral glycoprotein. *Virology* 115 (2): 334-44.

JACKSON, D.P., D.H. PERCY et V.L. MORRIS. 1984 Sep. Characterization of murine hepatitis virus (JHM) RNA from rats with experimental encephalomyelitis. *Virology* 137 (2): 297-304.

JACOBS, L., R. DE GROOT, B.A. VAN DER ZEIJST, M.C. HORZINEK et W. SPAAN. 1987 Nov. The nucleotide sequence of the peplomer gene of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV): comparison with the sequence of the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus (FIPV). *Virus Research* 8 (4): 363-71.

JACOBS, L., B.A. VAN DER ZEIJST et M.C. HORZINEK. 1986 Mar. Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *Journal of Virology* 57 (3):

1010-5.

- JERSILD, C., T. FOG, G.S. HANSEN, M. THOMSEN, A. SVEJGAARD et B. DUPONT. 1973 Dec. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet* 2 (840): 1221-5.
- JOUVENNE, P., N. ARPIN et P.J. TALBOT. 1993. Characterization and antigenicity of the M glycoprotein of human coronavirus 229E. *Life Sciences Advances - Molecular Biology* (sous presse)
- JOUVENNE, P., S. MOUNIR, J.N. STEWART, C.D. RICHARDSON et P.J. TALBOT. 1992 Feb. Sequence analysis of human coronavirus 229E mRNAs 4 and 5: evidence for polymorphism and homology with myelin basic protein. *Virus Research* 22 (2): 125-41.
- JOUVENNE, P., C.D. RICHARDSON, S.S. SCHREIBER, M.M. LAI et P.J. TALBOT. 1990 Feb. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus 229E. *Virology* 174 (2): 608-12.
- KAMAHORA, T., L.H. SOE et M.M. LAI. 1989 Jan. Sequence analysis of nucleocapsid gene and leader RNA of human coronavirus OC43. *Virus Research* 12 (1): 1-9.
- KAPKE, P.A. et D.A. BRIAN. 1986 May. Sequence analysis of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus nucleocapsid protein gene. *Virology* 151 (1): 41-9.
- KAPKE, P.A., F.Y. TUNG, B.G. HOGUE, D.A. BRIAN, R.D. WOODS et R. WESLEY. 1988 Aug. The amino-terminal signal peptide on the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus matrix protein is not an absolute requirement for membrane translocation and glycosylation. *Virology* 165 (2): 367-76.
- KAPKE, P.A., F.Y. TUNG et D.A. BRIAN. 1989 May. Nucleotide sequence between the peplomer and matrix protein genes of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus identifies three large open reading frames. *Virus Genes* 2 (3): 293-4.
- KENNY, A.J. et S. MAROUX. 1982 Jan. Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. *Physiological Reviews* 62 (1): 91-128.
- KIRK, J.. 1990 Sept. Blood vessels, viruses and lymphocytes in multiple sclerosis. (abstract). In: *Proceedings of the XIth International Congress of Neuropathology*. Kyoto, Japan: the Japanese Society for Neuropathology 1990: 366.
- KLENK, H.D. et R. ROTT. 1980. Cotranslational and posttranslational processing of viral glycoproteins. *Current Topics In Microbiology & Immunology* 90 : 19-48.

- KNOBLER, R.L., M. DUBOIS-DALCQ, M.V. HASPEL, A.P. CLAYSMITH, P.W. LAMPERT et M.B. OLDSTONE. 1981 Mar. Selective localization of wild type and mutant mouse hepatitis virus (JHM strain) antigens in CNS tissue by fluorescence, light and electron microscopy. *Journal of Neuroimmunology* 1 (1): 81-92.
- KNOBLER, R.L., P.W. LAMPERT et M.B. OLDSTONE. 1982 Jul. Virus persistence and recurring demyelination produced by a temperature-sensitive mutant of MHV-4. *Nature* 298 (5871): 279-80.
- KOOI, C., M. CERVIN et R. ANDERSON. 1991 Jan. Differentiation of acid-pH-dependent and nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus. *Virology* 180 (1): 108-19.
- KORNER, H., U. FRITZSCHE et H.G. BURGERT. 1992 Dec 15. Tumor necrosis factor alpha stimulates expression of adenovirus early region 3 proteins: implications for viral persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (24): 11857-61.
- KORNER, H., A. SCHLIEPHAKE, J. WINTER, F. ZIMPRICH, H. LASSMANN, J. SEDGWICK, S. SIDDELL et H. WEGE. 1991 Oct. Nucleocapsid or spike protein-specific CD4+ T lymphocytes protect against coronavirus-induced encephalomyelitis in the absence of CD8+ T cells. *Journal of Immunology* 147 (7): 2317-23.
- KOTZIN, B.L., S. KARUTURI, Y.K. CHOU, J. LAFFERTY, J.M. FORRESTER, M. BETTER, G.E. NEDWIN, H. OFFNER et A.A. VANDENBARK. 1991 Oct 15. Preferential T-cell receptor beta-chain variable gene use in myelin basic protein-reactive T-cell clones from patients with multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (20): 9161-5.
- KRZYSTYNIAK, K. et J.M. DUPUY. 1984 Jan. Entry of mouse hepatitis virus 3 into cells. *Journal of General Virology* 65 (1): 227-31.
- KURTZKE, JF. 1983. "Epidemiology of multiple sclerosis", *Multiple sclerosis: pathology, diagnosis and management*. London: Chapman and Hall. 47-95.
- KURTZKE, JF, LT KURLAND, ID GOLDBERG et NW CHOI. 1973. "multiple sclerosis", *Kurland, L.T., J.F. Kurtzke et I.D. Goldberg : Epidemiology of Neurologic and Sense Organ Disorders*. Cambridge, Ms, Harvard University Press. 64-107.
- LAEMMLI, U.K.. 1970 Aug. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259): 680-5.

- LAI, M.M.. 1990. Coronavirus: organization, replication and expression of genome. *Annual Review of Microbiology* 44: 303-33.
- LAI, M.M., R.S. BARIC, P.R. BRAYTON et S.A. STOHLMAN. 1984 Jun. Characterization of leader RNA sequences on the virion and mRNAs of mouse hepatitis virus, a cytoplasmic RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (12): 3626-30.
- LAI, M.M., P.R. BRAYTON, R.C. ARMEN, C.D. PATTON, C. PUGH et S.A. STOHLMAN. 1981 Sep. Mouse hepatitis virus A59: mRNA structure and genetic localization of the sequence divergence from hepatotropic strain MHV-3. *Journal of Virology* 39 (3): 823-34.
- LAI, M.M., C.D. PATTON et S.A. STOHLMAN. 1982 Nov. Replication of mouse hepatitis virus: negative-stranded RNA and replicative form RNA are of genome length. *Journal of Virology* 44 (2): 487-92.
- LAI, M.M. et S.A. STOHLMAN. 1978 May. RNA of mouse hepatitis virus. *Journal of Virology* 26 (2): 236-42.
- LAMONTAGNE, L., D. DECARIE et J.M. DUPUY. 1989. Host cell resistance to mouse hepatitis virus type 3 is expressed in vitro in macrophages and lymphocytes. *Viral Immunology* 2 (1): 37-45.
- LAPPS, W. et D.A. BRIAN. 1985. Oligonucleotide fingerprints of antigenically related bovine coronavirus and human coronavirus OC43. *Archives of Virology* 86 (1-2): 101-8.
- LAPPS, W., B.G. HOGUE et D.A. BRIAN. 1987a. Deduced amino acid sequence and potential O-glycosylation sites for the bovine coronavirus matrix protein. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 218 : 123-9.
- LAPPS, W., B.G. HOGUE et D.A. BRIAN. 1987b Mar. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* 157 (1): 47-57.
- LAUDE, H., D. RASSCHAERT et J.C. HUET. 1987 Jun. Sequence and N-terminal processing of the transmembrane protein E1 of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *Journal of General Virology* 68 (6): 1687-93.
- LAVI, E., P.S. FISHMAN, M.K. HIGHKIN et S.R. WEISS. 1988 Jan. Limbic encephalitis after inhalation of a murine coronavirus. *Laboratory Investigation* 58 (1): 31-6.

- LEIBOWITZ, J.L., S. PERLMAN, G. WEINSTOCK, J.R. DEVRIES, C. BUDZILOWICZ, J.M. WEISSEMAN et S.R. WEISS. 1988 May. Detection of a murine coronavirus nonstructural protein encoded in a downstream open reading frame. *Virology* 164 (1): 156-64.
- LEIBOWITZ, J.L., K.C. WILHELMSSEN et C.W. BOND. 1981 Oct. The virus-specific intracellular RNA species of two murine coronaviruses: MHV-a59 and MHV-JHM. *Virology* 114 (1): 39-51.
- LOMNICZI, B., F.X. BOSCH, A.J. HAY et J.J. SKEHEL. 1977 Apr. Influenza virus infection of a cell-cycle mutant of chinese hamster ovary cells. *Journal of General Virology* 35 (1): 187-90.
- LOOK, A.T., R.A. ASHMUN, L.H. SHAPIRO et S.C. PEIPER. 1989 Apr. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *Journal of Clinical Investigation* 83 (4): 1299-307.
- LUYTJES, W., P.J. BREDENBEEK, A.F. NOTEN, M.C. HORZINEK et W.J. SPAAN. 1988 Oct. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 166 (2): 415-22.
- LUYTJES, W., L.S. STURMAN, P.J. BREDENBEEK, J. CHARITE, B.A. VAN DER ZEIJST, M.C. HORZINEK et W.J. SPAAN. 1987 Dec. Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. *Virology* 161 (2): 479-87.
- MACNAUGHTON, M.R.. 1980. The polypeptides of human and mouse coronaviruses. Brief report. *Archives of Virology* 63 (1): 75-80.
- MAHY, B.W., S. SIDDELL, H. WEGE et V. TER MEULEN. 1983 Jan. RNA-dependent RNA polymerase activity in murine coronavirus-infected cells. *Journal of General Virology* 64 (1): 103-11.
- MARCADET, A., C. MASSART, G. SEMANA, R. FAUCHET, O. SABOURAUD, M. MERIENNE, J. DAUSSET et D. COHEN. 1985. Association of class II HLA-DQ beta chain DNA restriction fragments with multiple sclerosis. *Immunogenetics* 22 (1): 93-6.
- MARTIN, R., M.D. HOWELL, D. JARAQUEMADA, M. FLERLAGE, J. RICHERT, S. BROSTOFF, E.O. LONG, D.E. MCFARLIN et H.F. MCFARLAND. 1991 Jan. A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine* 173 (1): 19-24.

- MASSALSKI, A., M. COULTER-MACKIE et S. DALES. 1981. Assembly of mouse hepatitis virus strain JHM. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 142 : 111-8.
- MATSAS, R., S.L. STEPHENSON, J. HRYSZKO, A.J. KENNY et A.J. TURNER. 1985 Oct. The metabolism of neuropeptides. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N. *Biochemical Journal* 231 (2): 445-9.
- MCINTOSH K, KAPIKIAN AZ, HARDISON KA, HARTLEY JW et CHANOCK RM. 1969 May. Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *Journal of Immunology* 102 (5): 1109-18.
- MCINTOSH K. 1990 Nov-Dec. Overview of the symposium. *Reviews of Infectious Diseases* 12 Suppl 8: S867-9.
- MCINTOSH, K., J.H. DEES, W.B. BECKER, A.Z. KAPIKIAN et R.M. CHANOCK. 1967 Apr. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57 (4): 933-40.
- MELVOLD, R.W., D.M. JOKINEN, R.L. KNOBLER et H.L. LIPTON. 1987 Mar. Variations in genetic control of susceptibility to Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelinating disease. I. Differences between susceptible SJL/J and resistant BALB/c strains map near the T cell beta-chain constant gene on chromosome 6. *Journal of Immunology* 138 (5): 1429-33.
- MIZZEN, L., A. HILTON, S. CHELEY et R. ANDERSON. 1895 Apr. Attenuation of murine coronavirus infection by ammonium chloride. *Virology* 142 (2): 378-88.
- MORRIS, V.L., C. TIESZER, J. MACKINNON et D. PERCY. 1989 Mar. Characterization of coronavirus JHM variants isolated from Wistar Furth rats with a viral-induced demyelinating disease. *Virology* 169 (1): 127-36.
- MOUNIR, S. et P.J. TALBOT. 1993a Jan. Human coronavirus OC43 RNA4 lacks two open reading frames located downstream of the S gene of bovine coronavirus. *Virology* 192 (1): 355-60.
- MOUNIR, S. et P.J. TALBOT. 1993b Sep. Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43. *Journal of General Virology* 74 (9): 1981-7.
- MOUNIR, S. et P.J. TALBOT. 1992 Oct. Sequence analysis of the membrane protein gene of human coronavirus OC43 and evidence for O-glycosylation. *Journal of General*

Virology 73 (10): 2731-6.

MURRAY, R.S., B. BROWN, D. BRIAN et G.F. CABIRAC. 1992a May. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Annals of Neurology* 31 (5): 525-33.

MURRAY, R.S., G.Y. CAI, K. HOEL, J.Y. ZHANG, K.F. SOIKE et G.F. CABIRAC. 1992b May. Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system. *Virology* 188 (1): 274-84.

MURRAY, R.S., B. MACMILLAN, G. CABIRAC et J.S. BURKS. 1990. Detection of coronavirus RNA in CNS tissue of multiple sclerosis and control patients. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 276: 505-10.

NICOLL, J.A., E. KINRADE et S. LOVE. 1992 Dec. PCR-mediated search for herpes simplex virus DNA in sections of brain from patients with multiple sclerosis and other neurological disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 113 (2): 144-51.

NIEMANN, H., B. BOSCHEK, D. EVANS, M. ROSING, T. TAMURA et H.D. KLENK. 1982. Post-translational glycosylation of coronavirus glycoprotein E1: inhibition by monensin. *Embo journal* 1 (12): 1499-504.

NIEMANN, H. et H.D. KLENK. 1981a Dec 25. Coronavirus glycoprotein E1, a new type of viral glycoprotein. *Journal of Molecular Biology* 153 (4): 993-1010.

NIEMANN, H. et H.D. KLENK. 1981b. Glycoprotein E1 of coronavirus A59: a new type of viral glycoprotein. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 142: 119-31.

NIESTERS, H.G., J.A. LENSTRA, W.J. SPAAN, A.J. ZIJDERVELD, N.M. BLEUMINK-PLUYM, F. HONG, G.J. VAN SCHARRENBURG, M.C. HORZINEK et B.A. VAN DER ZEIJST. 1986 Aug. The peplomer protein sequence of the M41 strain of coronavirus IBV and its comparison with Beaudette strains. *Virus Research* 5 (2-3): 253-63.

NOREN, O., H. SJOSTROM, G.M. COWELL, J. TRANUM-JENSEN, O.C. HANSEN et K.G. WELINDER. 1986 Sep. Pig intestinal microvillar maltase-glucoamylase. Structure and membrane insertion. *Journal of Biological Chemistry* 261 (26): 12306-9.

NORONHA et ARNASON. 1992. , Edited by; Klawans, H.L. Goetz, C.G. Tanner, C.M.(22)Textbooks of clinical Neuropharmacology and Therapeutics, 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York. 287-296.

- NORRBY, E., H. LINK, J.E. OLSSON, M. PANELIUS, A. SALMI et B. VANDVIK. 1974 Oct. Comparison of antibodies against different viruses in cerebrospinal fluid and serum samples from patients with multiple sclerosis. *Infection & Immunity* 10 (4): 688-94.
- OKSENBERG, J.R., S. STUART, A.B. BEGOVICH, R.B. BELL, H.A. ERLICH, L. STEINMAN et C.C. BERNARD. 1991 Sep. Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature* 353 (6339): 94.
- OLESZAK, E.L. et J.L. LEIBOWITZ. 1990. Fc receptor-like activity of mouse hepatitis virus E2 glycoprotein. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 276 : 51-8.
- PACHUK, C.J., P.J. BREDENBEEK, P.W. ZOLTICK, W.J. SPAAN et S.R. WEISS. 1989 Jul. Molecular cloning of the gene encoding the putative polymerase of mouse hepatitis coronavirus, strain A59. *Virology* 171 (1): 141-8.
- PARHAM, D., A. TEREBA, P.J. TALBOT, D.P. JACKSON et V.L. MORRIS. 1986 Jul. Analysis of JHM central nervous system infections in rats. *Archives of Neurology* 43 (7): 702-8.
- PARKER, M.M. et P.S. MASTERS. 1990 Nov. Sequence comparison of the N genes of five strains of the coronavirus mouse hepatitis virus suggests a three domain structure for the nucleocapsid protein. *Virology* 179 (1): 463-8.
- PASICK, J.M. et S. DALES. 1991 Sep. Infection by coronavirus JHM of rat neurons and oligodendrocyte-type-2 astrocyte lineage cells during distinct developmental stages. *Journal of Virology* 65 (9): 5013-28.
- PEARSON, J. et C.A. MIMS. 1985 Mar. Differential susceptibility of cultured neural cells to the human coronavirus OC43. *Journal of Virology* 53 (3): 1016-9.
- PEDERSEN, N.C., J. WARD et W.L. MENGELING. 1978. Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species. *Archives of Virology* 58 (1): 45-53.
- PERLMAN, S., G. JACOBSEN, A.L. OLSON et A. AFIFI. 1990 Apr. Identification of the spinal cord as a major site of persistence during chronic infection with a murine coronavirus. *Virology* 175 (2): 418-26.
- PERLMAN, S., G. JACOBSEN et S. MOORE. 1988 Oct. Regional localization of virus in the central nervous system of mice persistently infected with murine coronavirus

- JHM. *Virology* 166 (2): 328-38.
- PERLMAN, S., G. JACOBSEN et A. AFIFI. 1989 Jun. Spread of a neurotropic murine coronavirus into the CNS via the trigeminal and olfactory nerves. *Virology* 170 (2): 556-60.
- PERLMAN, S., R. SCHELPER, E. BOLGER et D. RIES. 1987 Mar. Late onset, symptomatic, demyelinating encephalomyelitis in mice infected with MHV-JHM in the presence of maternal antibody. *Microbial Pathogenesis* 2 (3): 185-94.
- PFLEIDERER, M., M.A. SKINNER et S.G. SIDDELL. 1986 Aug. Coronavirus MHV-JHM: nucleotide sequence of the mRNA that encodes the membrane protein. *Nucleic Acids Research* 14 (15): 6338.
- PIKE, B.V. et D.J. GARWES. 1977 Mar. Lipids of transmissible gastroenteritis virus and their relation to those of two different host cells. *Journal of General Virology* 34 (3): 531-5.
- RAABE, T., B. SCHELLE-PRINZ et S.G. SIDDELL. 1990 May. Nucleotide sequence of the gene encoding the spike glycoprotein of human coronavirus HCV 229E. *Journal of General Virology* 71 (5): 1065-73.
- RASSCHAERT, D., J. GELFI et H. LAUDE. 1987 Jun-Jul. Enteric coronavirus TGEV: partial sequence of the genomic RNA, its organization and expression. *Biochimie* 69 (6-7): 591-600.
- RASSCHAERT, D. et H. LAUDE. 1987 Jul. The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *Journal of General Virology* 68 (7): 1883-90.
- RAVETCH, J.V., A.D. LUSTER, R. WEINSHANK, J. KOCHAN, A. PAVLOVEC, D.A. PORTNOY, J. HULMES, Y.C. PAN et J.C. UNKELESS. 1986 Nov. Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science* 234 (4777): 718-25.
- RESTA, S., J.P. LUBY, C.R. ROSENFELD et J.D. SIEGEL. 1985 Sep. Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science* 229 (4717): 978-81.
- RISKI, H. et T. HOVI. 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. *Journal of Medical Virology* 6 (3): 259-65.
- ROBBINS, S.J. et F. RAPP. 1980 Oct. Inhibition of measles virus replication by cyclic

- AMP. *Virology* 1980 Oct 106 (2): 317-26.
- ROTTIER, P., D. BRANDENBURG, J. ARMSTRONG, B. VAN DER ZEIJST et G. WARREN. 1984. In vitro assembly of the murine coronavirus membrane protein E1. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 173 : 53-64.
- ROTTIER, P.J., M.C. HORZINEK et B.A. VAN DER ZEIJST. 1981 Nov. Viral protein synthesis in mouse hepatitis virus strain A59-infected cells: effect of tunicamycin. *Journal of Virology* 40 (2): 350-7.
- ROTTIER, P.J., G.W. WELLING, S. WELLING-WESTER, H.G. NIESTERS, J.A. LENSTRA et B.A. VAN DER ZEIJST. 1986 Mar. Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. *Biochemistry* 25 (6): 1335-9.
- SALMI, A., B. ZIOLA, T. HOVI et M. REUNANEN. 1982 Mar. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* 32 (3): 292-5.
- SAWICKI, S.G. et D.L. SAWICKI. 1986 Jan. Coronavirus minus-strand RNA synthesis and effect of cycloheximide on coronavirus RNA synthesis. *Journal of Virology* 57 (1): 328-34.
- SAWICKI, S.G. et D.L. SAWICKI. 1990 Mar. Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *Journal of Virology* 64 (3): 1050-6.
- SCHALK, A. et M.C. HAWN. 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78 : 413-422.
- SCHMIDT, I., M. SKINNER et S. SIDDELL. 1987 Jan. Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM. *Journal of General Virology* 68 (1): 47-56.
- SCHMIDT, O.W. et G.E. KENNY. 1982 Feb. Polypeptides and functions of antigens from human coronaviruses 229E and OC43. *Infection & Immunity* 35 (2): 515-22.
- SCHREIBER, S.S., T. KAMAHORA et M.M. LAI. 1989 Mar. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of human coronavirus 229E. *Virology* 169 (1): 142-51.
- SCHWARZ, B., E. ROUTLEDGE et S.G. SIDDELL. 1990 Oct. Murine coronavirus nonstructural protein ns2 is not essential for virus replication in transformed cells. *Journal of Virology* 64 (10): 4784-91.

- SENANAYAKE, S.D., M.A. HOFMANN, J.L. MAKI et D.A. BRIAN. 1992 Sep. The nucleocapsid protein gene of bovine coronavirus is bicistronic. *Journal of Virology* 66 (9): 5277-83.
- SETHNA, P.B., S.L. HUNG et D.A. BRIAN. 1989 Jul. Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (14): 5626-30.
- SHIEH, C.K., H.J. LEE, K. YOKOMORI, N. LA MONICA, S. MAKINO et M.M. LAI. 1989 Sep. Identification of a new transcriptional initiation site and the corresponding functional gene 2b in the murine coronavirus RNA genome. *Journal of Virology* 63 (9): 3729-36.
- SHIEH, C.K., L.H. SOE, S. MAKINO, M.F. CHANG, S.A. STOHLMAN et M.M. LAI. 1987 Feb. The 5'-end sequence of the murine coronavirus genome: implications for multiple fusion sites in leader-primed transcription. *Virology* 156 (2): 321-30.
- SIDDELL S, WEGE H, BARTHEL A et TER MEULEN V. 1981 Mar. Coronavirus JHM: intracellular protein synthesis. *Journal of General Virology* 53 (1): 145-55.
- SIDDELL, S.. 1983 Jan. Coronavirus JHM: coding assignments of subgenomic mRNAs. *Journal of General Virology* 64 (1): 113-25.
- SKINNER, M.A., D. EBNER et S.G. SIDDELL. 1985 Mar. Coronavirus MHV-JHM mRNA 5 has a sequence arrangement which potentially allows translation of a second, downstream open reading frame. *Journal of General Virology* 66 (3): 581-92.
- SKINNER, M.A. et S.G. SIDDELL. 1985 Mar. Coding sequence of coronavirus MHV-JHM mRNA 4. *Journal of General Virology* 66 (3): 593-6.
- SKINNER, M.A. et S.G. SIDDELL. 1983 Aug. Coronavirus JHM: nucleotide sequence of the mRNA that encodes nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Research* 11 (15): 5045-54.
- SMITH, A.R., M.E. BOURSNEILL, M.M. BINNS, T.D. BROWN et S.C. INGLIS. 1990 Jan. Identification of a new membrane-associated polypeptide specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology* 71 (1): 3-11.
- SNIJDER, E.J., J.A. DEN BOON, M.C. HORZINEK et W.J. SPAAN. 1991 Jan. Comparison of the genome organization of toro- and coronaviruses: evidence for two nonhomologous RNA recombination events during Berne virus evolution. *Virology* 180 (1): 448-52.

- SNIJDER, E.J., M.C. HORZINEK et W.J. SPAAN. 1990 Jan. A 3'-coterminally nested set of independently transcribed mRNAs is generated during Berne virus replication. *Journal of Virology* 64 (1): 331-8.
- SODERBERG, C., T.D. GIUNI, J.A. ZAIA, S. LARSON, J.M. WAHLBERG et E. MOLLER. 1993. CD13 (HUMAN AMINOPEPTIDASE N) mediates human cytomegalovirus infection. *Journal of Virology* 67 : 6576-6585.
- SOE, L.H., C.K. SHIEH, S. MAKINO, M.F. CHANG, S.A. STOHLMAN et LAI M.M.. 1987a. Murine coronavirus 5'-end genomic RNA sequence reveals mechanism of leader-primed transcription. *Advances In Experimental Medicine & Biology* 218 : 73-81.
- SOE, L.H., C.K. SHIEH, S.C. BAKER, M.F. CHANG et M.M. LAI. 1987b Dec. Sequence and translation of the murine coronavirus 5'-end genomic RNA reveals the N-terminal structure of the putative RNA polymerase. *Journal of Virology* 61 (12): 3968-76.
- SORENSEN O, DUGRE R, PERCY D et DALES S. 1982 Sep. In vivo and in vitro models of demyelinating disease: endogenous factors influencing demyelinating disease caused by mouse hepatitis virus in rats and mice. *Infection & Immunity* 37 (3): 1248-60.
- SORENSEN, O., A. COLLINS, W. FLINTOFF, G. EBERS et S. DALES. 1986 Dec. Probing for the human coronavirus OC43 in multiple sclerosis. *Neurology* 36 (12): 1604-6.
- SORENSEN, O., D. PERRY et S. DALES. 1980 Aug. In vivo and in vitro models of demyelinating diseases. III. JHM virus infection of rats. *Archives of Neurology* 37 (8): 478-84.
- SPAAN, W., D. CAVANAGH et M.C. HORZINEK. 1988 Dec. Coronaviruses: structure and genome expression. *Journal of General Virology* 69 (12): 2939-52.
- SPAAN, W., H. DELIUS, M. SKINNER, J. ARMSTRONG, P. ROTTIER, S. SMEEKENS, B.A. VAN DER ZEIJST et S.G. SIDDELL. 1983. Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *Embo Journal* 2 (10): 1839-44.
- SPAAN, W.J., P.J. ROTTIER, M.C. HORZINEK et B.A. VAN DER ZEIJST. 1981 Jan. Isolation and identification of virus-specific mRNAs in cells infected with mouse hepatitis virus (MHV-A59). *Virology* 108 (2): 424-34.
- SPAAN, W.J., P.J. ROTTIER, M.C. HORZINEK et B.A. VAN DER ZEIJST. 1982 May. Sequence relationships between the genome and the intracellular RNA species 1,

- 3, 6, and 7 of mouse hepatitis virus strain A59. *Journal of Virology* 42 (2): 432-9.
- STEINMAN, L.. 1991. The development of rational strategies for selective immunotherapy against autoimmune demyelinating disease. *Advances In Immunology* 49 : 357-79.
- STERN, D.F. et S.I. KENNEDY. 1980 Jun. Coronavirus multiplication strategy. I. Identification and characterization of virus-specified RNA. *Journal of Virology* 34 (3): 665-74.
- STERN, D.F. et B.M. SEFTON. 1982a Dec. Coronavirus proteins: Structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. *Journal of virology* 44 (3): 804-12.
- STERN, D.F. et B.M. SEFTON. 1982b Dec. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus virion proteins. *Journal of Virology* 44 (3): 794-803.
- STERN, D.F. et B.M. SEFTON. 1984 Apr. Coronavirus multiplication: locations of genes for virion proteins on the avian infectious bronchitis virus genome. *Journal of Virology* 50 (1): 22-9.
- STEWART, J.N., S. MOUNIR et P.J. TALBOT. 1992 Nov. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* 191 (1): 502-5.
- STOHLMAN, S.A. et M.M. LAI. 1979 Nov. Phosphoproteins of murine hepatitis viruses. *Journal of Virology* 32 (2): 672-5.
- STURMAN, L.S.. 1977 Apr. I. Structural proteins: effects of preparative conditions on the migration of protein in polyacrylamide gels. *Virology* 77 (2): 637-49.
- STURMAN, L.S. et HOLMES K.V.. 1977 Apr. Characterization of coronavirus II. Glycoproteins of the viral envelope: tryptic peptide analysis. *Virology* 77 (2): 650-60.
- STURMAN, L.S., HOLMES K.V. et J. BEHNKE. 1980 Jan. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *Journal of Virology* 33 (1): 449-62.
- STURMAN, L.S. et K.V. HOLMES. 1983. The molecular biology of coronaviruses. *Advances In Virus Research* 28 : 35-112.
- STURMAN, L. et K.V. HOLMES. 1985. The novel glycoprotein of coronaviruses. *Trends biochem. Sci* 10 : 17-20.

- STURMAN, L.S. et K.V. HOLMES. 1984. Proteolytic cleavage of peplid glycoprotein E2 of MHV yields two 90K subunits and activates cell fusion. *Adv In Experimental Medicine & Biology* 173 : 25-35.
- STURMAN, L.S., C.S. RICARD et K.V. HOLMES. 1985 Dec. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. *Journal of Virology* 56 (3): 904-11.
- TALBOT, P.J., G. DIONNE et M. LACROIX. 1988 Aug. Vaccination against lethal coronavirus-induced encephalitis with a synthetic decapeptide homologous to a domain in the predicted peplomer stalk. *Journal of Virology* 62 (8): 3032-6.
- TANAKA, R., Y. IWASAKI et H. KOPROWSKI. 1976 may. Intracisternal virus-like particles in brain of a multiple sclerosis patient. *Journal of the Neurological Sciences* 28 (1): 121-6.
- TARDIEU, M., O. BOESPFLUG et T. BARBE. 1986 Nov. Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells. *Journal of Virology* 60 (2): 574-82.
- TOOZE, J., S. TOOZE et G. WARREN. 1984 Mar. Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *European Journal of Cell Biology* 33 (2): 281-93.
- TYRRELL, D.A., J.D. ALMEIDA, C.H. CUNNINGHAM, W.R. DOWDLE, M.S. HOFSTAD, K. MCINTOSH, M. TAJIMA, L.Y. ZAKSTELSKAYA, B.C. EASTERDAY, A. KAPIKIAN et R.W. BINGHAM. 1975. Coronaviridae. *Intervirology* 5 (1-2): 76-82.
- TYRRELL, D.A. J. et M.L. BYNOE. 1965. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br.Med. J.* 1 : 1467-1470.
- TYRRELL, D.A., M.L. BYNOE et B. HOORN. 1968 Mar. Cultivation of "difficult" viruses from patients with common colds. *British Medical Journal* 1 (592): 606-10.
- VENNEMA H, HEIJNEN L, ZIJDERVELD A, HORZINEK MC et SPAAN WJ. 1990 Jan. Intracellular transport of recombinant coronavirus spike proteins: implications for virus assembly. *Journal of Virology* 64 (1): 339-46.
- VERBEEK, A., S. DEEA et P. TIJSSEN. 1991. Genomic relationship between turkey and bovine enteric coronaviruses identified by hybridization with BCV or TCV specific

- cDNA probes. Archives of Virology 121 (1-4): 199-211.
- VLASAK, R., W. LUYTJES, J. LEIDER, W. SPAAN et P. PALESE. 1988 Dec. The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylsterase activity. Journal of Virology 62 (12): 4686-90.
- WATKINS, J.F.. 1964. Adsorption of sensitized sheep erythrocytes to HeLa cells infected with Herpes Simplex Virus. Nature (London) 202 : 1364-1365.
- WEGE, H., R. DORRIES et H. WEGE. 1984 Nov. Hybridoma antibodies to the murine coronavirus JHM: characterization of epitopes on the peplomer protein (E2). Journal of General Virology 65 (11): 1931-42.
- WEGE, H., A. MULLER et V. TER MEULEN. 1978 Nov. Genomic RNA of the murine coronavirus JHM. Journal of General Virology 41 (2): 217-27.
- WEGE, H., S. SIDDELL et V. TER. MEULEN. 1982. The biology and pathogenesis of coronaviruses. Current Topics In Microbiology and Immunology 99: 165-200.
- WEISS, S.R.. 1983 Apr. Coronaviruses SD and SK share extensive nucleotide homology with murine coronavirus MHV-A59, more than that shared between human and murine coronaviruses. Virology 126 (2): 669-77.
- WEISS, S.R. et J.L. LEIBOWITZ. 1983 Jan. Characterization of murine coronavirus RNA by hybridization with virus-specific cDNA probes. Journal of General Virology 64 (1): 127-33.
- WESLEY, R.D., R.D. ~~WESLEY~~ et A.K. CHEUNG. 1990 Oct. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. Journal of Virology 64 (10): 4761-6.
- WILHELMSSEN, K.C., J.L. LEIBOWITZ, C.W. BOND et J.A. ROBB. 1981 Apr. The replication of murine coronaviruses in enucleated cells. Virology 110 (1): 225-30.
- WILLIAMS, R.K., G.S. JIANG et K.V. HOLMES. 1991 Jul. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1 (88): 13
- WILSON, G.A., S. BEUSHAUSEN et S. DALES. 1986 Jun. *In vivo* and *in vitro* models of demyelinating diseases. XV. Differentiation influences the regulation of coronavirus infection in primary explants of mouse CNS. Virology 151 (2): 253-64.

- WUCHERPFENNIG, K.W., H.L. WEINER et D.A. HAFLER. 1991 Aug. T-cell recognition of myelin basic protein [see comments]. *Immunology Today* 12 (8): 277-82.
- YASUDA, J. et F. MILGROM. 1968. Hemadsorption by herpes simplex-infected cell cultures. *International Archives of Allergy & Applied Immunology* 33 (2):151-70.
- YEAGER, C.L., R.A. ASHMUN, R.K. WILLIAMS, C.B. CARDELLICHIO, L.H. SHAPIRO, A.T. LOOK et K.V. HOLMES. 1992 Jun. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357 (6377): 420-2.
- YOGO, Y., N. HIRANO, S. HINO, H. SHIBUTA et M. MATUMOTO. 1977 Oct. Polyadenylate in the virion RNA of mouse hepatitis virus. *Journal of Biochemistry* 82 (4): 1103-8.
- YOKOMORI K, BANNER LR et LAI MM. 1991 Aug. Heterogeneity of gene expression of the hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronaviruses. *Virology* 183 (2): 647-57.
- YOKOMORI K et LAI MM. 1992a Oct. Mouse hepatitis virus utilizes two carcinoembryonic antigens as alternative receptors. *Journal of Virology* 66 (10): 6194-9.
- YOKOMORI K et LAI MM. 1992b Dec. The receptor for mouse hepatitis virus in the resistant mouse strain SJL is functional: implications for the requirement of a second factor for viral infection. *Journal of Virology* 66 (12): 6931-8.
- YOKOMORI, K., S.C. BAKER, S.A. STOHLMAN et M.M. LAI. 1992 May. Hemagglutinin-esterase-specific monoclonal antibodies alter the neuropathogenicity of mouse hepatitis virus. *Journal of Virology* 66 (5): 2865-74.
- YOSHIKAWA, Y. et K. YAMANOUCHI. 1984 May. Effect of papaverine treatment on replication of measles virus in human neural and nonneural cells. *Journal of Virology* 50 (2): 489-96.
- ZHANG, X.M., K.G. KOUSOULAS et J. STORZ. 1992 Jan. The hemagglutinin/esterase gene of human coronavirus strain OC43: phylogenetic relationships to bovine and murine coronaviruses and influenza C virus. *Virology* 186 (1): 318-23.