

Recherche d'anticorps de classe IgG antioxsackie virus B3 chez des enfants diabétiques et sains par trois techniques différentes

M. HASSINE¹
 R. HARRATH¹
 S. NSAIBA¹
 J. GHARBI¹
 M.N. GUEDDICHE²
 M. AOUNI¹

¹ Laboratoire de virologie Faculté de Pharmacie - Monastir

² Service de Pédiatrie . CHU Fattouma Bourguiba - Monastir

Résumé : Les coxsackie virus de groupe B constituent un groupe d'agents infectieux intéressants en pathologie humaine. L'implication de ces virus dans le développement du diabète insulino-dépendant est fort suspectée. Dans notre travail nous avons recherché les anticorps antioxsackie virus B3 (CVB3) chez 33 enfants diabétiques insulino-dépendants et 35 enfants sains de la même tranche d'âge. Le spectre antigénique du coxsackie virus B3 a été déterminé en préparant 3 types d'antigènes élaborés au cours du cycle viral : antigène initial, antigène procapside et antigène terminal. La recherche des anticorps de classe IgG anti-CVB3 et leur titrage ont été réalisés par la technique d'immunofluorescence indirecte (I.F.I.) et l'immunoblot. Avec l'I.F.I., 24 % des malades sont positifs contre 11% chez les témoins. Avec l'immunoblot, 18 % (6 cas) des malades sont positifs contre 5% (2cas) chez les témoins. Chez les malades, les anticorps sont dirigés contre les polypeptides VP1, VP2 et VP3, alors que chez les témoins les anticorps ne sont dirigés que contre VP1. Tous les sérums des malades et témoins n'ont pas réagi avec les antigènes initiaux. La réaction observée avec l'antigène procapside concernait essentiellement VP1. Nos résultats plaident en faveur de l'hypothèse d'une association diabète-infection à entérovirus.

Mots -lés : *Coxsackievirus B3, Diabète insulino-dépendant, Antigènes initiaux, Antigènes procapsides, Antigènes terminaux, Anticorps IgG.*

Les entérovirus sont responsables d'un grand nombre de manifestations pathologiques dans l'espèce humaine. En complément de l'isolement et plus récemment des méthodes de détection des génomes viraux, la sérologie et en particulier la recherche d'anticorps de classe IgM a fortement contribué à préciser le rôle de ces entérovirus dans certains cadres nosologiques. La sérologie a fourni les premiers arguments d'ordre épidémiologique pour suspecter une relation de causalité entre les affections cardiaques et les infections à entérovirus en particulier à coxsackie virus B. L'association diabète sucré insulino-dépendant-entérovirus a été évoquée dans de nombreux travaux (10, 11, 19, 20,21), mais les résultats sont souvent divergents.

L'isolement d'un coxsackie virus B3 (CVB3) chez des enfants hospitalisés, des enfants de crèche et surtout chez des enfants diabétiques nous a amené à entre-

prendre une étude sérologique pour vérifier l'hypothèse de l'association du diabète insulino-dépendant au coxsackie virus B3 et de mettre en évidence des marqueurs sérologiques de l'infection.

Notre travail consiste à comparer le statut immunitaire vis-à-vis de différents antigènes élaborés au cours du cycle viral du CVB3, d'un groupe d'enfants diabétiques insulino-dépendants et d'un groupe d'enfants sains. Le but de notre travail est d'étudier l'association diabète sucré insulino-dépendant-coxsackie virus B3.

Matériel et méthodes

Populations étudiées

33 enfants diabétiques insulino-dépendants (19 garçons et 14 filles) ont fait l'objet de notre étude. Leur âge s'échelonne de 1 à 19 ans avec une moyenne de 11,4 ans. 35 enfants sains (18 garçons et 17 filles) de la même

tranche d'âge (13,2 ans) ont servi comme population témoin. Les malades et les témoins sont de la même région géographique (Sahel Tunisien).

Coxsackie virus B3

Nous avons utilisé une souche de CVB3 entretenue par culture cellulaire sur lignée cellulaire Hep.2.

Préparation des antigènes viraux

L'antigène terminal

La souche de travail a été inoculée à raison de 15 doses infectieuses par cellule à une culture en couche monocellulaire Hep.2. Après une heure de contact à 37°C, les particules virales non absorbées sont éliminées et le milieu de croissance est renouvelé. On incube à 37°C pendant 2 à 3 jours jusqu'à l'obtention de l'effet cytopathogène. Une série de congélation - décongélation libère les particules virales dans le milieu extracellulaire. Le surnageant est séparé des débris cellulaires par centrifugation à 1200 g pendant 10 minutes. On procède à la concentration de cette suspension virale par une centrifugation à 180 000 g pendant 4 heures à +4°C. Les culots sont récupérés dans le tampon P.B.S. stérile (150 mMol, pH =7,4). On congèle à -20°C jusqu'à utilisation.

L'Antigène procapside

L'antigène procapside est préparé à partir d'extraits des cellules infectées par le CVB3 et traitées par 3 mM de guanidine pendant 1h à 37° C. Le milieu de croissance est changé et l'incubation est prolongée à 2h 25 minutes post infection. Les antigènes viraux sont récupérés de la même façon que l'antigène terminal.

L'Antigène initial

L'antigène initial est préparé à partir de cellules infectées par le CVB3 en présence de 0,9 mM de chlorure de Zinc pendant 1h45 minutes à 37°C selon la méthode décrite par Aouni et al. (1).

Pour les 3 types d'antigènes viraux, des témoins cellulaires sont traités exactement comme l'antigène en omettant le virus.

Séparation des antigènes viraux

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

100 µl de l'antigène (initial, procapside ou terminal) du CVB3 sont dilués dans 100 µl de tampon de dénatura-

tion (tris 0,5 M, SDS 20%, 2 mercaptoéthanol, glycérol, bleu de bromophénol). Le tampon de migration utilisé est à base de tris-glycine SDS pH=8,8.

Le gel d'acrylamide est obtenu par dissolution d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide à 30% dans un tampon tris basique de pH 8,8.

Les antigènes initiaux et procapsides sont résolus dans un gel à 7%. Les antigènes terminaux sont résolus dans un gel à 12% selon la méthode de Towbin (17).

Recherche des anticorps anti-antigènes viraux

L'immunofluorescence indirecte : I.F.I.

Les cellules infectées à un stade précoce de l'effet cytopathogène sont fixées sur des lames portes objets. Les sérums à tester sont dilués au 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128. Le conjugué utilisé est une anti-IgG humaine marquée à la fluoresceine (Diagnostic Pasteur Æ) diluée au 1/100 dans le tampon P.B.S. (150 mM, pH = 7,4) Le seuil de positivité est défini par une fluorescence caractéristique volumineuse et envahissante.

L'Immunoblot

Les protéines virales séparées sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par électrophorèse (0,8 mA/cm² pendant 2h). Les membranes sont découpées en bandelettes de 0,5 cm et saturées avec le tampon PBS-Tween20- albumine bovine (BSA 0,5%) . Les bandelettes sont incubées avec les sérums à tester convenablement dilués (1/100) dans le tampon PBS-BSA-Tween20. L'immunodétection est conduite en utilisant un conjugué anti-IgG humaines marqué à la peroxydase (Diagnostic Pasteur Æ). La révélation est réalisée par une solution de diaminobenzidine (0,1 mM) et l'eau oxygénée (110 V).

Tests statistiques

Pour comparer les fréquences observées, nous avons utilisé le test d'écart réduit

Résultats

Profils électrophorétiques des antigènes viraux

Les antigènes initiaux (Figure 1)

Le profil électrophorétique montre l'accumulation de polypeptides de P.M. 66 KDa (a, b, c). Ces bandes ne

sont pas trouvées dans le témoin cellulaire.

Les antigènes procapsides (Figure 1)

Trois polypeptides de P.M. 64 KDa (bande 1), 30 KDa (bande 2) et 24 KDa (bande 3) sont détectés. Ils ne se trouvent pas dans le témoin cellulaire. Il s'agit respectivement de VP0, VP1 et VP3 des entérovirus.

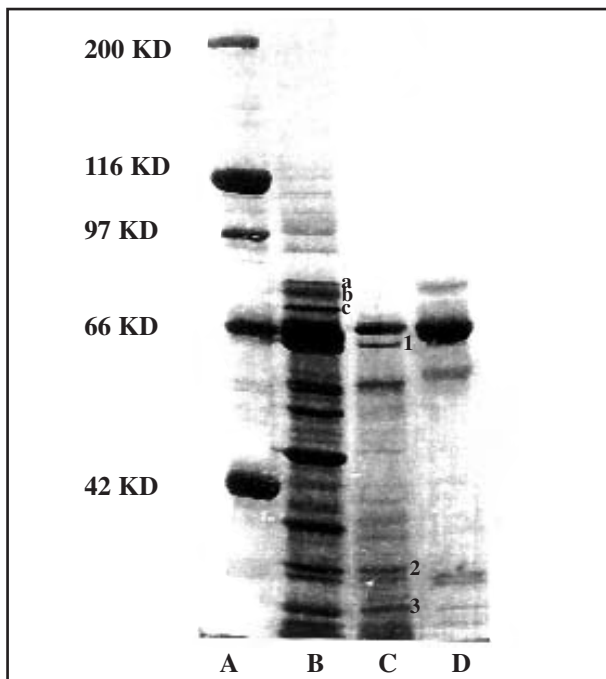


Figure 1. Profil électrophorétique des antigènes initiaux et procapsidaux dans un gel d'acrylamide à 7%

- A - Marqueur de poids moléculaire
- B - Antigènes initiaux bloqués par le Zn Cl₂
- C - Antigènes procapsidaux bloqués par la guanidine
- D - Témoin cellulaire
- a, b, c : polypeptides de P.M. ≥ 66 KD
- 1, 2, 3 : polypeptides de 64 KD, 30 KD, 24 KD

L'antigène terminal (Figure 2)

Trois polypeptides (1,2,3) de P.M. de 30 KDa, 27 KDa et 24 KDa ont été caractérisés. Il s'agit de VP1, VP2 et VP3 (VP4 étant de taille très faible, n'a pas été détecté)

Etude de la réponse anticorps des malades et témoins vis-à-vis des différents types d'antigènes du coxsackie virus B3.

L'Immunofluorescence indirecte

Chez le groupe des enfants malades, nous avons trouvé 8 malades positifs (24%). Il s'agit de 3 garçons et 5 filles. Chez les témoins, nous rapportons 4 cas positifs (11%). La différence entre les malades et les témoins est statistiquement significative ($p < 0,01$). Les titres des anticorps chez les malades et les témoins sont (à 1/32).

L'immunogénéicité individualisée des polypeptides

Les résultats de cette expérience montrent des bandes immunorévélees bien définies, d'une intensité variable témoignant de la réactivité des sérums testés. Les anticorps mis en évidence sont dirigés contre les 3 polypeptides de l'antigène terminal. Nous n'avons pas trouvé d'anticorps dirigés contre les antigènes initiaux (polypeptides de P.M. 66 KDa) et procapsides (VP0).

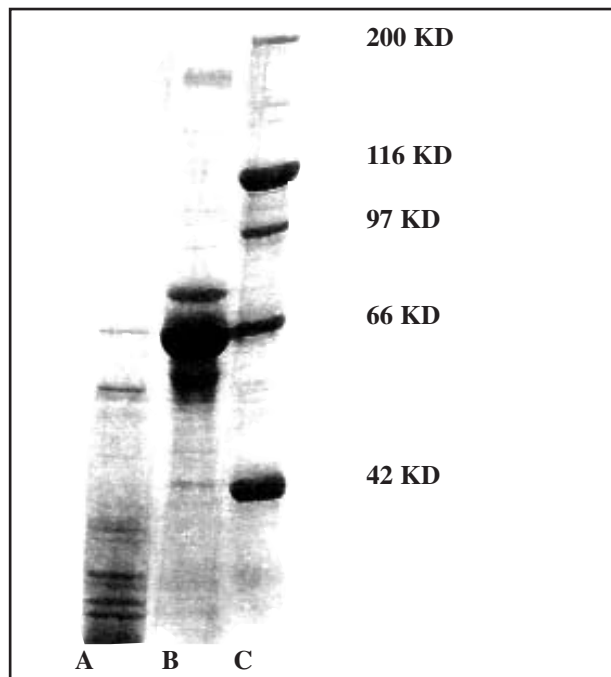


Figure 2. Profil électrophorétique des antigènes terminaux séparés dans un gel d'acrylamide à 12%

- A - Antigène terminal
- B - Témoin cellulaire
- C - Marqueur de poids moléculaire
- 1 : VP 1 ; 2 : VP 2 ; 3 : VP 3

Chez le groupe d'enfants malades, nous avons trouvé 6 cas positifs (18%) dont 4 ont des anticorps dirigés contre le polypeptide VP1 et 2 ont des anticorps dirigés contre les 3 polypeptides VP1, VP2 et VP3.

Chez les sujets témoins, nous rapportons 2 cas positifs (5%) qui n'ont réagi qu'avec la bande de 30 KDa correspondant au polypeptide VP1.

Tous les sérums positifs en immunoblot sont positifs aussi avec l'Immunofluorescence indirecte.

Discussion

L'essai de blocage du clivage des polypeptides viraux entrepris dans notre travail par le chlorure de Zinc et la guanidine se traduit normalement par l'accumulation dans le cytoplasme cellulaire de polypeptides dérivant immédiatement du polypeptide unique codé par le génome viral (1).

Les polypeptides de P.M. 66 KDa du profil électrophorétique des antigènes bloqués par le chlorure de Zinc et qui ne figurent pas chez le témoin cellulaire, pourraient correspondre aux polypeptides initiaux du virus. Les ions Zinc, en se fixant au niveau de la protéine virale, forment une gêne stérique empêchant la protéase d'atteindre son site spécifique pour cliver la protéine (13).

Le polypeptide de 64 KDa de l'antigène procapside pourrait correspondre à la protéine VP0 des entérovirus non encore clivée en VP2 et VP4 ou à son précurseur. Les polypeptides de 30 KDa et 24 KDa pourraient correspondre respectivement aux polypeptides VP1 et VP3 des entérovirus.

Quant aux antigènes terminaux, les 3 polypeptides constituant la capsid virale sont bien séparés par électrophorèse. Il s'agit des polypeptides VP1 (30 KDa), VP2 (27KDa) et VP3 (24 KDa).

Nos résultats d'étude de la réponse anticorps des deux groupes d'enfants vis-à-vis des antigènes du CVB3 montrent une fréquence de positivité en anticorps IgG plus élevée chez les malades. Nous remarquons que tous les malades et témoins positifs en immunoblot ont des anticorps dirigés contre le polypeptide VP1 qui constitue la protéine la plus immunogène des entérovirus. Elle est de plus en plus considérée comme antigène de groupe (4, 14).

Les anticorps dirigés contre les antigènes VP2 et VP3 ne sont trouvés que chez les malades. Il serait intéressant de considérer ces polypeptides comme marqueurs potentiels d'évolution de l'infection à CVB3.

Les sérologies entreprises pour vérifier l'hypothèse d'incrimination des entérovirus, plus particulièrement le CVB3 dans la genèse du diabète de type I, ont donné des résultats contradictoires. La mise en évidence d'IgM spécifiques anti-CVB3 plaide pour une association dans les études de groupe de Banatavla (3). Dans l'étude de Foulis (8), il a été montré, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine VP1 d'un CVB3 recombinant, des stigmates d'infection virale dans le coeur et le pancréas d'enfants diabétiques. Dahlquist et al.(7) montrent que les enfants nés de mère ayant une sérologie positive anti-CVB de classe IgM ont un risque élevé de développer un diabète insulino-dépendant. Cependant Mevki (12), par une technique de séroneutralisation anti-sérotype 1, 2, 3, 4, 5 et 6 du CVB, ne trouve pas de différence significative entre 2 populations constituées de 37 diabétiques et 100 sujets sains. De même Yoon (21) ne trouve pas de corrélation entre l'induction d'anticorps anti CVB et la présence d'auto-anticorps anti-cellules des îlots de Langerhans chez les diabétiques insulino-dépendants.

Les outils utilisés dans notre travail pour étudier l'immunité humorale vis-à-vis du CVB3 montrent une différence significative entre un groupe d'enfants diabétiques insulino-dépendants et un groupe d'enfants sains. Ces résultats plaident en faveur de l'association CVB3 - diabète insulino-dépendant.

Le recours à des techniques de mise en évidence du virus par des outils de biologie moléculaire dans le sérum ou l'organe atteint du malade, pourrait éclaircir mieux la relation entre infection virale et le développement du diabète. En effet, Cléments et al. (6) ont pu détecter l'ARN viral dans le sérum de 9 malades parmi 14 par une technique de polymérase- chain réaction (PCR), alors que chez les témoins l'ARN n'a été détecté que chez 2 sujets sains parmi 45. Les séquences de ces virus isolés présentent une grande homologie avec les sérotypes 3 et 4 du CVB.

Références

- 1- Aouni M., Pozzetto B., Guaudin O., Rosa A., Characterization of a non structural 147 KD precursor polypeptide of echovirus-33 and its immunogenicity in man *Res. Virol.* 1989, 140 : 313-317.
- 2- Andreoletti L., Hober D., Hober-Vandenberghe C., Belaiech S., Vantychem C., Lefebvre J., Wattré P. Detection of coxsackie B virus RNA séquences in whole blood samples from adult patients at the onset of type 1 diabetes mellitus. *Jour. Med. Virol.* 1997, 52 : 121-127.
- 3- Banatavla J.E., Bryant J., Scherthaner G., Borken Stein M., Schober E., Brown D., Desilva L.M., Menser M.A., Silink M. Coxsackie B mumps, rubella and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile onset insulin-dependant diabetes mellitus in Britain, Austria and Australia. *Lancet* 1985, 22 : 1409-1412
- 4- Bourlet T., Gharbi J., Omar S., Aouni M., POzzetto B. Comparaison of a rapid culture method combining an immuno-peroxidase test and a group specific Anti-VP1 monoclonal antibody with conventional virus isolation techniques for routine detection of Enteroviruses in stools. *Journ.Med. Virol.* 1998, 54 : 204-209.
- 5- Bourlet T., Omar S., Grattard F., Pozzetto B. Detection of coxsackie virus B3 in intestinal tissue of orally infected mice by a standardized RT-PCR assay. *Clin. Diag. Virol.* 1997, 8 : 143-150.
- 6- Clements G.B., Galbaiten D.N., Taylor K.W. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *Lancet* 1995, 346 : 221-223.
- 7- Dahlquist G., Frisk G., Ivarsson S.A., Svanberg L., Forgen M., Diderholm H. Indications that maternal coxsackie B virus infection during pregnancy is a risk factor for childhood - onset IDDM *Diabetologia*, 1995, 11 : 1371-1373.
- 8- Foulis A.K., Farquharson M.A., Cameron S.O., McGill M., Schouke H., Kandoff R. A search for the presence of the enteroviral capsid protein VP1 in pancreas of patients with type 1 diabetes and pancreases and hearts of infants who died of coxsackie viral myocarditis. *Diabetologia*, 1990, 33 : 290-298.
- 9- Frisk G., Diderholm H. Antibody responses to different strains of coxsackie B4 virus in patients with newly diagnoses type I diabetes mellitus or aseptic meningitis. *The Journal of infection*, 1997, 3 : 205-210.
- 10- Graves P.M., Novis J.M., Pallansch M. A., Gerling I. G., Rewers M. The role of enteroviral infections in the development of IDDM : limitations of current approaches. *Diabètes* ; 1997, 2 : 161-168.
- 11- Hyoty H., Hiltunen M., Knip M., Laakkouen M., Valrasaf P., Karjalainen J., Kos Kala P., Roivainen M., Leinikki P., Hivi T., Akerblom H.K. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. *Diabètes* ; 1995, 6 : 652-653.
- 12- Mevki Y., Hastanesi A. Diabets mellitus *Microbio. Bull.* 1992, 26 : 116-120.
- 13- Muckelbanier J.K., Kremer M., Minor I., Diano G., Dutko J. F., Groarke J., Pevear D.G., Rassdamm M. G. The structure of coxsackie virus B3 at 3,5 \approx resolution. *Structure.* 1995, 3 : 653-667.
- 14- Muir P., Kammarer U., Kounk., Mulders M. N., Poyry T., Weissbrick B., Kandoff R., Cleaator G. M., Vanloon A.M. Molecular typing of enteroviruses : Current status and future requirements. *Clin. Microbio.Rev.* 1998, 1 : 202-227.
- 15- Pozzetto B., Bourlet T. Actualité des entérovirus en pathologie humaine. *Ann. Biol. Clin.* 1997, 55 : 183-188.
- 16- Signore A., Procaccinini E., Chianelli M., Pozzilli P. Retroviruses and diabetes in animal models : hypothesis for the induction of the disease. *Diabète et métabolisme.* 1995, 3 : 147-155.
- 17- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979, 76 : 4350-4354.
- 18- Tuvemo T., Dahlquist G., Frisk G., Blom L., Friman G., Laudrin-Olsson M., Diderholm H. The swedish childhood diabetes study : IgM against coxsackie B viruses in newly diagnosed type 1 diabetic children. *Diabetologia.* 1989, 32 : 745-747.
- 19- Vissem F.C.J., Bouter K.P., Pon M. J., Hoekstra J.B.L., Erbelous D. W., Diepersloot R.J.A. Patients with diabetes mellitus and atherosclerosis ; a role of cytomegalovirus ? *Diab. Resear. Clin. Pract.* 1997, 1 : 49-55.
- 20- Vrengdenhic G.R., Geluk A., Ottenhoff T.H.M., Melc Dors W.J., Roep B.O., Gallama J.M.D. Molecular mimicry in diabetes mellitus : the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet auto-antigen GAD (65) is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia.* 1998, 1 : 40-46.
- 21- Wagen Kinecht L.E., Roseman J. M., Herman W. H., Increase incidence of insulin-dependant diabetes mellitus following an epidemic of coxsackie virus B5. *Ann. Jour. Epid.* 1991, 133 : 1024-1031.
- 22- Yoon J. W., Ihm S. H., Kim K. W. Viruses a triggering factor of type 1 diabetes and genetic markers related to the susceptibility to the virus-associated diabetes. *Diab. Res. Clin. Pract.* 1987, 7 : 547-548.