Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Institut Armand-Frappier

INFLUENCE DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA CHORIOMÉNINGITE LYMPHOCYTAIRE SUR LA RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE

Par

Matthieu DAUGAN

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.) en Immunologie et Virologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr. Julien Van Grevenynghe INRS – Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Dr. Martin Richer Université McGill
Examinateur externe	Dr. Andrés Finzi Université de Montréal
Directeur de recherche	Dr. Alain Lamarre INRS-Institut Armand-Frappier

Dépôt initial le 31 décembre 2015
Dépôt final le 7 mars 2016

© Droits réservés de *Matthieu Daugan*, 2016

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps j'aimerais remercier mon directeur de recherche et mentor Alain Lamarre pour m'avoir accepté dans son laboratoire et avoir accompagné mon cheminement durant toutes ces années de doctorat.

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à avancer et mûrir d'un point de vue scientifique: Esther Tarrab, Armstrong Murira, Pascal Lapierre, Marie-Pierre Langlois, Tania Charpentier, Marie-Ève Lebel, Karine Chartrand, Valérie Janelle, Jessy Tremblay, Mathieu Blanchet, Marc Desforges, Alain Le Coupanec et Mathieu Pinard. Que cela soit par des discussions théoriques ou de l'aide technique au cours de certaines expériences, leur aide m'a été plus que précieuse.

Merci aussi à tous ceux qui ont rendu pour séjour à l'INRS agréable en parallèle du laboratoire. Je n'aurai pas assez de place ici pour tous les nommer mais de toute façon ils se reconnaitront.

Merci à ma conjointe Valérie d'être un support de tous les instants. Les moments de doute auraient peut-être eu raison de ma motivation si elle n'avait pas été là pour me soutenir. Merci aussi au petit bout de chou qui est venu agrandir la famille à la fin de ce long parcours. Petite Chloé, tes sourires et tes bêtises ont été une distraction plus que bienvenue lors de cette dernière année.

Pour finir, merci à tous les nouveaux amis que nous nous sommes fait avec Valérie au cours de notre aventure québécoise. S'aérer l'esprit en votre compagnie est la manière la plus sûre de pouvoir retravailler de manière efficace lors du retour au laboratoire.

Une page se tourne et j'ai bien hâte de lire la prochaine.

RÉSUMÉ

Les infections virales chroniques sont un problème de santé publique majeur. À elles seules les infections par le VIH et le VHC représentent plus de 250 millions de personnes infectées à travers le monde et continuent de se propager.

Une caractéristique commune de ces infections est, contrairement aux infections aigües, leur tendance à provoquer une apparition tardive des anticorps neutralisants. Afin de comprendre si cette modification affecte seulement la réponse antivirale ou bien agit à une échelle plus large, ces travaux ont pour objectif de caractériser la réponse humorale montée contre le 4-hydroxy-3-nitrophenyl dans le contexte d'une infection par le virus de la choriomeningite lymphocytaire (LCMV), un modèle murin d'infection chronique bien connu.

Nous avons pu démontrer que l'infection par LCMV provoque une profonde perturbation de la réponse humorale en général. Une plus grande quantité d'anticorps totaux est sécrétée alors que la réponse spécifique est à l'opposé dramatiquement diminuée. Cet effet est dépendant des lymphocytes T, apparait dès les premiers jours de l'infection et persiste durant environ 20 jours. Il s'accompagne aussi d'une forte augmentation des lymphocytes T auxiliaires folliculaires (T_{FH}) ainsi que de leurs fonctions de soutien à la survie des lymphocytes B.

En parallèle, nous avons pu démontrer que le blocage spécifique du récepteur majeur de l'interféron de type I (IFN-I) sur les lymphocytes B permettait de retrouver des réponses en anticorps spécifiques et totales similaires à celles obtenues chez les souris infectées par un virus causant une infection aigüe ou non-infectées. Ce traitement a notamment permit d'accélérer l'apparition des anticorps neutralisants, primordiaux pour éviter la propagation du virus dans l'organisme infecté.

Ces résultats suggèrent qu'une modulation du nombre et de la fonction des T_{FH}, ainsi que l'activation des lymphocytes B par l'interféron de type I, pourraient être responsables de la réponse humorale déréglée caractéristique des infections virales persistantes. Ils ouvrent de nouvelles perspectives pour faciliter le développement de traitements et vaccins contre les infections chroniques.

ABSTRACT

Chronic viral infections are a major health issue. Infection with HIV and HCV alone represent more than 250 millions infected people worlwide and keep spreading.

One caracteristic of these infections, as opposed to acute infections, is their tendency to induce a late appearance of neutralizing antibodies. In order to better understand if this modification affects only the antiviral response or acts at a larger scale, this work has for objective to caracterize the humoral response mounted against the 4-hydroxy-3-nitrophenyl in the context of an infection by the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), a well-known model of chronic infection.

We managed to demonstrate that the LCMV infection provokes a deep disruption of the general humoral response. A greater quantity of total antibodies is secreted whereas the specific response is dramatically decreased. This effect is T-dependent, appears in the first days of the infection and persists for around 20 days. It's accompanied by a strong increase in follicular helper T cells (T_{FH}) and their functions of sustain of the B cell survival.

In parallel we showed that upon specific blockade of the major type 1 interferon (IFN-I) receptor on B cells, total and specific antibody responses similar to those obtained in uninfected mice or mice infected with a virus causing an acute infection were retreived. This treatment notably allowed us to accelerate the appearance of neutralizing antibodies, mandatory to avoid the spreading of the virus in the infected organism.

These results suggest that a modulation of the numbers and functions of the T_{FH} and the activation of B cells by IFN-I could be responsible for the disrupted humoral response caracteristic of chronic viral infections. They give news perspectives to facilitate the design of treatments and vaccines against those infections.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS i

RÉSUMÉ iii

ABSTRACT iv

LISTE DES FIGURES ix

LISTE DES ABRÉVIATIONS x

CHAPITRE I - REVUE DE LITTÉRATURE

1. LE PROBLEME DES VIRUS PERSISTANTS HUMAINS 2

1.1. VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE 2

1.2. VIRUS DE L'HEPATITE C 2

2. LES MODELES VIRAUX MURINS 4

3.1. VIRUS DE LA CHORIOMENINGITE LYMPHOCYTAIRE 4

3.1.1. Épidémiologie 4

3.1.2. Phylogénie 5

3.1.3. Structure 5

3.1.4. Cycle de vie du virus 7

3.1.5. Les souches de LCMV 8

3.1.5.1. LCMV Clone 13 9

3.1.5.1. LCMV WE 9

3.1.6. Pathogénèse 10

3.1.7. Réponse immunitaire 11

3.1.7.1. Innée 11

3.1.7.2. Adaptative 12

3.1.8. Pertinence en tant que modèle d'infection chronique 14

3.2. VIRUS DE LA STOMATITE VESICULAIRE 15

3.2.1. Épidémiologie 16

3.2.2. Phylogénie ... 16
3.2.3. Structure ... 16
3.2.4. Cycle de vie du virus ... 17
3.2.5. Pathogénèse et réponse immunitaire ... 18
3. LA REPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE ... 20
3.1. LES LYMPHOCYTES B ... 20
3.1.1. Production et maturation dans la moelle osseuse ... 21
3.1.2. Maturation dans les organes lymphoïdes secondaires ... 22
3.1.2.1. Structure ... 22
3.1.2.2. Dépendance de la réponse aux lymphocytes T ... 23
3.1.2.3. Maturation dans les centres germinatifs ... 25
3.1.3. Types de lymphocytes B ... 27
3.2. LES ANTICORPS ... 28
3.2.1. Structure générale ... 28
3.2.2. Les différentes classes d'anticorps ... 29
3.2.3. Fonctions des anticorps ... 30
3.2.4. L'hypermutation somatique ... 32
3.2.5. La permutation de classe ... 34
3.3. LES LYMPHOCYTES T FOLLICULAIRES AUXILIAIRES ... 35
3.3.1. Différentiation ... 36
3.3.2. Caractérisation ... 38
3.3.3. Rôle des T_{FH} et synapse immunologique ... 39
3.3.4. T_{FH} et infection virale chronique ... 42
3.4. LES INTERFERONS DE TYPE I ... 43
3.4.1. Généralités ... 43
3.4.2. Voies de production ... 43
3.4.3. Récepteur ... 45
3.4.4. IFN et infection virale chronique ... 46

CHAPITRE II - HYPOTHÈSES ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE

4. HYPOTHESES DE TRAVAIL 49

4.1. L'INFECTION PAR LCMV PROVOQUE UN DEREGLEMENT GENERALISE DE LA MATURATION D'AFFINITE DEBOUCHANT SUR UNE FAIBLE PRODUCTION D'ANTICORPS SPECIFIQUES. 49

4.2. LA DESORGANISATION DE L'ARCHITECTURE SPLENIQUE PAR LCMV EST A L'ORIGINE D'UN DEBALANCEMENT DES POPULATIONS DE LB. 49

4.3. LORS DE L'INFECTION PAR LCMV, LES LYMPHOCYTES T_{FH} SONT PERTURBES DANS LEUR DEVELOPPEMENT ET LEURS FONCTIONS DE SOUTIEN A LA SELECTION DES LB. 50

4.4. UNE ACTIVATION TROP IMPORTANTE PAR LE BIAIS DES RECEPTEURS DETECTEURS DE MOTIFS BACTERIENS EST A L'ORIGINE DU DEREGLEMENT HUMORAL PROVOQUE PAR L'INFECTION PAR LCMV. 51

4.5. LA FORTE PRODUCTION D'IFN-I PARTICIPE AU DEREGLEMENT HUMORAL LORS DE L'INFECTION PAR LCMV. 51

5. OBJECTIFS DE RECHERCHE ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE 53

5.1. ÉVALUER L'IMPACT DE L'INFECTION PAR LCMV SUR LA REPONSE HUMORALE EN GENERAL. 53

5.2. ÉTUDIER LES DIFFERENTES POPULATIONS CELLULAIRES IMMUNITAIRES DE LA RATE SUITE A L'INFECTION PAR LCMV. 54

5.3. ÉVALUER L'IMPLICATION DU TLR7 ET DE MOLECULES DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE DANS LE DEREGLEMENT HUMORAL PROVOQUE PAR L'INFECTION PAR LCMV. 55

5.4. ÉVALUER L'IMPLICATION DES IFN-I DANS LE DEREGLEMENT HUMORAL PROVOQUE PAR L'INFECTION PAR LCMV. 56

CHAPITRE III - ARTICLE SCIENTIFIQUE

6. TYPE I INTERFERON IMPAIRS HUMORAL IMMUNE RESPONSES EARLY DURING ESTABLISHMENT OF LCMV INFECTION 59

6.1. RESUME EN FRANÇAIS 60

6.2. ABSTRACT 61

6.3. INTRODUCTION 62

6.4. RESULTS 63
6.5. DISCUSSION 70
6.6. FIGURES 74
6.7. MATERIAL AND METHODS 86
6.8. ACKNOWLEDGMENTS 91
6.9. AUTHOR CONTRIBUTIONS 91
6.10. REFERENCES 91

7. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES 98

7.1. INFLUENCE DE ICOS 98
7.1. INFLUENCE DU TLR7 99

CHAPITRE IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

8. DISCUSSION 101

8.1. L'IMPORTANCE DE LA REPONSE HUMORALE DANS LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS VIRALES CHRONIQUES 101
8.2. IMPACT DE LA CHRONICITE 102
8.3. ROLE DU TLR7 103
8.4. LES T_{FH} LORS DE L'INFECTION CHRONIQUE, AMIS OU ENNEMIS ? 104
8.5. HYPERGAMMAGLOBULINEMIE ET PERTE DE REPONSE SPECIFIQUE : DEUX PHENOMENES LIES ? 106
8.6. LE ROLE DE L'IFN-I DANS L'INFECTION PAR LCMV 107
8.7. MODELE EXPLICATIF 109
8.8. PERSPECTIVES POUR LE TRAITEMENT DES INFECTIONS CHRONIQUES HUMAINES 111
8.9. PERSPECTIVES DE POURSUITE DU PROJET 116

9. CONCLUSION 117

10. RÉFÉRENCES 118

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE DU VIRION DE LCMV 5

FIGURE 2 : GENOME DE LCMV 6

FIGURE 3 : CYCLE DE REPLICATION DE LCMV 7

FIGURE 4 : CINETIQUE D'APPARITION DES DIFFERENTS EFFECTEURS IMMUNITAIRES LORS D'UNE INFECTION PAR LCMV 12

FIGURE 5 : STRUCTURE ET GENOME DU VIRION DE VSV 17

FIGURE 6 : CYCLE DE REPLICATION DE VSV 18

FIGURE 7 : CINETIQUE D'APPARITION DES DIFFERENTS EFFECTEURS IMMUNITAIRES LORS D'UNE INFECTION PAR VSV 19

FIGURE 8 : STRUCTURES DES PRE-RCB ET RCB 22

FIGURE 9 : DEPENDANCE OU INDEPENDANCE AUX LYMPHOCYTES T DE LA REPONSE HUMORALE 24

FIGURE 10 : LA MATURATION D'AFFINITE 25

FIGURE 11 : REPRESENTATION SIMPLIFIEE DE LA STRUCTURE GENERALE D'UN ANTICORPS 28

FIGURE 12 : LES CLASSES D'ANTICORPS PRESENTENT DES DIFFERENCES STRUCTURELLES 29

FIGURE 13 : L'HYPERMUTATION SOMATIQUE 33

FIGURE 14 : MECANISME DE PERMUTATION DE CLASSE PERMETTANT DE PASSER D'UNE CELLULE B EXPRIMANT UNE IGM A UNE CELLULE B EXPRIMANT UNE IGG2 35

FIGURE 15 : LE CYCLE DE VIE D'UN T_{FH} 36

FIGURE 16 : LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE 40

FIGURE 17 : LES VOIES DE SIGNALISATION ET DE PRODUCTION DE L'IFN-I 44

FIGURE 18 : LE RECEPTEUR DE L'IFN-I ET SA VOIE DE SIGNALISATION 45

FIGURE 19 : MODELE EXPERIMENTAL DE VACCINATION AU NP 54

FIGURE 20 : PROTOCOLE DE FABRICATION DES CHIMERES DE MOELLE OSSEUSE IFNAR B KO 57

FIGURE 21 : MODELE EXPLICATIF DE LA MODIFICATION DE LA REPONSE HUMORALE DANS LE CONTEXTE D'UNE INFECTION PAR LCMV 110

FIGURE 22 : PARAMETRES COMMUNS DES REPONSES IMMUNITAIRES PROVOQUEES PAR LCMV, VHC ET VIH ... 112

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aa	Acide aminé
Ac	Anticorps
AcN	Anticorps neutralisant
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
AID	Désaminase de cytidines induite par l'Ag
Arm	Souche Armstrong de LCMV
ARN	Acide Ribonucléique
CDB	Cassure double-brin
Cl13	Souche Clone 13 de LCMV
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSB	Cassure simple-brin
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
DC	Cellule dendritique
DG	Dystroglycan
DZ	Zone sombre des centres germinatifs
ERSI	Élément de réponse sensible à l'interféron
FcR	Récepteur de la fraction constante des immunoglobulines
G	Glycoprotéine de VSV
GL	Ganglion lymphatique
HGG	Hypergammaglobulinémie
HMS	Hypermutation somatique
ICOS	Costimulateur inductible
ICOSL	Ligand du costimulateur inductible
IFN	Interféron
IFNAR	Récepteur de l'interféron de type 1

IFN-I	Interféron de type 1
Ig	Immunoglobuline
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL	Interleukine
ISG	Gène induit par l'interféron
kDa	Kilodalton
LB	Lymphocyte B
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
LT	Lymphocyte T
LZ	Zone claire des centres germinatifs
M	Protéine de la matrice de VSV
MZ	Zone marginale
NHEJ	Jonction d'extrémités non-homologues
NP	4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl ester
OLS	Organe lymphoïde secondaire
PALS	Manchon lymphoïde péri-artériel
PC	Plasmocyte
PDC	Permutation de classe
PD-L1/2	Ligands 1 et 2 de PD-1
Pfu	Unité formant une plage, traduisant la présence d'un virion infectieu
PKR	Protéine kinase R dépendante de l'ADN bicaténaire
PRR	Récepteurs détecteurs de motifs microbiens
qRT-PCR	Rétrotranscription suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RCB	Récepteur des lymphocytes B
RCT	Récepteur des lymphocytes T
RLR	Récepteur de type RIG-I
RNP	Ribonucléoprotéine virale
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience humaine
T_{FH}	Lymphocyte T auxiliaire folliculaire

T_{FR}	Lymphocyte T auxiliaire régulateur
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
UNG	Uracile N-glycosylase
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1. LE PROBLÈME DES VIRUS PERSISTANTS HUMAINS

1.1. Virus de l'immunodéficience humaine

En 2013, 78 millions de personnes à travers le monde avaient été contaminées par le virus de l'immunodéficience humaine (**VIH**) depuis le début de l'épidémie et 38 millions étaient mortes de maladies liées au syndrome de l'immunodéficience acquise (**SIDA**) (ONUSIDA 2014).

Bien qu'on observe une diminution du nombre de nouveaux cas chaque année (2,1 millions en 2013 contre 2,7 millions en 2004 ou 3,4 millions en 2001), la propagation continue de la maladie reste un enjeu majeur de santé publique qui a couté près de 20 milliards de dollars en 2013. Depuis la découverte du virus en 1983 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983, Gallo *et al.*, 1983), d'importants progrès ont été réalisés en termes de compréhension des mécaniques virales et des réponses immunitaires associées. Les médicaments antirétroviraux et leur accessibilité ont aussi énormément progressé.

À ce jour, l'ensemble des moyens développés pour éviter tous les types de transmissions (sexuelle, par contact sanguin, mère-enfant, par partage de seringue) conjugué aux nouveaux traitements ne sont cependant pas suffisants pour enrayer complètement l'épidémie. Ce constat démontre bien l'importance de la tâche que constitue toujours une meilleure compréhension de la pathogénèse du virus afin de trouver un traitement efficace ou un vaccin.

1.2. Virus de l'hépatite C

Dans le courant des années 70 il a été remarqué que des individus étaient affligés d'hépatites n'étant causées ni par le virus de l'hépatite A, ni celui de l'hépatite B. Cette pathologie était alors définie comme étant « non-A, non-B » (Feinstone *et al.*, 1975). Le virus de l'hépatite C (**VHC**), finalement découvert en 1989 (Choo *et al.*, 1989), est depuis connu comme une des causes les plus répandues de maladies du foie.

On estime que 170 millions de personnes sont infectées à travers le monde (Alvarez-Lajonchere *et al.*, 2009), que 3 à 4 millions de personnes de plus sont infectées chaque année et que 350 000 personnes meurent chaque année de maladies reliées à l'hépatite C (Arumugaswami *et*

al., 2008). Parmi les sujets infectés, il est connu qu'environ 80% le sont de manière chronique, 25 à 30% développent une cirrhose après 20-30 ans et plus de 25% sont atteints d'un cancer du foie au bout de quelques années (Seeff, 2002). Quels facteurs déterminent exactement la persistance du virus ou non reste cependant toujours inconnu à ce jour.

VHC est classifié en sept génotypes (1 à 7) avec nombreux sous-types basés sur la phylogénie et l'analyse de séquence des génomes viraux (Messina *et al.*, 2015). Les différents génotypes diffèrent par 30-35% de leur génome et les différents sous-types par moins de 15% (Smith *et al.*, 2014). Selon l'organisation mondiale de la santé, la période d'incubation avant apparition des premiers symptômes cliniques est de 15 à 150 jours, bien que l'infection soit asymptomatique dans 60 à 70 % des cas. Cette absence fréquente de signes cliniques rend la détection précoce de l'infection particulièrement difficile.

Le but des traitements anti-VHC est de se débarrasser du virus en provoquant une réponse antivirale soutenue. Historiquement ils se faisaient à l'aide d'IFN pegylé et de ribavirine mais ces traitement étaient chers, longs et contre-indiqués dans de nombreux cas de figures (dépression, psychose et épilepsie, grossesse, désordres autoimmuns, etc.) (Diedrich, 2006). Depuis 2011 de nouvelles approches thérapeutiques ont été développées avec une efficacité d'environ 90% (Kowdley *et al.*, 2014). Ces agents agissent directement sur le virus, notamment en inhibant sa protease NS3 ou sa polymérase NS5B (Aghemo *et al.*, 2013).

Bien que ces traitements soient très efficaces, ils restent encorre très chers et il n'existe toujours aucun vaccin pour prévenir les nouvelles infections. Il est donc crucial de mieux comprendre la réponse immunitaire développée durant une infection par le VHC dans le but de perfectionner encore approches thérapeutiques et ultimement de développer une prophylaxie.

2. LES MODÈLES VIRAUX MURINS

3.1. Virus de la choriomeningite lymphocytaire

Le virus de la choriomeningite lymphocytaire (**LCMV**) constitue un outil précieux en immunologie et virologie qui a permis des avancées majeures s'appliquant de manière beaucoup plus larges à d'autres infections virales et microbiennes chez l'Homme. Il a entre autre permis de mieux comprendre la tolérance immunologique et la présentation antigénique dans le contexte du soi, la restriction du complexe majeur d'histocompatibilité (**CMH**) lors de la reconnaissance par les lymphocytes T (**LT**), le rôle des LT CD4 et CD8 dans l'élimination virale et l'immunopathologie, l'épuisement des LT ainsi que la mémoire immunologique (Zinkernagel, 2002).

3.1.1. Épidémiologie

L'hôte et le réservoir naturel de LCMV est la souris (*Mus Musculus* et *Mus domesticus*) mais il peut infecter de très nombreuses autres espèces comme les rats, les chiens, les chats, les hamsters, les furets, les chimpanzés, les vaches, les chevaux et les humains (Lehmann-Grube, 1972, Skinner *et al.*, 1979).

La contamination souris-humain se fait la plupart du temps dans le cadre de la recherche en laboratoire ou suite à une cohabitation avec des souris infectées et un contact avec leur urine (Laposova *et al.*, 2013). L'infection chez l'Homme est la plupart du temps asymptomatique chez le sujet immunocompétent. Des symptômes grippaux mineurs peuvent éventuellement se déclarer comme des maux de tête, des douleurs musculaires, des nausées ou de la fièvre.

Dans de rares cas les symptômes peuvent être plus sévères comme lors de la découverte du virus par Charles Armstrong et ses collègues au cours d'une étude d'échantillons dans le cadre d'une épidémie d'encéphalite à St. Louis aux États-Unis en 1933 (Armstrong *et al.*, 1934). Au cours de la même décennie, LCMV a été mis en évidence comme pouvant causer des méningites aseptiques aussi bien chez l'Homme (Rivers *et al.*, 1936) que chez la souris (Traub, 1936).

3.1.2. Phylogénie

LCMV est un membre prototypique de la famille des *Arenaviridae*, dénommée ainsi en raison du fait que ses virus membres contiennent des ribosomes leur donnant une apparence sablonneuse lorsque observés au microscope électronique. Cette famille a été mise en évidence au cours des années 1960 comme partageant une morphologie et des caractéristiques biochimiques communes (Rowe *et al.*, 1970).

Selon la « Liste de Taxonomie des Virus » par le « Comité International sur la Taxonomie des Virus », la famille des *Arenaviridae* compte depuis 1970 un seul genre *Arenavirus* contenant 24 espèces. En fonction de caractères sérologiques, phylogénétiques et géographiques, les arenavirus sont séparés en deux sous-groupes distincts. Comme leur nom l'indique les membres du sous-groupe du « Vieux Monde » sont retrouvés en Europe et en Afrique alors que les membres du « Nouveau Monde » sont retrouvés en Amérique du Nord, Centrale et du Sud (Charrel *et al.*, 2008, Clegg, 2002). Le LCMV appartient au premier sous-groupe.

3.1.3. Structure

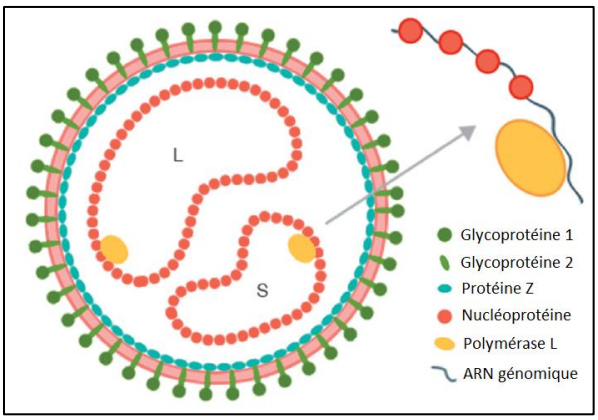


Figure 1 : Structure du virion de LCMV (modifié de Laposova et al. 2013) L'enveloppe du virion de LCMV est constituée de lipides et de glycoprotéines liées à des protéines Z. Le génome est quant à lui composé d'une polymérase virale liée à deux structures circulaires de ribonucléoprotéines.

LCMV est constitué d'un virion sphérique pléomorphique d'un diamètre pouvant aller de 40 à 200 nm (moyenne de 90-110 nm) et dont la surface est couverte de glycoprotéines alignées

avec des protéines Z. La nucléocapside est quant à elle composée d'environ 1530 unités de la nucléoprotéine associée au génome viral (Burns *et al.*, 1991) (figure 1).

C'est un virus enveloppé dont le génome viral consiste en deux segments d'acide ribonucléique (ARN) simple-brin ambisens de tailles inégales : un ARN S court (3,4 kb) et un ARN L long (7,2 kb) (figure 2). Chaque segment d'ARN code pour deux protéines en sens opposés, séparées par une épingle à cheveux intergénique non codante. L'ARN S code pour la précurseur de la glycoprotéine virale (GP-C, 75 kDa) et la nucléoprotéine (NP-LCMV 63 kDa) (Southern *et al.*, 1987). En revanche l'ARN L code pour la polymérase ARN-dépendante (L, 200 kDa) et une protéine à doigt de zinc impliquée dans la structure (Z, 11 kDa) (Singh *et al.*, 1987).

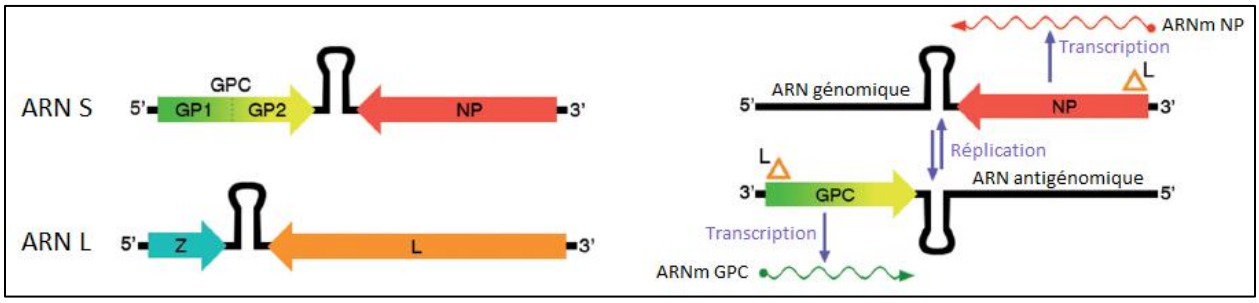


Figure 2 : Génome de LCMV (modifié de Laposova et al. 2013) Le génome à ARN de LCMV est composé d'un segment court de 3,4 kb et d'un segment long de 7,2 kb. Chaque segment code pour deux protéines en sens opposés et séparées par une épingle à cheveux intergénique.

GP-C, une fois transcrit, code pour le peptide signal stable (SSP, 58 aa) ainsi que les deux glycoprotéines virales GP-1 (44 kDa) et GP-2 (35 kDa) (Wright *et al.*, 1990). Un homotétramère transmembranaire de GP-2 surmonté d'un homotétramère de GP-1 forment les spicules présentes à la surface des particules virales (Burns *et al.*, 1991). La protéine SSP des arenavirus joue quant à elle un rôle crucial dans l'adressage de la GP à travers la voie de sécrétion ainsi que dans la formation des particules et la fusion cellulaire (Eichler *et al.*, 2003, Eichler *et al.*, 2004, Saunders *et al.*, 2007, York *et al.*, 2006).

3.1.4. Cycle de vie du virus

Le récepteur principal de LCMV est l'alpha-dystroglycan (**α-DG**), un récepteur pour les protéines de matrice extracellulaire hautement conservé et exprimé à la surface des cellules (Cao *et al.*, 1998). Il est associé de manière non-covalente à la protéine transmembranaire béta-dystroglycan (**β-DG**) (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992), formant un complexe exprimé à différents niveaux dans la plupart des organes (Durbeej *et al.*, 1998).

Suite à l'attachement de la GP à ce récepteur, le virion est internalisé dans des vésicules associées à de la clathrine qui sont transférées vers des endosomes acides. La ribonucléoprotéine virale (**RNP**) est alors libérée vers le cytoplasme via un mécanisme de fusion de membrane dépendant du pH (Borrow *et al.*, 1994).

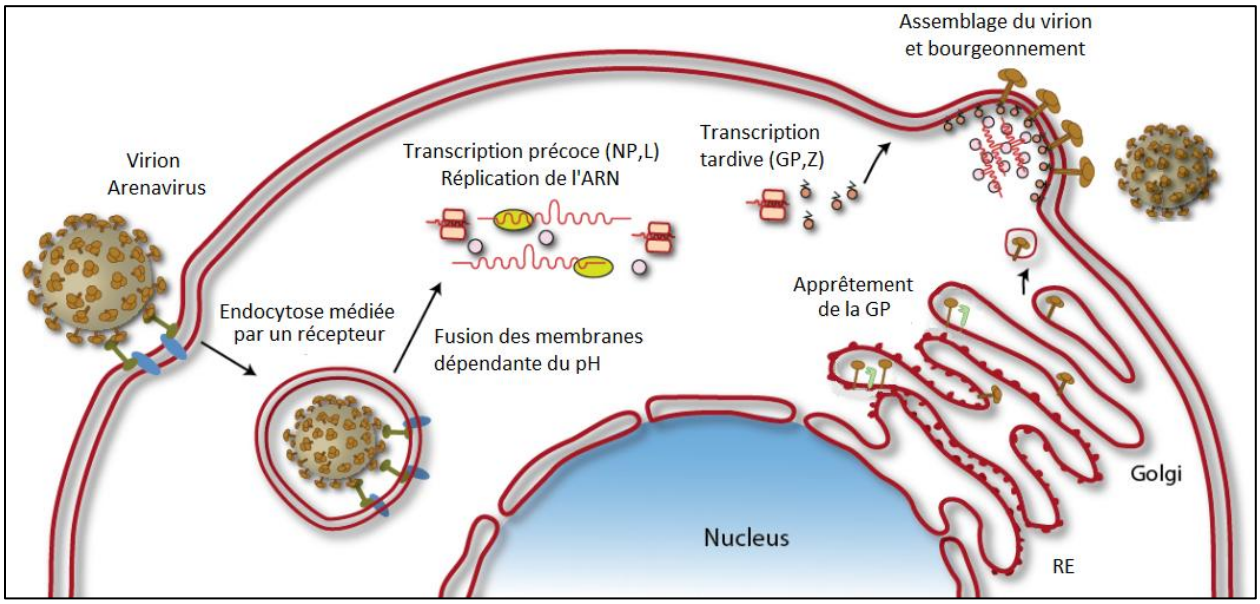


Figure 3 : Cycle de réplication de LCMV (modifié de Burri *et al.* 2012) LCMV présente un cycle de réplication protoype de sa famille de virus. Il s'attache à la cellule cible par son récepteur l'alpha-dystroglycan et y pénètre par endocytose pour y libérer sa nucléocapside virale. Suite à la transcription et traduction de son génome l'assemblage des protéines en nouveaux virus se fait à la membrane, orchestrée par la protéine Z.

Une fois dans le cytoplasme, la RNP sert de matrice pour la transcription et les réplications, orchestrées par la polymérase du virion (figure 3). Les premières transcriptions en ARNm sont

respectivement celles de la NP-LCMV ainsi que de L. La polymérase du virion adopte par la suite un mode réplicase grâce auquel elle passe par-dessus l'épingle à cheveux intergénique pour générer une copie de l'antigénome à l'origine de la synthèse des ARNm de GP-C et Z (Perez *et al.*, 2003).

Suite au clivage de la GP-C, les homotétramères de GP-1 et GP-2 vont s'associer et s'ancrer à la membrane cellulaire grâce au domaine transmembranaire de GP-2 (Burri *et al.*, 2012). La protéine Z joue alors un rôle de protéine de matrice et permet l'assemblage des particules virales contenant la RNP entourée de membrane cellulaire enrichie en GP (Perez *et al.*, 2003, Strecker *et al.*, 2003).

3.1.5. Les souches de LCMV

La souche originale du virus, appelée Armstrong (**Arm**) en l'honneur de son découvreur en 1933, présente un faible taux de réplication. Elle a un tropisme neurologique et peut provoquer des maladies du système nerveux central (Sullivan *et al.*, 2011). Cependant au fil des études *in vivo*, de nombreuses équipes de recherche ont isolé plusieurs nouvelles souches de LCMV à haut niveau d'homologie avec cependant des tropismes tissulaires variés et différents devenirs d'infections.

Les souches et leurs variants peuvent être séparés en deux groupes fonctionnels :

- Le premier groupe, dans lequel se retrouvent les souches Clone 13 (**Cl13**), Traub, WE54 et Docile, démontrent une forte affinité de liaison avec l'α-DG et une dépendance à cette molécule pour l'entrée dans la cellule-cible. Ces virus causent généralement une infection persistante, corrélant avec une habilité à infecter les cellules de la pulpe blanche de la rate (particulièrement les cellules dendritiques (**DC**)) et à provoquer un épuisement des LT menant à une perte de la réponse cellulaire spécifique au virus (Ng *et al.*, 2011, Smelt *et al.*, 2001).
- Le second groupe, comprenant les souches WE, Arm ou E350, démontrent une plus faible liaison ou une absence de liaison avec l'α-DG et une dépendance réduite à cette molécule pour l'entrée dans la cellule-cible. Ces virus se répliquent majoritairement dans la pulpe rouge de la rate et sont généralement rapidement éliminés par le système

immunitaire (Smelt *et al.*, 2001). Le récepteur alternatif utilisé par ces souches pour pénétrer dans les cellules reste à ce jour inconnu.

Afin de garder une continuité avec les travaux déjà effectués par d'autres équipes de recherche et de pouvoir étudier un représentant de chacun des deux groupes, deux souches de virus ont été utilisées dans notre étude.

3.1.5.1. LCMV Clone 13

Clone 13 fait partie du premier groupe décrit à la page précédente. Il a à l'origine été isolé dans des rates de souris infectées avec la souche originelle Armstrong (Sullivan *et al.*, 2011) et présente principalement un tropisme pour les organes lymphoïdes.

Cette souche diffère de sa parente par six nucléotides, trois d'entre-eux modifiant la séquence codante. Une lysine à la place d'une glutamine en position 1079 de la protéine L (polymérase virale) a pour conséquence d'augmenter le titre viral dans les macrophages, mais pas les autres populations cellulaires. La contribution de cette mutation sur la persistance virale reste peu connue. La seconde mutation codante est le remplacement d'une phenylalanine par une leucine en position 260 de la GP1. C'est cette mutation qui cause la forte affinité pour l'α-DG de la souche Cl13, permettant l'infection des DC et rendant plus difficile la réponse antivirale des LT (Smelt *et al.*, 2001). Une troisième mutation en position 176 de la GP1, retrouvée dans plus de 95% des souches persistantes de LCMV, n'a quant à elle pas d'effet sur la persistance du virus (Sullivan *et al.*, 2011).

Pour la suite du document la mention de LCMV sans précision de souche fera maintenant référence à LCMV Cl13.

3.1.5.1. LCMV WE

WE fait partie du second groupe décrit à la page précédente. Elle n'est pas dérivée de la souche originelle Amrstrong mais a plutôt été isolée en 1936 des fluides spinaux d'un autre patient (W.E.) souffrant de méningite.

Elle présente un important tropisme pour le foie et, bien qu'ayant une cinétique de réplication moyenne, est rapidement éliminé chez la plupart des individus infectés (Bocharov *et al.*, 2004). Elle peut cependant dans certains cas mener à une pathologie hépatique.

Elle présente elle aussi une mutation sur la GP-1 en position 153 qui diminue sa dépendance à l'α-DG pour la llaison à ses cellules cibles, ce qui la rend moins persistante que LCMV Cl13.

3.1.6. Pathogénèse

En tant que membre prototypique de la famille des *Arenaviridae*, l'infection par LCMV peut déboucher sur trois issues : l'infection aigüe, l'infection chronique ou la mort. Le virus peut naturellement être transmis de façon horizontale ou verticale. La transmission horizontale par morsure ou aérosol d'urine ou de salive débouche rarement sur une infection chronique chez la souris adulte. À l'inverse, la transmission verticale *in utero* engendre habituellement la persistance virale (Traub, 1939).

En ce qui concerne l'étude en laboratoire les possibilités sont beaucoup plus nombreuses car les paramètres d'injection (souche, dose, voie d'infection, âge des souris) sont très importants dans le devenir de l'infection.

En général une infection avec entre 10^2 et 10^5 virions infectieux (unité formant une plage, ou **pfu**) chez une souris adulte débouche sur une infection systémique de tout les organes (sauf le cerveau). Une expansion très importante des LT CD8 est observée et les anticorps (**Ac**) apparaissent environ 7 jours après infection. Ces derniers n'ont cependant pas la capacité de neutraliser le virus. Le virus est quand même généralement éliminé dans les deux premières semaines (Laposova *et al.*, 2013).

L'utilisation d'une dose plus importante (plus de 10^6 pfu) de virus provoque un épuisement des LT CD8 cytotoxiques (**CTL**) et une perte de la réponse cellulaire antivirale débouchant sur la persistance virale. Une infection à faible dose (10^3 pfu) chez le nouveau-né aura aussi pour conséquence une infection chronique sans symptômes apparents.

Une injection intracérébrale de 1 à 50 pfu chez l'adulte provoquera la mort chez la souris dans les 9 jours suite au développement d'une chorioméningite (Oldstone, 2002, Zinkernagel, 2002).

Une caractéristique majeure de l'infection par LCMV est la destruction de l'architecture splénique folliculaire dès les premiers jours suivant l'infection et se poursuivant pendant une dizaine de jours. Cette destruction se fait par élimination des macrophages et cellules dendritiques de la zone marginale par effet cytotoxique des CTL (Odermatt *et al.*, 1991). L'architecture splénique étant primordiale pour le développement d'une réponse humorale efficace, il est naturel de penser que sa destruction pourrait être une des raisons expliquant l'apparition tardive des anticorps neutralisants (**AcN**) lors d'une infection par LCMV (Louten *et al.*, 2006).

3.1.7. Réponse immunitaire

3.1.7.1. Innée

La première étape pour le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace est la détection du virus ou des cellules infectées. Dans le cas de LCMV, la détection se fait majoritairement par le récepteur de type Toll (**TLR**)-7 (Gilliet *et al.*, 2008) mais peut aussi faire appel à d'autres molécules comme MDA5 ou RIG-I (Y. Wang *et al.*, 2012). Ces récepteurs sont exprimés majoritairement par les DC et les macrophages.

Suite à la détection du virus par ces récepteurs, les cellules vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale α (**TNF-α**), les interleukines (**IL**) 1 et 6 ou encore les interférons de type 1 (**IFN-I**) α et β. Ces derniers sont produits en forte quantité lors des premiers jours suivant l'infection par LCMV (Y. Wang *et al.*, 2012). Ils se lient au récepteur de l'IFN-I (**IFNAR**) et sont importants pour la réponse antivirale. En effet, les souris IFNAR$^{-/-}$ ne parviennent pas à contrôler la multiplication du virus (Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2013).

Le système immunitaire inné comprend aussi d'autres effecteurs qui jouent un rôle dans le contrôle précoce de LCMV. Les Ac naturels peuvent se lier au virus et ralentir sa dissémination dans l'organisme (Hangartner *et al.*, 2006a), ou encore activer le complément et lier le virus pour mener à sa lyse par la voie classique (Welsh Jr, 1977). En parallèle, le complément favorise l'induction de la réponse CTL spécifique au virus (Suresh *et al.*, 2003).

3.1.7.2. Adaptative

La réponse immunitaire antivirale adaptative joue un rôle central dans le devenir de l'infection. Son rôle de contrôle empêche, avec succès ou non, le virus d'établir une infection chronique et ses conséquences pathologiques associées. De manière assez contradictoire, cette réponse peut aussi entrainer des dégâts importants tels qu'une méningite dépendante des LT ou une destruction de l'organisation de la rate chez la souris infectée (Moseman *et al.*, 2013). De nombreux facteurs à la fois viraux et de l'hôte modifient la balance entre réplication virale et réponse immunitaire, rendant complexe l'étude de différentes souches d'un même virus.

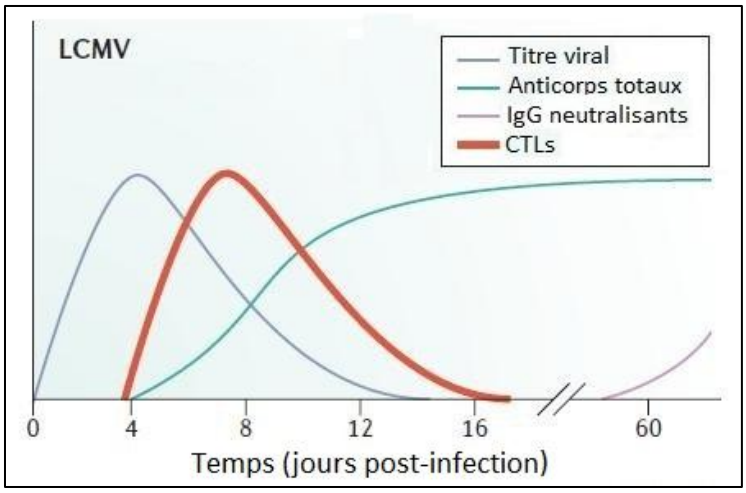


Figure 4 : Cinétique d'apparition des différents effecteurs immunitaires lors d'une infection par LCMV (modifié d'après Hangartner *et al*. 2006) L'infection de souris adultes avec LCMV induit une réponse CTL (en rouge) dans les premiers jours de l'infection à l'origine de la diminution rapide du titre viral sous le seuil de détection (en gris). Les premiers Ac apparaissent avec un délai et les anticorps neutralisants ne se développemt qu'au bout de 50 à 80 jours.

Le mécanisme immunitaire central dans le contrôle de la réplication de LCMV est la réponse CTL spécifique au virus (Virgin, 2007) (figure 4). Ces CTLs apparaissent autour du jour 5 avec un pic d'activité environ une semaine après infection pour diminuer de nouveau dans les 5 à 10 jours suivants (Gallimore *et al.*, 1998). Ce pic d'activité corrèle avec une chute importante de la virémie. Ces effecteurs tuent les cellules infectées à l'aide de perforines et l'IFN gamma joue un rôle important dans la résolution de l'infection (Kagi *et al.*, 1995). Les individus incapables de

monter une réponse cytotoxique efficace (par exemple des souris infectées au stade néo-natal ou encore des souris $CD8^{-/-}$) deviennent infectés chroniquement (Fung-Leung *et al.*, 1991a, Lehmann-Grube *et al.*, 1993).

La réponse cytotoxique optimale est induite quand une charge virale faible voir modérée est présente dans les tissus lymphoïdes d'une souris immunocompétente adulte qui alors éliminera rapidement l'infection (Buchmeier *et al.*, 1980). Cependant une dose d'infection trop grande ou tout simplement certaines souches en elles-mêmes (comme Cl13) vont provoquer une dysfonction généralisée des CTL appelée épuisement (Mueller *et al.*, 2009). Ces CTL vont initialement acquérir des fonctions effectrices normales mais par la suite devenir moins fonctionnels. Ils sont caractérisés par une prolifération plus faible, une diminution de l'expression du récepteur des LT (**RCT**) et une perte de la capacité à sécréter des cytokines antivirales (Zajac *et al.*, 1998). Ils expriment aussi fortement des molécules inhibitrices comme LAG-3 (Richter *et al.*, 2010), TIM-3 (Jin *et al.*, 2010) ou encore PD-1 (Barber *et al.*, 2006). Ce dernier est d'ailleurs maintenant considéré en lui-même comme un marqueur d'épuisement. Toute situation durant laquelle la charge virale critique est dépassée rapidement après infection (pendant l'induction de la réponse CTL spécifique au virus) résulte en un épuisement des CTL antiviraux et fait pencher la balance en faveur de la persistance (Moskophidis *et al.*, 1993).

Sur le long terme (après 6 à 8 semaines), les CTLs ne peuvent agir sans le soutien des LT CD4 et des cellules B productrices d'Ac pour éliminer le virus. Ces autres effecteurs ne sont pas en mesure d'assurer l'élimination du virus par eux-mêmes mais s'ils ne sont pas présents en plus de la réponse CTL alors le virus ré-émerge (Planz *et al.*, 1997). Les Ac spécifiques au virus commencent à apparaitre et sont détectables dans le sérum dès le quatrième jour après infection puis augmentent pour atteindre un plateau entre 10 et 20 jours. L'apparition des AcN spécifiques au virus survient quant à elle entre 50 et 120 jours après infection alors que la virémie est déjà contrôlée (Battegay *et al.*, 1993b). Ils peuvent cependant apparaitre plus tôt dans le cas où la réponse CTL ne serait pas efficace (Battegay *et al.*, 1993a). Ces Ac jouent notamment un rôle dans la diminution des titres viraux et des réponses CTL, réduisant ainsi l'immunopathologie (Wright *et al.*, 1991).

Il est important de noter qu'en parallèle de la réponse spécifique au virus, une activation polyclonale des lymphocytes B a lieu lors de l'infection par LCMV. Cette activation non spécifique est provoquée par un facteur inconnu et débouche sur une hypersécrétion d'immunoglobuline G (**IgG**) appelée hypergammaglobulinémie (**HGG**) qui corrèle avec le titre viral et est dépendante des LT CD4 (Hunziker *et al.*, 2003).

3.1.8. Pertinence en tant que modèle d'infection chronique

Depuis plusieurs années des modèles murins d'infection chroniques sont utilisés en parallèle des études effectuées directement chez les patients. Il existe plusieurs raisons à cela. Tout d'abord l'étude d'un virus directement chez l'Homme est toujours plus fastidieuse que chez la souris pour des raisons de disponibilité d'échantillons à prélever (organes notamment), mais aussi de diversité génétique des patients à étudier, ou encore de rapidité de développement de la maladie et de ses symptômes associés.

Un des modèles murins majeurs pour les infections chroniques est LCMV car il présente de nombreuses similitudes avec les virus persistants humains. Il a aussi l'avantage de la simplicité de son génome et qu'il soit non-cytopathique, permettant l'étude de changements cellulaires, structuraux ou biochimiques sans la complication de la destruction des cellules. Parmi les principaux mécanismes immunologiques découverts chez LCMV, un des plus significatifs est possiblement l'épuisement des LT qui a par la suite été étendu à de nombreuses infections chroniques humaines comme le VHC ou le VIH. Bien que ces virus soient très différents d'un point de vue génétique, de stratégie de réplication ou encore de mécanismes d'infection, ils provoquent chez le sujet infecté des réponses immunitaires similaires.

Un des attraits clé de LCMV d'un point de vue immunologique est sa faculté à induire des développements cliniques différents à partir de souches virales très proches. Dans le cas des souches de LCMV provoquant l'épuisement des CTL, le profil de ces derniers est extrêmement semblable à celui développé par les LT CD8 lors d'une infection par le VIH ou VHC, particulièrement dans leur absence de prolifération et de sécrétion de cytokines suite à une stimulation antigénique (Klenerman *et al.*, 2005, Owusu Sekyere *et al.*, 2015). Ces cellules ont

aussi la particularité d'exprimer de façon très soutenue le marqueur PD-1 dans les trois infections (Barber *et al.*, 2006, Day *et al.*, 2006, Nakamoto *et al.*, 2008, Trautmann *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter que la plupart des infections chroniques provoque une augmentation de la sécrétion d'IFN-I dans les premiers stades d'infection (G. A. Hardy *et al.*, 2013, Y. Wang *et al.*, 2012). De plus aussi bien LCMV, VHC que le VIH provoquent des réponses immunitaires qui sont dépendantes de l'aide des LT CD4 pour le développement et le maintien des effecteurs cellulaires et humoraux (Fahey *et al.*, 2010, Grakoui *et al.*, 2003). Malheureusement ces cellules subissent plusieurs modifications dans leur phénotype lors des infections chroniques. Elles provoquent par exemple une immunosuppression par la sécrétion d'IL-10 (Brockman *et al.*, 2009, Brooks *et al.*, 2006, Paladino *et al.*, 2006). Les LT CD4 perdent aussi rapidement leur capacité à soutenir la réponse CTL en sécrétant l'IL-2 chez LCMV Cl13 et le VIH (Aiuti *et al.*, 2006, Bachmann *et al.*, 2007). Une autre cytokine qu'elles produisent et qui a un effet diminué lors des infections chroniques est l'IL-21 (Elsaesser *et al.*, 2009, Iannello *et al.*, 2010). Cependant, une particularité majeure du VIH est, contrairement à LCMV, sa capacité à infecter et détruire les LT CD4, agissant ainsi directement dans l'immunosuppression (Ho *et al.*, 2000).

Si on se focalise plus particulièrement sur les caractéristiques liées à la réponse humorale, ces trois infections partagent le fait qu'elles provoquent une apparition tardive des AcN antiviraux (Battegay *et al.*, 1993b, Cooper *et al.*, 1999, Gray *et al.*, 2007). Cette réponse spécifique retardée s'accompagne de l'activation polyclonale des LB menant au développement rapide d'une HGG (De Milito *et al.*, 2004, Haas *et al.*, 2011, Hunziker *et al.*, 2003, Kawamoto *et al.*, 1993, Mayo, 2003, Racanelli *et al.*, 2006)). Il est aussi à noter que durant ces infections, les patients ont plus de difficulté à répondre efficacement aux vaccins (influenza, hépatite B) qui leur sont administrés (De Milito *et al.*, 2004, Pallikkuth *et al.*, 2012, Yao *et al.*, 2013).

3.2. Virus de la stomatite vésiculaire

Comme il a été précédemment expliqué, LCMV est un modèle d'infection chronique qui provoque une réponse immunitaire majoritairement cellulaire. Afin de pouvoir effectuer une comparaison, nous avions besoin d'un modèle murin d'infection aigüe. Notre choix s'est porté

sur le virus de la stomatite vésiculaire (**VSV**) car c'est un modèle répandu dont les caractéristiques sont bien connues.

3.2.1. Épidémiologie

Les hôtes primaires de VSV sont les rongeurs, les bovins, les porcs et les chevaux chez qui il provoque une infection aigüe caractérisée par des ulcérations de la cavité buccale et des pattes (Flanagan *et al.*, 2001). Sa transmission entre individus dans la nature se fait par l'intermédiaire d'un vecteur insecte (moustique, mouche des sables ou mouche noire) (Mead *et al.*, 2000).

Il peut aussi infecter l'Homme chez qui l'infection peut être asymptomatique ou aller jusqu'au développement de symptômes grippaux légers. Un unique cas d'encéphalite a été rapporté chez un enfant de trois ans (Roberts *et al.*, 1999). La contamination humaine se fait généralement au sein du laboratoire suite à un contact avec les stocks viraux (Lichty *et al.*, 2004).

3.2.2. Phylogénie

VSV fait partie de la famille des Rhabdoviridae et du genre Vesiculovirus. Les membres de cette famille sont capables d'infecter aussi bien les vertébrés, les invertébrés, que certaines plantes.

Il existe deux souches principales de VSV : Indiana (VSV-Ind) et New Jersey (VSV NJ) (Wagner *et al.*, 1996). Ces souches partagent environ 50% d'homologie dans la séquence de leur glycoprotéine d'enveloppe (**G**).

3.2.3. Structure

VSV est un virus à ARN simple brin à polarité négative qui présente en microscopie électronique une forme caractéristique en balle de fusil de 180 nm de long par 75 nm de large. Les virions sont composés d'une membrane lipidique provenant de la cellule hôte dans laquelle sont insérés environ 400 homotrimères de G. Sous la membrane virale sont assemblées 1800 unités de la protéine de la matrice (**M**) (figure 5) (Lichty *et al.*, 2004).

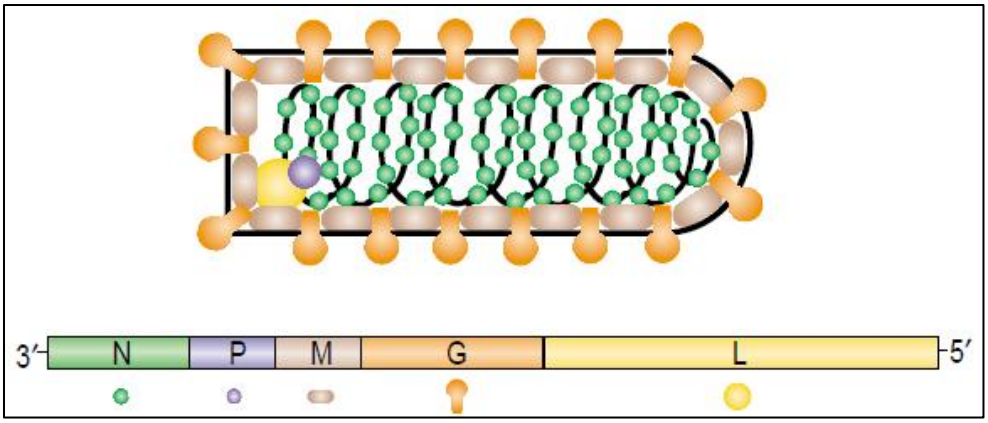


Figure 5 : Structure et génome du virion de VSV (Lichty *et al.* 2004) VSV est composé d'un génome de 11 kb codant pour 5 protéines disctinctes.

Son génome fait 11 kb, est recouvert d'une nucléoprotéine virale et code pour 5 protéines distinctes : la nucléoprotéine (**N**), la phosphoprotéine (**P**), la protéine M, la glycoprotéine (**G**) et la polymérase virale ARN-dépendante (**L**) (Wagner *et al.*, 1996) (figure 5).

3.2.4. Cycle de vie du virus

Le récepteur d'entrée auquel se lie la protéine G de VSV est la phosphatidylsérine, retrouvée chez la plupart des espèces animales et donnant au virus un tropisme cellulaire très large. Après fixation à la cellule-cible le virus pénètre dans la cellule par endocytose. Suite à une diminution progressive du pH endosomal, les membranes endosomales et virales fusionnent, libérant la ribonucléoprotéine viral dans le cytoplasme (Lichty *et al.*, 2004). La transcription graduelle des gènes peut alors se mettre en place. La polymérase s'arrête à chaque région intergénique en attendant la polyadénylation du transcrit et ne repart pas systématiquement, provoquant une transcription différentielle du génome de 3' en 5'. Ceci explique la décroissance en quantité des protéines N vers L (Barr *et al.*, 2002). Plus tard dans l'infection, la polymérase virale adopte une activité réplicase et fabrique le brin d'ARN positif à l'origine de la réplication de l'ARN négatif viral. Pour terminer, la protéine M joue un rôle primordial dans l'assemblage du virus qui bourgeonne de la surface cellulaire, emportant une partie de sa membrane couverte de protéine G (figure 6).

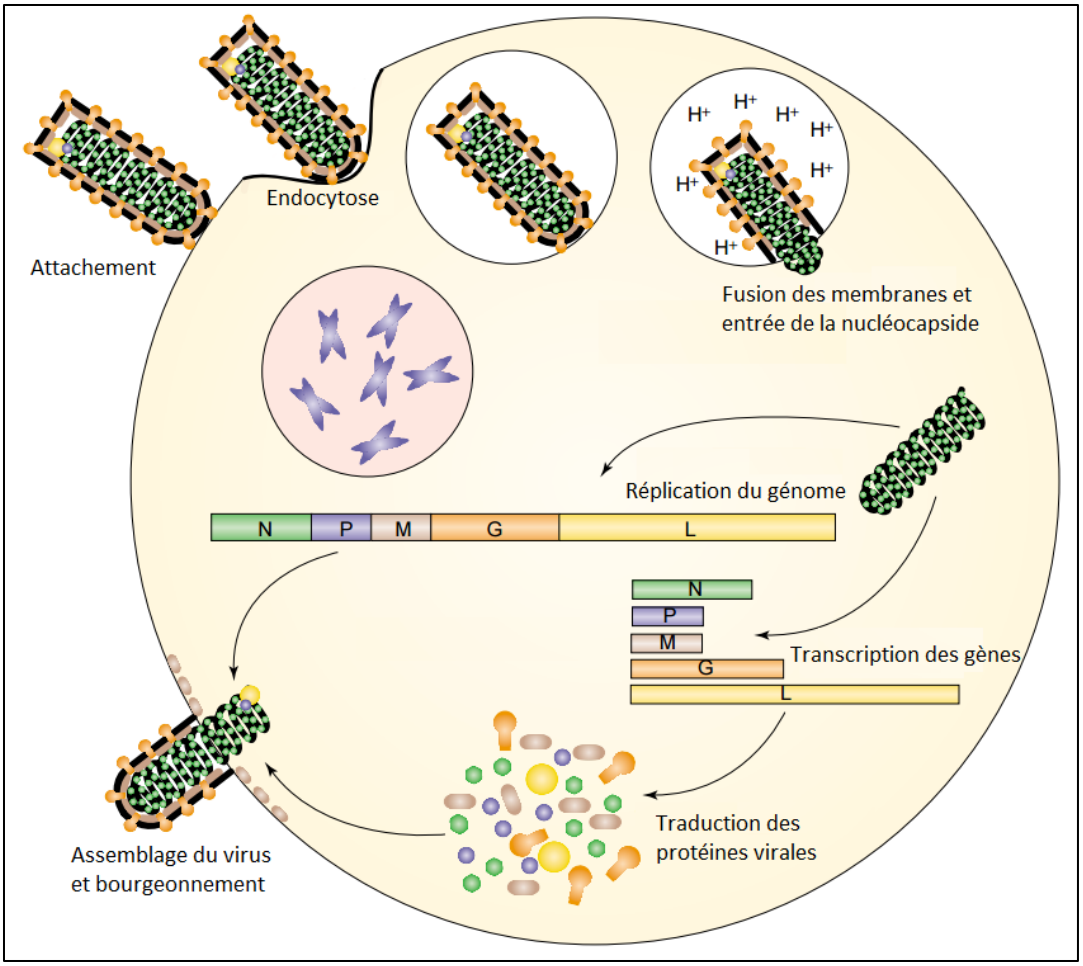


Figure 6 : Cycle de réplication de VSV (d'après Lichty *et al.* 2004) L'attachement des particules virales est médié par la glycoprotéine de VSV et est suivi par l'entrée dans la cellule par la voie endosomale. L'acidification de ces derniers entraine la libération de la nucléocapside pour permettre la réplication virale. L'assemblage de l'ARN et des protéines virales avec des morceau de membrane cellulaire permettent la formation des nouveaux virions.

3.2.5. Pathogénèse et réponse immunitaire

VSV est un virus cytopathique qui se réplique très rapidement chez son hôte mais est tout aussi rapidement éliminé. La pathogénèse du virus est hautement dépendante de la protéine G pour la fixation à la cellule cible et le bourgeonnement pour sortir de cette dernière. En cas de protéine G défectueuse, la réplication virale est diminuée et la pathogénèse atténuée (Schnell *et al.*, 1998, Wertz *et al.*, 1998). Le virus provoque la mort des cellules qu'il infecte par plusieurs mécanismes : la toxicité de ses protéines virales, l'inhibition de la synthèse des facteurs de

l'hôte et l'inhibition de la synthèse et du transport de l'acide désoxyribonucléique (**ADN**) et ARN cellulaire.

Rapidement suite à l'infection par le virus, les cellules infectées vont se mettre à produire de l'IFN-I, avec une hétérogénéité de réponse en fonction des souches de VSV (Marcus *et al.*, 1998). Cette sécrétion est primordiale pour le contrôle de la réplication virale lors des premières heures de l'infection (Steinhauer *et al.*, 1989).

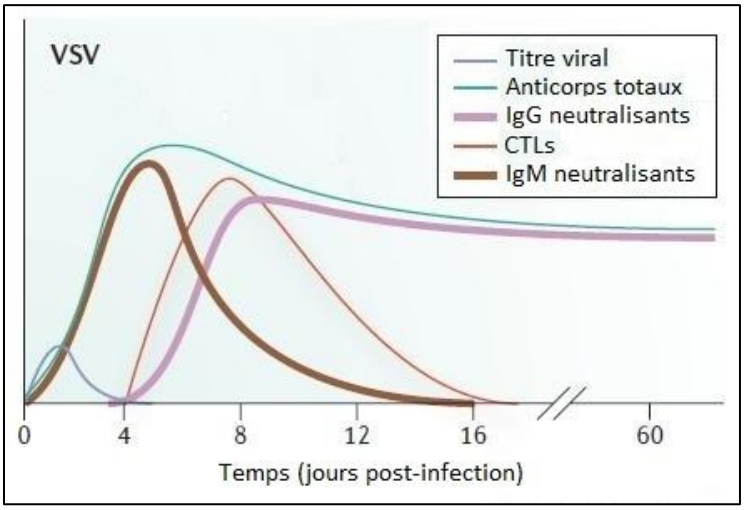


Figure 7 : Cinétique d'apparition des différents effecteurs immunitaires lors d'une infection par VSV (modifié de Hangartner *et al*. 2006) Suite à l'infection le titre viral (en gris) est rapidement contrôlé par une forte réponse en Ac (en bleu) initiallement d'isotype IgM indépendante des lymphocytes T (en brun) puis IgG dépendante des lymphocytes T (en mauve) au bout de 4 à 6 jours. La réponse CTL (en rouge) apparait quant à elle au bout de 4 jours et ne joue aucun rôle dans l'élimination du virus.

Le principal mécanisme mis en place pour le contrôle de l'infection VSV est la production d'AcN (figure 7). Ces derniers apparaissent très rapidement dès les premiers jours de l'infection sous forme d'Ig M (**IgM**) puis par la suite d'IgG. Cette apparition précoce découle du fait que les LB de souris ne nécessitent pas de maturation d'affinité pour être capable de produire les AcN et se passent ainsi de l'aide des LT CD4 (Kalinke *et al.*, 1996). De plus, la neutralisation de VSV est

très efficace car sa structure quasiment cristalline d'homotrimères de G ne présente que des épitopes antigéniques en surface du virus.

La réponse cellulaire joue quant à elle un rôle mineur dans l'élimination du virus et ne se développe qu'au bout de quelques jours, une fois la charge virale contrôlée (Fung-Leung *et al.*, 1991b).

3. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE

Bien que très proche d'un point de vue global, il existe de multiples différences ponctuelles (populations cellulaires, cytokines sécrétées, cinétiques) entre le système immunitaire de la souris et celui de l'Homme. L'auteur est tout à fait conscient de cela et la revue de littérature qui va suivre est, sauf mention contraire, volontairement restreinte au modèle de la souris afin de ne pas trop complexifier le développement.

3.1. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B (**LB**) (pour bursal ou bone-marrow-derived) ont originalement été découverts à la fin des années 50 (R. A. Good *et al.*, 1956), mais il a fallu attendre 1968 pour que leur relation avec la production d'Ac soit mise en évidence (Miller *et al.*, 1968, Mitchell *et al.*, 1968). Bien que cette famille de cellules immunitaires soit homogène d'un point de vue morphologique, elle présente une importante hétérogénéité dans ses sous-populations en ce qui concerne leur développement et les différentes fonctions qu'elles peuvent occuper.

Aussi bien chez l'Homme (Gathings *et al.*, 1977) que chez la souris (Raff *et al.*, 1976), les LB sont d'abord produits dans le foie fœtal avant la naissance, puis dans la moelle osseuse après celle-ci. Ils dérivent de cellules souches hématopoïétiques au travers d'un processus de différentiation complexe qui a lieu dans un environnement idéal pour la maturation et la différentiation. Une succession de contacts cellulaires et d'expression (ou de perte d'expression) de récepteurs spécifiques à leur surface sont la clé de ce processus.

3.1.1. Production et maturation dans la moelle osseuse

Les premiers précurseurs des LB entrent en interaction avec les cellules stromales environnantes dans l'endosteum de la moelle osseuse (Pietrangeli *et al.*, 1988). Cette interaction se fait par l'intermédiaire de la liaison de l'intégrine VLA-4 du précurseur avec le VCAM-1 des cellules stromales (Miyake *et al.*, 1991). En conséquence de cette première interaction, les gènes d'activation de la recombinaison (RAG-1/2) sont activés et déclenchent le réarrangement des gènes codant pour les chaînes lourdes d'Ig (réarrangement D avec J) (Oettinger *et al.*, 1990). Les LB atteignent alors un stade de développement appelé pro-B précoce (Rumfelt *et al.*, 2006).

Suite à ce premier réarrangement ces cellules se mettent à exprimer à leur surface le récepteur de l'IL-7 tout en continuant les réarrangements des gènes d'Ig. Elles deviennent alors des cellules pro-B tardives. Le microenvironnement cellulaire, de son côté, se met à produire des cytokines spécifiques telles que l'IL-7, qui encouragent la survie et la prolifération (Lee *et al.*, 1989). La liaison de l'IL-7 avec son récepteur va provoquer le réarrangement V avec DJ (Milne *et al.*, 2006) et la cellule atteint alors un stade appelé large pré-B un fois sa chaîne lourde complètement constituée. À partir de ce stade de développement, la cellule large pré-B va pour la première fois exprimer à sa surface un pré-récepteur des cellules B (pré-**RCB**) qui remplira temporairement le rôle du futur RCB complet (figure 8).

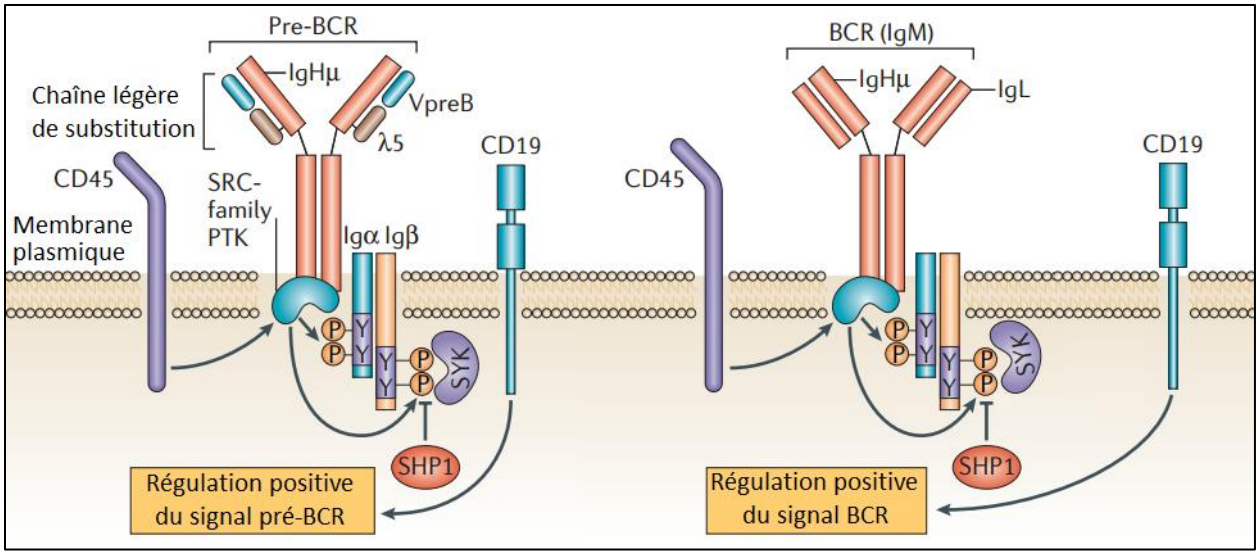


Figure 8 : Structures des pré-RCB et RCB (d'après Monroe *et al.* 2006) Le pré-RCB contient une forme transmembranaire de la chaîne lourde d'Ig associée de manière non-covalente à un hétérodimère de CD79a et b (Igα et Igβ) et une chaîne légère de substitution composée des molécules λ5 et VpreB. Plusieurs protéines associées jouent un rôle dans la transduction du signal du pré-RCB comme : une protéine tyrosine kinase (PTK) de la famille sarc (SRC), une spleen tyrosine kinase (SYK), CD19, CD45 et une protéine tyrosine phosphatase contenant un domaine SH2 (SHP1). Le RCB est considéré complet quand la chaine légère d'Ig a remplacé la chaîne de substitution λ5-VpreB.

La liaison du pré-RCB aux cellules stromales environnantes inhibe d'autres réarrangements géniques suite à l'exclusion allélique et permet la multiplication des futurs LB qui deviennent alors des petites cellules pré-B. Ces cellules vont alors arrêter leur multiplication et engager le réarrangement VJ des gènes de leurs chaînes légères (Schlissel *et al.*, 1989). Les réarrangements productifs permettront l'expression d'un RCB complet d'isotype M à la membrane de la cellule qui devient alors une cellule B à part entière. Ces cellules sont cependant encore considérées immatures car incapables de proliférer sans activation de leur RCB. Elles vont alors migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (**OLS**) pour poursuivre leur maturation.

3.1.2. Maturation dans les organes lymphoïdes secondaires

3.1.2.1. Structure

Il existe deux OLS principaux : les ganglions lymphatiques (**GL**) filtrant la lymphe et la rate filtrant le sang. Cette activité de filtration augmente les probabilités de rencontre entre les

cellules immunitaires et les Ag circulant dans l'organisme. Les OLS possèdent une architecture très précise permettant des interactions cellulaires spécifiques et procurant ainsi un environnement idéal pour l'initiation d'une réponse immunitaire ciblée et efficace.

Les GL sont divisés en trois zones définies par l'expression de certaines chimiokines (Cyster, 2005) :

- La partie la plus interne des GL est la medulla, qui contient aussi bien des LB, des LT, des DC et des macrophages.
- Un sinus sous-capsulaire entoure une zone appelée le cortex et où les LB sont concentrés en follicules contenant aussi des cellules dendritiques folliculaires (**FDC**). Suite à un contact avec un Ag les follicules peuvent développer des structures spécialisées appelés centres germinatifs (**GC**).
- Entre le cortex et la medulla se trouve une zone riche en LT appelée le paracortex qui contient aussi les conduits lymphatiques par lesquels vont arriver les Ag et circuler les cellules immunitaires.

Un peu comme les GL, la rate est composée de trois principaux types de tissus :

- La pulpe rouge, constituée de sinus veineux et de cordons cellulaires contenant de très nombreux types cellulaires (macrophages, érythrocytes, plaquettes, etc.).

- La zone marginale (**MZ**), située entre la pulpe blanche et la pulpe rouge. Elle est très vascularisée et le sang entrant dans la rate passe d'abord par la ZM avant de passer dans la pulpe rouge (Schmidt *et al.*, 1993). Elle contient de nombreux macrophages et DC ainsi que des LB non-circulants (Kumararatne *et al.*, 1981).

- La pulpe blanche, correspondant au tissu lymphoïde, située pour l'essentiel autour d'une artériole centrale constituant ainsi le manchon lymphoïde péri-artériel (**PALS**). Celui-ci comporte des LT principalement localisés autour de l'artériole (zone T) ainsi que des LB organisés en follicules primaires non-stimulés (LB naïfs) ou secondaires stimulés alors appelés GCs comme dans les GL.

3.1.2.2. Dépendance de la réponse aux lymphocytes T

Les LB immatures, aussi appelés « de transition », peuvent répondre en périphérie à certains Ag (comme les lipopolysaccharides de bactéries) de manière indépendante des LT, ce qui élicite une réponse rapide (Coutinho *et al.*, 1975). Cependant ils ont une demi-vie très courte (quelques jours) comparée à celle des LB folliculaires (plusieurs mois) (Carsetti *et al.*, 1995). La plupart migre donc par la circulation (sanguine ou lymphoïde) vers les OLS pour y poursuivre leur maturation.

L'activation des LB se fait suite à un contact entre leur RCB et un Ag qui peut être soit soluble (Pape *et al.*, 2007), soit associé à la membrane d'une cellule présentatrice (Qi *et al.*, 2006). Suite à la stimulation antigénique, le LB peut internaliser l'Ag et le présenter sur CMH de classe II à des LT auxiliaires folliculaires (**T_{FH}**) en bordure des zones B-T. Ce contact T_{FH}-LB pré-GC va délivrer des signaux costimulateurs permettant la prolifération et la différentiation du LB (Lanzavecchia, 1985). Bien que les signaux régissant le devenir des LB soient complexes, ces derniers peuvent essentiellement se différentier suivant deux voies : une voie extra folliculaire indépendante des LT et une voie folliculaire dépendante de LT (figure 9).

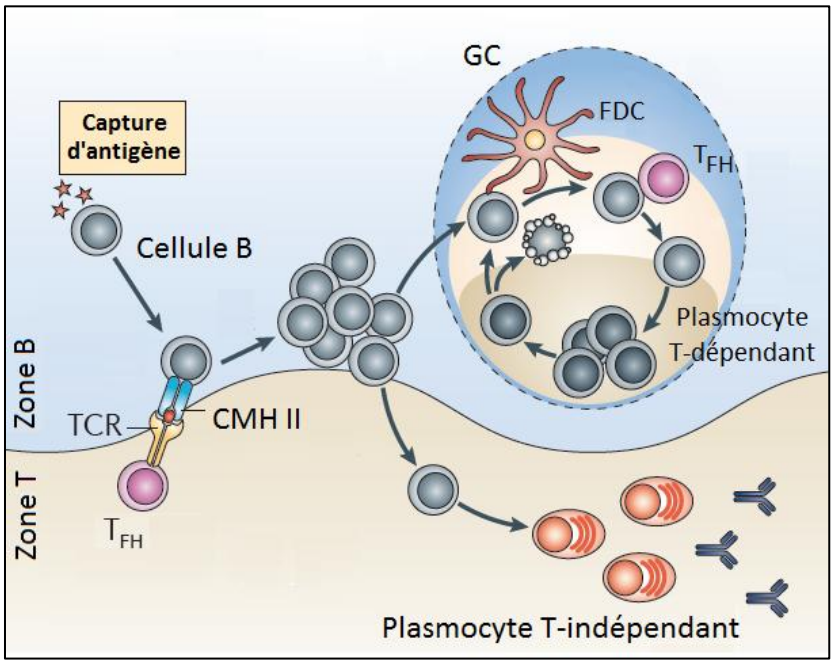


Figure 9 : Dépendance ou indépendance aux lymphocytes T de la réponse humorale (modifié de McHeyzer-Williams *et al*. 2012) En fonction de la capacité de l'Ag présenté à activer les LB directement, ces derniers vont s'engager soit dans une voie rapide de différentiation extrafolliculaire, soit dans un processus plus long à l'intérieur des centres germinatifs.

La voie extra folliculaire permet une différentiation immédiate des LB en plasmocytes à courte durée de vie qui permettront une réponse en Ac rapide mais la plupart du temps de faible affinité. Les LB qui s'engagent dans cette voie sont généralement ceux qui possèdent la meilleure affinité pour l'Ag qu'ils présentent (Paus *et al.*, 2006). Il a aussi été mis en évidence qu'une forme de mémoire précoce se met en place suite à cette réponse extra-folliculaire (Inamine *et al.*, 2005).

La voie folliculaire est un processus plus complexe qui nécessite l'entrée des LB dans les GCs. Elle implique une maturation d'affinité des LB qui débouche sur une production d'Ac de haute affinité et de LB mémoires qui confèrent une protection à long terme. Ce sont généralement les LB avec la plus faible affinité qui s'engagent dans cette voie de différentiation (Paus *et al.*, 2006).

3.1.2.3. Maturation dans les centres germinatifs

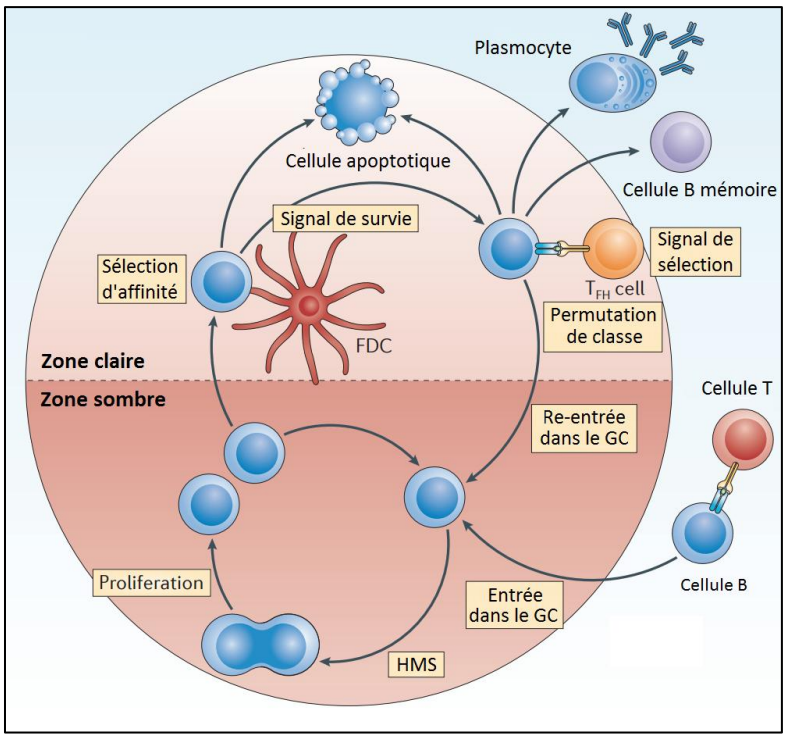


Figure 10 : La maturation d'affinité (modifié de Balthasar *et al.* 2014) La maturation d'affinité est un processus long et complexe qui fait intervenir plusieurs populations cellulaires différentes. Les LB vont alterner entre subir des mutations somatiques et une prolifération clonale dans la zone sombre de la rate et une sélection au contact des FDC et des T_{FH} dans la zone claire.

Les GCs furent décrits pour la première fois en 1884 mais leur rôle en tant que site principal de formation de LB mémoires et de plasmocytes sécrétant des Ac de haute affinité n'a été mis en évidence qu'un siècle plus tard (Jacob *et al.*, 1991b). Suite à la rencontre d'un Ag dans la MZ ou le sinus sous-capsulaire, les LB vont migrer dans les GCs pour y subir un phénomène d'évolution miniature appelé la maturation d'affinité (Batista *et al.*, 2009) (figure 10).

Les LB, une fois pénétrés dans les GCs, vont entrer dans une phase de prolifération intense appelée « expansion clonale » qui va transformer le follicule primaire en « follicule secondaire ». Les GCs vont alors se polariser en une zone claire (**LZ**) et une zone sombre (**DZ**). La LZ est très riche en FDC et T_{FH} et est le site de sélection des LB à proprement parler. La DZ quant à elle est la partie du GC où les LB vont majoritairement proliférer et se différencier (Allen *et al.*, 2007).

Dans la DZ, les LB vont entrer dans un processus d'hypermutation somatique (**HMS**, développé plus en détail dans la partie de la revue de littérature sur les Ac) ayant pour finalité de diversifier le répertoire de réponse des Ac. Une fois ces mutations acquises sur leur génome, les LB migrent vers la LZ pour y subir une sélection positive (Victora *et al.*, 2010). Ils vont alors se mettre à exprimer de manière constitutive de très forts niveaux de Fas, les rendant très susceptibles à la mort cellulaire.

Ils entrent en contact avec des FDC chargés de complexes immuns contenant les Ag d'intérêt qui se lient plus ou moins efficacement à leur RCB en fonction des mutations reçues. Seules les LB ayant réussi une reconnaissance efficace vont pouvoir apprêter les Ag et les présenter à leur tour à des T_{FH} par le biais de leur CMH (Allen *et al.*, 2007). La formation de la synapse immunologique entre le LB et le T_{FH} est à l'origine de la transmission au LB de signaux de survie qui lui permettront de survivre au processus de sélection en contrebalançant les signaux de mort transmis par Fas. C'est donc la compétition pour les contacts avec les T_{FH} des GC qui est le facteur limitant à l'origine de la sélection des LB. Après cette première ronde de sélection, les LB survivants vont retourner dans la DZ pour y subir une nouvelle expansion, une nouvelle HMS et éventuellement une permutation de classe (**PDC**, développée dans la partie sur les Ac).

Après plusieurs cycles de diversification et sélection, les LB pourront quitter le follicule soit en tant que LB mémoire soit en tant que précurseur des plasmocytes (**PC**), générant ainsi une réponse de haute affinité contre l'Ag d'intérêt (Allen *et al.*, 2007). Les cellules mémoires persistent pour de longues périodes et recirculent dans les OLS en plus de coloniser la MZ de la rate (Schittek *et al.*, 1990). Portant déjà les mutations somatiques, elles sont capables de rapidement répondre à un nouveau contact avec l'Ag en sécrétant des Ac de haute affinité (McHeyzer-Williams *et al.*, 1991). La mémoire humorale à long terme est quant à elle assurée par les PC à longue durée de vie qui migrent vers la moelle osseuse et continuent de produire des Ac (Manz *et al.*, 1997).

3.1.3. Types de lymphocytes B

La majorité des LB a pour rôle de produire des Ac lors d'une réponse adaptative et est rassemblée sous la dénomination de LB conventionnels (LB-2). Il existe cependant d'autres sous-types de LB aux fonctions différentes :

- Les LB-1, décrits pour la première fois en 1983, sont une sous-population $CD5^+$ (Hayakawa *et al.*, 1983) distincte des LB-2. Ils sont essentiellement en charge de l'immunité innée par la production d'Ac naturels (R. R. Hardy *et al.*, 2001b). Leur origine reste toujours controversée à l'heure actuelle, notamment à savoir s'ils proviennent des mêmes cellules progénitrices que les LB-2.

- Les LB de la zone marginale (LB ZM) ont quant à eux les attributs de cellules naïves et mémoires (Pillai *et al.*, 2005). Ils constituent une première barrière contre les infections sanguines de bactéries encapsulées et sont responsables du transport des Ag aux FDC. Ils participent au développement des réponses immunitaires précoces aux Ag aussi bien dépendantes qu'indépendantes des LT (Martin *et al.*, 2002).

3.2. Les anticorps

Les Ac, aussi appelés Ig, sont des glycoprotéines de grande taille présentes sous forme soluble dans le sang et les liquides tissulaires ou attachées à la membrane des LB pour constituer leur RCB.

3.2.1. Structure générale

La structure de base de chaque Ig est une unité en Y faite de deux chaînes polypeptidiques légères (25 kDa) et deux chaînes polypeptidiques lourdes (55 kDa) liées par des ponts disulfures et des liaisons non covalentes (Hill *et al.*, 1966) (figure 11). Elles sont repliées en domaines distincts d'environ 110 acides aminés (**aa**) permettant la formation de motifs conformationnels appelés boucles d'Ig. Cette structure caractéristique définit les membre de la superfamille des Ig (A. F. Williams *et al.*, 1988).

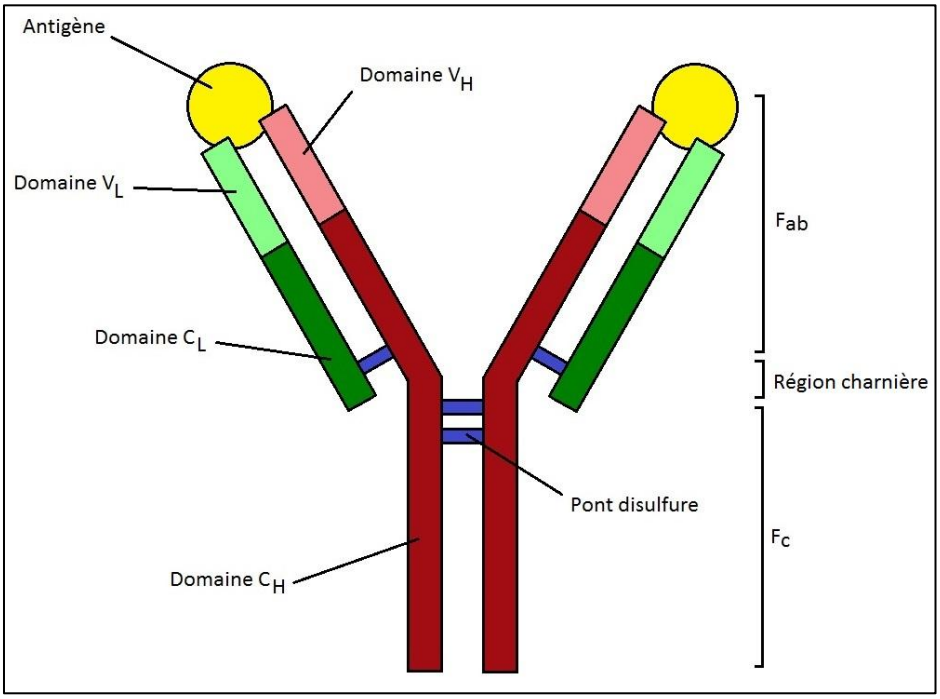


Figure 11 : Représentation simplifiée de la structure générale d'un anticorps Chaque Ac est constitué de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères découpées en un domaine variable et un domaine constant. Les régions Fab et Fc sont définies par une rupture au niveau de la région charnière lors d'une protéolyse. Les chaînes lourdes et légères sont reliées entre elles par des ponts disulfures.

Il existe cinq types de chaînes lourdes (α, γ, μ, δ et ε) qui varient suivant la classe d'Ig, ainsi que deux types de chaînes légères (κ et λ). Que cela soit pour les chaînes lourdes ou les chaînes légères, elles présentent un ou plusieurs domaines carboxy-terminaux constants (respectivement $\mathbf{C_H}$ ou $\mathbf{C_L}$) et un domaine amino-terminal variable unique à chaque protéine ($\mathbf{V_H}$ ou $\mathbf{V_L}$) (Kolar *et al.*, 2003). Les deux domaines V, qui présentent des segments polypeptidiques avec une variabilité exceptionnelle (régions hypervariables), contiennent des sites de liaison antigéniques qui sont en général spécifiques d'un seul type d'Ag (Capra *et al.*, 1975, Wu *et al.*, 1970).

3.2.2. Les différentes classes d'anticorps

Les Ig forment chez l'Homme et la souris une famille comportant cinq classes (aussi appelées isotypes) distinctes définies par leur chaîne lourde : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE (figure 12). Toutes ces classes d'Ac diffèrent par leurs tailles, leurs charges, leurs séquences d'aa, leurs contenus en glucides, leur localisation mais plus important encore : leurs fonctions. Certaines antigènes (**Ag**) induisent la production d'Ac de tous les isotypes alors que d'autres provoquent une réponse limitée à certaines classes ou sous-classes.

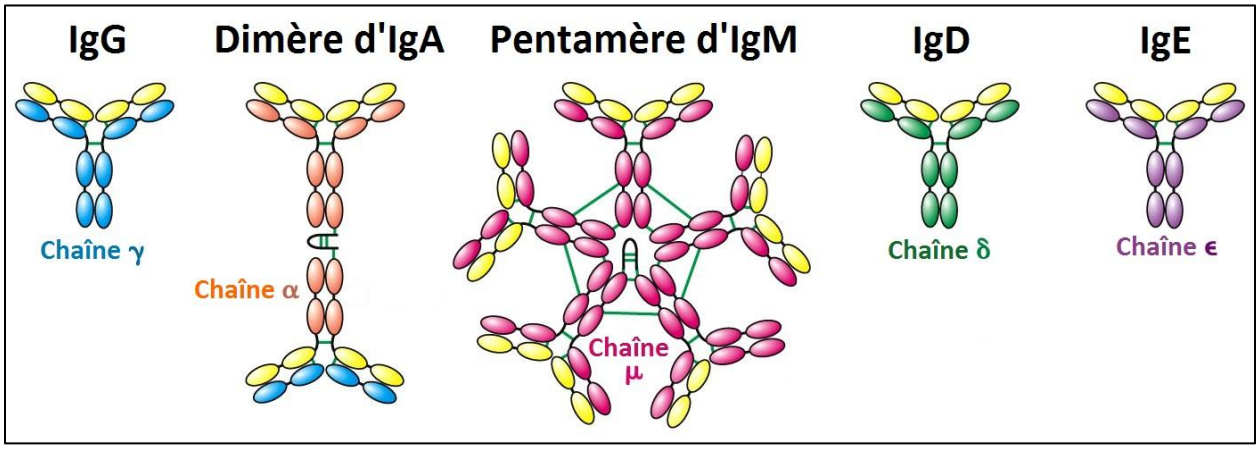


Figure 12 : Les classes d'anticorps présentent des différences structurelles (modifié de Biochemistry, 7th Edition, WH Freeman & Co) En fonction de la classe d'Ac, ces derniers peuvent contenir plusieurs domaines C et former des dimères ou des pentamères.

Les IgG présentent quatre sous-classes (IgG1, 2, 3 ou 4) en fonction de la chaîne γ qui les constituent. C'est l'Ig prédominante dans le sérum normal du fait de sa stabilité. Elle compte pour 70 à 75 % des Ac sériques chez l'Homme (Saji *et al.*, 1994). C'est une molécule monomérique dont le poids moléculaire est de 146-170 kDa. Les quatre sous-classes ont une structure très homologue mais ont des profils de fonctions effectrices uniques, activant plus ou moins efficacement le complément par sa voie classique (Sandlie *et al.*, 1991).

Les IgM, comprenant la chaîne lourde μ, comptent pour environ 10% de la quantité totale des Ig sériques et prédominent lors de la réponse immunitaire primaire. Elles sont pentamériques et d'un poids moléculaire d'environ 970 kDa. Il en existe cependant une forme monomérique transmembranaire qui agit comme un récepteur critique pour la maturation des LB (G. T. Williams *et al.*, 1990).

Les IgA, formées par les chaînes lourdes α1 ou α2, comportent donc elles aussi deux sous-classes : IgA1 ou IgA2. Elles ont un poids moléculaire de 385 kDa. Les IgA1 sont la classe dominante dans les sécrétions séromuqueuses (salive, colostrum, lait, etc.) alors que les IgA2 sont majoritairement sériques et comptent pour 15 à 20 % des Ac totaux (Mestecky *et al.*, 1987). Chez l'Homme plus de 80 % des IgA sont monomériques alors qu'elles sont surtout dimériques chez la plupart des mammifères (Davis *et al.*, 1988).

La chaîne lourde ε permet de former des IgE monomériques d'environ 188 kDa. Leur taux sérique est très faible mais elles peuvent se lier à des récepteurs spécifiques de très haute affinité sur les basophiles et les mastocytes (B. Wang *et al.*, 1992).

Les IgD, comprenant la chaîne lourde δ, comptent pour moins de 1 % des Ig sériques et sont probablement l'isotype le moins connu des Ac. Leur forme transmembranaire monomérique (IgDm) est cependant le récepteur d'Ag spécifique des LB matures (Kolar *et al.*, 2003).

3.2.3. Fonctions des anticorps

Une fois sécrétés par les LB, les Ac sont relâchés dans la circulation sanguine ou lymphatique et peuvent ainsi entrer en contact avec leur Ag à travers tout l'organisme. Les pathogènes ont typiquement de nombreux Ag différents à leur surface. Chaque Ig peut se lier à un épitope

particulier qui correspond à une partie restreinte de l'Ag. Un Ag complet peut contenir plusieurs épitopes différents ou répétés et les Ig se lient à un épitope spécifique et non à l'Ag dans son ensemble (Porter, 1958).

Les Ac sont bifonctionnels car ils doivent exécuter deux tâches en même temps : former des complexes avec les Ag pour éviter leur propagation dans l'organisme ainsi que déclencher des réponses de l'hôte pour faciliter l'élimination de l'Ag. La nature de la région constante détermine la fonction effectrice de l'Ac et les réponses provoquées par la fixation à son récepteur (**FcR**, CD89) (Ravetch *et al.*, 2001). Cette double capacité de liaison à la fois au potentiel pathogène et aux acteurs immunitaires fait des Ig un excellent adaptateur permettant aux différents effecteurs immunitaires de « reconnaitre » les intrus et ainsi faciliter leur activation.

Certaines classes d'Ig, une fois liée à leur Ag, sont des activateurs puissants de la voie classique du complément. C'est le cas des IgM ainsi que des IgG1, IgG2 et igG3 (Sandlie *et al.*, 1991). Les IgA sont caractéristiques d'une réponse immunitaire secondaire et peuvent se fixer à leur Ag pour former des complexes immuns et activer leur phagocytose par l'intermédiaire des FcR, un phénomène appelé cytotoxicité dépendante des cellules et des Ac (ADCC) (Pleass *et al.*, 1999). Ce processus de recouvrement de la surface antigénique est appelé opsonisation. D'autres molécules comme par exemple celles du complément peuvent aussi opsoniser les pathogènes, optimisant ainsi l'efficacité de reconnaissance par les cellules immunitaires. Les Ac liés aux cellules infectées peuvent être reconnus par leur fragment Fc, favorisant ainsi la capture et la lyse des cellules cibles par les cellules NK (Titus *et al.*, 1987). Enfin, toujours par l'intermédiaire d'une fixation à un FcR, les Ac peuvent sensibiliser les cellules en leur permettant de reconnaitre l'Ag de manière indirecte. La cellule est alors activée si l'Ag se lie aux Ac présents à sa surface (Ravetch *et al.*, 2001).

Une stratégie alternative utilisée par les Ac consiste à former des complexes avec les Ag non pas pour activer ou permettre la reconnaissance par les cellules mais bien pour empêcher leur dissémination dans l'organisme (Male *et al.*, 2010). Les Ac effectuant cette action, appelés AcN, sont des Ig de haute affinité pour leur Ag qui sont particulièrement efficaces dans le contrôle de la virémie dans le cas d'infections virales. Cette neutralisation prend effet à plusieurs niveaux

au cours du cycle viral et peut se faire avec des Ac seuls ou couplés à des molécules du complément. Les différentes étapes où les AcN peuvent agir sont : la fixation à la cellule où ils bloquent la liaison récepteur cellulaire-protéine de surface virale par encombrement stérique; l'entrée dans la cellule en stabilisant la capside, en inhibant les protéines de l'enveloppe ou en modifiant les structures virales; et la sortie des vésicules d'endocytose, par interférence avec la fusion ou stabilisation de la capside virale.

3.2.4. L'hypermutation somatique

Suite à la rencontre avec l'Ag, les LB entrent dans les GCs, prolifèrent et l'ADN germinal codant pour les séquences variables des chaînes légères et lourdes d'Ig subit des cycles répétés de mutations. Cette HMS a lieu dans un domaine bien précis d'environ 2 kb situé 150 nucléotides en aval du promoteur et consiste en des substitutions successives dans le génome à une fréquence d'environ 10^{-3} à 10^{-4} par base par génération (Shlomchik *et al.*, 1987).

Bien que toutes les bases puissent être mutées, leur ciblage aléatoire n'est en fait qu'une illusion. En effet certaines séquences consensus du domaine de mutation semblent privilégiées comme une mutation sur le C de AGCT par exemple (Di Noia *et al.*, 2007). Il est aussi intéressant de noter que bien que les mutations aient lieu dans les mêmes proportions sur les paires AT et CG, les mutations sur les paires AT sont plus probables si l'adénosine est située sur le brin codant alors qu'il n'existe pas de telle différence pour les paires CG. Il en résulte ainsi deux fois plus de mutations sur les A que sur les T alors que celles sur les C et G sont similaires (Milstein *et al.*, 1998).

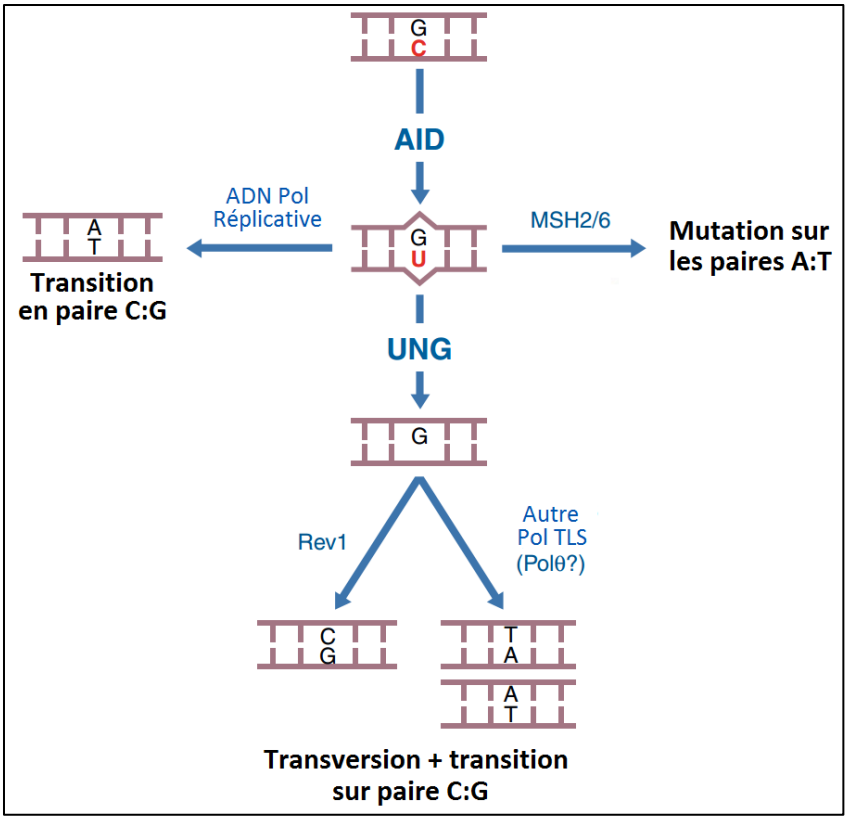


Figure 13 : L'hypermutation somatique (modifié de Di Noia *et al.* 2007) L'HMS peut faire intervenir plusieurs mécanismes différents. C'est la succession de ces mécanismes qui permet une si grande variabilité dans les mutations somatiques des LB.

Plusieurs mécanismes font intervenir différentes enzymes pour procéder aux mutations à l'origine de la variabilité de l'ADN germinal des LB (figure 13). Dans l'ensemble l'HMS se déroule en deux à trois étapes distinctes :

- La désamination d'une cytidine, la transformant en uracile. Cette étape est réalisée par une enzyme appelée la désaminase de cytidines induite par l'Ag (**AID**).
- La nouvelle paire UG peut par la suite être traitée de différentes manières. En cas de simple réplication il en résultera alors une transition de la paire GC en AT (Seki *et al.*, 2005). Une excision de l'U par l'uracile N-glycosylase (**UNG**) suivie de l'action d'autres enzymes normalement utilisées pour la réparation de l'ADN pourra aussi mener à la formation de paires CG ou TA.

- Une reconnaissance du mauvais appariement GU par un hétérodimère MSH2/MSH6 peut aussi mener au déclenchement de nouvelles mutations comme des substitutions sur des paires AT dont le mécanisme exact reste encore flou (T. M. Wilson *et al.*, 2005).

3.2.5. La permutation de classe

Au début de la réponse humorale provoquée par une infection ou une immunisation, les Ig produites sont toutes de l'isotype M. Environ une semaine plus tard cependant, les LB migrant dans les follicules reçoivent des stimuli de cytokines (IL-4, IL-21, IFN-γ, TGF-β) et de molécules costimulatrices (TLR4, CD40) pouvant induire un évènement appelé la PDC (Foy *et al.*, 1996, Hou *et al.*, 2011) (figure 14).

Il s'agit d'une délétion entre les régions S (pour switch), segments de 1-10 kb se trouvant en 5' de tous les gènes codant pour les régions C_H des LB (Dunnick *et al.*, 1993). La recombinaison a lieu entre une cassure double-brin (**CDB**) induite dans la région Sμ donneuse et une autre région S receveuse située de 65 à 160 kb en aval.

Les régions S sont riches en séquence consensus pour l'AID, qui va initier la PDC en transformant des C en U (Muramatsu *et al.*, 2000). Par la suite une action successive de l'UNG pour exciser les U intrus puis d'une AP endonucléase (mécanisme normalement utilisé pour la réparation de l'ADN) va provoquer des cassures simple-brin (**CSB**). Si les CSB sont suffisamment proches sur chaque brin d'ADN, une CDB est alors produite. Les CDB Sμ sont ensuite « réparées » par jonction d'extrémités non-homologues (**NHEJ**) avec une autre région S contenant une CDB (Stavnezer *et al.*, 2008).

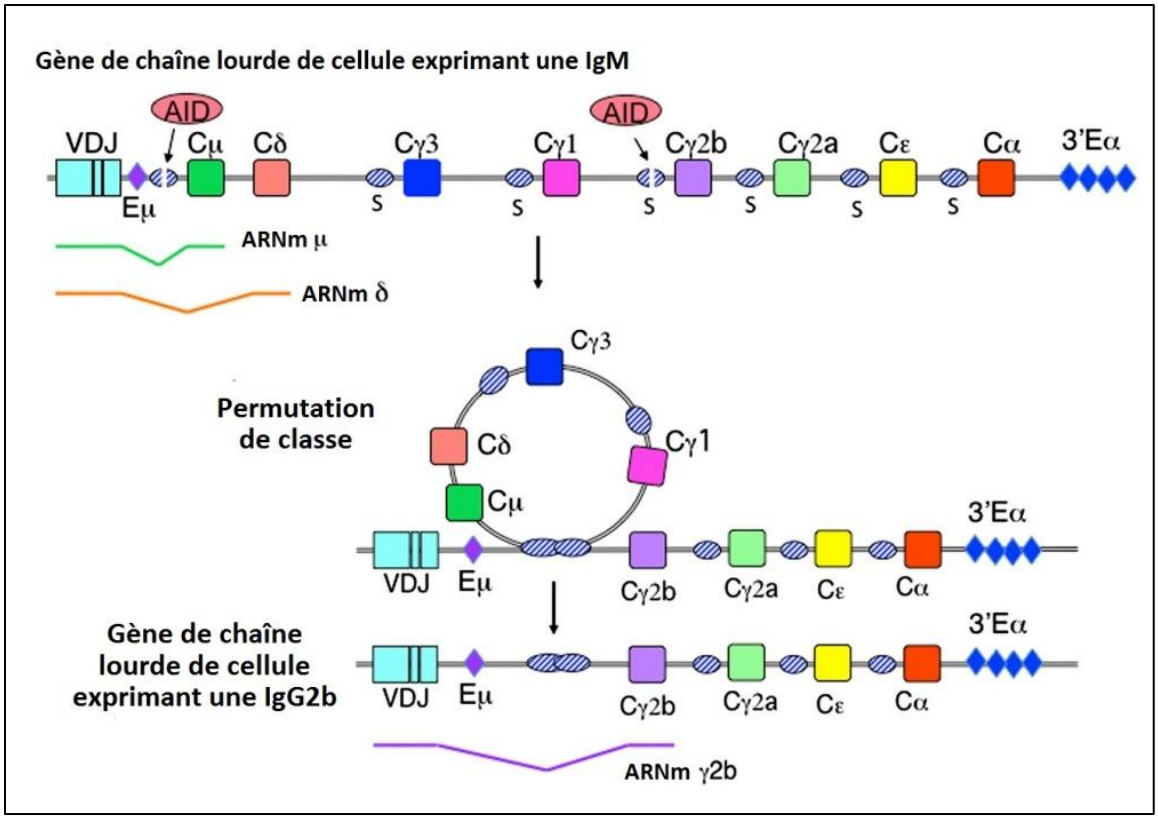


Figure 14 : Mécanisme de permutation de classe permettant de passer d'une cellule B exprimant une IgM à une cellule B exprimant une IgG2 (modifié de Stavnezer *et al.* 2014) Durant l'HMS vers une IgG2, l'AID désamine les régions Sμ et le Sγ2b, initiant ainsi la CDB. Ces deux régions se recombinent par NHEJ, permettant au segment VDJ exprimé d'être maintenant associé à un gène Cγ2b.

Les LB peuvent potentiellement changer leur génome pour n'importe quel isotype. Ce dernier est orienté par induction de la transcription dans la région S d'intérêt car l'AID ne peut agir que sur une région en cours de transcription (Matthews *et al.*, 2014). Le choix est donc finalement orienté par les cytokines présentes dans le milieu et qui vont pouvoir aller activer les promoteurs de transcription situés en amont de chaque région S receveuse.

3.3. Les lymphocytes T folliculaires auxiliaires

Le fait que les LB nécessitent l'aide des LT pour pouvoir correctement se développer et assurer leurs fonctions est un fait connu de longue date (Miller *et al.*, 1968, Mitchell *et al.*, 1968). Il faut

en revanche attendre le début des années 2000 pour que la population de LT spécialisée dans cette aide, les T_{FH}, commence à être définie (Breitfeld *et al.*, 2000). Finalement, il faudra attendre pratiquement encore une décennie et la découverte de leur facteur de transcription canonique Bcl6 pour que les T_{FH} soient considérés comme une lignée de cellules T à part entière (Nurieva *et al.*, 2009).

3.3.1. Différentiation

Il existe plusieurs voies de différentiation des T_{FH} menant à des sous-populations dont les phénotypes peuvent légèrement varier. Cependant dans l'ensemble la différentiation des T_{FH} est un processus complexe en plusieurs étapes dans lequel interviennent une multitude de facteurs extérieurs (figure 15).

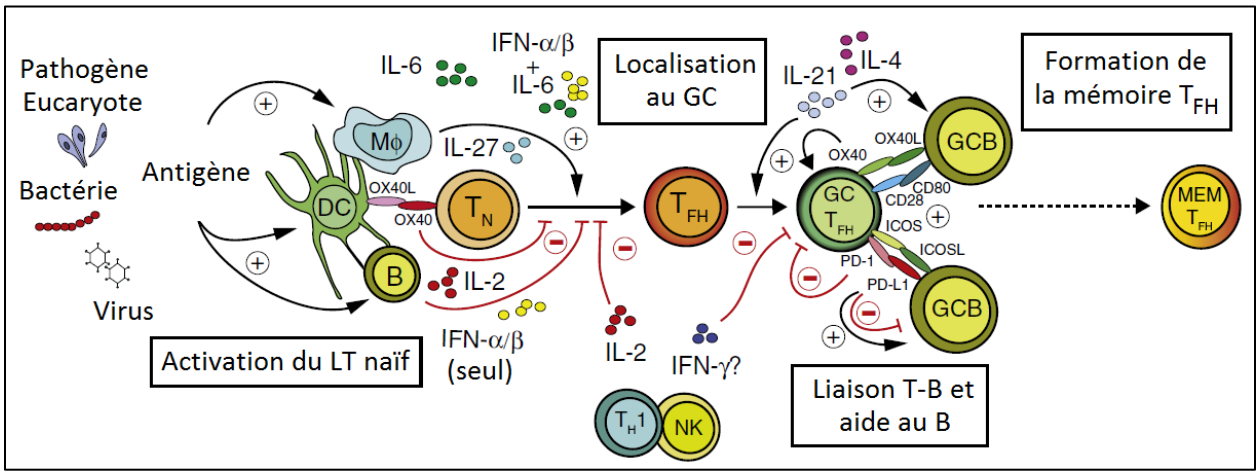


Figure 15 : Le cycle de vie d'un T_{FH} (modifié de Butler *et al.* 2015) La formation des T_{FH} est un processus complexe qui nécessite de recevoir plusieurs signaux de la part de populations immunitaires différentes.

Lors d'une infection ou d'une immunisation, le contact des DC avec un Ag entraine leur maturation et migration vers la zone T des OLS. Elles vont alors sécréter une multitude de cytokines et exprimer à leur surface des molécules costimulatrices ainsi que des complexes peptide-CMH II qui vont se lier au RCT des LT CD4 naïfs (Goenka *et al.*, 2011). Ce sont les différents messages reçus en parallèle de cette activation du RCT qui vont décider de la

différentiation des LT. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les LT naïfs qui présentent les RCT de plus forte affinité ont tendance à adopter un profil de différentiation en pré-T_{FH} de manière préférentielle par rapport aux autres profils effecteurs (Tubo *et al.*, 2013).

Les signalisations positives par l'IL-6 et l'IL-21 sont primordiales pour l'adoption du programme de différentiation en T_{FH}. Bien que présentes dans un environnement idéal, ces cytokines ne semblent pas individuellement obligatoires et l'une peut compenser l'absence de l'autre (Eto *et al.*, 2011). Ces signaux de cytokines sont envoyés en parallèle de signaux de costimulation provenant du costimulateur inductible (**ICOS**) (Choi *et al.*, 2011) et de CD28 (Ferguson *et al.*, 1996). L'ensemble de ces signaux va permettre d'activer STAT3, menant à la transcription du facteur Bcl6 et la perte du facteur Blimp-1 (Choi *et al.*, 2011, Nurieva *et al.*, 2009).

En parallèle de cela, une autre voie de signalisation par l'IL-27 peut aussi favoriser la différentiation en T_{FH} (Batten *et al.*, 2010, Harker *et al.*, 2013). En plus de son action positive sur STAT3 et la sécrétion d'IL-21, l'IL-27 limite l'expression d'IL-2, régulateur négatif des T_{FH} (Ballesteros-Tato *et al.*, 2012).

L'IFN-I peut aussi avoir des effets variables sur la différentiation des LT CD4 naïfs. Il semble que sous certaines conditions il a un effet positif, induisant notamment Bcl6 (Nakayamada *et al.*, 2014); alors que dans d'autres il a tendance à inhiber le développement des T_{FH} (Ray *et al.*, 2014).

Suite à l'expression des facteurs de transcription Bcl6 et Ascl2, les pré-T_{FH} vont exprimer à leur surface le récepteur de chimiokine CXCR5 (Choi *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2014). Ce récepteur va permettre, grâce à sa liaison avec le CXCL13 sécrété par les FDC, de faire migrer les pré-T_{FH} vers la bordure des zones T et B des OLS.

À la frontière entre les zones T et B des follicules, les T_{FH} vont entrer en contact avec des LB présentant des Ag sur leur CMH, formant alors une synapse immunologique (qui sera développée en détail plus tard). La liaison d'ICOS à son récepteur (**ICOSL**) active la PI3K et déclenche la migration des cellules B et T_{FH} ensemble vers les GC (Xu *et al.*, 2013) par perte de l'expression du CCR7 (Haynes *et al.*, 2007), leur permettant de quitter la bordure de la zone T.

Une fois dans les GC, l'activité des T_{FH} est fortement dépendante des interactions engagées avec les LB (Baumjohann *et al.*, 2013). Pour favoriser les contacts, les T_{FH} vont se mettre à exprimer le CXCR4 pour se localiser précisément dans la zone claire des GC. Dans cette zone ils vont entrer en contact avec des LB leur présentant des Ag et potentiellement leur délivrer des signaux de survie par le biais de la synapse immunologique.

L'étude de la formation d'une mémoire T_{FH} est un champ de recherche très actif à l'heure actuelle car peu de choses sont connues à ce sujet. Des T_{FH} mémoires ont été identifiés (Fazilleau *et al.*, 2007, Sage *et al.*, 2014) et il semblerait que, durant une réponse secondaire, ils puissent soit développer une activité Th2 conventionnelle ou encore ré-adopter un profil T_{FH} (Luthje *et al.*, 2012).

Finalement, il est important de noter que bien que les T_{FH} aient un profil d'expression génique bien distinct (Chtanova *et al.*, 2004), la sous-population a une certaine perméabilité et d'autres LT CD4 peuvent évoluer en T_{FH} sous certains conditions. Par exemple, lors d'une infection virale chronique, des Th1 peuvent se transformer en T_{FH} s'ils sont suffisamment stimulés au travers de leur RCT (Fahey *et al.*, 2011). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que des LT polarisés en Th2 *in vitro* peuvent devenir des T_{FH} *in vivo* (Glatman Zaretsky *et al.*, 2009).

3.3.2. Caractérisation

La population des T_{FH} en général peut être caractérisée de différentes manières mais la plus commune est d'utiliser les marqueurs CXCR5, Bcl6 et ICOS, qui sont tous très fortement exprimés chez ces cellules.

Il existe aussi plusieurs sous-populations de T_{FH} caractérisées par différents marqueurs exprimés ou non par les cellules :

- CCR7 : Récepteur originel des LT qui permet leur migration vers la zone T des follicules. Exprimé chez les pré-T_{FH} en bordure de la zone T et perdu lorsqu'ils deviennent T_{FH} et migrent vers les GC.
- CXCR4 : Récepteur de chimiokine réagissant avec le CXCL12 et permettant la mobilité à l'intérieur des GC, fortement exprimé par les T_{FH}.

- EBI2 : Récepteur 2 couplé aux protéines G induit par le virus Epstein-Barr, important pour la localisation dans les GC (Hannedouche *et al.*, 2011).
- PD-1 : Fortement exprimé par les T_{FH} en conséquence des interactions répétées avec les LB. La signalisation par ce récepteur contrebalance la forte stimulation reçue au travers du RCT afin de s'assurer que les T_{FH} ne prolifèrent pas mais se consacrent exclusivement à délivrer leurs signaux costimulateurs.
- D'autres molécules comme SAP, CD40, SLAM, OX40, CD28, CTLA4 et CD84 qui seront développées plus en détail dans la partie sur la synapse immunologique.

Les T_{FH} peuvent aussi être caractérisés par la sécrétion de plusieurs cytokines comme le CXCL13, l'IL-21 (Spolski *et al.*, 2009) ou l'IL-4 (Liang *et al.*, 2012).

3.3.3. Rôle des T_{FH} et synapse immunologique

Le rôle principal des T_{FH} est de soutenir la réponse humorale et de réguler le fonctionnement des GCs. Ils peuvent notamment en réguler la taille (Hams *et al.*, 2011) et l'entrée des LB de haute affinité en leur sein (Schwickert *et al.*, 2011).

Cependant, le rôle majeur des T_{FH} est bien sûr de dispenser aux LB les signaux de survie leur permettant de passer au travers du processus de maturation d'affinité. Comme il a déjà été mentionné dans la partie sur les LB, la régulation de ces signaux est primordiale pour orienter correctement la réponse humorale vers un Ag d'intérêt (Victora *et al.*, 2012). En temps normal, les T_{FH} délivrent les signaux de survie exclusivement aux LB de plus haute affinité car ces derniers sont ceux qui ont le plus endocyté et apprêté d'Ag et sont ainsi ceux qui présentent le plus de peptides antigéniques à leur surface.

Chaque T_{FH} peut interagir avec de multiples LB dans des contacts majoritairement de courte durée (2-5 minutes); cependant, ces derniers peuvent être de bien plus longue durée (30 minutes) si la présentation antigénique par le LB est optimale (Shulman *et al.*, 2014). Ce qui assure ces contacts soutenus avec les LB de haute affinité est une boucle d'auto-activation mettant en œuvre les voies ICOS et CD40. Suite à la signalisation initiale par ICOS-ICOSL, les T_{FH} relâchent du calcium intracellulaire ayant pour conséquence d'augmenter l'expression de CD40L à leur surface. La liaison du CD40 des LB au CD40L des T_{FH} va elle-même stabiliser

l'ICOSL, fermant ainsi la boucle prolongeant la durée du contact. Par la suite, les LB qui ont reçu les contacts les plus longs (et donc le plus d'aide de la part des T_{FH}) sont ceux qui pourront se diviser le plus efficacement une fois de retour dans la DZ (Gitlin *et al.*, 2014).

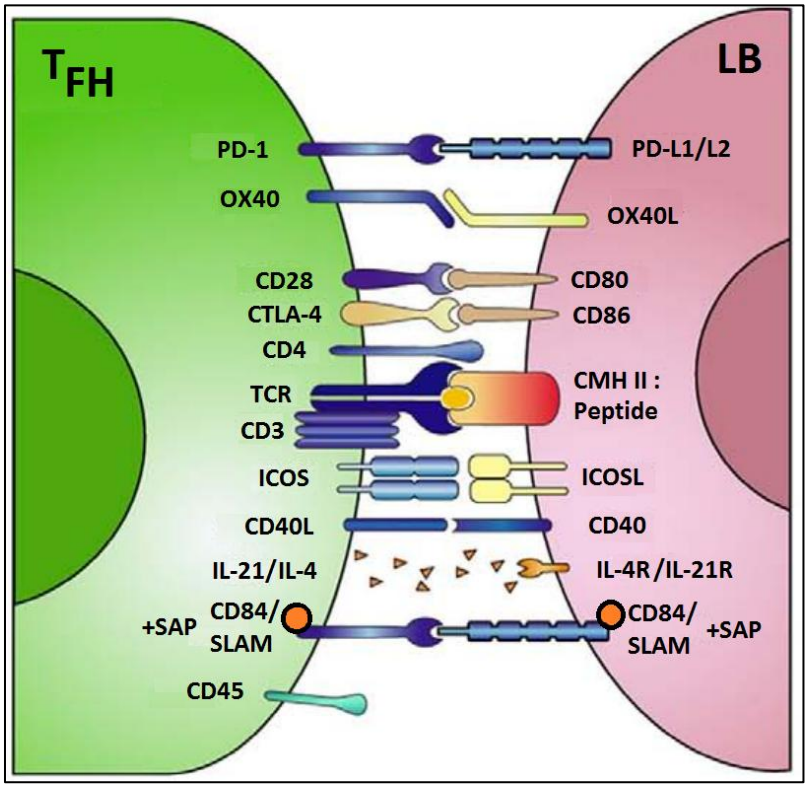


Figure 16 : La synapse immunologique (d'après Chevrier *et al.* 2012) La synapse immunologique est une interaction multifactorielle entre un LB et une cellule T_{FH}. Ce sont les différents signaux échangés entre les deux cellules qui décideront de la survie ou non du LB et le devenir du T_{FH}.

La communication entre T_{FH} et LB est bidirectionnelle et a à la fois une influence sur les LB et sur les T_{FH}. Elle fait entrer en jeu des récepteurs de surface costimulateurs ou corépresseurs ainsi que des facteurs sécrétés, formant une synapse immunologique (figure 16):

- CD40/CD40L : Voie d'interaction T-B primordiale pour la formation des GC (Foy *et al.*, 1994). Elle est importante pour l'activation, la prolifération et la survie des LB. Elle permet aussi d'éviter la différentiation terminale en PC (Randall *et al.*, 1998).

- PD-1/PD-L1-PD-L2 : Voie corépressive permettant la régulation de la prolifération des T_{FH}.
- OX40/OX40L : Important pour la survie des LT activés par l'induction de signaux anti-apoptotiques. La signalisation sur des LB activés a aussi pour conséquence d'augmenter la sécrétion d'Ac par les PC chez l'Homme (Morimoto *et al.*, 2000).
- CD28-CTLA-4/CD80-CD86 : Le rôle de ces voies est encore flou mais des travaux récents démontrent qu'elles sont critiques pour une aide efficace aux LB (Linterman *et al.*, 2014).
- ICOS/ICOSL : Signalisation importante pour la migration des T_{FH} (Xu *et al.*, 2013), le maintien d'un contact de longue durée et la sécrétion de certaines cytokines comme l'IL-21 (Morita *et al.*, 2011).
- CD84-SLAM: Molécules d'adhésion, liées à leur protéine adaptatrice SAP, permettant la formation de liaison T_{FH}-B stables (Schwartzberg *et al.*, 2009).
- Fas/FasL : Transmets des signaux de mort cellulaire aux LB qui, s'ils ne sont pas contrebalancés par des signaux de survie, provoqueront la mort de la cellule B.
- IL-21 : Favorise la prolifération des LB (K. L. Good *et al.*, 2006) et leur différentiation en PC par activation du facteur de transcription Blimp-1 (Ozaki *et al.*, 2004). Favorise aussi la permutation de classe vers l'IgG1 (Ozaki *et al.*, 2002).
- IL-4 : Produit principalement par les GC T_{FH} suite au contact dépendant de SLAM avec les LB dans la LZ (Yusuf *et al.*, 2010). Elle a un effet anti-apoptotique très important principalement en induisant Bcl-XL chez les LB (Wurster *et al.*, 2002). Favorise aussi la prolifération des LB et la permutation de classe vers l'IgG1 et l'IgE (Reinhardt *et al.*, 2009).

A l'inverse du rôle positif exercé lors de la sélection adéquate des LB, un dérèglement de la population T_{FH} ou des signaux délivrés par celle-ci peut entraîner des conséquences dramatiques d'un point de vue immunologique. En effet, il a par exemple été démontré qu'une population de cellules ressemblant aux T_{FH} était présente en grande quantité chez les patients atteints par différentes maladies auto-immunes (Morita *et al.*, 2011, Simpson *et al.*, 2010). Un lien a rapidement été fait avec la production abondante d'auto-Ac caractéristique de ces

maladies, mettant en évidence l'importance d'avoir une signalisation par les T_{FH} qui soit contrôlée et non pas exacerbée de manière anarchique.

3.3.4. T_{FH} et infection virale chronique

De manière générale, les études démontrent que les infections chroniques orientent la différentiation des LT CD4 vers la voie T_{FH} (Fahey *et al.*, 2011) dont la population augmente en conséquence (Cubas *et al.*, 2013, Feng *et al.*, 2012).

Il a été montré il y a quelques années que les patients possédant une population de T_{FH} mémoire importante sont plus susceptibles de produire des AcN contre le VIH (Locci *et al.*, 2013). À l'inverse, une incapacité des T_{FH} à délivrer des signaux d'aide efficaces aux LB a été démontrée lors de l'infection par le VIH (Cubas *et al.*, 2013). De plus, lors d'une étude clinique, les patients incapables de répondre à un projet de vaccin contre le VIH avaient tous en commun une activité T_{FH} altérée (Pallikkuth *et al.*, 2012). Ces deux faits démontrent bien l'importance du rôle des T_{FH} dans le développement de réponses humorales efficaces et de haute affinité.

Lors d'une infection par LCMV Cl13, il a été démontré que les T_{FH} apparaissent dès les premiers jours de l'infection (Choi *et al.*, 2011). Cette population cellulaire est primordiale puisque dans l'éventualité d'une incapacité à produire des T_{FH} il a été démontré que les souris concernées sont incapables de contrôler le virus (Fahey *et al.*, 2011, Harker *et al.*, 2011). Ceci est tout à fait compréhensible dans la mesure où une réponse en Ac efficace contre LCMV nécessite une maturation d'affinité poussée qui ne saurait se produire en l'absence de T_{FH}.

3.4. Les interférons de type I

3.4.1. Généralités

Les IFN-I sont des cytokines appartenant au système immunitaire inné. Ils représentent une des premières lignes de défense contre l'invasion, la multiplication et la dissémination des organismes pathogènes, notamment des virus. Les gènes codant pour les IFN-I sont situés sur le chromosome 9 chez l'Homme (S. Pestka *et al.*, 2004) et le chromosome 4 chez la souris (Chen *et al.*, 2004) et codent pour de nombreux IFN-I: α (qui peut à son tour être sous-divisés en 13 sous-types), β, δ ε, κ, τ et ω; δ et τ n'existant que chez les porcs et les bovins (S. Pestka *et al.*, 2004). Les deux membres principaux, IFN-α et IFN-β, ont une masse moléculaire variable de 18 à 36 kDa chez la souris et présentent une homologie de séquence de 35% (Leroy, 2006).

3.4.2. Voies de production

La production des IFN-I est transcriptionnellement régulée et est fortement stimulée dans la plupart des infections virales (Samuel, 2001) suite à une détection par des récepteurs détecteurs de motifs microbiens (**PRR**).

Parmi ces récepteurs on peut compter les TLR, présents essentiellement sur les cellules présentatrices d'Ag (Moresco *et al.*, 2011) ; ainsi que les récepteurs de type RIG-I (**RLR**), exprimés sur la plupart des cellules (Kato *et al.*, 2006), ou encore la protéine cytoplasmique kinare R dépendante de l'ARN bicaténaire (**PKR**) (Perry *et al.*, 2005). Ces différents récepteurs provoquent une cascade complexe de molécules adaptatrices et de facteurs de transcription débouchant sur une production soutenue d'IFN-I (Pichlmair *et al.*, 2007) (figure 17). Une fois dans le milieu extracellulaire cet IFN-I peut agir de manière autocrine ou paracrine et induire chez la cellule réceptrice un état antiviral global, agissant sur plusieurs étapes du cycle de réplication viral (Sen, 2001).

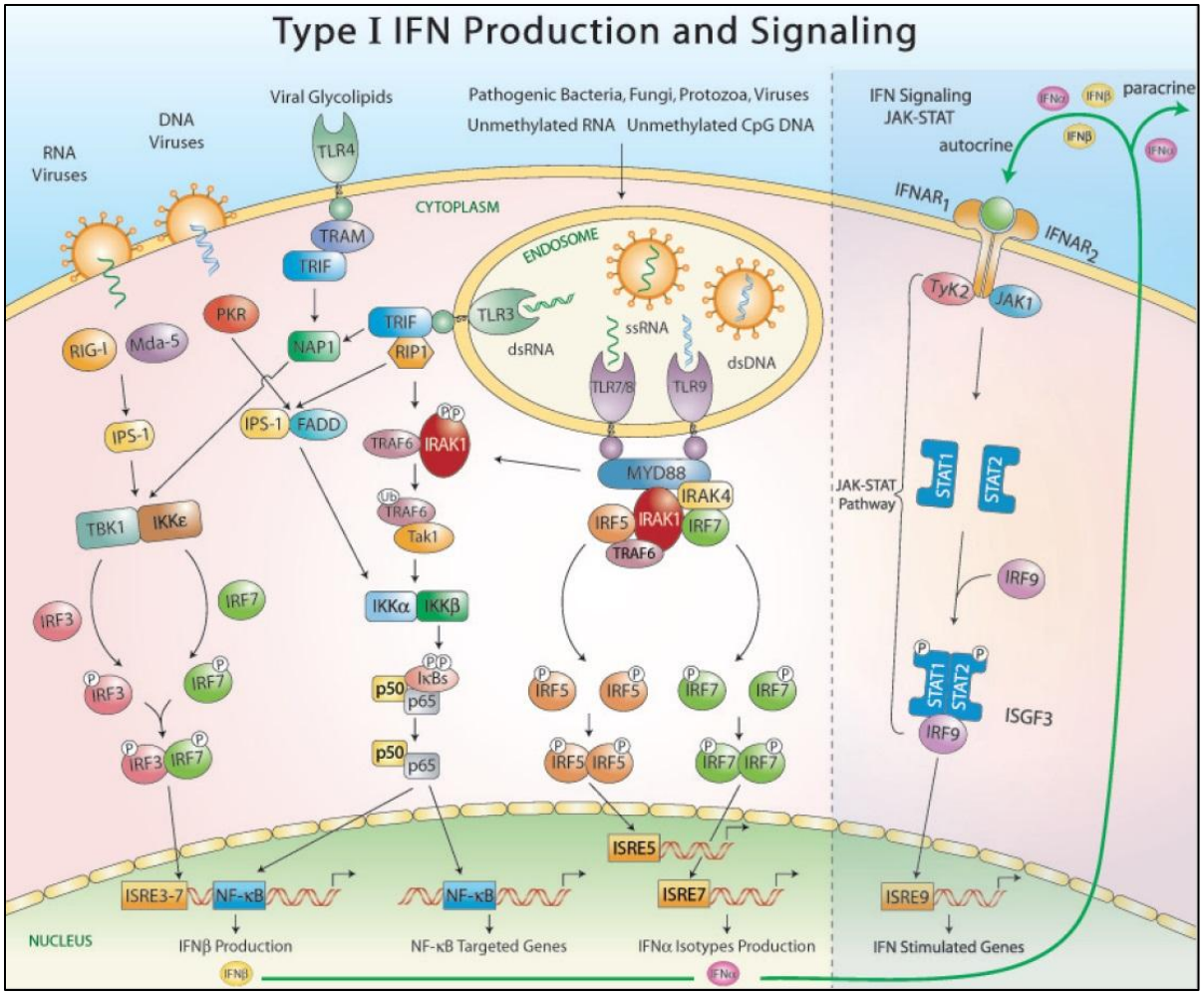


Figure 17 : Les voies de signalisation et de production de l'IFN-I (Invivogen.com, 2005) Trois voies de signalisation majeures peuvent mener à la production des IFN-I. La voie RIG-I est activée suite à la détection intracellulaire d'ARN viraux; la seconde voie implique TRIF suite à une détection par les TLR3 et 4; alors que la troisième voie active l'IRF7 suite à une détection par les TLR7 et 9.

La réponse IFN à une infection est biphasique, avec une première vague de sécrétion essentiellement d'IFN-β mais aussi de certains IFN-α. Cette vague fait intervenir l'IRF-3 et est rapide car ne nécessite pas de synthèse préalable de protéine. Elle constitute un mécanisme de rétroaction positif entrainant une seconde vague impliquant la plupart des IFN-α, plus lente car nécessitant la synthèse de facteurs protéiques comme l'IRF-7 (Honda *et al.*, 2005). Une réponse adéquate nécessite cependant la présence d'un niveau de base d'IRF-7 lors de la première vague, assuré par l'expression constitutive des IFN-I (Sato *et al.*, 2000).

3.4.3. Récepteur

La souris possède un système de signalisation d'IFN-I similaire à celui observé chez l'Homme (M. P. Hardy *et al.*, 2001a, M. P. Hardy *et al.*, 2003). Le récepteur membranaire est présent sur toutes les cellules et est composé d'un hétérodimère de deux sous-unités glycoprotéiques : IFNAR1 et IFNAR2 (figure 18). La coexpression des deux sous-unités est absolument nécessaire pour l'activation des propriétés antivirales des IFN-I (Platanias, 2005).

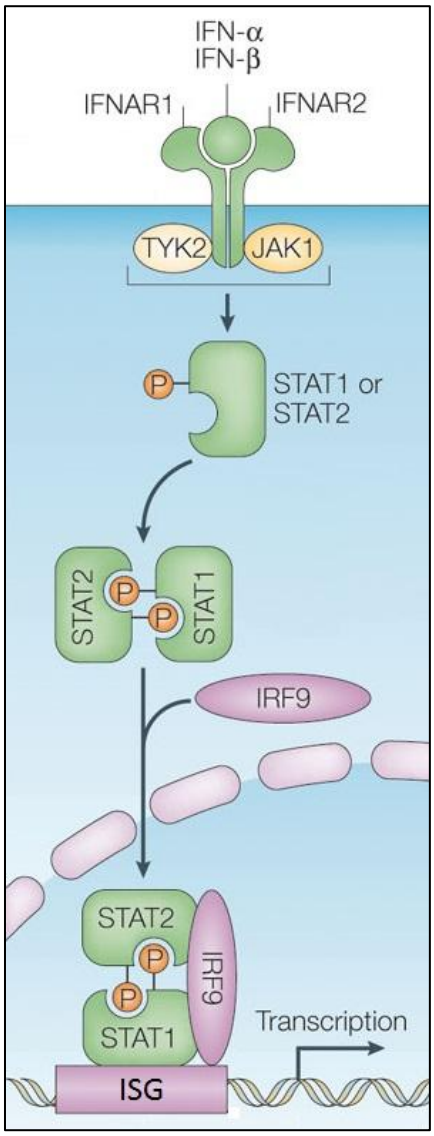


Figure 18 : Le récepteur de l'IFN-I et sa voie de signalisation (adapté de Platanias, 2005) Suite à la liaison des IFN-I à leur récepteur, les kinases JAK1 et TYK2 vont être activées et phosphoryker STAT1 et STAT2. Ces derniers vont former des complexes avec l'IRF9, être transportés au noyau et se lier sur l'ADN à des ISGs.

Les sous-unités comprennent un domaine extracellulaire de liaison à l'IFN, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Lors de la fixation des IFN-I et la dimérisation des deux sous-unités du récepteur, les facteurs Tyk2 et Jak1 auxquels elles sont associées se retrouvent rapprochés et subissent une série de phosphorylations menant à leur activation. Ces protéines adaptatrices vont à leur tour phosphoryler des facteurs cytoplasmiques de la famille STAT, classiquement (mais pas uniquement) STAT1 et STAT2, qui vont s'hétérodimériser et être transportés au noyau avec l'IRF9 sous forme d'un complexe ISGF3. Ce dernier se caractérise par un domaine conservé de fixation à l'ADN ayant une forte affinité pour les éléments de réponse sensibles à l'IFN (**ERSI**) présents dans les promoteurs des gènes induits par l'IFN (**ISG**) (Leroy, 2006). Ils intéragissent avec la machinerie de transcription de ces gènes pour les induire (Schreiber *et al.*, 2015).

3.4.4. IFN et infection virale chronique

Les profils de secrétion des IFN-I varient énormément en fonction des souches de LCMV utilisées. Par exemple lors de l'infection par LCMV Cl13, les IFN-α et β sont produits en très forte quantité dans les premières 24 heures alors que ce n'est pas du tout le cas pour la souche aigüe Arm (Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2013). C'est par le biais des RLRs et IRF3 que LCMV Cl13 induit cette forte production (Sullivan *et al.*, 2015), qui joue d'ailleurs un rôle négatif sur les réponses CD4 et CD8 montées en réponse au virus (Osokine *et al.*, 2014). Ces LT CD8 semblent d'ailleurs démontrer une plus forte expression de STAT4 que de STAT1 durant l'infection par LCMV, ce qui pourrait jouer un rôle dans leur phénotype (Gil *et al.*, 2012). Bien que les IFNα et β soient produits tôt durant l'infection par LCMV Cl13, il semble que cela soit surtout l'IFN-β qui joue un rôle dans la persistance virale, l'IFN-α agissant plus sur la dissémination précoce du virus (Ng *et al.*, 2015).

Cette opposition de rôle entre les deux types d'IFN-I se retrouve aussi dans le cadre d'autres infections chroniques. En effet lors de traitements IFN sur des patients atteints d'hépatite C, seul les traitements à l'IFN-α ont permis de diminuer les ARN viraux (Ng *et al.*, 2016). Dans un autre contexte, un blocage d'IFNAR chez les macaques rhesus infectés par le virus de l'immunodéficience simien (SIV) diminue l'activation des LT mais aussi l'expression de gènes

antiviraux; alors que l'administration d'IFN-α, bien que ralentissant la dissémination précoce du virus, finit par diminuer elle aussi l'expression de ces gènes (Sandler *et al.*, 2014). On constate donc une complexité dans le rôle joué par les IFN-I dans les infections chroniques, la puissance du signal et le moment de l'infection étant probablement d'une importance capitale pour obtenir un effet positif ou négatif.

CHAPITRE 2

HYPOTHÈSES ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE

4. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

4.1. L'infection par LCMV provoque un dérèglement généralisé de la maturation d'affinité débouchant sur une faible production d'anticorps spécifiques.

Il est connu que les infections virales aigües provoquent classiquement une réponse humorale forte et rapide. À l'opposé, les infections virales chroniques sont à l'origine de réponses en Ac inefficaces échouant la plupart du temps à développer des AcN de haute affinité. Dans ce contexte, le rôle de ces AcN lors de l'infection par un virus persistant reste encore mal connu, mais il semble légitime de penser qu'accélérer leur production participerait à un contrôle plus efficace de la charge virale.

Le retard d'apparition des Ac peut être rapidement expliqué par deux phénomènes parallèles :

- Des mécanismes d'échappement viraux développés avec le temps au cours de l'évolution entre l'hôte et le virus (Ciurea *et al.*, 2001, Pinschewer *et al.*, 2004). Ces stratagèmes concernent uniquement les Ac produits contre les épitopes du virus.
- Une modification généralisée du processus de production des Ac directement au niveau de l'organisme hôte, altérant ainsi toute réponse humorale déclenchée lors de l'infection virale chronique.

Dans le présent travail, nous émettons l'hypothèse que LCMV provoque une dérégulation de la maturation d'affinité dans son ensemble, ce qui serait à l'origine de l'incapacité de l'organisme à produire des Ac avec la même cinétique que lors d'une infection virale aigüe.

4.2. La désorganisation de l'architecture splénique par LCMV est à l'origine d'un débalancement des populations de LB.

La rate est un organe dont l'architecture est très ordonnée, permettant aux différentes populations de cellules immunitaires d'entrer facilement en contact entre elles et avec les Ag. Il est cependant bien connu que l'infection par LCMV provoque une désorganisation de cette

architecture très rapidement suivant l'infection. Cet effet commence dès le quatrième jour et la rate commence à retrouver un état normal à partir du douzième jour (Odermatt *et al.*, 1991).

En prenant en compte ce paramètre, nous supposons que la destruction de l'architecture splénique lors de l'infection par LCMV est responsable d'une modification des populations de LB, que cela soit au niveau de leurs phénotypes, de leur localisation ou encore de leur capacité à subir la maturation d'affinité et conséquemment à produire des Ac.

4.3. Lors de l'infection par LCMV, les lymphocytes T_{FH} sont perturbés dans leur développement et leurs fonctions de soutien à la sélection des LB.

Il est maintenant démontré que lors des infections chroniques par le VIH (Cubas *et al.*, 2013), VHC (Feng *et al.*, 2012) ou LCMV (Fahey *et al.*, 2011), la population T_{FH} connait une forte augmentation. Cette population cellulaire est le sujet d'une balance immunitaire très précise, délivrant des signaux de survie de manière ciblée afin d'assurer la sélection adéquate des LB de haute affinité. Une aide perturbée de la part des T_{FH} peut mener à une mauvaise sélection, la survie de LB qui auraient dû mourir et ainsi la production d'Ac de faible affinité (Victora *et al.*, 2010) ou encore d'auto-Ac.

Dans les dernières années, l'implication de certaines molécules de la synapse immunologique comme PD-1 ou ICOS a été mise en évidence dans la régulation des LB dans les GCs (Ko *et al.*, 2012). Cependant, les résultats restent encore controversés dans la mesure où certains semblent y attribuer un rôle positif (Green *et al.*, 2008), alors que d'autres y voient plutôt un rôle négatif (Dyavar Shetty *et al.*, 2012, Good-Jacobson *et al.*, 2010).

Dans le présent travail nous supposons que lors d'une infection par LCMV, une population T_{FH} trop importante et son expression ou sécrétion modifiée des molécules costimulatrices et des cytokines de la synapse immunologique sont à l'origine de la délivrance de signaux de survie inappropriés, menant ainsi au dérèglement humoral observé.

4.4. Une activation trop importante par le biais des récepteurs détecteurs de motifs bactériens est à l'origine du dérèglement humoral provoqué par l'infection par LCMV.

L'activation des cellules immunitaires lors de l'infection par LCMV se fait la plupart du temps suite à la détection du génome viral par le TLR7 (Gilliet *et al.*, 2008), MDA5 ou RIG-I (Y. Wang *et al.*, 2012). Cette détection concerne les DC et les macrophages, qui pourront par la suite présenter les Ag viraux aux autres populations immunitaires; mais aussi directement les LB qui peuvent eux-mêmes servir de cellules présentatrices d'Ag. Or, l'HGG observée lors de l'infection par LCMV a justement été par le passé liée directement à une activation polyclonale des LB (Hunziker *et al.*, 2003).

Le TLR7 est nécessaire pour le développement de LB spécifiques au virus (Walsh *et al.*, 2012), démontrant son implication dans les processus humoraux suite à l'Infection par LCMV. Il est aussi connu que les LB TLR7$^{-/-}$ sont désavantagées dans le processus de sélection dans les GCs (Clingan *et al.*, 2013).

Ainsi, nous émettons l'hypothèse que lors d'une infection par LCMV, une activation exacerbée des LB suite à une détection par les récepteurs liés aux motifs microbiens serait à l'origine d'une trop grande migration des LB dans les GC. Ceci déboucherait sur une sélection inappropriée de ces LB, menant à l'HGG et la perte de la production d'Ac spécifiques.

4.5. La forte production d'IFN-I participe au dérèglement humoral lors de l'infection par LCMV.

En plus de son rôle dans la réponse immunitaire innée, l'influence de l'IFN-I sur la réponse adaptative en général est connue depuis longtemps (Braun *et al.*, 1972). Cependant, son influence sur le développement et la survie des LB n'a été mise en évidence que récemment (Lien *et al.*, 2010, Swanson *et al.*, 2010, J. H. Wang *et al.*, 2010).

En effet la réponse humorale *in vivo* à des Ag solubles a été montrée comme étant augmentée suite à des injections d'IFN-I (Le Bon *et al.*, 2001). Ce dernier favorise notamment l'activation des LB par le RCB et empêche leur mort (Minamino *et al.*, 2012). Il peut aussi agir de façon

indirecte, par exemple en augmentant la sécrétion par les DC de cytokines pro-survie des LB telles que BAFF et APRIL (Litinskiy *et al.*, 2002), en augmentant la population T_{FH} (Osokine *et al.*, 2014), ou encore en favorisant l'expression par les LB de CD86 jusqu'à un niveau ou les signaux costimulateurs des LT CD4 pourront être efficace (J. H. Wang *et al.*, 2011). Son implication dans le dérèglement humorale dans un contexte d'infection virale chronique reste cependant à démontrer.

Dans le présent travail, nous supposons que l'IFN-I pourrait jouer un rôle dans l'activation polyclonale des LB, menant à l'HGG et l'absence de réponse spécifique au virus caractéristique de l'infection par LCMV. Cette hypothèse cadre parfaitement avec le fait que l'IFN-I est requis pour la sécrétion d'auto-Ac (Ronnblom *et al.*, 2009) et participe à la génération de LB et PC auto-réactifs dans le cas de plusieurs maladies ou modèles auto-immuns (Colonna *et al.*, 2004, Jego *et al.*, 2003, J. H. Wang *et al.*, 2011).

5. OBJECTIFS DE RECHERCHE ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE

5.1. Évaluer l'impact de l'infection par LCMV sur la réponse humorale en général.

Cet objectif se base sur l'hypothèse que l'infection par LCMV pourrait non seulement provoquer une modification de la réponse humorale antivirale, mais aussi la production d'Ac spécifiques à n'importe quel Ag exogène présent dans l'organisme pendant l'infection. Afin d'étudier cette possibilité, nous avons utilisé un modèle dans lequel des souris C57BL/6 infectées (par LCMV Cl13 ou WE, VSV, ou laissées non-infectées) sont en parallèle vaccinées avec le 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl ester (**NP**).

Le NP est un haptène provoquant une réponse humorale caractérisée de longue date et n'étant pas immunogénique en lui-même (Han *et al.*, 1995, Jacob *et al.*, 1991a, Jacob *et al.*, 1993). Pour provoquer une réponse immunitaire, il doit donc être couplé à une molécule porteuse plus grosse qui, en fonction de la nature de ses épitopes, pourra donc provoquer des réponses de nature différentes (Boak *et al.*, 1971, Britton *et al.*, 1971, Mitchison, 1971a, Mitchison, 1971b, Mitchison, 1971c).

Dans notre modèle nous avons choisi trois molécules porteuses :

- La gammaglobuline de poulet (**CGG**), Ag internalisé et présenté au LT. Elle permet ainsi de provoquer une réponse dépendante des LT majoritairement de classe IgG1 (Jack *et al.*, 1977).
- Le FICOLL, composant de la paroi bactérienne au motif osidique fortement répété et déclenchant une réponse indépendante des LT majoritairement de classe IgG3 (Jack *et al.*, 1977).
- L'albumine sérique bovine (**BSA**), employée uniquement pour l'adsorption lors des tests ELISA afin d'éviter la détection des Ac spécifiques aux molécules porteuses utilisées pour la vaccination.

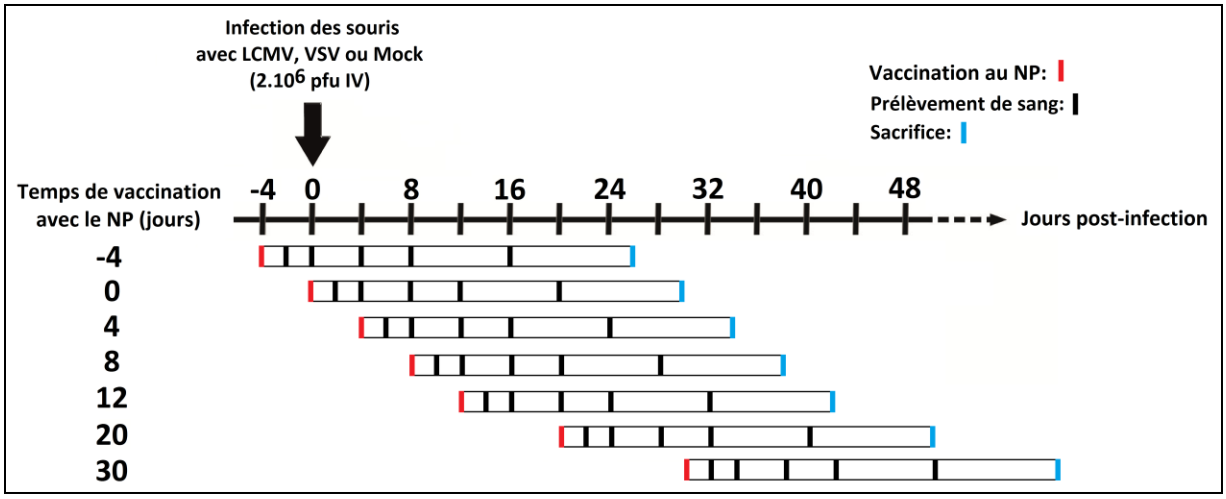


Figure 19 : Modèle expérimental de vaccination au NP

Comme il est résumé dans la figure 19, les souris ont été vaccinées suivant des délais variables après l'infection virale (de -4 à +30 jours) en fonction de l'expérience afin d'évaluer l'impact des différentes étapes de l'infection sur la réponse. Suite à la vaccination, les réponses humorales totale et spécifique au NP ont été mesurées.

5.2. Étudier les différentes populations cellulaires immunitaires de la rate suite à l'infection par LCMV.

Afin d'étudier ces différentes populations, des souris C57BL/6 infectées et vaccinées dans les même conditions que dans le premier objectif ont été sacrifiées et leurs rates prélevées au milieu de la fenêtre de destruction de l'architecture splénique (8 jours après infection).

Suite à cela plusieurs techniques ont été utilisées :

- Des marquages en immunohistochimie pour étudier l'état de l'architecture et la répartition des principales populations cellulaires immunitaires dans la rate.
- Des marquages de cytométrie en flux (**FACS**) afin de mesurer différentes populations cellulaires spléniques.
- Des stimulations *ex vivo* des LB afin de mesurer leur potentiel sécrétoire d'Ac.

- Des ELISPOT pour quantifier les LB en fonction de leur capacité à sécréter des Ac.
- Des ELISA, des marquages de FACS et des rétrotranscriptions suivies de polymérisations en chaîne quantitatives (**qRT-PCR**) pour mesurer la transcription, l'expression et la sécrétion de molécules impliquées dans la synapse immunologique entre LB et T_{FH}.

5.3. Évaluer l'implication du TLR7 et de molécules de la synapse immunologique dans le dérèglement humoral provoqué par l'infection par LCMV.

Pour réaliser cet objectif deux approches furent adoptées :

- Pour le TLR7, des souris incompétentes pour son expression ($TLR7^{-/-}$) ont été utilisées.
- Pour les molécules de la synapse immunologique, leur expression de surface a été annulée chez des souris C57BL/6 par l'administration d'un traitement bloquant tout au long de l'expérience. Les molécules bloquées ont été PD-1 ainsi que ses ligands PD-L1 et PD-L2 ou encore ICOS et son ligand ICOSL.

Le même protocole d'infection, vaccination et prélèvement de sang que dans le premier objectif a en parallèle été réalisé afin de mesurer la production des Ac totaux ainsi que des Ac spécifiques au NP chez les souris n'exprimant par les molécules étudiées.

5.4. Évaluer l'implication des IFN-I dans le dérèglement humoral provoqué par l'infection par LCMV.

L'approche ici était de voir si en l'absence de signal IFN-I la réponse humorale était toujours déréglée suite à l'infection par LCMV Cl13. Il a été démontré par le passé que les souris IFNAR$^{-/-}$ présentent une réduction de l'activation des LB (Kelly-Scumpia *et al.*, 2011), une réponse humorale réduite suite à différents types de challenges (Le Bon *et al.*, 2001) et une production d'Ac spécifiques plus importante en réponse à un vecteur adénovirus recombinant (Hensley *et al.*, 2007).

Il est cependant important de noter que malgré cela, les souris IFNAR$^{-/-}$ infectées par LCMV Cl13 sont incapables de contrôler l'infection (Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2013). C'est d'ailleurs à ce niveau que le modèle se retrouve confronté à certaines limites. Les LT CD8 étant primordiaux dans l'élimination de LCMV et l'IFN-I jouant lui-même un rôle prépondérant dans la formation des CTL (Huang *et al.*, 2007), une incapacité permanente et généralisée à recevoir un signal IFN-I rend plus difficile l'étude précise des mécanismes immunitaire antiviraux. Nous avons donc décidé d'utiliser deux approches pour notre objectif.

La première avenue que nous avons empruntée était un blocage du signal IFNAR par traitement avec un Ac bloquant. Cette technique avait déjà été utilisée par le passé, démontrant tout son potentiel dans le cas d'une infection par LCMV car le virus avait alors été éliminé plus rapidement. Certaines questions restaient cependant en suspend dans la mesure où aucun changement dans la production d'Ac ou le phénotype des LT CD8 n'avait été noté (Teijaro *et al.*, 2013). Cette approche avait l'avantage d'être rapide mais présentait une nouvelle fois le défaut d'agir sur l'ensemble des populations cellulaires de l'organisme infecté, incluant les CTL pour lesquels l'IFN-I est primordial.

La seconde approche nous permettait d'agir de manière plus ciblée. Nous avons développé un modèle de souris chimères dans lequel l'expression d'IFNAR était supprimée uniquement sur les LB (figure 20).

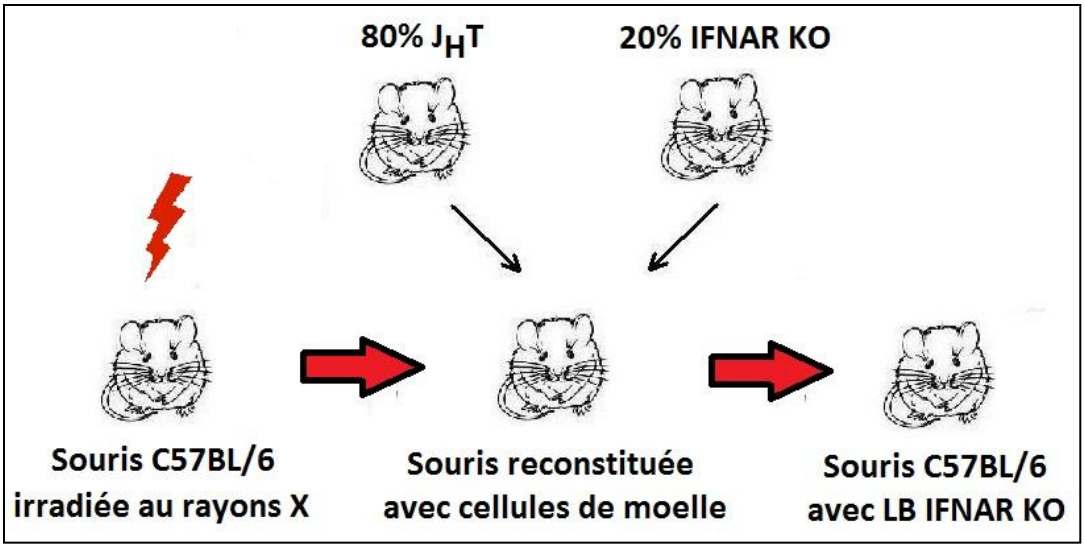


Figure 20 : Protocole de fabrication des chimères de moelle osseuse IFNAR B KO

Pour cela, des souris C57BL/6 ont dans un premier temps été irradiées au rayons X afin de détruire leurs cellules de moelle osseuse, incluant les progéniteurs immunitaires. Par la suite, ces souris ont été reconstituées par une injection mélangeant 80% de cellules de souris J_HT (souris incapable de réarranger leurs gènes d'Ig et ne comprenant donc aucun LB) et 20% de cellules de souris IFNAR$^{-/-}$. Nous avons donc ainsi pu « fabriquer » des souris dont seulement les LB étaient à 100% IFNAR$^{-/-}$ (les autres populations cellulaires étant à 80% sauvage et 20% IFNAR$^{-/-}$). Cette approche présentait l'avantage d'être beaucoup plus ciblée au niveau du mécanisme mais avec le défaut d'être beaucoup plus longue à développer.

Les souris utilisées dans ces deux approches ont été infectées et vaccinées puis leurs cellules et sérums analysés de la même manière que pour les objectifs 1 et 2, nous permettant de voir l'impact de la signalisation IFN-I sur la réponse humorale dans le contexte de l'infection par LCMV.

CHAPITRE 3

ARTICLE SCIENTIFIQUE

6. TYPE I INTERFERON IMPAIRS HUMORAL IMMUNE RESPONSES EARLY DURING ESTABLISHMENT OF LCMV INFECTION

Matthieu Daugan[1], Armstrong Murira[1], Barbara C. Mindt[2], Amélie Germain[1], Esther Tarrab[1], Pascal Lapierre[1], Jörg H. Fritz[2,3] and Alain Lamarre[1*]

AFFILIATIONS

[1]Immunovirology Laboratory, Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada.

[2]Department of Microbiology and Immunology, Complex Traits Group, McGill University, Montréal, Canada.

[3]Department of Physiology, Complex Traits Group, McGill University, Montréal, Canada.

*Correspondence to: Alain Lamarre, Ph.D., INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7, Phone : +1 (450) 687-5010 ext: 4262, Fax: +1 (450) 686-5501, Email : alain.lamarre@iaf.inrs.ca

6.1. Résumé en français

L'induction d'une réponse IFN-I est connue pour à la fois augmenter et perturber la réponse immunitaire cellulaire durant les infections virales aigües et chroniques, respectivement. Dans le présent travail nous montrons qu'en plus de son effet sur LT, l'IFN-I provoque une perturbation de la réponse immunitaire humorale par interaction directe avec les LB durant la phase aigüe de l'infection par le virus LCMV. Cette modification est limitée à la réponse dépendante des LT et est associée à une perturbation des follicules B, au développement d'une HGG et une expansion des T_{FH}. Les réponses spécifiques aux Ag ont été restaurées suite à une perte de la signalisation IFN-I par un blocage par Ac bloquant ou encore un knockout spécifique sur les LB. Il est important de noter que la déficience en réponse IFN-I sur les LB a aussi permis d'accélérer le développement de la réponse neutralisante contre LCMV. Ces résultats fournissent de nouvelles cibles thérapeutiques applicables dans le cadre du développement de mesures de traitements efficaces contre les infections virales chroniques pour augmenter les réponses neutralisantes et limiter l'immunopathologie.

6.2. **Abstract**

Elicitation of type I interferon (IFN-I) has been shown to both enhance and impair cell-mediated immune responses in acute and persistent viral infections, respectively. Here, we show that in addition to its effect on T cells, IFN-I drives impairment of humoral immune responses through direct interaction with B cells in the acute phase of lymphocytic choriomeningitis virus infection. This impairment was limited to the T cell-dependent B cell response and was associated with disruption of B cell follicles, development of hypergammaglobulinemia and T follicular helper cell expansion. Antigen-specific antibody responses were restored by ablation of IFN-I signaling through antibody-mediated IFN-I receptor blockade and B cell-specific IFN-I receptor knockout. Importantly, IFN-I receptor deficiency in B cells also accelerated the development of LCMV neutralizing antibodies. These results provide a therapeutic target potentially applicable towards the development of efficient treatment measures against persistent virus infections to improve neutralizing antibody responses and limit immunopathology.

6.3. Introduction

The humoral immune response plays a central effector role against viral infection whereby induction of effective antibody (Ab) responses serves as an important correlate towards pathogen clearance. However, during persistent viral infections *e.g.*, with human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis C virus (HCV) or the murine infection model lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), emergence of effective neutralizing Abs (nAbs) against these highly mutable viruses is delayed, initially narrow in specificity and ineffective against the established infection; as such, the Ab response bears negligible impact on the progression of the disease (Murira *et al.*, 2016). Accompanying the delayed induction of the nAb response, infected hosts also exhibit an altered immunological milieu that features aberrancies to the humoral response such as: (*i*) dysregulation of B cell subpopulations (Charles *et al.*, 2008, Moir *et al.*, 2008); (*ii*) hypergammaglobulinemia (HGG) (De Milito *et al.*, 2004, Racanelli *et al.*, 2006); (*iii*) increase of polyreactive Abs (He *et al.*, 2006, Qiao *et al.*, 2006); and (*iv*) impaired response to vaccines (De Milito *et al.*, 2004, Pallikkuth *et al.*, 2012). Altogether, these perturbations result in a diminished antigen-specific Ab response and an enhanced non-specific polyclonal response. Notably, these immunomodulatory effects are driven directly by viral pathogenic mechanisms and indirectly through immunopathogenesis triggered by host antiviral responses (Moir *et al.*, 2013). Presently, it is yet to be determined whether this immunological disruption occurs as a function of chronicity or due to mechanisms initiated at the acute stage of the viral infection.

Concomitant with the dysregulation observed in the humoral immune response, an increase in T follicular helper (T_{FH}) cells has also been observed during persistent HIV (Cubas *et al.*, 2013) and HCV (Feng *et al.*, 2012) infections as well as the chronic phase of LCMV infection (Fahey *et al.*, 2011). In the LCMV model, expansion of T_{FH} cells has been attributed to polarization of the CD4 T cell compartment towards T_{FH} responses, which suggests a role of cytokines such as IFN-I that skew differentiation and maturation towards T_{FH} and away from T helper type 1 (T_H1) cells (Osokine *et al.*, 2014). The role of IFN-I signaling with respect to T cells is well characterized and increasing evidence shows that this antiviral cytokine has both enhancing and

immunosuppressive effects on the T cell response upon viral infection (McNab *et al.*, 2015, Oldstone, 2015). Two recent studies clearly outlined the bipolar effect that IFN-I renders on T cell mediated immune responses by comparing the expression profile of IFN-I and IFN stimulated genes (ISGs) in LCMV Armstrong (acute) *versus* LCMV Clone 13 (Cl13; persistent) infection (Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2013). Collectively, this research revealed that although protective upon transient elicitation such as in acute infections, prolonged elevation of IFN-I levels post infection led to immunosuppression of T cell responses. In these studies, sustained expression of IFN-I was shown to drive upregulation of immunosuppressive molecules such as PD-1 and IL10 as well as disruption of splenic architecture and dampened effector CD8+ T cell (CTL) responses (Barber *et al.*, 2006, Brooks *et al.*, 2006, Ng *et al.*, 2015, Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2012, E. B. Wilson *et al.*, 2013). Altogether, this contributes to the failure of viral clearance and eventual persistent infection.

Similarly, IFN-I production has also been shown to enhance the development of the Ab response against acute viral infections or vaccine antigens (Coro *et al.*, 2006, Le Bon *et al.*, 2001). Furthermore, IFN-I produced during persistent viral infection has been shown to suppress replication of a superinfecting virus consequently reducing the adaptive immune response against the secondary infection (Honke *et al.*, 2016). However, despite data demonstrating that similar to T cells, upregulation of ISGs occurs in B cells from HIV-viremic patients (Moir *et al.*, 2004), the direct influence of IFN-I on the development of the humoral immune response during persistent viral infection is yet to be elucidated. In this report, we use the LCMV mouse model to further characterize the molecular mechanisms that drive the modulation and resulting humoral immune dysregulation during persistent virus infection.

6.4. **Results**

LCMV infection impairs the humoral response to T-dependent antigens

Although the influence of escape mutations within the glycoprotein envelope of LCMV as well as a dysregulated T cell response have been implicated in the delayed appearance of nAbs (Battegay *et al.*, 1993b, Pinschewer *et al.*, 2004), it is unclear whether broader modulation of

the immune response contributes to the disrupted humoral response. To directly evaluate this, we analyzed the Ab response against the model T-dependent (TD) antigen, nitrophenyl (NP) coupled to chicken gamma globulin (CGG) in the context of CTL-controlled LCMV (Fung-Leung *et al.*, 1991a, Moskophidis *et al.*, 1987) and Ab-controlled vesicular stomatitis virus (VSV) infection (Steinhoff *et al.*, 1995). Here, NP was used to evaluate the global humoral response that is independent of the reaction against the pathogenic determinants of the viruses used in the different experimental conditions. C57BL/6 (B6) mice were infected with LCMV Cl13, VSV Indiana or mock-infected with culture media only. The three groups were contemporaneously immunized with NP-CGG, which predominantly elicits an IgG1 response (Cumano *et al.*, 1985). At various time points after immunization, the NP-specific IgG1 serum response was monitored by ELISA, which revealed that NP-specific IgG1 titers were significantly reduced in LCMV Cl13-infected mice, compared to VSV-infected or mock-infected control mice **(Fig. 1a**). Furthermore, this impairment was also present albeit to a lesser extent in mice infected with the non-persistent LCMV strain WE (**Fig. 1b**; left panel and **Supplementary Fig. 1a**). Although LCMV-associated impairment of NP-specific responses declined after day (d)12, the increase in the IgG1 responses thereafter did not attain the levels observed in VSV-infected or mock-infected groups for the duration of the experiment (30 days) (**Fig. 1a**). The kinetics of the disrupted NP-specific response and the impact by both the acute and persistent strains of LCMV suggest that the immunological process that drives this phenotype partially occurs early after infection and not entirely at the chronic stage.

To further characterize the duration of LCMV-associated effects on the NP-specific response, we immunized mice 4 days before (d-4) and on d4, d8, d12, d20 or d30 after LCMV-WE or VSV infections (**Supplementary Fig. 2a-b**). As shown, the Ab response in the VSV-infected group was unaffected irrespective of the time interval between infection and immunization. On the other hand, NP-specific IgG1 responses in LCMV WE-infected mice revealed similar levels of impairment upon immunization on d4, d8 and d12 post immunization. However, only limited impact on the NP-specific response was observed when immunization was carried out on d-4 before or d20 after infection indicating that B cell responses: (*i*) were less susceptible to LCMV impairment if established prior to infection; (*ii*) start to recover by d20 following LCMV WE

infection before returning to normal levels by d30 post infection and (*iii*) remain impaired past d30 following infection with LCMV Cl13 (**Fig. 1b**, right panel). Upon infection with LCMV Cl13 or VSV as above and simultaneous immunization with a T-independent Type 2 (TI-2) antigen, NP-FICOLL, NP-specific IgG3 (**Fig. 1c**) and IgM (**Fig. 1d**) responses were similar in all groups although a trend towards weaker IgM responses in the LCMV-infected group was observed at latter time points. These results demonstrate that LCMV predominantly impairs the TD response. Similar results were also observed in LCMV WE-infected mice (**Supplementary Fig. 1b-c**).

Despite the impairment of the TD response, however, the affinity maturation process was unaltered by LCMV infection. As illustrated in **Fig. 1e** for LCMV Cl13 (**Supplementary Fig. 1d** for LCMV WE), the ratio of high affinity anti-NP IgG1 Abs binding to NP_4-BSA *versus* the total anti-NP IgG1 response, measured using NP_{26}-BSA, reflected a similar increase in Ab affinity at various time points in all three experimental groups. Similar results were also obtained when immunizations were performed on d-4, d4, d8, d12, d20 or d30 post-infection (**Supplementary Fig. 2c**). Thus, although diminished in serum concentration, the quality of the NP-specific response was not affected by LCMV infection. Importantly, the reduction in the NP-specific response occurs in the context of increased total IgG serum levels that is evident by d12 in LCMV Cl13- (**Fig. 1f**) and d8 in LCMV WE- (**Supplementary Fig. 1e**) infected mice compared to VSV- or mock-infected animals. These results are in agreement with the emergence of polyclonal non-specific B cell activation and resultant HGG that is observed during LCMV infection (Hunziker *et al.*, 2003) and other persistent viral infections such as HIV (De Milito *et al.*, 2004, He *et al.*, 2006) or HCV (Kawamoto *et al.*, 1993).

LCMV infection modifies the lymphoid microenvironment and B-cell function

To gain further insight into the immunological milieu within which the impairment of TD NP-specific Ab responses occurred, we evaluated B cell populations and the splenic microenvironment in the three infection groups on d8 post infection/immunization. Similar to a previous report (Odermatt *et al.*, 1991), we observed perturbations in the splenic architecture whereby immunohistochemistry revealed a dramatic disruption of B cell follicles in LCMV-infected mice relative to VSV- and mock-infected controls with B cells being mostly found

outside of the follicles (**Fig. 2a**). Counterintuitive to this disruption, while total splenic B cell numbers were unaltered (**Supplementary Fig. 3a-b**), the number and proportion of GC B cells in the LCMV-infected group were significantly increased (**Fig. 2b**). Expansion of the GC B cell population suggested hyperactivation of B cells in the LCMV group. Given that this phenomenon could manifest as increased differentiation into effector B cell subsets (*e.g.,* plasma cells; PCs), we evaluated the splenic Ab-secreting cell (ASC) population on d8 after infection and immunization with NP-CGG using ELISPOT (**Fig. 2c**). In agreement with the presence of HGG, the total number of IgG-secreting ASCs in the LCMV-infected group was increased. Conversely, the quantity of NP-specific ASCs was significantly decreased in the LCMV group, correlating with the depressed antigen-specific Ab response. Similar results were also observed in the bone marrow compartment to which the PCs migrate after differentiation in the secondary lymphoid organs (data not shown) and these features were also observed in LCMV WE-infected animals as well (**Supplementary Fig. 3c**). Lastly, consistent with the increase in the number of IgG-secreting ASCs due to hyperactivation during LCMV infection, ASCs from this group also displayed an increased secretory capacity (**Fig. 2d**). Expressed here as a ratio, the *ex vivo* Ab concentration from splenic ASCs was quantified from culture supernatants and revealed that following LCMV infection, ASCs secreted a significantly higher quantity of Ab relative to VSV- or mock-infected mice.

LCMV infection triggers the expansion of T_{FH} and an increase in their effector function

Upon phenotypic characterization of the CD4 T cell compartment, we observed that while the absolute number of CD4 T cells was unchanged (**Supplementary Fig. 4a**), there was a contraction in the proportion of CD4 T cells in the LCMV-infected group (**Supplementary Fig. 4b**). This coincided with a significant increase in the T_{FH} compartment ($CD4^{+}CD62L^{-}$ $CD44^{+}CXCR5^{+}Bcl\text{-}6^{+}$) as shown in **Fig. 3a** and **Supplementary Fig. 4c-d** for LCMV Cl13 and WE, respectively. These results are supported by previous work, which demonstrated that LCMV increased differentiation of CD4 T cells into T_{FH}, and this redirected differentiation program was sustained in LCMV Cl13 due to viral persistence(Fahey *et al.*, 2011). Based on these changes in the T_{FH} population and their potential influence on the humoral immune response, we sought

to determine whether the essential co-stimulatory and signaling molecules that comprise interaction between T_{FH} and GC B cells were similarly modified during LCMV infection. Using flow cytometry, we observed an increased proportion of T_{FH} cells expressing PD-1 in the LCMV WE-infected mice (**Supplementary Fig. 4e**) whereas T_{FH} cells from LCMV Cl13-infected mice were only slightly elevated compared to controls although not to a statistically significant level (**Fig. 3b**). On the other hand, proportions of T_{FH} expressing ICOS were significantly augmented. Surprisingly, while proportions of B cells expressing PD-L1 similarly increased (**Fig. 3c,** LCMV Cl13 and **Supplementary Fig. 4f**, LCMV WE), those expressing ICOSL were reduced whereas the ligand pair CD40:CD40L remained unchanged across the three infection groups (**Fig. 3b-c**). Serum levels of BAFF were also elevated in LCMV-infected mice along with BAFF, IL-21 and IL-4 mRNA and protein expression in CD4 T cells **(Fig. 3d-e)**. Predilection towards T_{FH} differentiation in the context of persistent infection can occur as a result of prolonged expression of IFN-I. However, whether the effects on the humoral response were solely due to a modulated T_{FH} response shaping the B cell response or more direct impact of IFN-I on the B cells is unknown. To determine the potential role of T_{FH} immunomodulation on perturbation of the humoral response, we administered blocking Abs against PD-1, which comprises a key molecular interaction between GC B cells and T_{FH} (Good-Jacobson *et al.*, 2010). As illustrated in **Supplementary Fig. 4g-h**, blockade of PD-1 prior to infection and immunization with NP did not alter the NP-specific and total IgG titers relative to the isotype control group. Similar results were obtained following PD-L1 blockade (data not shown). Therefore, in our model, humoral disruption was immutable to blockade of the PD-1 pathway suggesting a more direct role of IFN-I on B cell function.

IFNAR signaling is essential for LCMV-mediated humoral immune response disruption

Previous studies have demonstrated a rapid and robust increase in LCMV-induced IFN-I levels in the serum (Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2013), which, as illustrated in **Fig. 4a**, was also observed in our LCMV cohort as well as in VSV-infected mice albeit to a much lesser extent. To determine whether IFN-I could have a direct impact on B cells, we performed *in vitro* stimulation of B cells with IFN-β in the presence or absence of BCR signaling to evaluate any

modifications in survival and proliferation. Here, B cell samples were harvested from both wildtype B6 and IFNAR$^{-/-}$ mice to determine specific action by IFN-I. As shown in **Fig. 4b**, addition of IFN-β in the WT B cell culture sustained the survival of B cells by 2.5 fold after 4 days whereas as expected, B cells from IFNAR$^{-/-}$ mice did not respond to IFN-β. Interestingly, upon stimulation through the BCR, survival of cultured B cells was diminished regardless of addition of IFN-β. Furthermore, while BCR stimulation increased B cell proliferation, the addition of IFN-β completely abrogated the BCR-dependent increase in proliferation (**Fig. 4c**). We also measured B cell activation by evaluating expression of the activation marker CD69 upon which we found that IFN-β increases B cell activation independently of BCR stimulation (**Fig. 4d**). Given the enhancement of survival independent and antagonistically to BCR signaling, these results suggest that IFN-I signaling could potentiate the increase of non-specific B cells while impairing the development of antigen-specific B cell responses.

To directly evaluate the effect of IFN-I signaling in our *in vivo* model, we performed LCMV Cl13 infection and co-immunization with NP in mice that were treated with either an anti-IFNAR blocking Ab or isotype control Ab. Remarkably, although the LCMV-specific binding Ab response was unaffected by IFNAR blockade as shown previously (**Supplementary Fig. 5a**) (Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2013), NP-specific serum Ab titers were restored to levels present in VSV- or mock-infected controls **(Fig. 5a)**. In addition, restoration of the anti-NP humoral immune response was observed following either: (*i*) a single anti-IFNAR administration conducted on d-1 prior to the infection/immunization or (*ii*) a series of 11 anti-IFNAR treatments conducted every third day until d30 post-infection/immunization although the effect of the single Ab treatment regimen seemingly waned over time **(Supplementary Fig. 5b)**. However, consistent with a previous report that showed the induction of HGG in IFNAR$^{-/-}$ mice following LCMV infection (Hunziker *et al.*, 2003), HGG was unchanged by this treatment **(Fig. 5b** and **Supplementary Fig. 5c**). Furthermore, while the number of NP-specific ASCs returned to those found in control animals (**Fig. 5c**; right panel), total IgG-secreting ASCs remained elevated in anti-IFNAR-treated animals (**Fig. 5c**; left panel), consistent with the persistence of HGG. Collectively, these results suggest that; (*i*) the suppressive effect of IFN-I on the NP-specific Ab

response occurs early following LCMV infection and persists for several weeks and (*ii*) functional positive B cell selection is restored upon IFNAR blockade.

Surprisingly, although IFNAR blockade led to the restoration of total splenic CD4+ T cell proportions (**Supplementary Fig. 6a**), the increase in T_{FH} observed following LCMV infection remained unchanged (**Fig. 5d)**. Moreover, the treatment bore limited to negligible impact on IL-4 and IL-21 expression in CD4 T cells (**Supplementary Fig. 6b**), GC B cell proportions (**Supplementary Fig. 6c**) and relative Ab secretion by ASCs (**Supplementary Fig. 6d**). However, relative to the isotype control, anti-IFNAR treatment resulted in moderate modulation in the expression levels of ICOS, PD-L1 and ICOSL (**Fig. 5e-f**). Given that T_{FH} and GC B cell populations remained elevated following IFNAR blockade and that NP-specificity was recovered, we sought to determine whether B cell follicular structure was also restored as previously described for general lymphoid architecture potentially explaining the ameliorated antigen-specific response (Ng *et al.*, 2015, Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2013). However, only partial recovery of the B cell follicle structure was observed suggesting that B cell localization could be disrupted (**Fig. 5g**). Based on the role of CXCR4 in the trafficking of B cells in lymphoid follicles (Nie *et al.*, 2004), we examined its expression level upon IFNAR blockade. As shown in **Fig. 5h**, we observed a dramatic elevation in CXCR4 expression in total B cells which was restored to base levels upon IFNAR blockade. Surprisingly, this variation in CXCR4 levels was not observed in the GC compartment illustrating a significant role played by IFN-I during LCMV infection in altering the trafficking and localization of B cells. This interplay suggests a mechanistic outline by which IFN-I modulates the humoral immune response.

B-cell intrinsic IFN-I signaling directly disrupts the antigen-specific humoral response

Our data so far have suggested a direct effect of IFN-I on B cells. Therefore, to determine the role of B cell-intrinsic IFN-I signaling on the impaired humoral response observed during LCMV infection, we developed a chimeric model by reconstituting irradiated B6 mice with a mix of bone marrow cells from B cell deficient (J_HT) mice (Chen *et al.*, 1993) and $IFNAR^{-/-}$ mice. As a result, we obtained chimeras in which only the B cells are deficient in IFN-I-signaling. Upon Cl13 infection and NP-CGG immunization of these chimeras we observed restoration of the NP-

specific response to levels observed in the VSV- or mock-infected animals (**Fig. 6a**), which was consistent with the IFNAR blockade experiment. Interestingly, whereas IFNAR blockade did not ameliorate HGG, the levels of serum IgG in LCMV Cl13 infected $J_HT/IFNAR^{-/-}$ chimeras were significantly lower than those in WT animals and normal relative to VSV and mock-infected mice (**Fig. 6b**). Yet, despite the normalization of humoral immune responses, $J_HT/IFNAR^{-/-}$ mice only exhibited partial rescue of the splenic marginal-zone and B cell follicle structures (**Fig 6c**). Perhaps the most significant impact observed by the absence of B cell-specific IFNAR signaling was the accelerated emergence of nAbs in the chimeras compared to both control $J_HT/B6$ chimeras and more importantly, WT B6 mice (**Fig. 6d**). Collectively, these data illustrated a potent effect borne by IFN-I signaling directly on B cells, which upon negation results in a normal antigen-specific humoral response as well as enhanced induction of LCMV nAbs.

6.5. Discussion

The immune response in the LCMV-infection model has been classically defined as cell-mediated (Zinkernagel *et al.*, 2001b) whereas the role of the humoral immune response has only been considered relevant in the context of re-infection (Zinkernagel *et al.*, 1985). Although the absence of an initial robust Ab response and infection-induced dysregulation has been primarily attributed to antiviral escape mechanisms (Ciurea *et al.*, 2000, Pinschewer *et al.*, 2004) the immunological processes that drive the disruption of humoral immunity during persistent infection are yet to be elucidated.

In this report, we reveal that emergence of humoral dysfunction during LCMV infection occurs in an IFN-I-dependent manner in which antigen specificity in the TD immune response was impaired; this effect was notably more evident in Cl13- relative to the WE-infected animals. Collectively, the presence of humoral disruption observed with both viral strains illustrates that pathogenic mechanisms present in the acute phase of infection as well as sustenance of viral burden in the face of prolonged Cl13 infection both play a role in the observed perturbations. In addition to changes in the humoral response, T_{FH} expansion was also observed during LCMV infection alongside elevation of IFN-I levels. These observations are validated by previous work

(Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2013), which established the central role played by IFN-I in orchestrating chronicity due to immunopathogenic characteristics of LCMV.

A key determinant of humoral immunity is the interaction between B and T cells that comprise the TD arm of the Ab-mediated response. In the follicular context of the B cell response, the synapse between these two lymphocytes features a myriad of ligand pairings such as ICOSL:ICOS, PD-L1/PD-L2:PD-1 and CD40:CD40L (listed as B:T interactions) (Breitfeld *et al.*, 2000, Nutt *et al.*, 2011), which drive the essential signaling cascades that provide survival signals to GC B cells in the form of cytokines (*e.g.*, IL-21, IL-4 and BAFF) (Goenka *et al.*, 2014, Rasheed *et al.*, 2013, Yusuf *et al.*, 2010).

In our study, whereas blockade of IFN-I signaling using anti-IFNAR Abs reestablished the anti-NP response and partially restored the expression of costimulatory molecules between B and T cells, HGG remained present similar to a previous report in IFNAR$^{-/-}$ (Hunziker *et al.*, 2003). In addition, expansion in the T_{FH} and total IgG-secreting ASC populations was observed despite IFNAR-blockade. Furthermore, treatment with anti-PD-1/PD-L1, which was conducted prior to infection and co-immunization, bore no impact on LCMV-mediated dysregulation. Although these findings did not rule out that a cocktail of costimulatory-blockade treatments would effectively diminish the extent of humoral dysregulation observed, they suggested that the effects of LCMV-induced IFN-I acted directly on B cells. The significance of this interaction was demonstrated using JHT/IFNAR$^{-/-}$ chimeric mice in which only B cells carried the receptor knockout. Remarkably, the complete absence of IFN-signaling on B cells restored normal humoral function with increased NP specificity and reduced HGG to levels similar to those observed in VSV- or mock-infected mice. Altogether, these results revealed the role of IFN-I signaling on B cells and advance a means by which to counter the effects of aberrant humoral responses triggered by this cytokine. Furthermore, targeted attenuation of B cell-specific IFNAR signaling may be more pragmatic towards clinical considerations than indiscriminate IFNAR blockade.

Along with the recovery of the antigen-specific humoral response, we observed a reduction in the extent of destruction to splenic follicular architecture upon both the blockade and B cell-specific knockout of IFNAR. Similar to the recovery of the general splenic tissue organization

observed in previous studies (Teijaro *et al.*, 2013, E. B. Wilson *et al.*, 2013), we surmise that this occurs in part due to preservation of cellular trafficking and localization in the splenic microstructure. In the TD response, interactions between the GC B cells and T_{FH} occur in the LZ of the GC wherein, upon positive selection, GC B cells migrate to the DZ where somatic hypermutation and clonal expansion occur. Thereafter, B cells expressing the rearranged BCRs traffic back to the LZ for another round of selection in which higher affinity B cell clones are selected and continue to receive survival signals while the low affinity clones are deleted. This iterative process constitutes the principle of affinity maturation and shuttling back and forth between the LZ and DZ is actuated by differential expression of chemokines receptors such as CXCR4 and CXCR5 (Allen *et al.*, 2004, Bannard *et al.*, 2013). Upon analysis of CXCR4 expression on B cells, we observed that the LCMV-associated increase in total B cells was completely reversed by anti-IFNAR Ab administration. However, since CXCR4 expression on GC B cells remained unchanged across all groups we surmise that the increased expression of the chemokine receptor upon infection most likely occurred in B cells outside of the GC. It is important to note that this change to cellular trafficking and localization likely represents only a fraction of similar such changes that alter splenic structure during LCMV infection.

In addition, these changes to B cell trafficking also suggest altered positive selection thresholds of effector cells. This possibility is further advanced by the increase in GC B cell numbers as well as the expansion of the non-specific ASC population. Along with the observation of T_{FH} increase in LCMV infected animals, we deduce that the positive selection process in which antigen-specific B cell clones compete for survival signals from T_{FH} is dysregulated. However, the affinity maturation process is still intact despite this disruption based on the stability of the high affinity NP_4-BSA Ab titers in all the infection groups. Thus, the positive selection mechanism is functional yet stunned by the influx of non-specific B cell clones. Most significantly, the increase in LCMV nAbs observed in the J_HT/ IFNAR$^{-/-}$ chimeras relative to WT B6 and J_HT/B6 can also be accounted for by such a mechanism. In this setting, the WT response features increased activation of non-specific B cell clones that is further exacerbated by the immunodominance of the non-neutralizing epitopes on the surface of LCMV envelope glycoprotein. Consequently, the response to neutralizing epitopes, which are immunorecessive and lower in concentration, is

further diminished by the effects of IFN-I signaling. However, in the absence of IFNAR on B cells, positive selection occurs at a threshold similar to that observed in acute infections in which effective nAb responses are elicited. This is a significant characterization given that the elicitation of nAbs and moreover, broadly nAbs, is also delayed in chronic infection settings such as HIV and HCV whose immunological profiles closely mirror those observed in LCMV. Delineation of the IFN-I-associated role in this impediment convincingly underscores an immunological process by which nAb responses are delayed in human infections.

Another important aspect of persistent infection is poor immunization responses in infected patients. Using NP co-immunization, our model recapitulates the diminished response against a secondary antigen, similar to an immunogen, and elucidates the role played by IFN-I-mediated signaling in the chronic infection setting. Other studies have also shown that poor responses against vaccines are correlated with an increased PD-1:PD-L1 profile in HIV and HCV infected patients (Cubas *et al.*, 2013, Moorman *et al.*, 2011).

In conclusion, the lack of an effective humoral immune response during LCMV infection is driven by general modulation to the humoral immune microenvironment by IFN-I. This modulation is limited to the TD response and is established early following infection; as well, blockade of IFN-I-mediated effects allows the immune response to proceed normally. Altogether, there are many aspects of the immune response to consider in their entirety but the significance of IFN-I signaling offers an ideal anchor for future analysis and provides a therapeutic target against persistent viral infections to potentially boost Ab responses as well as limit immunopathogenesis.

6.6. Figures

Figure 1

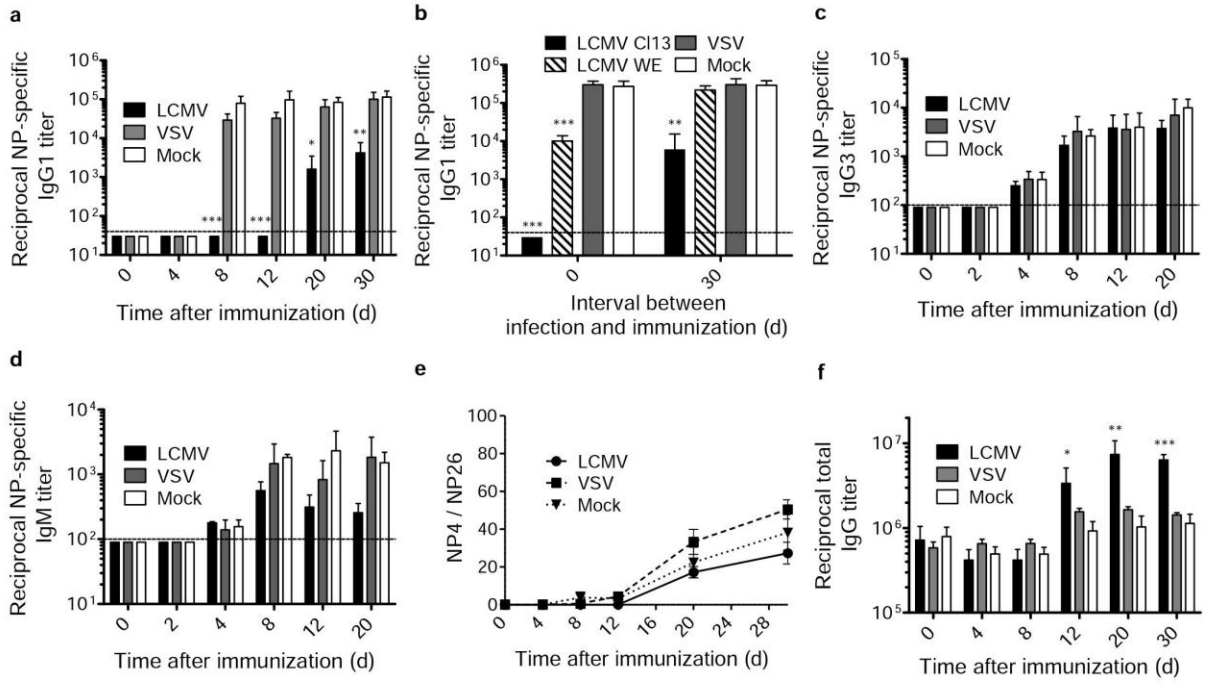


Figure 1. LCMV infection impairs the NP-specific Ab response in a T cell-dependent manner. B6 mice (4 per group) were infected with LCMV Cl13 (black), LCMV WE (hatched), VSV (grey) or mock-infected (white). Mice were immunized the same day (except when indicated otherwise) with an i.p. injection of NP_{53}-CGG in alum (**a, b, e, f**) or NP_{40}-FICOLL in PBS (**c, d**). **(a)** NP-specific IgG1 response monitored by ELISA following NP_{53}-CGG immunization. **(b)** Mice were infected as above and immunized with NP_{53}-CGG the same day (d0) or 30 days after infection (d30) and IgG1 NP-specific responses were monitored by ELISA on d8 post-immunization. NP-specific IgG3 **(c)** or IgM **(d)** responses monitored by ELISA following NP_{40}-FICOLL immunization. **(e)** ELISA plates were coated with NP_4-BSA or NP_{26}-BSA and high affinity Abs were measured as a ratio of total IgG1-binding Abs produced following NP_{53}-CGG immunization. **(f)** Total serum IgG responses following concomitant infection and NP_{53}-CGG immunization. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. The dotted line represents detection threshold. Results are representative two to three independent experiments.

Figure 2

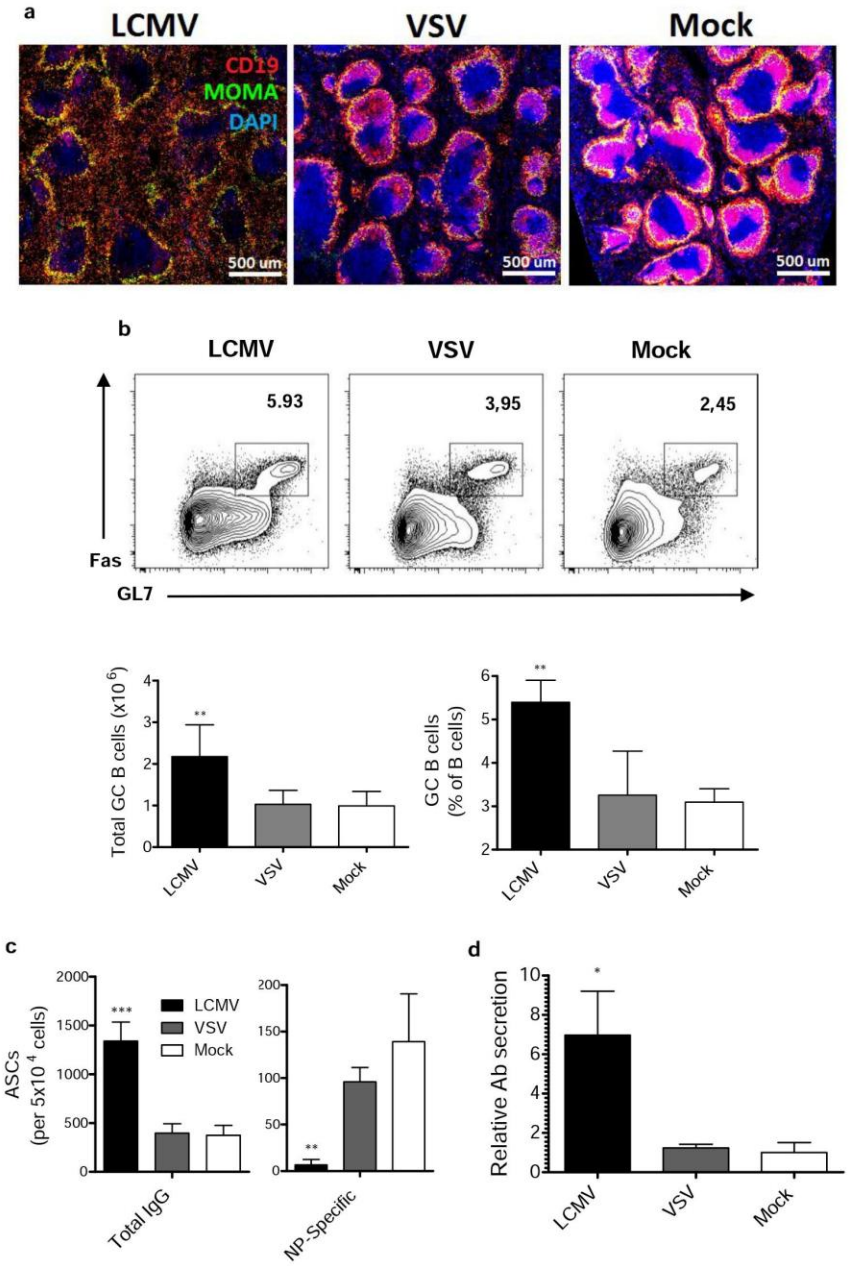


Figure 2. LCMV infection disrupts the splenic follicular architecture while increasing GC B cells and non-specific Ab responses. B6 mice (4 per group) were infected with LCMV Cl13 (black), VSV (grey) or mock-infected (white). Mice were immunized the same day with an i.p. injection of NP_{53}-CGG in alum. **(a)** Immunofluorescence showing CD19 (red), MOMA-1 (green) and DAPI (blue) expression on spleen sections taken on d8 post-infection. **(b)** Number and proportion of splenic GC B cells determined using flow cytometry on d8 following infection. **(c)** Number of total IgG-secreting and NP-specific ASCs detected on d8 after infection/immunization by ELISPOT. **(d)** Relative Ab secretion of ASCs calculated by *ex vivo* measurement of secreted Abs produced by 10^5 ASCs isolated from splenocytes on d8 post-infection. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Results are representative of four independent experiments.

Figure 3

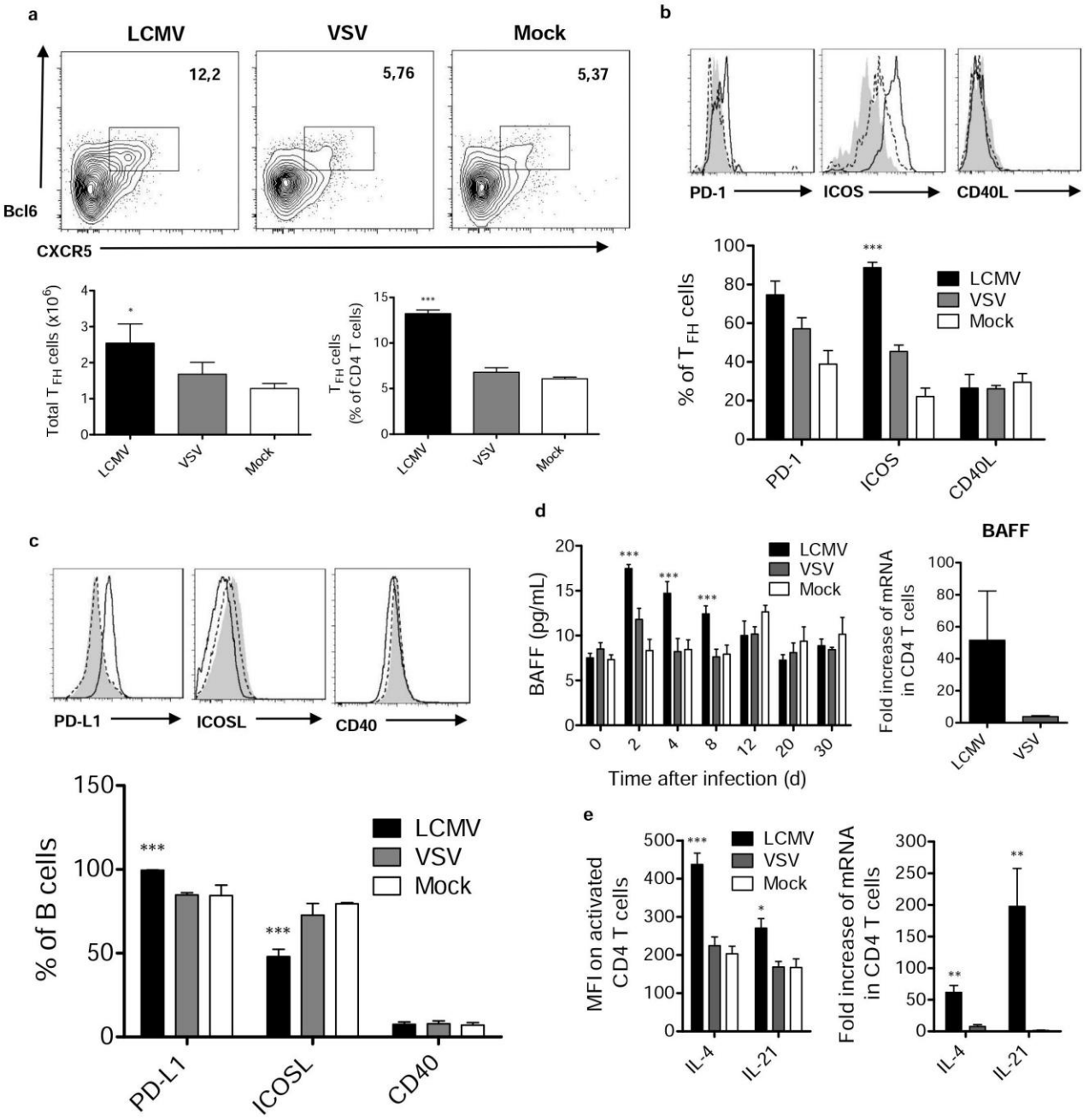


Figure 3. LCMV infection triggers the expansion of T_{FH} cells and induces their expression of B cell-activating cytokines. B6 mice (4 per group) were infected with LCMV Cl13 (black bar or line), VSV (grey bar or dotted line) or mock-infected (white bar or shaded area). T_{FH} cells **(a)** were enumerated on d8 post infection using flow cytometry. (**b**) Proportion of T_{FH} cells expressing PD-1, ICOS and CD40L and **(c)** B cells expressing PD-L1, ICOSL and CD40 determined by flow cytometry. **(d)** Serum BAFF concentration and BAFF mRNA expression in total splenic CD4 T cells measured using ELISA and qRT-PCR, respectively. **(e)** Intracellular cytokine levels and mRNA expression of IL-4 and IL-21 in CD4 T cells measured using flow cytometry and qRT-PCR, respectively. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Results are representative of three independent experiments.

Figure 4

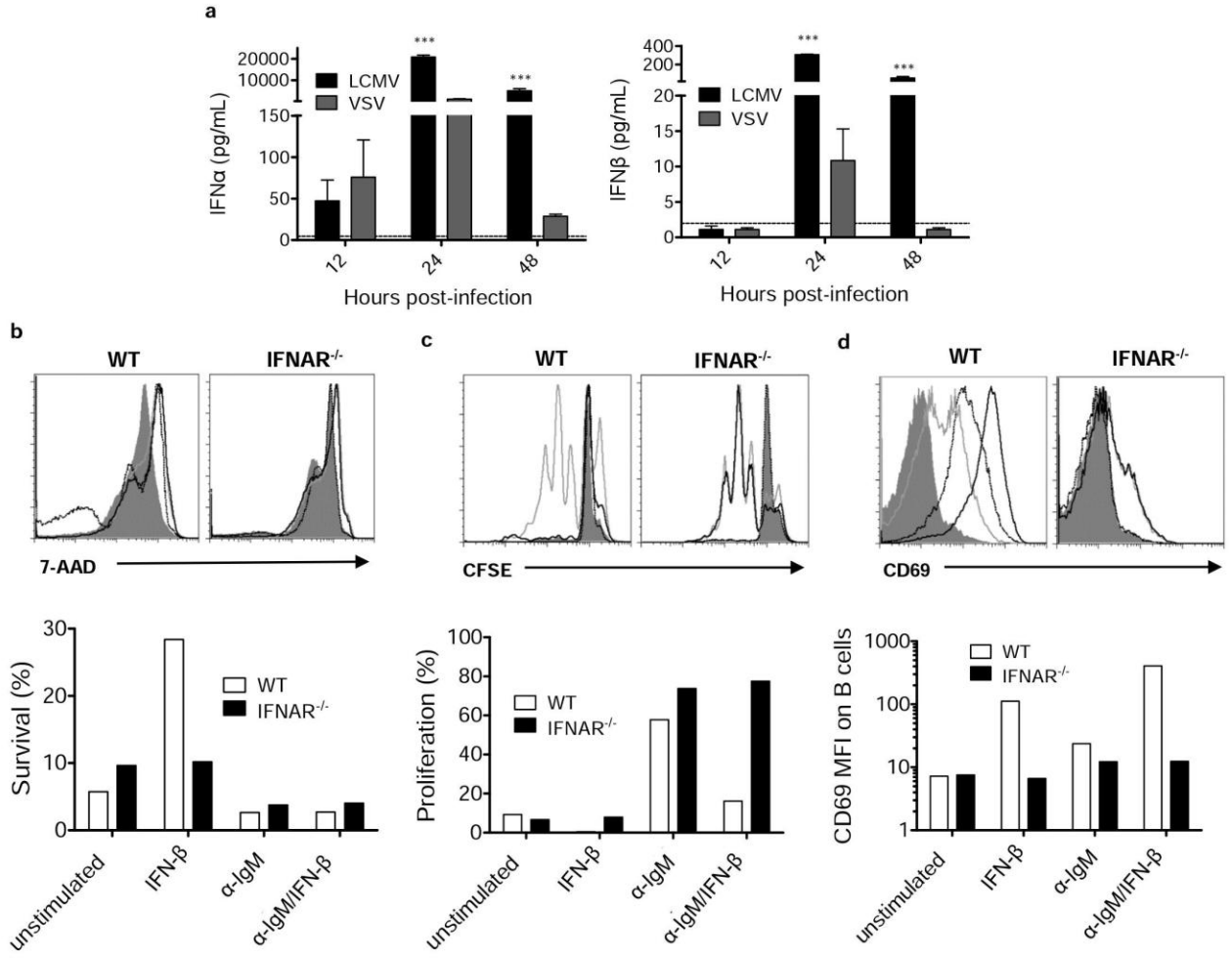


Figure 4. IFN-I acts in competition with BCR signaling to induce B cell survival and proliferation. **(a)** Serum level of IFN-I in B6 mice (n=4) infected with LCMV Cl13 (black), or VSV (grey) measured using ELISA. **(b-d)** 2 x 10^6 B cells from WT B6 (white bars) or IFNAR$^{-/-}$ (black bars) mice were cultured for 7.5 hours (for proliferation and CD69 expression) or 4 days (for survival) without *in vitro* stimulation (solid dark grey), or with α-IgM (light grey line), IFN-β (black dotted line), or both (black line). **(b)** 7-AAD exclusion, **(c)** CFSE dilution and **(d)** CD69 expression were measured by flow cytometry. *** = $p < 0.001$. Results are representative of two independent experiments.

Figure 5

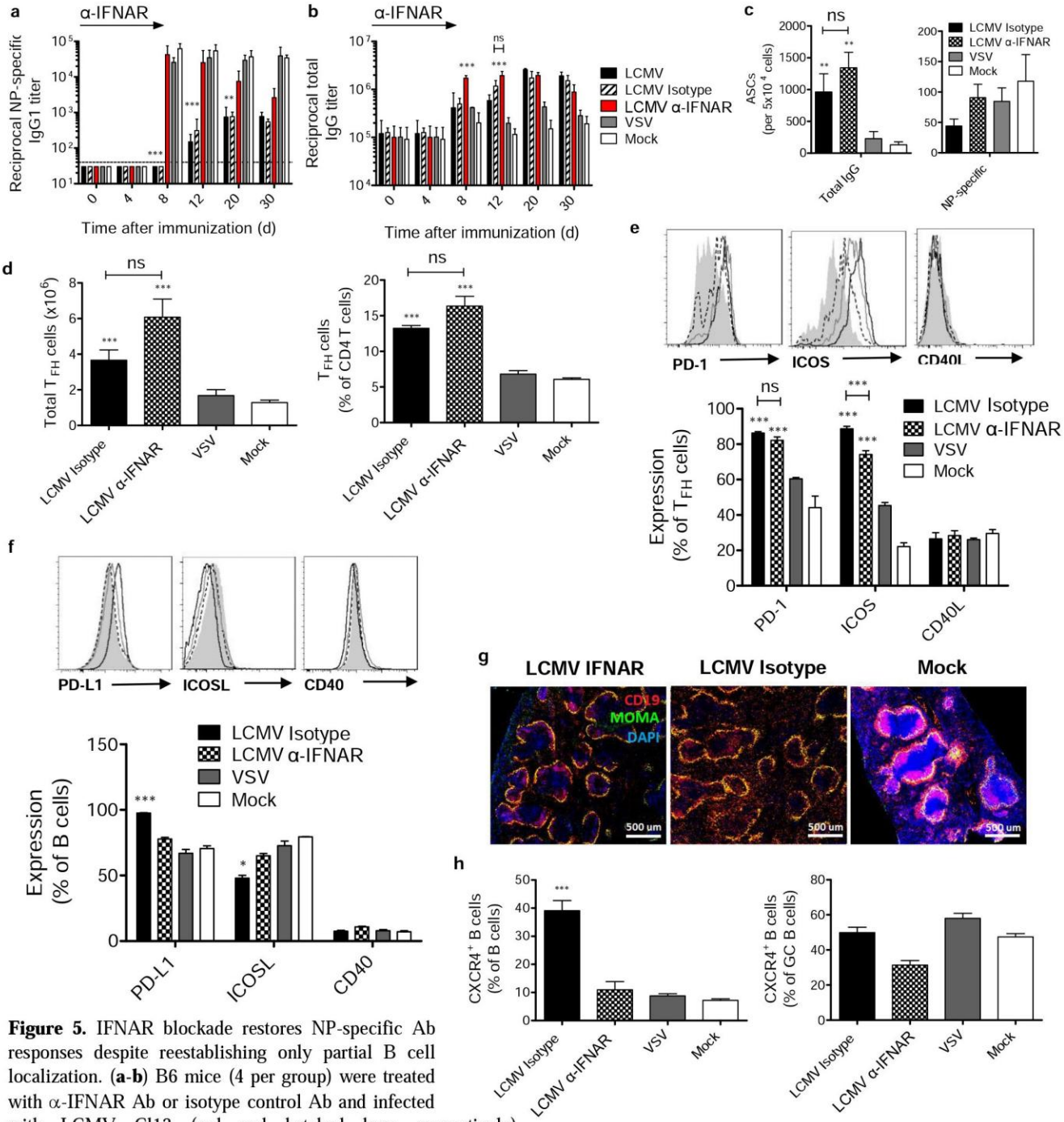


Figure 5. IFNAR blockade restores NP-specific Ab responses despite reestablishing only partial B cell localization. (**a**-**b**) B6 mice (4 per group) were treated with α-IFNAR Ab or isotype control Ab and infected with LCMV Cl13 (red and hatched bars, respectively), VSV (grey) or mock-infected (white). (**c**-**h**) B6 mice (4 per group) were treated with α-IFNAR Ab (checkered bars or grey lines) or isotype control Ab (black bars or lines) and infected with LCMV Cl13, VSV (grey bars or dotted lines) or mock-infected (white bars or shaded area). Serum level of **(a)** NP-specific IgG1 and **(b)** total IgG responses monitored by ELISA following NP_{53}-CGG immunization. (**c**) Number of total IgG-secreting and NP-specific ASCs detected on d8 by ELISPOT. Flow cytometry results showing **(d)** total numbers and proportions of T_{FH} cells among total CD4 T cells; and **(e)** proportion of T_{FH} cells expressing PD-1, ICOS and CD40L. **(f)** Proportion of B cells expressing PD-L1, ICOSL and CD40. **(g)** Splenic follicular structures visualized using immunofluorescent staining of CD19 (red), MOMA-1 (green) and DAPI (blue) in tissue sections obtained on d8 after infection. (**h**) Proportion of $CXCR4^+$ B cells among total B cells (left) and GC B cells (right) determined using flow cytometry. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. The dotted line represents detection threshold. Results are representative of three to four independent experiments.

Figure 6

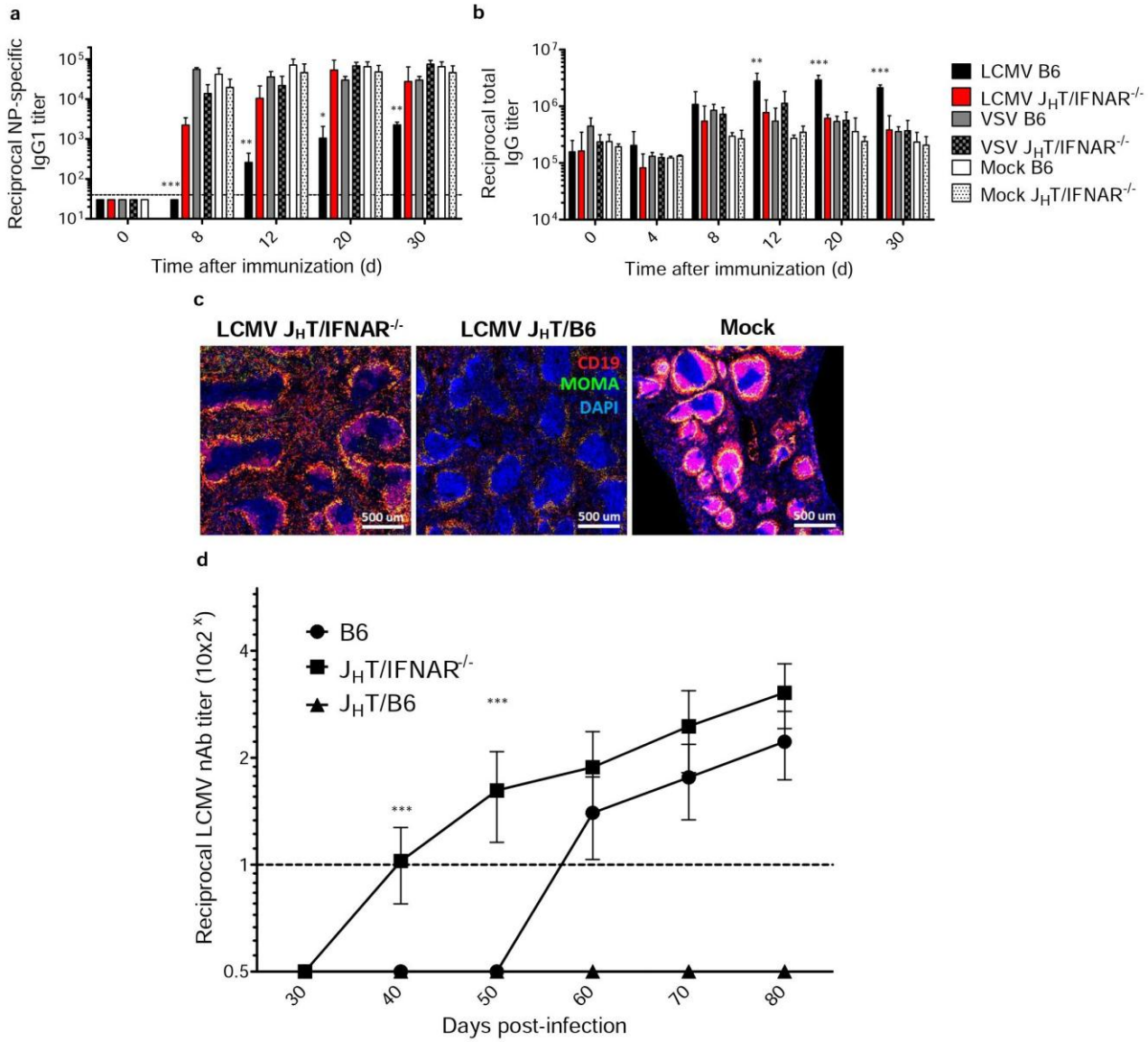
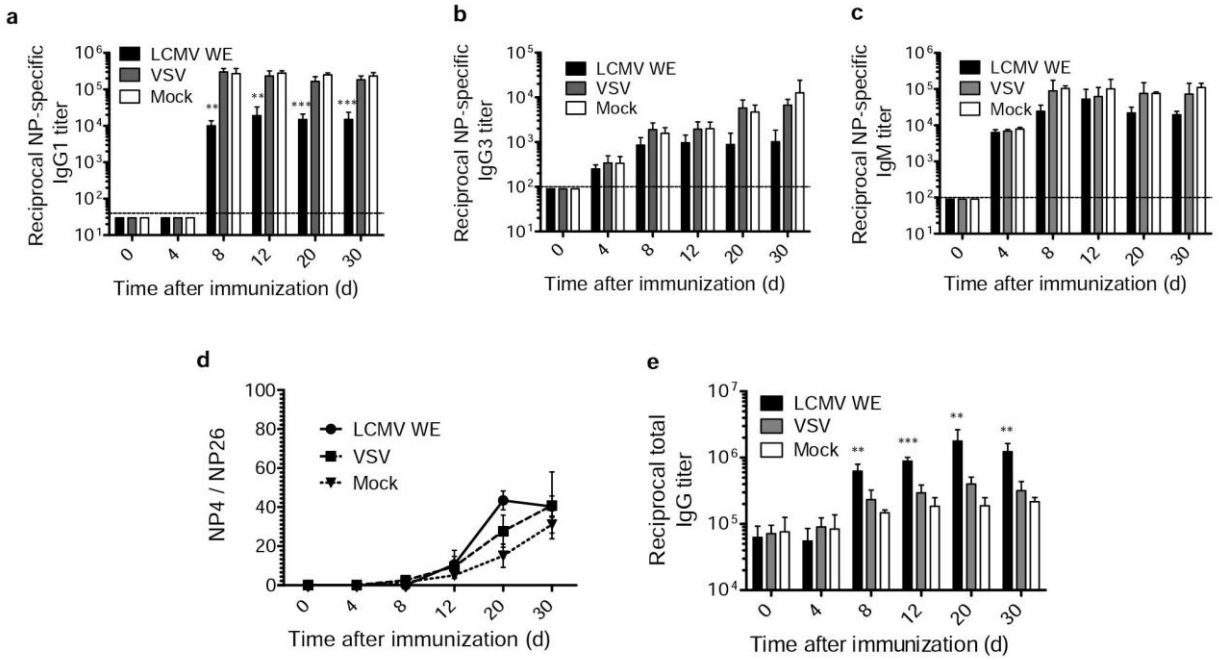


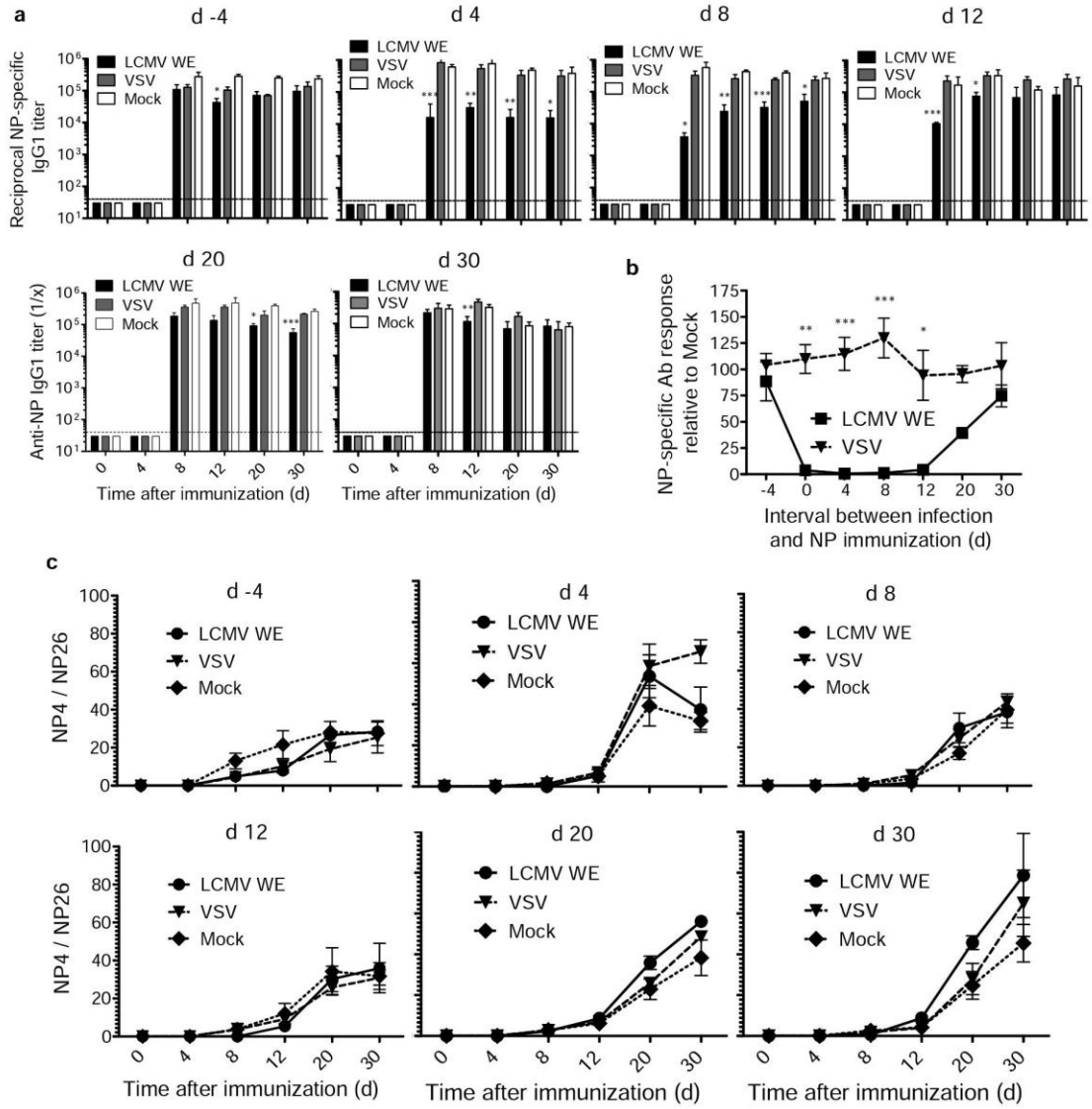
Figure 6. B cell-specific disruption of IFNAR restores NP-specific Ab responses and accelerates the development of LCMV nAbs. B6 mice (4 per group) were infected with LCMV Cl13 (black for B6; red for $J_HT/IFNAR^{-/-}$), VSV (grey) or were mock-infected (white). Plain bars represent B6 mice and checkered bars $J_HT/IFNAR^{-/-}$ B cell bone marrow chimeric mice. **(a)** NP-specific IgG1 and **(b)** total IgG responses monitored using ELISA on d8 following infection/NP_{53}-CGG immunization. **(c)** Splenic follicular structures visualized using immunofluorescent staining of CD19 (red), MOMA-1 (green) and DAPI (blue) on spleen sections obtained on d8 post-infection. **(d)** Neutralization assay showing accelerated nAb responses in $J_HT/IFNAR^{-/-}$ chimeric mice upon infection with LCMV Cl13. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. The dotted line represents detection threshold. Results are representative of three independent experiments.

Supplementary Figure 1



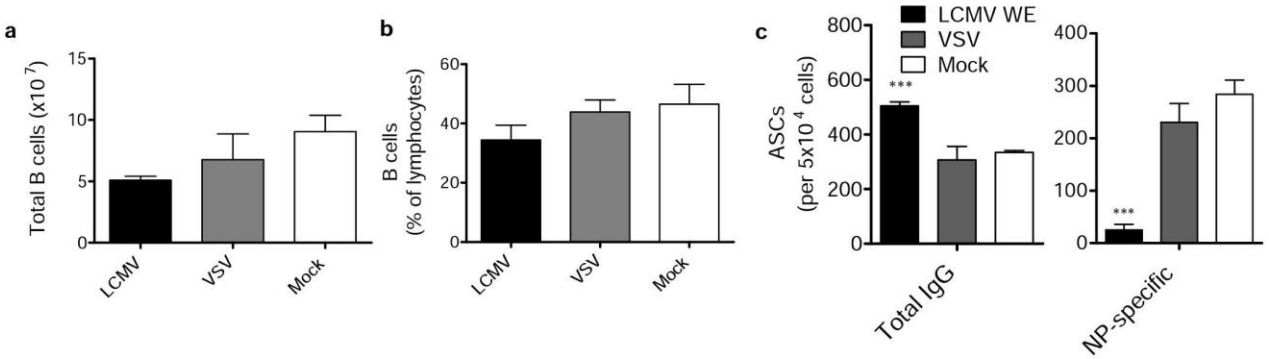
Supplementary Figure 1. LCMV WE infection also impairs the T-dependent Ab response. B6 mice (4 per group) were i.v infected with LCMV WE (black), VSV Ind (grey) or were mock-infected (white). Mice were immunized the same day with an i.p injection of NP_{53}-CGG in alum or NP_{40}-FICOLL in PBS. **(a)** NP-specific IgG1 T-dependent response monitored by ELISA following NP_{53}-CGG immunization. **(b)** NP-specific IgG3 or **(c)** IgM T-independent responses monitored by ELISA following NP_{40}-FICOLL immunization. **(d)** ELISA plates were coated with NP-BSA as described in the methods to determine the ratio of high-affinity Ab from the total pool of IgG1-binding Abs produced following NP_{53}-CGG immunization. **(e)** Total IgG response following infection and NP_{53}-CGG immunization. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. The dotted line represents detection threshold. Results are representative of three independent experiments.

Supplementary Figure 2



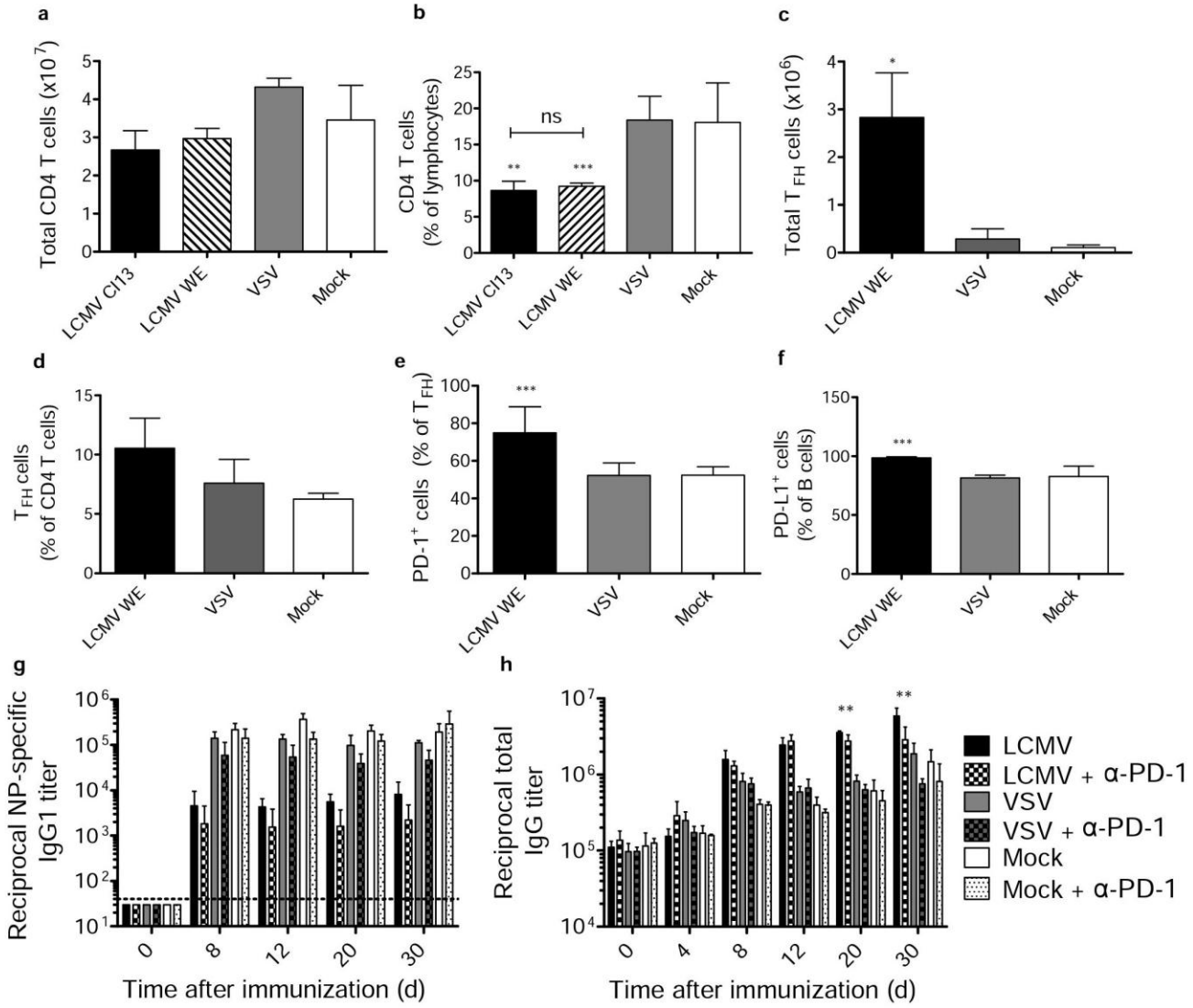
Supplementary Figure 2. Ab response to NP with different time interval between infection and immunization. B6 mice (4 per group) were infected i.v. with LCMV WE (black), VSV Ind (grey) or mock-infected (white). Mice were then immunized with an i.p. injection of NP_{53}-CGG in alum following a varying immunization schedule depending on the experiment (from d-4 to d30). **(a)** NP-specific IgG1 response in each differentially timed experiment monitored by ELISA. **(b)** Proportion of the NP-specific response in each infected group compared to mock-infected mice depending on the time interval of the delay. (**c**) ELISA plates were coated with NP-BSA as described in the materials and methods to discriminate high-affinity Abs from the total pool of IgG1-binding Abs produced following NP_{53}-CGG immunization. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Results are representative of two independent experiments.

Supplementary Figure 3



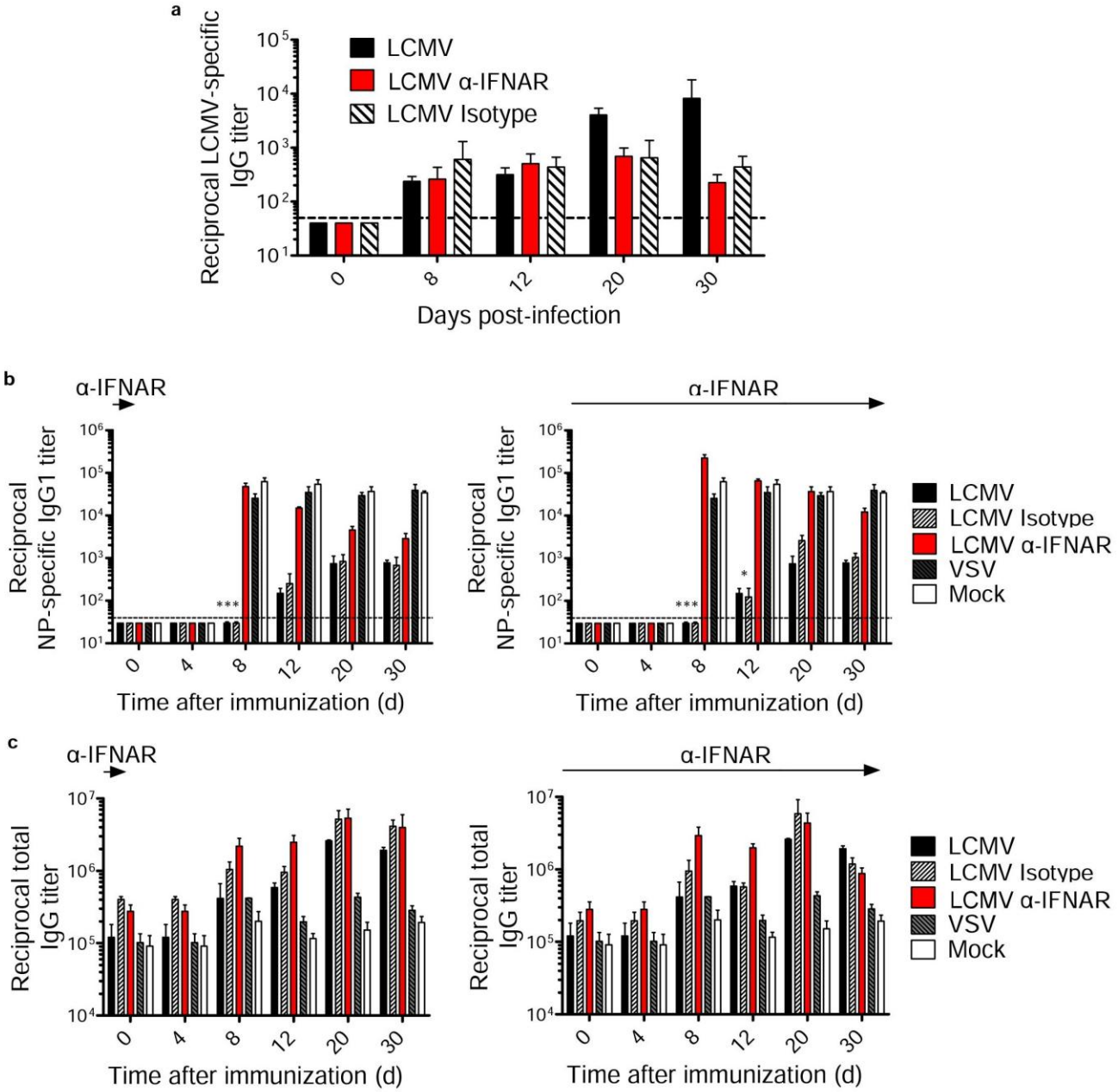
Supplementary Figure 3. Influence of LCMV CL13 and WE infection on the B cell response. B6 mice (4 per group) were infected i.v. with LCMV WE (black), VSV Ind (grey) or mock-infected (white). (**a**) Total B cell numbers and (**b**) proportions were enumerated on d8 after infection by flow cytometry. (**c**) Spleens were harvested on d8 after infection/immunization and total IgG and NP-specific secreting ASCs counts were determined as described in Materials and Methods. *** = $p < 0.001$. Results are representative of four independent experiments.

Supplementary Figure 4



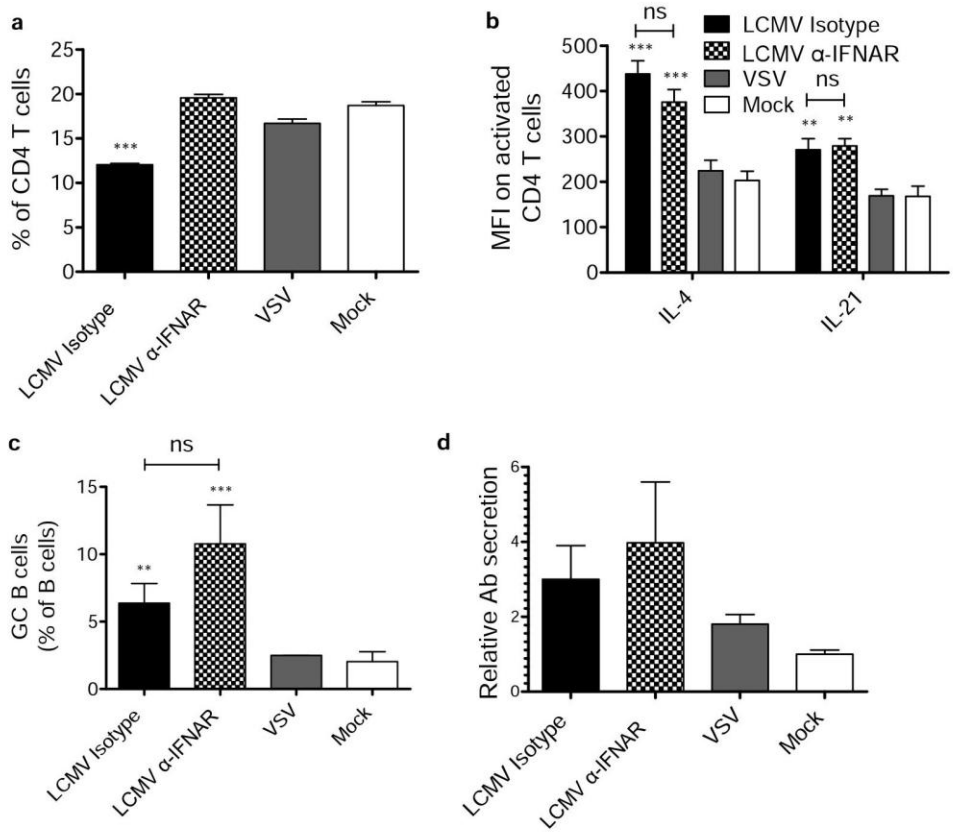
Supplementary Figure 4. While LCMV WE infection triggers T_{FH} expansion and PD-1 upregulation, impairment of the antigen-specific humoral response is independent of PD-1 signaling. B6 mice (4 per group) were infected i.v. with LCMV Cl13 (black) or LCMV WE (hatched), VSV Ind (grey) or mock-infected (white). Total $CD4^+$ T cell numbers **(a)** and proportions **(b)** and T_{FH} cell numbers **(c)** and proportions **(d)** were enumerated on d8 after infection by flow cytometry. Proportions of T_{FH} cells **(e)** expressing PD-1 and of B cells **(f)** expressing PD-L1 as measured by flow cytometry. The NP-specific IgG1 response **(g)** and total IgG response **(h)** were monitored upon infection only (plain bars) or infection along with injection of PD1-blocking Ab (checkered bars) * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$. Results are representative of three independent experiments.

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. IFNAR blockade does not modify the LCMV-specific binding Ab response but restores the NP-specific response. B6 mice (4 per group) were infected i.v. with LCMV Cl13 (black), VSV Ind (grey) or mock-infected (white). Hatched bars represent mice injected with isotype control Ab and red bars with IFNAR blocking Ab. **(a)** LCMV nucleoprotein-specific IgG titers as determined by ELISA. Anti-IFNAR treatment was either stopped after one injection (day -1) or 10 injections (day 30). The NP-specific IgG1 response **(b)** and total IgG response **(c)** were monitored for each experiment. * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$.

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. IFNAR blockade does not modify cytokine secretion by T_{FH} cells, GC B cell proportions and relative Ab secretion. B6 mice (4 per group) were infected i.v. with LCMV Cl13 (black), VSV Ind (grey) or mock-infected (white). Plain bars represent mice injected with isotype control Ab and checkered bars mice injected with IFNAR blocking Ab. **(a)** Proportion of CD4 T cells, **(b)** intracellular IL-4 and IL-21 levels in T_{FH} cells and **(c)** proportion of splenic GC B cells determined by flow cytometry on d8 following infection. (**d**) Secretory capacity of ASCs as determined by measuring the quantity of secreted Abs produced by 10^5 ASCs. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

6.7. Material and methods

Mice, infections and immunizations

6-8 week-old B6 female mice were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Quebec, Canada). J_HT, mice were obtained from Rolf M. Zinkernagel, Zurich, Switzerland. IFNAR$^{-/-}$ mice on a B6 background were obtained from Ulrich Kalinke, Hannover, Germany. All mice were maintained at the INRS animal facility until use.

To generate mixed bone marrow chimeric mice, bone marrow cells from 8-12 weeks-old B6, J_HT and IFNAR$^{-/-}$ mice were mixed at a ratio of 1:4 J_HT/IFNAR$^{-/-}$ or J_HT/B6 and injected intravenously (i.v.) into lethally irradiated (2x 600 rads) B6 mice. Mice were left untouched for ≥ 5 weeks to allow for immune reconstitution as determined by flow cytometry.

All viral strains used in this paper were obtained from Rolf M. Zinkernagel, Zurich, Switzerland. Infections with LCMV Cl13, LCMV WE or VSV Indiana were carried out by i.v. injection with $2x10^6$ pfu of virus or with culture media alone (mock).

For T cell-dependent Ab response characterization, mice were immunized intraperitoneally (i.p.) with 50 µg alum-precipitated 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetic hapten conjugated to chicken gamma globulin (NP-CGG; Biosearch Technologies, Petaluma, USA)), at a ratio of 53:1, or with precipitated alum alone as a control. For T cell-independent Ab response characterization, mice were immunized i.p. with 5 µg 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetic hapten conjugated to AminoEthylCarboxyMethyl-FICOLL (NP-FICOLL; Biosearch Technologies, Petaluma, USA) in PBS, at a ratio of 40:1, or with PBS alone as a control. All mice were maintained under specific pathogen–free conditions and immunizations or adoptive transfers were carried out at 6–10 weeks of age.

Blocking Abs were used to block PD-1 and IFNAR signaling. For PD-1 blockade 250 µg of blocking Abs or isotype control (BioXcell, West Lebanon, NH, USA) were injected i.p. every 3 days starting 1 day before infection and continuing throughout the whole experiment. For IFNAR blockade, 500 µg of blocking Abs or isotype control (Leinco Technologies) were injected i.v. every 2 days starting 1 day before infection and stopping at various time points as indicated. All

animal experiments were reviewed and approved by the INRS animal care committee and in accordance with AAALAC and CCAC guidelines.

B cell *in vitro* stimulation and CFSE staining

Splenic B cells were isolated using the EasySepTM Mouse B Cell Enrichment Kit (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) according to the manufacturer's instructions. B cells were resuspended to 2 x 10^7 cells/ml in PBS containing 2% FBS and CFSE (Fisher, Waltham, MA, USA) was added to a final concentration of 1 µM. Samples were incubated for 5 min at room temperature and staining was quenched by addition of an equal amount of FBS. Cells were washed with PBS/2% FBS and resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 55 µM 2-Mercaptoethanol. 3 x 10^6 cells/well were seeded in 24-well plates and stimulated with either 10 µg/mL goat anti-mouse IgM (Jackson Immunoresearch West Grove, PA, USA) and 500 U/mL mouse IFN-β (Quansys Biosciences, Logan, UT, USA) or respective combinations and cultured (37 °C, 5% CO2) for either 7.5 hours or 4 days.

Antibodies and detection reagents

The following staining reagents were used: Anti-CD3 (145-2C11), anti-CD4 (H129,19), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD44 (IM7). anti-CD45R (RA3-6B2), anti-PD-1 (29F,1A12), anti-PD-L1 (10F.9G2), anti-ICOSL (HK5.3), anti-CD40 (HM40-3), anti-CD40L (MR1), anti-CXCR4 (L276F12), and anti-IL-4 (11b11) were from Biolegend (San Diego, CA, USA); anti-CD19 (eBio1D3), anti-ICOS (7E,17G9), anti-IL-21 (mhalx21), anti-CD69 (H1.2F3) and anti-GL7 (GL-7) were from eBiosciences (San Diego, CA, USA); anti-Bcl-6 (K112-91), anti-CXCR5 (2G8), and anti-Fas (Jo2) were from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA). PNA (B-1075; Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) was used for staining of germinal center B cells and MOMA-1 (Abcam, Cambridge, UK) for the staining of MZ macrophages.

Flow cytometry

Single-cell suspensions of splenocytes were stained on ice with the appropriate Abs in PBS containing 1% (v/v) bovine serum albumin (BSA, Fisher, Waltham, MA, USA) and 0.1% (w/v) sodium azide (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada). Nonspecific staining was blocked by 24G2 Ab against CD16/32 (Biolegend; prepared as previously described(Hannum *et al.*, 2000). Samples were fixed with 1% (v/v) paraformaldehyde and analyzed on a BD LSR II Fortessa (BD Bioscience). For intracellular cytokine staining, splenocytes were stimulated *ex vivo* for 5 h with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI, USA) (100 ng/mL), ionomycin (Sigma-Aldrich) (1 µM) and Brefeldin A (Sigma-Aldrich) (10 µg/mL). Samples were fixed and permeabilized prior to incubation with Ab in permeabilization buffer (eBiosciences). Dead cells were excluded based on positive staining with 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (BD Pharmingen), and doublets gated out using FSA-A/SSC-A. Data were analyzed with FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

$CD4^+$ T cells were magnetically selected using the EasySep system (StemCell, Vancouver, BC, Canada), frozen and conserved at -80°C. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified by Nanodrop ND-1000 (Fisher, Waltham, MA, USA). cDNA was synthesized from total RNA using the Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Applied Biosystems) and frozen at -80°C until use. Gene expression was determined by quantitative PCR using TaqMan Gene expression System (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) on a Rotor-gene 6000 system (Corbett, Concorde, Australia). Standard commercial TaqMan probes were used for IL-4, IL-21 and BAFF (Life Technologies). Samples were normalized to GAPDH and represented as fold change over mock-infected mice using the ΔΔCT method(Schmittgen *et al.*, 2008).

ELISA and ELISPOT assay

ELISAs were used to quantify both serum and cell culture-supernatant Ab levels. 96 well plates (Mabtech, Cincinnati, OH, USA) were coated overnight at 4 °C with 0.1 µg of NP-BSA conjugated

at a ratio of NP to BSA ranging from 4:1 to 26:1. Nonspecific binding was blocked with 10% (v/v) fetal bovine serum and 0,2% (v/v) Tween 20 in PBS. Horseradish peroxidase (HRP)–conjugated secondary Abs: anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2b and 2c, anti-IgG3, and anti-IgG (total IgG) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) were detected with 0.04% (w/v) o-phenylene-diamine and 0.8% H_2O_2 (v/v) in citrate buffer. Serum BAFF detection was done by coating 96-well plates overnight at 4°C with 2 µg of anti-BAFF Ab (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in carbonate buffer. Nonspecific binding was blocked with 1% (v/v) BSA in PBS. HRP-conjugated anti-BAFF secondary Ab (R&D Systems) was detected with 0.04% (w/v) o-phenylene-diamine and 0.8% H_2O_2 (v/v) in citrate buffer. Serum IFN-α and –β detection was done using Verikine kits (PBL Assay Science, Piscataway Township, NJ, USA) in conditions recommended by the company. LCMV nucleoprotein-specific IgG serum Abs were determined by ELISA using plates coated with purified recombinant LCMV nucleoprotein-GST as previously described(Chabot *et al.*, 2013).

For ASC determination by ELISPOT, a mouse IgG ELISPOT^{Plus} kit (Mabtech, Nacka Strand, Sweden) was used. Briefly, 96-well nitrocellulose plates (Millipore, Etobicoke, ON, Canada) were coated overnight at 4°C with anti-IgG antibody. Nonspecific binding was blocked with 5% (v/v) FBS in PBS. Cell suspensions obtained from spleens were added to wells (10^4 cells for detection of IgG and 10^5 for NP) in duplicate and incubated overnight at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. B cell spots were developed by sequential washes with PBS, addition of biotinylated anti-IgG or NP-BSA-Biotin, washes with PBS, addition of streptavidin-alkaline phosphatase, washes with PBS and addition of 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate substrate for 15 minutes. Spots were counted using an AID Elispot Reader (Autoimmun Diagnostika GmbH, Straβberg, Germany).

Immunochemistry

Freshly harvested spleens were flash frozen in OCT (Electron Microsopy Sciences, Hartfield, PA, USA) in liquid nitrogen, stored at -80°C and processed for sets of 10 µm section sizes with a cryostat (Microm HM 525; GMI, Ramsey, MN, USA). Tissue sections were fixed on slides in 75% acetone and 25% ethanol (v/v) for 5 minutes and incubated with primary reagent in PBS for 1 h

at room temperature. The following primary reagents were used: anti-mouse CD19-PE (RA3-6B2, eBiosciences, 1:10000) and anti-mouse MOMA-1-FITC (Abcam, Toronto, ON, Canada, 1:200). Tissue sections were then washed in PBS and incubated with a secondary Alexa 488 anti-FITC (Life Technologies) to amplify FITC signal or strep-A488 if needed. Tissue sections were then mounted with Prolong (Life Technologies), dried overnight and observed using a LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Ab secretion quantitation

Freshly prepared splenocyte suspensions were plated in triplicates in 96-well flat bottom plates at 10^5 cells per well in culture medium containing DMEM, 10% FBS, 1% streptavidin/penicillin 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate and β-mercaptoethanol. Cells were incubated for 48 hours at 37°C and culture media was harvested to quantify Ab by ELISA. This quantitation was compared to the numeration of ASCs obtained using ELISPOT to define an individual secretion per ASC cell.

LCMV nAb quantification

LCMV nAb were quantified as described previously(Lopez-Macias *et al.*, 1999). In brief, serial 2-fold dilutions of 10-fold prediluted sera were incubated with LCMV for 90 min at 37°C in 96-well plates. MC57G mouse fibroblasts were added, and incubated for 1 h to allow cells to settle and be infected by non-neutralized virus; cells were then overlaid with 1% methylcellulose in MEM. After 48 h, cell monolayers were fixed with 4% formalin and infectious foci were detected by intracellular LCMV staining of infected cells with rat anti-LCMV mAb VL-4.

Statistical analysis

Data were analyzed using the SPSS software (IBM, Markham, ON, Canada). Statistical significance was assessed with a one-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test. $P < 0.05$ was considered significant * = $p < 0.05$ ** = $p < 0.01$ *** = $p < 0{,}001$. Data are represented as means ± standard deviation (SD).

6.8. Acknowledgments

We thank S. Moir and J. Van Grevenynghe for helpful discussions and critical review of the manuscript. Data reported in the manuscript are tabulated in the main paper and in the supplementary materials. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), grant MOP-89797, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, grant 355979-2013 and the Jeanne and J.-Louis Lévesque Research Chair in Immunovirology from the J.-Louis Lévesque Foundation (A.L.); CIHR grant MOP-114972 and Canadian Foundation of Innovation Leaders Opportunity Fund infrastructure grant (J.H.F.).

6.9. Author contributions

M.D. and A.M. designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper; B.C.M. designed and performed some experiments and analyzed data; A.G. and E.T. performed some experiments; P.L. helped analyze some data; J.H.F. designed part of the study and analyzed data; A.L. initiated the study, analyzed data and organized, designed and wrote the paper.

6.10. References

Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N & Cyster JG (2004) Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5(9):943-952.

Bannard O, Horton RM, Allen CD, An J, Nagasawa T & Cyster JG (2013) Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* 39(5):912-924.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ & Ahmed R (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439(7077):682-687.

Battegay M, Moskophidis D, Waldner H, Brundler MA, Fung-Leung WP, Mak TW, Hengartner H & Zinkernagel RM (1993) Impairment and delay of neutralizing antiviral antibody responses by virus-specific cytotoxic T cells. *J Immunol* 151(10):5408-5415.

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M & Forster R (2000) Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192(11):1545-1552.

Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB & Oldstone MB (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12(11):1301-1309.

Chabot S, Fakhfakh A, Beland K, Lamarre A, Oldstone MB, Alvarez F & Djilali-Saiah I (2013) Mouse liver-specific CD8(+) T-cells encounter their cognate antigen and acquire capacity to destroy target hepatocytes. *J Autoimmun* 42:19-28.

Charles ED, Green RM, Marukian S, Talal AH, Lake-Bakaar GV, Jacobson IM, Rice CM & Dustin LB (2008) Clonal expansion of immunoglobulin M+CD27+ B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia. *Blood* 111(3):1344-1356.

Chen J, Trounstine M, Alt FW, Young F, Kurahara C, Loring JF & Huszar D (1993) Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol* 5(6):647-656.

Ciurea A, Klenerman P, Hunziker L, Horvath E, Senn BM, Ochsenbein AF, Hengartner H & Zinkernagel RM (2000) Viral persistence in vivo through selection of neutralizing antibody-escape variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6):2749-2754.

Coro ES, Chang WL & Baumgarth N (2006) Type I IFN receptor signals directly stimulate local B cells early following influenza virus infection. *J Immunol* 176(7):4343-4351.

Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, Connick E, Meditz A, Freeman GJ, Abesada-Terk G, Jr., Jacobson JM, Brooks AD, Crotty S, Estes JD, Pantaleo G, Lederman MM & Haddad EK (2013) Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 19(4):494-499.

Cumano A & Rajewsky K (1985) Structure of primary anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in normal and idiotypically suppressed C57BL/6 mice. *Eur J Immunol* 15(5):512-520.

De Milito A, Nilsson A, Titanji K, Thorstensson R, Reizenstein E, Narita M, Grutzmeier S, Sonnerborg A & Chiodi F (2004) Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* 103(6):2180-2186.

Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB & Brooks DG (2011) Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med* 208(5):987-999.

Feng J, Hu X, Guo H, Sun X, Wang J, Xu L, Jiang Z, Xu B, Niu J & Jiang Y (2012) Patients with chronic hepatitis C express a high percentage of CD4(+)CXCR5(+) T follicular helper cells. *Journal of gastroenterology* 47(9):1048-1056.

Fung-Leung WP, Kundig TM, Zinkernagel RM & Mak TW (1991) Immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice without CD8 expression. *J Exp Med* 174(6):1425-1429.

Goenka R, Matthews AH, Zhang B, O'Neill PJ, Scholz JL, Migone TS, Leonard WJ, Stohl W, Hershberg U & Cancro MP (2014) Local BLyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J Exp Med* 211(1):45-56.

Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM & Shlomchik MJ (2010) PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* 11(6):535-542.

Hannum LG, Haberman AM, Anderson SM & Shlomchik MJ (2000) Germinal center initiation, variable gene region hypermutation, and mutant B cell selection without detectable immune complexes on follicular dendritic cells. *J Exp Med* 192(7):931-942.

He B, Qiao X, Klasse PJ, Chiu A, Chadburn A, Knowles DM, Moore JP & Cerutti A (2006) HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol* 176(7):3931-3941.

Honke N, Shaabani N, Merches K, Gassa A, Kraft A, Ehrhardt K, Haussinger D, Lohning M, Dittmer U, Hengel H, Recher M, Lang PA & Lang KS (2016) Immunoactivation induced by chronic viral infection inhibits viral replication and drives immunosuppression through sustained IFN-I responses. *Eur J Immunol* 46(2):372-380.

Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ, Ciurea A, Freigang S, Hengartner H & Zinkernagel RM (2003) Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol* 4(4):343-349.

Kawamoto H, Sakaguchi K, Takaki A, Ogawa S & Tsuji T (1993) Autoimmune responses as assessed by hypergammaglobulinemia and the presence of autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. *Acta medica Okayama* 47(5):305-310.

Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F & Tough DF (2001) Type i interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14(4):461-470.

Lopez-Macias C, Kalinke U, Cascalho M, Wabl M, Hengartner H, Zinkernagel RM & Lamarre A (1999) Secondary rearrangements and hypermutation generate sufficient B cell diversity to mount protective antiviral immunoglobulin responses. *J Exp Med* 189(11):1791-1798.

McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A & O'Garra A (2015) Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15(2):87-103.

Moir S & Fauci AS (2013) Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol Rev* 254(1):207-224.

Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, Roby G, Kottilil S, Arthos J, Proschan MA, Chun TW & Fauci AS (2008) Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 205(8):1797-1805.

Moir S, Malaspina A, Pickeral OK, Donoghue ET, Vasquez J, Miller NJ, Krishnan SR, Planta MA, Turney JF, Justement JS, Kottilil S, Dybul M, Mican JM, Kovacs C, Chun TW, Birse CE &

Fauci AS (2004) Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *J Exp Med* 200(7):587-599.

Moorman JP, Zhang CL, Ni L, Ma CJ, Zhang Y, Wu XY, Thayer P, Islam TM, Borthwick T & Yao ZQ (2011) Impaired hepatitis B vaccine responses during chronic hepatitis C infection: involvement of the PD-1 pathway in regulating CD4(+) T cell responses. *Vaccine* 29(17):3169-3176.

Moskophidis D, Cobbold SP, Waldmann H & Lehmann-Grube F (1987) Mechanism of recovery from acute virus infection: treatment of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice with monoclonal antibodies reveals that Lyt-2+ T lymphocytes mediate clearance of virus and regulate the antiviral antibody response. *J Virol* 61(6):1867-1874.

Murira A, Lapierre P & Lamarre A (2016) Evolution of the Humoral Response during HCV Infection: Theories on the Origin of Broadly Neutralizing Antibodies and Implications for Vaccine Design. *Adv Immunol* 129:55-107.

Ng CT, Sullivan BM, Teijaro JR, Lee AM, Welch M, Rice S, Sheehan KC, Schreiber RD & Oldstone MB (2015) Blockade of interferon Beta, but not interferon alpha, signaling controls persistent viral infection. *Cell Host Microbe* 17(5):653-661.

Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR & Zou YR (2004) The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* 200(9):1145-1156.

Nutt SL & Tarlinton DM (2011) Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol* 12(6):472-477.

Odermatt B, Eppler M, Leist TP, Hengartner H & Zinkernagel RM (1991) Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18):8252-8256.

Oldstone MB (2015) A Jekyll and Hyde Profile: Type 1 Interferon Signaling Plays a Prominent Role in the Initiation and Maintenance of a Persistent Virus Infection. *J Infect Dis* 212 Suppl 1:S31-36.

Osokine I, Snell LM, Cunningham CR, Yamada DH, Wilson EB, Elsaesser HJ, de la Torre JC & Brooks D (2014) Type I interferon suppresses de novo virus-specific CD4 Th1 immunity during an established persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(20):7409-7414.

Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, Pahwa R & Pahwa S (2012) Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* 120(5):985-993.

Pinschewer DD, Perez M, Jeetendra E, Bachi T, Horvath E, Hengartner H, Whitt MA, de la Torre JC & Zinkernagel RM (2004) Kinetics of protective antibodies are determined by the viral surface antigen. *J Clin Invest* 114(7):988-993.

Qiao X, He B, Chiu A, Knowles DM, Chadburn A & Cerutti A (2006) Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol* 7(3):302-310.

Racanelli V, Frassanito MA, Leone P, Galiano M, De Re V, Silvestris F & Dammacco F (2006) Antibody production and in vitro behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J Virol* 80(8):3923-3934.

Rasheed MA, Latner DR, Aubert RD, Gourley T, Spolski R, Davis CW, Langley WA, Ha SJ, Ye L, Sarkar S, Kalia V, Konieczny BT, Leonard WJ & Ahmed R (2013) Interleukin-21 is a critical cytokine for the generation of virus-specific long-lived plasma cells. *J Virol* 87(13):7737-7746.

Schmittgen TD & Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3(6):1101-1108.

Steinhoff U, Muller U, Schertler A, Hengartner H, Aguet M & Zinkernagel RM (1995) Antiviral protection by vesicular stomatitis virus-specific antibodies in alpha/beta interferon receptor-deficient mice. *J Virol* 69(4):2153-2158.

Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KC, Welch M, Schreiber RD, de la Torre JC & Oldstone MB (2013) Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340(6129):207-211.

Wilson EB, Kidani Y, Elsaesser H, Barnard J, Raff L, Karp CL, Bensinger S & Brooks DG (2012) Emergence of distinct multiarmed immunoregulatory antigen-presenting cells during persistent viral infection. *Cell Host Microbe* 11(5):481-491.

Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, Aronow BJ, Karp CL & Brooks DG (2013) Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340(6129):202-207.

Yusuf I, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, Ditoro D, Hansen K, Barnett B & Crotty S (2010) Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* 185(1):190-202.

Zinkernagel RM, LaMarre A, Ciurea A, Hunziker L, Ochsenbein AF, McCoy KD, Fehr T, Bachmann MF, Kalinke U & Hengartner H (2001) Neutralizing antiviral antibody responses. *Adv Immunol* 79:1-53.

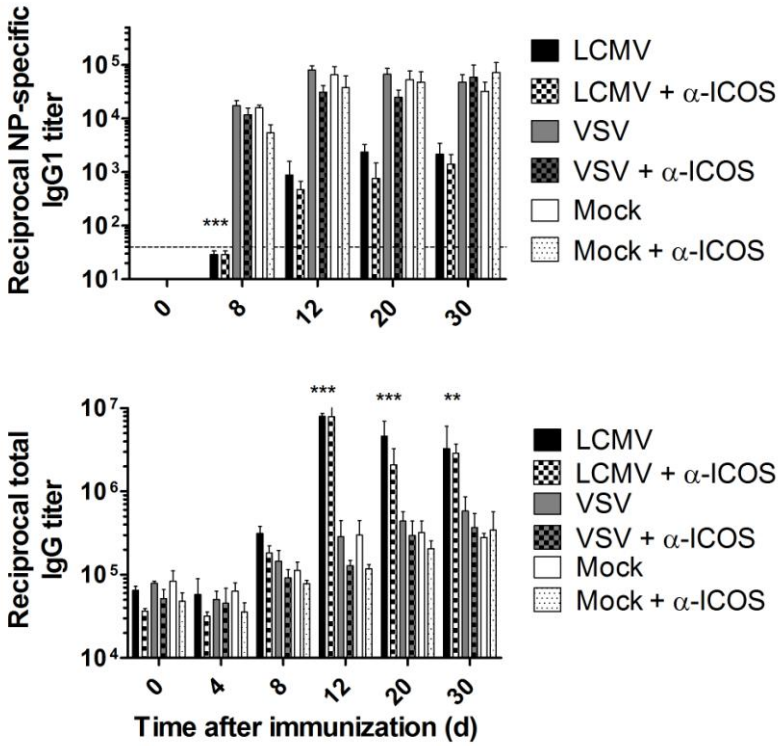
Zinkernagel RM, Leist T, Hengartner H & Althage A (1985) Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T cell activity, as well as with footpad swelling reaction, and all three are regulated by H-2D. *J Exp Med* 162(6):2125-2141.

7. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Certains résultats importants n'ont pas été inclus dans la publication présentée précédemment et se doivent d'être mentionnés dans la thèse : il s'agit de l'évaluation du rôle du TLR7 et de ICOS dans la perturbation humorale provoquée par l'infection par LCMV.

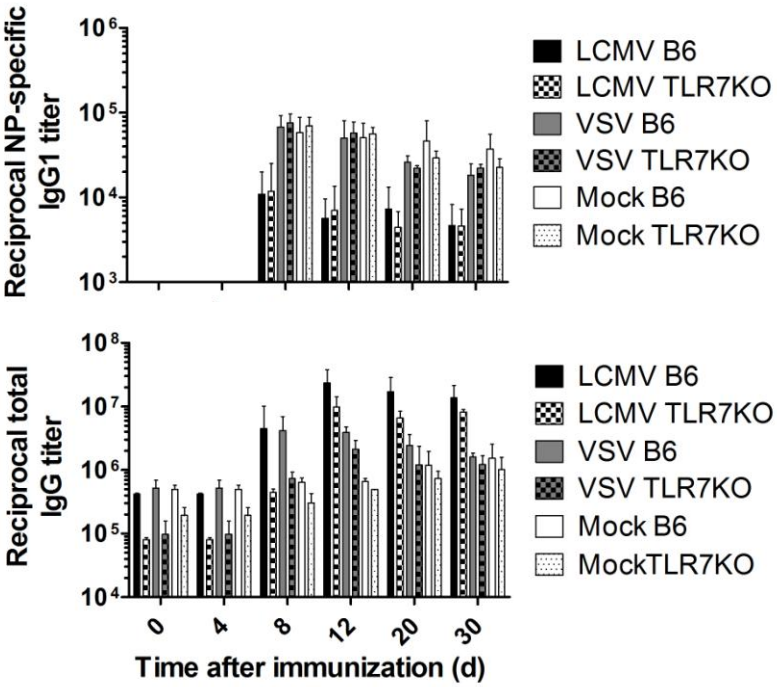
Pour évaluer cela le même protocole d'infection avec LCMV Cl13 puis d'immunisation avec le NP que précédemment a été pratiqué à la fois sur des souris C57BL/6 et des souris TLR7$^{-/-}$ ou des souris dont la signalisation d'ICOS a été bloquée à l'aide d'une Ac bloquant. Les réponses IgG1 spécifique au NP ou IgG totales ont ensuite été mesurées à l'aide d'un ELISA.

7.1. Influence de ICOS



Suite au blocage de ICOS la réponse spécifique au NP lors de l'infection LCMV Cl13 n'est pas augmentée et l'HGG est toujours présente.

7.1. Influence du TLR7



Que cela soit sur les souris C57BL/6 ou les souris TLR7$^{-/-}$, la réponse spécifique au NP lors de l'infection LCMV Cl13 n'est pas augmentée et l'HGG est toujours présente.

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

8. DISCUSSION

8.1. L'importance de la réponse humorale dans la lutte contre les infections virales chroniques

L'idée de vouloir étudier la réponse humorale dans le contexte de l'infection par LCMV peut paraître surprenante. C'est un virus qui a été longuement étudié par le passé et le paradigme actuel est que la réponse majoritaire (bien que transitoire et partielle) vienne de la composante cellulaire du système immunitaire. En effet jusqu'à ce jour et du fait de la quasi absence d'AcN (J. M. Pestka *et al.*, 2007, Tomaras *et al.*, 2008, Zinkernagel *et al.*, 2001a), l'élimination du virus est considérée comme assumée uniquement par les LT CD8, les Ac ne jouant un rôle que sur le long-terme ou dans l'éventualité d'une réinfection (Moskophidis *et al.*, 1987, Planz *et al.*, 1997, Thomsen *et al.*, 1996, Zinkernagel *et al.*, 1985).

Cependant si on essaye d'aborder le sujet avec un angle différent, il est logique d'imaginer le système immunitaire comme la balance entre ses deux composantes cellulaires et humorales. L'absence ou la réduction drastique d'une composante provoquerait un débalancement et modifierait en conséquence l'autre côté de la balance. Dans ce contexte la proéminence de la réponse cellulaire pourrait être causée par une incapacité à développer une réponse humorale précoce. Un parallèle peut d'ailleurs être tracé entre l'hypothèse que l'augmentation précoce de la population CTL serait provoquée par un manque de production précoce d'Ac et l'apparition précoce d'AcN chez des souris dans l'incapacité de développer une réponse CTL (Battegay *et al.*, 1993b). Malheureusement dans le cas du modèle LCMV, une charge trop importante repose alors sur les LT en l'absence d'une réponse Ac efficace et leur sur-activation les mènent à l'épuisement (Thomsen *et al.*, 1996). Ceci illustre donc bien l'importance pour le système immunitaire de répondre de façon équilibrée avec deux composantes travaillant de concert. L'échec de l'une entrainerait nécessairement la chute de l'autre, menant à la persistance virale. Ainsi il est tout à fait possible que de restaurer une réponse humorale efficace puisse avoir par la suite un effet collatéral positif sur la réponse cellulaire.

8.2. Impact de la chronicité

De part de nombreuses études passées, il est connu que la souche Cl13 de LCMV présente un potentiel de chronicité bien plus important que la souche WE. Cette dernière est rapidement éliminée chez la plupart des individus infectés alors que Cl13 se réplique plus vite et peut persister pendant plusieurs semaines (Bocharov *et al.*, 2004, Smelt *et al.*, 2001). En conséquence il paraissait intéressant d'étudier l'impact de cette chronicité sur la réponse humorale engendrée.

De manière globale le fait que les deux souches aient un impact sur la réponse humorale nous indique que des mécanismes ayant lieu durant la phase aigüe de l'infection jouent un rôle dans la perturbation. Il est cependant important de noter que l'effet est plus prononcé et plus durable dans le cas de Cl13, illustrant alors l'importance du maintien d'une charge virale conséquente dans le phénomène.

C'est donc bien la présence et la quantité du virus en lui-même ainsi que les mécanismes engendrés par sa présence, que cela soit durant la phase aigüe ou la phase chronique, qui sont à l'origine de la perturbation humorale observée lors de l'Infection par LCMV.

8.3. **Rôle du TLR7**

L'activation des cellules immunitaires lors de l'infection par LCMV se fait la plupart du temps suite à la détection du génome viral par le TLR7 (Gilliet *et al.*, 2008). Un environnement de stress est notamment induit par la sécrétion massive d'IFN-I observée dans les premiers jours de l'infection. Le TLR7 est également nécessaire pour le développement de LB spécifiques au virus (Walsh *et al.*, 2012), démontrant son implication dans les processus humoraux suite à l'Infection par LCMV. Il paraissait donc logique dans le cadre de ce projet d'évaluer si ce PRR était impliqué dans la perturbation humorale observée lors de l'infection par LCMV.

Or, il s'avère qu'au regard des résultats obtenus lors des expériences d'infection par LCMV Cl13 sur des souris TLR7$^{-/-}$, le TLR7 ne joue pas de rôle majeur dans l'induction de ce phénomène humoral perturbé. Le déclenchement de la sécrétion massive d'IFN doit donc nécéssairement être orchestré par d'autres PRR tels que MDA5 ou RIG-I par exemple (Y. Wang *et al.*, 2012). Étant donné qu'une des causes possibles du dérèglement humoral est la trop grande activation des LB dans le contexte LCMV, il est probable que la détection du virus y joue un rôle primordial et il serait pertinent pour la suite du projet d'investiguer les autres voies de détection pour déterminer si elles jouent un rôle dans la forte sécrétion d'IFN-I.

8.4. Les T_{FH} lors de l'infection chronique, amis ou ennemis ?

De manière générale les travaux portant sur le domaine démontrent que les sujets infectés par des virus persistants, qu'ils soient humains ou souris, présentent une population T_{FH} augmentée (Fahey *et al.*, 2011, Kong *et al.*, 2015, Lindqvist *et al.*, 2012). Nous avons par ailleurs démontré dans notre étude que lors de l'infection par LCMV les T_{FH} exprimaient de manière exacerbée des molécules de la synapse immunologique (PD-1, ICOS) et des cytokines favorisant la survie des LB (IL-4, IL-21, BAFF).

Étant donné que les molécules de la synapse immunologique sont particulièrement importantes pour la survie des LB lors de leur sélection dans les GCs (Akiba *et al.*, 2005, Goenka *et al.*, 2014, Haynes *et al.*, 2007, Rasheed *et al.*, 2013, Yusuf *et al.*, 2010), que les LB semblent « trop » survivre lors de l'infection par LCMV et que le problème semble partiellement résolu lorsque l'aide des LT est diminuée (Recher *et al.*, 2004), ces résultats posent la question à savoir si les T_{FH} exercent une action positive ou négative dans le développement de l'infection. L'augmentation de leur population est-elle la conséquence d'une tentative avortée de contrôle de l'infection ou bien d'un détournement à son avantage du système immunitaire par le virus ? Cette ambigüité est renforcée par le fait que d'un côté les T_{FH} se montrent primordiaux pour le développement d'AcN (Locci *et al.*, 2013) et le contrôle de l'infection virale (Fahey *et al.*, 2011, Harker *et al.*, 2011); mais ils ont aussi été rapportés comme délivrant des signaux inefficaces (Cubas *et al.*, 2013), comme orientant mal la réponse humorale (Cubas *et al.*, 2013, Preite *et al.*, 2015) ou comme pouvant dans un autre contexte mener à la formation d'Ac délétères pour l'organisme (Ko *et al.*, 2012, Victora *et al.*, 2010).

L'influence de la voie PD-1 sur le phénotype T_{FH} et la réponse B est connue depuis plusieurs années (Hams *et al.*, 2011). En bloquant l'expression de PD-L1 l'équipe du Dr. Fallon avait en effet réussi à améliorer la réponse humorale. Cependant dans leur cas cela avait provoqué une prolifération des T_{FH} alors que dans notre cas c'est la forte expression de PD-L1 et non son blocage qui est associée à cette prolifération. Dans le même ordre d'idée une autre équipe avait démontré l'importance de PD-1 dans la fonctionnalité des T_{FH} et leur sécrétion de cytokine

(Good-Jacobson *et al.*, 2010). Le rôle exact des molécules de la synapse immunologique durant les infections chroniques restait donc assez peu défini.

Dans l'optique où ces signaux seraient délétères pour le déroulement de la réponse humorale, nous avions choisi d'influencer les interactions T-B en perturbant les liaisons de PD-1 et ICOS avec leurs ligands. Nos résultats tendent à démontrer que, du moins lorsque bloquées individuellement, ces molécules ne jouent pas un rôle dans la perturbation humorale observée lors de l'infection par LCMV. Ceci va à l'encontre de résultats déjà démontrés dans d'autres modèles d'infection virales chroniques (Dyavar Shetty *et al.*, 2012). Cela n'exclue cependant pas que les T_{FH} agissent par le biais d'autres molécules telles que le CD40 ou l'IL-4 ou encore que la signalisation concomitante de plusieurs molécules costimulatrices soit à l'origine de phénotype humoral modifié. Il reste aussi tout à fait possible qu'ils ne jouent aucun rôle négatif durant l'infection par LCMV et que leur augmentation soit un simple effet de compensation suite à la difficulté de développement d'une réponse humorale efficace.

Récemment une autre population de LT CD4 folliculaire a été mise en évidence, les lymphocytes T folliculaires régulateurs (T_{FR}) (Chung *et al.*, 2011, Linterman *et al.*, 2011). Ces T_{FR} présentent de nombreuses caractéristiques communes avec les T_{FH}, notamment l'expression de Bcl6, CXCR5, PD-1 et ICOS, avec la différence majeure qu'ils expriment en plus Foxp3. Ils ont pour rôle principal de contrôler l'action des T_{FH} lors de la réponse immunitaire dans les GCs (Wollenberg *et al.*, 2011). Or il a été démontré qu'une action efficace des T_{FR} dans un contexte de population T_{FH} trop importante permet de diminuer cette population, redistribuer les LB adéquatement entre LZ et DZ et de retrouver un réponse humorale spécifique (Preite *et al.*, 2015). Ainsi il pourrait pour la suite du projet être intéressant d'étudier le phénotype de cette sous-population afin d'évaluer son implication dans la régulation des T_{FH} et des LB et indirectement dans la réponse humorale perturbée observée lors d'une infection par LCMV.

8.5. Hypergammaglobulinémie et perte de réponse spécifique : deux phénomènes liés ?

Dans notre étude nous avons démontré que lors d'une infection par LCMV le système immunitaire était incapable de développer une réponse en Ac spécifique au NP. Il parait raisonnable d'étendre ce résultat et d'émettre l'hypothèse que l'infection virale provoque un état d'immunosuppression humorale généralisée, diminuant la capacité de l'organisme à engendrer quelque production d'Ac spécifique que ce soit.

Ce phénomène était couplé à d'autres symptômes déjà connus par le passé tels que la splénomégalie ou encore l'HGG (Hunziker *et al.*, 2003); ou bien démontrés dans nos expériences tels qu'une augmentation des GCs ou des PCs. L'ensemble de ces symptômes semble être une conséquence logique de l'activation polyclonale des LB parallèle à l'augmentation de la charge virale lors de l'infection par LCMV (Hunziker *et al.*, 2003).

Dans l'ensemble nous avons donc là deux paramètres de la réponse à l'infection qui peuvent sembler opposés mais qui partagent une caractéristique commune : la dépendance aux LT. En effet nous avons démontré que la diminution spécifique ne s'appliquait pas pour les réponses indépendantes aux LT et il est connu que l'HGG ne se développe pas chez des souris $CD4^{-/-}$ (Hunziker *et al.*, 2003). En conséquence, il paraissait pertinent de spéculer que les deux phénomènes étaient intrinsèquement liés, découlant d'une mauvaise sélection des LB lors de la maturation d'affinité, connue pour être hautement dépendante des T_{FH}.

Cette hypothèse a cependant été finalement remise en question par nos expériences impliquant le blocage de l'action de l'IFN-I. En effet lors de nos deux approches (blocage par injection d'Ac ou par l'utilisation de chimères de moelle osseuse) nous avons observé une restitution de la réponse spécifique au NP. Cependant contrairement à nos attentes la perte de l'HGG polyclonale n'a quant à elle été observée que lors de l'utilisation des chimères, les souris bloquées par injection d'Ac conservant leur forte concentration circulante d'IgG.

Ces derniers résultats nous obligent donc à affiner notre hypothèse. Les deux phénomènes parallèles sont soit liés, soit indépendants. Cependant s'ils sont liés, ils font alors intervenir l'action de l'IFN-I sur des effecteurs cellulaires différents.

8.6. Le rôle de l'IFN-I dans l'infection par LCMV

Le système immunitaire inné joue un rôle primordial dans l'activation des populations immunitaires en réponse à une infection. Sa signalisation se concrétise par une activation de centaines de gènes d'activation ou inflammatoires qu'il semble logique de considérer pour expliquer l'environnement d'hyper-activation observé durant l'infection par LCMV. Parmi les différents effecteurs qui font partie du système inné, l'IFN-I paraissait un des plus pertinents à étudier dans la mesure où son implication dans l'activation des LB est déjà connue (Minamino *et al.*, 2012).

De manière très intéressante le fait de bloquer l'action de l'IFN-I en général a permis de restaurer une réponse spécifique au NP similaire à celle observée en l'absence d'infection. Ce résultat est majeur et démontre bien l'importance du rôle que joue l'IFN-I dans l'activation immunitaire exacerbée observée durant l'infection LCMV. Plus concrètement plusieurs hypothèses mécanistiques peuvent être formulées. En effet il est connu que le blocage de l'activité IFN-I permet une reconstitution du compartiment T du système immunitaire, initialement déréglé par LCMV (Teijaro *et al.*, 2013). Les LT CD4 jouant un rôle important dans l'activation des LB, il est tout à fait possible que l'effet de l'IFN-I sur la réponse humorale spécifique en soit un indirect médié par les LT. Il est cependant à noter que dans notre cas la réponse spécifique au NP a aussi été reconstituée dans le cas d'un blocage spécifiquement sur les LB. Ceci nous démontre bien que, sans écarter l'hypothèse d'une action conjointe sur les LT, la signalisation de l'IFN-I sur les LB est un facteur primordial pour la perte de la réponse spécifique observée lors de l'infection par LCMV.

Dans un second temps l'HGG n'a en revanche été perdue que lorsque le blocage de la voie IFN-I était effectué exclusivement sur les LB. Ce résultat apporte un nouveau regard sur le phénomène. En effet contrairement à la perte de réponse spécifique dans laquelle l'IFN-I joue un rôle négatif, activant les LB de manière trop importante; l'HGG ferait aussi intervenir au moins une autre population cellulaire sur laquelle l'IFN-I jouerait cette fois un rôle positif d'un point de vue immunitaire. Le fait que l'HGG soit un phénomène dépendants des LT nous amène à formuler l'hypothèse logique que l'une des ces autres populations sur lesquelles agirait l'IFN-I

serait les LT CD4. Il a en effet été démontré par le passé que l'IFN-I pouvait avoir un effet positif sur le développement des T_{FH} (Nakayamada *et al.*, 2014). Étudier l'HGG chez des souris dont les CD4 ne pourraient pas répondre à l'IFN-I donnerait probablement plus d'informations sur cette possibilité.

Un autre aspect intéressant concernant l'IFN-I est la reconstitution d'une architecture splénique organisée et une reconstitution de l'expression de CXCR4 suite au blocage de son action. Cette constatation met l'emphase sur l'importance pour l'action de LCMV dans la perte de cohérence de l'organisation cellulaire des follicules de la rate. Une reconstitution au moins partielle de cette organisation hautement contrôlée chez les souris bloquées pour la signalisation IFN-I corrèle en effet avec une apparition plus précoce des AcN contre le virus.

Dans l'ensemble ces résultats démontrent clairement l'implication directe de la signalisation IFN-I sur les LB dans le développement du phénotype humoral déréglé lors de l'infection par LCMV et ouvre de nouvelles avenues explicatives pour ce dérèglement.

8.7. Modèle explicatif

Si l'on prend en compte l'ensemble des données récoltées dans les études passées et celles obtenues dans notre laboratoire, un modèle explicatif peut être élaboré concernant la modification de la réponse humorale durant l'infection par LCMV (figure 21).

Les LBs, suite à l'infection par le virus, sont activés de manière polyclonale par un mécanisme dont la nature est encore inconnue et migrent de façon massive dans les GCs de la rate. Ceci explique notamment les augmentations de ces derniers en taille et en nombre de cellules observées dans notre étude. Ils vont subir l'HMS et une prolifération clonale exacerbée dans la DZ puis migrer massivement vers la LZ. Seulement cet afflux disproportionné de cellules à sélectionner entraine une pression de sélection accrue sur les LB. De plus la trop grande disponibilité des signaux de survie (ou de signaux de survie inadéquats) dispensés par des T_{FH} eux aussi trop nombreux, normalement facteur limitant pour la bonne sélection des LB de haute affinité entrainent une mauvaise sélection. Cette aide inappropriée des T_{FH} est d'ailleurs une hypothèse qui a déjà été avancée dans le cas de l'infection par le VIH (Cubas *et al.*, 2013).

Bien qu'une bonne partie des LB polyactivés meurt, des LBs qui en temps normal ne devraient pas recevoir de signaux de survie passent au travers d'un environnement permissif et peuvent retourner proliférer dans la DZ ou sortir des GCs en temps que PC à courte durée de vie, sécrétant des Ac ne présentant aucun intérêt immunitaire immédiat dans la lutte contre l'infection. Ils entrainent alors une sécrétion massive d'IgG, causant l'HGG mesurable dans le sérum des souris infectées.

En parallèle de cela les LB spécifiques du NP ou des épitopes viraux, dilués dans la masse des LB polyactivés, ne reçoivent quant à eux pas aussi rapidement que nécessaire (voir pas du tout) de la part des T_{FH} les signaux appropriés pour retourner dans la DZ poursuivre leur maturation. Une partie d'entre eux meurt alors qu'elle devrait survivre dans un contexte normal et le développement de ceux qui survivent prend plus de temps. Lorsque l'infection progresse, les LB polyclonaux sont moins activés et viennent donc moins faire compétition aux LB spécifiques, entrainant le développement d'une réponse spécifique qui demeure efficace mais désormais décalée dans le temps.

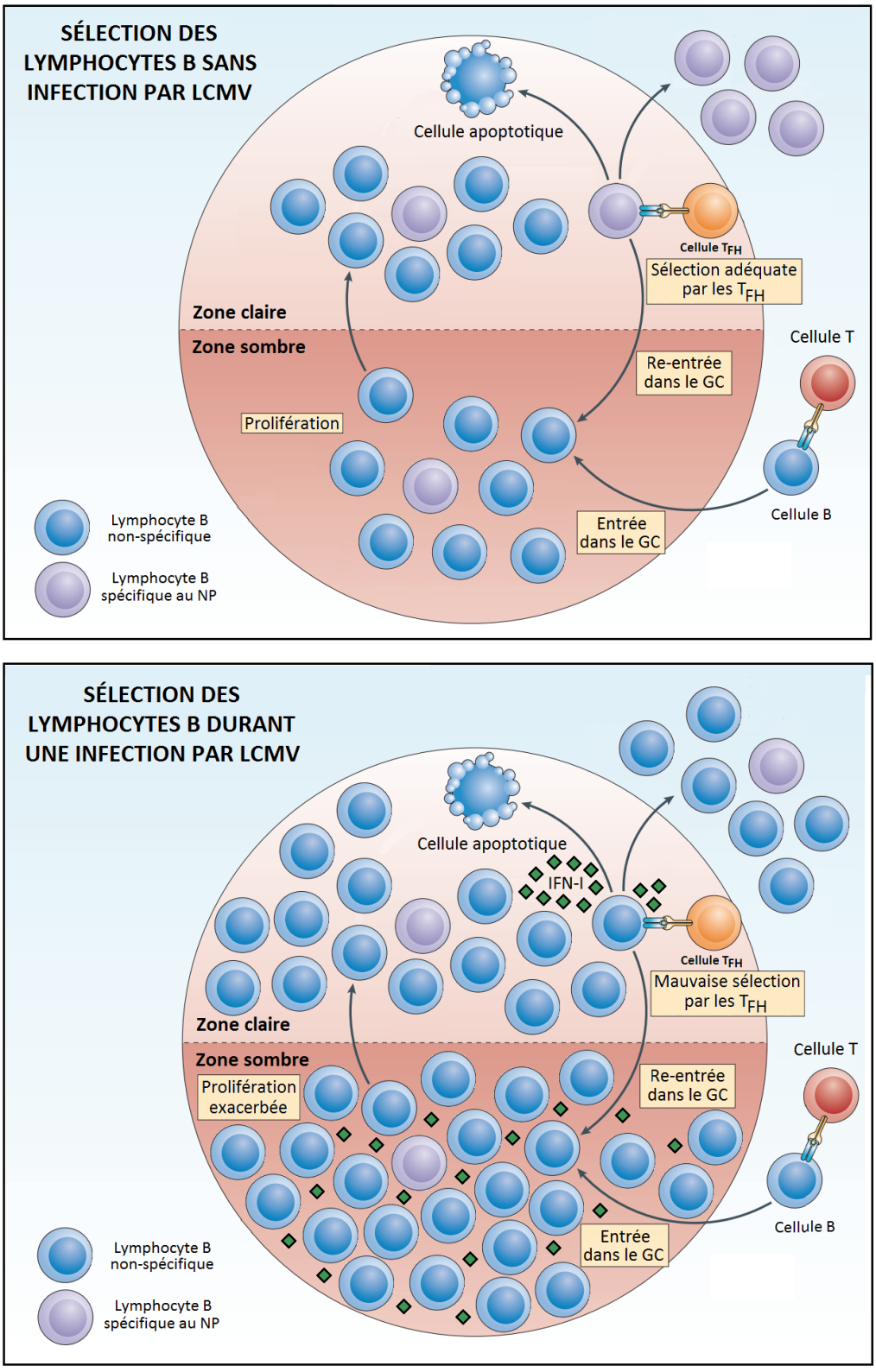


Figure 21 : Modèle explicatif de la modification de la réponse humorale dans le contexte d'une infection par LCMV

8.8. Perspectives pour le traitement des infections chroniques humaines

Il était déjà connu que l'infection par LCMV pouvait avoir des répercussions sur des réponses humorales non reliées, notamment dans le contexte de co-infection (Pinschewer *et al.*, 2004). Cependant les différentes études pratiquées par d'autres équipes étaient centrées sur des Ag issus d'hôtes eux-aussi infectieux et provoquant donc potentiellement des effets intrinsèques. La nouveauté de notre approche consistait justement à s'affranchir de cette composante infectieuse en utilisant un Ag inerte. L'utilisation de chimères de moelle osseuses nous a aussi permis d'étudier les effets de l'interféron en ciblant les LB, sans toucher les autres composantes du système immunitaire qui y sont intimement liées, commes la composante cellulaire par exemple.

Comme résumé dans la figure 22, sur plusieurs aspects les résultats que nous avons obtenus miment des phénomènes déjà observés durant les infections chroniques humaines, démontrant une nouvelle fois la pertinence du modèle LCMV et ouvrant de nouvelles pistes dans la recherche d'explications à la suppression immunitaire provoquée par les infections chroniques.

À l'instar de ses équivalents humains VHC et VIH (Cubas *et al.*, 2013, Feng *et al.*, 2012), nous avons observé dans le cadre de l'infection LCMV une augmentation du nombre des T_{FH} et une modification de l'expression de certaines molécules de la synapse immunologique. À cet égard la voie PD-1/PD-L1 a été particulièrement étudiée du fait de son importance en tant que mécanisme de contrôle de la réponse. Cependant d'autres molécules costimulatrices comme par exemple ICOS pourraient aussi jouer un rôle.

CARACTÉRISTIQUE	LCMV	VIH	VHC	RÉFÉRENCES
Épuisement des lymphocytes T	X	X	X	(Klenerman *et al.*, 2005, Mueller *et al.*, 2009, Owusu Sekyere *et al.*, 2015)
Forte expression de PD-1 sur les lymphocytes T	**X**	X	X	(Barber *et al.*, 2006, Day *et al.*, 2006, Nakamoto *et al.*, 2008)
Augmentation du nombre de T_{FH}	**X**	X	X	(Cubas *et al.*, 2013, Feng *et al.*, 2012)
Production d'IL-21 par les CD4	**Aug.**	Dim.	Dim.	(Iannello *et al.*, 2010, Spaan *et al.*, 2015)
Molécules de la synapse immunologique modifiées	**X**	X	X	(Cubas *et al.*, 2013, D. Wang *et al.*, 2013)
Expansion des centres germinatifs	**X**	X		(Phetsouphanh *et al.*, 2014)
Hyperactivation des LB	**X**	X	X	(Racanelli *et al.*, 2006, Tompkins *et al.*, 2008)
Apparition tardive des anticorps neutralisants	**X**	X	X	(Bergthaler *et al.*, 2009, Gray *et al.*, 2007, Murira *et al.*, 2016)
Hypergammaglobulinémie	**X**	X	X	(De Milito *et al.*, 2004, Hunziker *et al.*, 2003, Racanelli *et al.*, 2006)
Mécanisme d'échappement à l'action des Ac	X	X	X	(Hangartner *et al.*, 2006b, Richard *et al.*, 2016, Wahid *et al.*, 2013)
Forte sécrétion d'IFN-I dans les premiers jours de l'infection	**X**	X		(G. A. Hardy *et al.*, 2013, Y. Wang *et al.*, 2012)

Figure 22 : Paramètres communs des réponses immunitaires provoquées par LCMV, VHC et VIH Les points indiqués en rouge font référence aux résultats obtenus durant les expériences présentées dans la thèse.

Bien que nous ayons démontré l'augmentation de l'expression d'ICOS lors de l'infection LCMV, peu d'études existent dans le contexte des infections humaines. Il est cependant connu que son expression est diminuée durant l'infection par le VIH (Cubas *et al.*, 2013) alors que la ribavirine diminue l'expression d'ICOS chez les LT CD4, corrélant avec l'élimination de VHC (Atsukawa *et al.*, 2012). Les interactions B-T sont des processus très complexes et bien que les blocages individuels de certains de ces effecteurs (PD-1, ICOS) dans notre modèle n'aient pas provoqués d'effet sur la réponse humorale, c'est peut-être leur action conjointe qui entraine un mécanisme délétère. Il est aussi tout à fait possible que d'autres molécules déréglées de la synapse (comme par exemple les cytokines sécrétées) puissent jouer un rôle. Ceci reste cependant à étudier dans la mesure où nous avons démontré une augmentation de sécrétion d'IL-21 par les T_{FH} chez LCMV alors que les deux infections humaines montrent quant à elles une réduction (Iannello *et al.*, 2010, Spaan *et al.*, 2015).

Dans un autre ordre d'idée LCMV, VIH et VHC présentent des similitudes dans le phénotype et le développement des lymphocytes B. On observe une modification dans la formation des GC, une hyperactivation des LB, une hypergammaglobulinémie et une apparition tardive des AcN. Dans ce contexte nous avons montré sur les LB une variation de l'expression de CXCR4, récepteur de chimiokine jouant important dans l'organisation des GC. Ceci traduit une potentielle action de l'infection par LCMV sur le traffic des populations cellulaires et cela pourrait s'avérer une avenue à creuser. En effet il a été démontré que dans le cas d'une infection par le VIH une augmentation du CXCL13 (chimiokine impliquée dans le traffic des cellules dans les GCs) dans le sang était associée au développement d'AcN contre le virus (Havenar-Daughton *et al.*, 2016).

La recherche en prévention et traitement des infections virales chroniques est un domaine en constante évolution. Et effet il s'agit d'un enjeu majeur puisque bien que des traitements efficaces aient été développés contre HCV par exemple, ils représentent un coût important et on constate qu'ils n'enrayent pas la propagation de la maladie.

Les traitements ont beaucoup évolué dans les dernières années. Une avenue particulièrement utilisée auparavant pour la lutte contre HCV est la thérapie basée sur l'injection d'IFN pegylé couplé ou non à des antiviraux. L'injection de PEG-IFN avait pour but de stimuler le système

immunitaire en créant un environnement de stress infectieux. Ce traitement ne faisait cependant pas consensus puisque la plupart des études contenaient de petits nombres de sujets et les effets observés étaient variables en fonction du génotype infectant le patient (Berenguer, 2008). De plus les nombreux effets secondaires avaient par le passé écarté la possibilité de traiter certains patients à cause de leur mauvaise condition de santé initiale.

Nos résultats dans la présente étude tempèrent une nouvelle fois le bien fondé de l'utilisation de l'IFN pour le traitement des infections chroniques. En effet s'il peut avoir des effets positifs concernant la défense contre les mécanismes viraux en général, nous démontrons que cela pourrait potentiellement être au détriment d'une réponse humorale efficace. Augmenter l'activation des cellules par des injections régulières d'IFN pourrait ne faire qu'exacerber l'HGG et la perte d'Ac antiviraux durant les infections chroniques. À cause de son efficacité limitée et de ses nombreux défauts le paradigme est en train de changer et les nouveaux traitements font maintenant plus appel à des antiviraux ayant un effet directement sur le virus plutôt qu'à des molécules stimulant le système immunitaire.

De plus en plus la communauté scientifique réalise que le seul moyen de réellement arrêter la propagation de ces virus sera par le développement de vaccins pouvant être utilisés à la fois en prophylaxie et en thérapie. D'ailleurs de très nombreuses études parallèles tentent de provoquer des réponses à la fois humorale et cellulaires contre les différentes protéines de ces virus (Folgori *et al.*, 2006, Houghton, 2011, Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Cependant plusieurs difficultés apparaissent dans le cas des virus persistants. Dans un premier temps ces virus présentent une forte variabilité génotypique, obligeant les vaccins à se concentrer sur les séquences communes aux différents génotypes afin d'avoir une efficacité optimale. De plus les virus possèdent un haut taux de mutation natif leur conférant une forte capacité à échapper aux Ac et aux LT CD8.

Cependant le souci principal réside dans le fait que ces virus induisent un état d'immunodépression généralisé dans lequel les LT sont épuisés et qui restreint fortement toute capacité à produire des Ac spécifiques pendant l'infection. Dans ce contexte toute stimulation extérieure est d'autant plus difficile, comme cela a pu être constaté avec la difficulté à répondre aux vaccins qui leurs sont injectés qu'éprouvent des patients atteints de l'hépatite C

ou du SIDA (De Milito *et al.*, 2004, Pallikkuth *et al.*, 2012, Yao *et al.*, 2013). Ainsi les résultats de ce projet de recherche, qui mime l'injection d'un vaccin dans un contexte d'infection virale chronique, offrent de nouvelles possibilités pour la compréhension de cet état d'immunosuppression. Si les résultats obtenus avec LCMV peuvent s'extrapoler aux virus humains, une intervention sur la voie de l'IFN durant des infections par HIV ou HCV pourrait bien s'avérer une bonne manière de s'assurer d'une réponse efficace à un éventuel vaccin. Par contre, il faudra prendre garde à ne pas bloquer totalement cette voie antivirale essentielle et trouver des approches thérapeutiques ciblées permettant la restauration d'une réponse immunitaire efficace.

8.9. Perspectives de poursuite du projet

Dans le cadre de ce projet de nombreuses nouvelles informations ont été rassemblées concernant la perturbation immunitaire provoquée par LCMV, ouvrant de nouvelles pistes d'explications.

Dans un premier temps nous avons mis en évidence une augmentation des T_{FH} et des leur signaux de survie transmis au LB durant la phase de sélection de la maturation d'affinité. Bien que le blocage de certains de ces signaux n'ai pas permis d'améliorer le phénotype perturbé observé durant l'infection par LCMV, de nombreuses pistes restent encore à explorer à leur propos. Il serait notamment pertinent d'étudier l'effet des cytokines sécrétées par les T_{FH} telles que les Il-4 et 21 ainsi que BAFF, des facteurs primordiaux pour assurer la survie des LB. Il pourrait d'ailleurs être aussi pertinent d'étudier l'implication et les interactions entrenues avec le dernier intervenant majeur dans cette sélection : les cellules dendritiques folliculaires.

Dans un autre ordre d'idée nous avons mis en évidence une variation de l'expression de CXCR4 sur les LB totaux mais pas sur les LB GC. Cette donnée particulièrement intéressante nous laisse à penser qu'une des perturbations possible pourrait se situer dans le traffic des LB dans les follicules et les GC. Une étude plus poussée des récepteurs tels que le CXCR4 ou le CXCR5 ainsi que des chimiokines qui leur sont associées (CXCL12, CXCL13) pourrait s'avérer clé dans la compréhension du phénomène de perturbation d'apparition des Ac.

Pour terminer le résultat majeur de notre étude réside dans la démonstration de l'implication de la signalisation de l'IFN-I directement sur les LB. Les mécanismes sousjacents de cette action restent cependant encore à déterminer. Est-ce dû à une modification du rôle de certaines molécules afférentes de la voie de signalisation telles que les protéines STAT ? Et si oui de que manière le virus agit-t-il sur ces protéines ?

9. CONCLUSION

La compréhension du phénomène d'immunosuppression lors des infections chroniques représente un défi depuis leur découverte. Les facteurs viraux et immunitaires pouvant en être responsable sont tellement nombreux que les mécanismes qui en découlent sont nécessairement multiples et complexes.

Nos travaux apportent une pierre à l'édifice dans la compréhension de ces mécanismes. Nous avons pu démontrer que LCMV provoque une dépression générale dans la production d'Ac spécifiques et que ce phénomène s'accompagnait d'une forte croissance des populations T_{FH} et LB de la DZ des GCs, deux populations majeures impliquées dans la maturation des LB. Un blocage d'IFNAR spécifiquement sur les LB nous a permis de retrouver des réponses humorales spécifiques et générales normales et d'accélérer l'apparition des AcN contre le virus.

Étant donné la difficulté à déclencher des réponses humorales efficaces chez les patients atteints d'infections chroniques, nos travaux offrent de nouveaux outils pour potentiellement faciliter la conception de vaccins contre ces maladies. Plusieurs zones d'ombre restent cependant à éclaircir. Il faudra dans un premier temps déterminer si cette particularité de LCMV s'applique aussi à ses équivalents humains. Une compréhension plus profonde du mode d'action de l'IFN-I constitue aussi une piste de recherche qui se doit d'être explorée. Enfin, l'étude des autres partenaires cellulaires pouvant être impliqués dans le phénomène (T_{FH}, T_{FR}, FDC) permettrait d'avoir un paysage plus complet de l'influence de l'infection par LCMV sur la réponse immunitaire humorale.

10. RÉFÉRENCES

Aghemo A, Degasperi E & Colombo M (2013) Directly acting antivirals for the treatment of chronic hepatitis C: unresolved topics from registration trials. *Dig Liver Dis* 45(1):1-7.

Aiuti F & Mezzaroma I (2006) Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. *AIDS reviews* 8(2):88-97.

Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, Ma J, Tezuka K, Yagita H & Okumura K (2005) The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol* 175(4):2340-2348.

Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N & Cyster JG (2004) Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5(9):943-952.

Allen CD, Okada T & Cyster JG (2007) Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27(2):190-202.

Alvarez-Lajonchere L, Shoukry NH, Gra B, Amador-Canizares Y, Helle F, Bedard N, Guerra I, Drouin C, Dubuisson J, Gonzalez-Horta EE, Martinez G, Marante J, Cinza Z, Castellanos M & Duenas-Carrera S (2009) Immunogenicity of CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, in HCV-chronically infected individuals in a Phase I clinical trial. *J Viral Hepat* 16(3):156-167.

Armstrong C & Lillie RD (1934) Experimental Lymphocytic Choriomeningitis of Monkeys and Mice Produced by a Virus Encountered in Studies of the 1933 St. Louis Encephalitis Epidemic. *Public Health Reports (1896-1970)* 49(35):1019-1027.

Arumugaswami V, Remenyi R, Kanagavel V, Sue EY, Ngoc Ho T, Liu C, Fontanes V, Dasgupta A & Sun R (2008) High-resolution functional profiling of hepatitis C virus genome. *PLoS Pathog* 4(10):e1000182.

Atsukawa M, Nakatsuka K, Kobayashi T, Shimizu M, Tamura H, Harimoto H, Takahashi H & Sakamoto C (2012) Ribavirin downmodulates inducible costimulator on CD4+ T cells and their interleukin-10 secretion to assist in hepatitis C virus clearance. *J Gastroenterol Hepatol* 27(4):823-831.

Bachmann MF, Wolint P, Walton S, Schwarz K & Oxenius A (2007) Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol* 37(6):1502-1512.

Ballesteros-Tato A, Leon B, Graf BA, Moquin A, Adams PS, Lund FE & Randall TD (2012) Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* 36(5):847-856.

Bannard O, Horton RM, Allen CD, An J, Nagasawa T & Cyster JG (2013) Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* 39(5):912-924.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ & Ahmed R (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439(7077):682-687.

Barr JN, Whelan SP & Wertz GW (2002) Transcriptional control of the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Biochimica et biophysica acta* 1577(2):337-353.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W & Montagnier L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599):868-871.

Batista FD & Harwood NE (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9(1):15-27.

Battegay M, Kyburz D, Hengartner H & Zinkernagel RM (1993a) Enhancement of disease by neutralizing antiviral antibodies in the absence of primed antiviral cytotoxic T cells. *European Journal of Immunology* 23(12):3236-3241.

Battegay M, Moskophidis D, Waldner H, Brundler MA, Fung-Leung WP, Mak TW, Hengartner H & Zinkernagel RM (1993b) Impairment and delay of neutralizing antiviral antibody responses by virus-specific cytotoxic T cells. *J Immunol* 151(10):5408-5415.

Batten M, Ramamoorthi N, Kljavin NM, Ma CS, Cox JH, Dengler HS, Danilenko DM, Caplazi P, Wong M, Fulcher DA, Cook MC, King C, Tangye SG, de Sauvage FJ & Ghilardi N (2010) IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J Exp Med* 207(13):2895-2906.

Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A & Sallusto F (2013) Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* 38(3):596-605.

Berenguer M (2008) Systematic review of the treatment of established recurrent hepatitis C with pegylated interferon in combination with ribavirin. *Journal of hepatology* 49(2):274-287.

Bergthaler A, Flatz L, Verschoor A, Hegazy AN, Holdener M, Fink K, Eschli B, Merkler D, Sommerstein R, Horvath E, Fernandez M, Fitsche A, Senn BM, Verbeek JS, Odermatt B, Siegrist CA & Pinschewer DD (2009) Impaired antibody response causes persistence of prototypic T cell-contained virus. *PLoS Biol* 7(4):e1000080.

Boak JL, Mitchison NA & Pattisson PH (1971) The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. 3. The anatomical distribution of helper cells and antibody-forming-cell-precursors. *Eur J Immunol* 1(2):63-65.

Bocharov G, Ludewig B, Bertoletti A, Klenerman P, Junt T, Krebs P, Luzyanina T, Fraser C & Anderson RM (2004) Underwhelming the immune response: effect of slow virus growth on CD8+-T-lymphocyte responses. *J Virol* 78(5):2247-2254.

Borrow P & Oldstone MB (1994) Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* 198(1):1-9.

Braun W & Levy HB (1972) Interferon preparations as modifiers of immune responses. *Proc Soc Exp Biol Med* 141(3):769-773.

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M & Forster R (2000) Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192(11):1545-1552.

Britton S, Mitchison NA & Rajewsky K (1971) The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. IV. Uptake of antigen in vitro and failure to obtain cooperative induction in vitro. *Eur J Immunol* 1(2):65-68.

Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, Porichis F, Le Gall S, Waring MT, Moss K, Jessen H, Pereyra F, Kavanagh DG, Walker BD & Kaufmann DE (2009) IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 114(2):346-356.

Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB & Oldstone MB (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12(11):1301-1309.

Buchmeier MJ, Welsh RM, Dutko FJ & Oldstone MB (1980) The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Adv Immunol* 30:275-331.

Burns JW & Buchmeier MJ (1991) Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 183(2):620-629.

Burri DJ, da Palma JR, Kunz S & Pasquato A (2012) Envelope glycoprotein of arenaviruses. *Viruses* 4(10):2162-2181.

Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov EV, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP & Oldstone MB (1998) Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282(5396):2079-2081.

Capra JD & Kehoe JM (1975) Hypervariable regions, idiotypy, and the antibody-combining site. *Adv Immunol* 20:1-40.

Carsetti R, Kohler G & Lamers MC (1995) Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* 181(6):2129-2140.

Chabot S, Fakhfakh A, Beland K, Lamarre A, Oldstone MB, Alvarez F & Djilali-Saiah I (2013) Mouse liver-specific CD8(+) T-cells encounter their cognate antigen and acquire capacity to destroy target hepatocytes. *J Autoimmun* 42:19-28.

Charles ED, Green RM, Marukian S, Talal AH, Lake-Bakaar GV, Jacobson IM, Rice CM & Dustin LB (2008) Clonal expansion of immunoglobulin M+CD27+ B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia. *Blood* 111(3):1344-1356.

Charrel RN, de Lamballerie X & Emonet S (2008) Phylogeny of the genus Arenavirus. *Curr Opin Microbiol* 11(4):362-368.

Chen J, Baig E & Fish EN (2004) Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* 24(12):687-698.

Chen J, Trounstine M, Alt FW, Young F, Kurahara C, Loring JF & Huszar D (1993) Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol* 5(6):647-656.

Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, Lao C & Crotty S (2011) ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34(6):932-946.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW & Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244(4902):359-362.

Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS & Mackay CR (2004) T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* 173(1):68-78.

Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, Wang YH, Lim H, Reynolds JM, Zhou XH, Fan HM, Liu ZM, Neelapu SS & Dong C (2011) Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med* 17(8):983-988.

Ciurea A, Hunziker L, Zinkernagel RM & Hengartner H (2001) Viral escape from the neutralizing antibody response: the lymphocytic choriomeningitis virus model. *Immunogenetics* 53(3):185-189.

Ciurea A, Klenerman P, Hunziker L, Horvath E, Senn BM, Ochsenbein AF, Hengartner H & Zinkernagel RM (2000) Viral persistence in vivo through selection of neutralizing antibody-escape variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6):2749-2754.

Clegg JC (2002) Molecular phylogeny of the arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 262:1-24.

Clingan JM & Matloubian M (2013) B Cell-intrinsic TLR7 signaling is required for optimal B cell responses during chronic viral infection. *J Immunol* 191(2):810-818.

Colonna M, Trinchieri G & Liu YJ (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5(12):1219-1226.

Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P & Walker CM (1999) Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10(4):439-449.

Coro ES, Chang WL & Baumgarth N (2006) Type I IFN receptor signals directly stimulate local B cells early following influenza virus infection. *J Immunol* 176(7):4343-4351.

Coutinho A & Moller G (1975) Thymus-independent B-cell induction and paralysis. *Adv Immunol* 21:113-236.

Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, Connick E, Meditz A, Freeman GJ, Abesada-Terk G, Jr., Jacobson JM, Brooks AD, Crotty S, Estes JD, Pantaleo G, Lederman MM & Haddad EK (2013) Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 19(4):494-499.

Cumano A & Rajewsky K (1985) Structure of primary anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in normal and idiotypically suppressed C57BL/6 mice. *Eur J Immunol* 15(5):512-520.

Cyster JG (2005) Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23:127-159.

Davis AC, Roux KH & Shulman MJ (1988) On the structure of polymeric IgM. *Eur J Immunol* 18(7):1001-1008.

Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ & Walker BD (2006) PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443(7109):350-354.

De Milito A, Nilsson A, Titanji K, Thorstensson R, Reizenstein E, Narita M, Grutzmeier S, Sonnerborg A & Chiodi F (2004) Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* 103(6):2180-2186.

Di Noia JM & Neuberger MS (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76:1-22.

Diedrich G (2006) How does hepatitis C virus enter cells? *FEBS J* 273(17):3871-3885.

Dunnick W, Hertz GZ, Scappino L & Gritzmacher C (1993) DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res* 21(3):365-372.

Durbeej M, Henry MD, Ferletta M, Campbell KP & Ekblom P (1998) Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 46(4):449-457.

Dyavar Shetty R, Velu V, Titanji K, Bosinger SE, Freeman GJ, Silvestri G & Amara RR (2012) PD-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. *J Clin Invest* 122(5):1712-1716.

Eichler R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk HD & Garten W (2003) Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. *EMBO Rep* 4(11):1084-1088.

Eichler R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk HD & Garten W (2004) Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended endoplasmic reticulum luminal region. *J Biol Chem* 279(13):12293-12299.

Elsaesser H, Sauer K & Brooks DG (2009) IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* 324(5934):1569-1572.

Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, Yusuf I & Crotty S (2011) IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS ONE* 6(3).

Fahey LM & Brooks DG (2010) Opposing positive and negative regulation of T cell activity during viral persistence. *Curr Opin Immunol* 22(3):348-354.

Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB & Brooks DG (2011) Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med* 208(5):987-999.

Fazilleau N, Eisenbraun MD, Malherbe L, Ebright JN, Pogue-Caley RR, McHeyzer-Williams LJ & McHeyzer-Williams MG (2007) Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat Immunol* 8(7):753-761.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ & Holland PV (1975) Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 292(15):767-770.

Feng J, Hu X, Guo H, Sun X, Wang J, Xu L, Jiang Z, Xu B, Niu J & Jiang Y (2012) Patients with chronic hepatitis C express a high percentage of CD4(+)CXCR5(+) T follicular helper cells. *Journal of gastroenterology* 47(9):1048-1056.

Ferguson SE, Han S, Kelsoe G & Thompson CB (1996) CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol* 156(12):4576-4581.

Flanagan EB, Zamparo JM, Ball LA, Rodriguez LL & Wertz GW (2001) Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *J Virol* 75(13):6107-6114.

Folgori A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, Pezzanera M, Tafi R, Arcuri M, Fattori E, Lahm A, Luzzago A, Vitelli A, Colloca S, Cortese R & Nicosia A (2006) A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 12(2):190-197.

Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE & Noelle RJ (1996) Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 14:591-617.

Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E & Noelle RJ (1994) gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J Exp Med* 180(1):157-163.

Fung-Leung WP, Kundig TM, Zinkernagel RM & Mak TW (1991a) Immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice without CD8 expression. *J Exp Med* 174(6):1425-1429.

Fung-Leung WP, Schilham MW, Rahemtulla A, Kundig TM, Vollenweider M, Potter J, van Ewijk W & Mak TW (1991b) CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 65(3):443-449.

Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, Hengartner H & Zinkernagel R (1998) Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* 187(9):1383-1393.

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J & Popovic M (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599):865-867.

Gathings WE, Lawton AR & Cooper MD (1977) Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. *Eur J Immunol* 7(11):804-810.

Gil MP, Ploquin MJ, Watford WT, Lee SH, Kim K, Wang X, Kanno Y, O'Shea JJ & Biron CA (2012) Regulating type 1 IFN effects in CD8 T cells during viral infections: changing STAT4 and STAT1 expression for function. *Blood* 120(18):3718-3728.

Gilliet M, Cao W & Liu YJ (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8(8):594-606.

Gitlin AD, Shulman Z & Nussenzweig MC (2014) Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* 509(7502):637-640.

Glatman Zaretsky A, Taylor JJ, King IL, Marshall FA, Mohrs M & Pearce EJ (2009) T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med* 206(5):991-999.

Goenka R, Barnett LG, Silver JS, O'Neill PJ, Hunter CA, Cancro MP & Laufer TM (2011) Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *J Immunol* 187(3):1091-1095.

Goenka R, Matthews AH, Zhang B, O'Neill PJ, Scholz JL, Migone TS, Leonard WJ, Stohl W, Hershberg U & Cancro MP (2014) Local BLyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J Exp Med* 211(1):45-56.

Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM & Shlomchik MJ (2010) PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* 11(6):535-542.

Good KL, Bryant VL & Tangye SG (2006) Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J Immunol* 177(8):5236-5247.

Good RA & Zak SJ (1956) Disturbances in gamma globulin synthesis as experiments of nature. *Pediatrics* 18(1):109-149.

Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghrayeb J, Murthy KK, Rice CM & Walker CM (2003) HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302(5645):659-662.

Gray ES, Moore PL, Choge IA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Li H, Leseka N, Treurnicht F, Mlisana K, Shaw GM, Karim SS, Williamson C & Morris L (2007) Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* 81(12):6187-6196.

Green KA, Okazaki T, Honjo T, Cook WJ & Green WR (2008) The programmed death-1 and interleukin-10 pathways play a down-modulatory role in LP-BM5 retrovirus-induced murine immunodeficiency syndrome. *J Virol* 82(5):2456-2469.

Haas A, Zimmermann K & Oxenius A (2011) Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. *J Virol* 85(23):12102-12113.

Hams E, McCarron MJ, Amu S, Yagita H, Azuma M, Chen L & Fallon PG (2011) Blockade of b7-h1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. *J Immunol* 186(10):5648-5655.

Han S, Zheng B, Dal Porto J & Kelsoe G (1995) In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. IV. Affinity-dependent, antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers as a mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med* 182(6):1635-1644.

Hangartner L, Zellweger RM, Giobbi M, Weber J, Eschli B, McCoy KD, Harris N, Recher M, Zinkernagel RM & Hengartner H (2006a) Nonneutralizing antibodies binding to the surface glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus reduce early virus spread. *J Exp Med* 203(8):2033-2042.

Hangartner L, Zinkernagel RM & Hengartner H (2006b) Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol* 6(3):231-243.

Hannedouche S, Zhang J, Yi T, Shen W, Nguyen D, Pereira JP, Guerini D, Baumgarten BU, Roggo S, Wen B, Knochenmuss R, Noel S, Gessier F, Kelly LM, Vanek M, Laurent S, Preuss I, Miault C, Christen I, Karuna R, Li W, Koo DI, Suply T, Schmedt C, Peters EC, Falchetto R, Katopodis A, Spanka C, Roy MO, Detheux M, Chen YA, Schultz PG, Cho CY, Seuwen K, Cyster JG & Sailer AW (2011) Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature* 475(7357):524-527.

Hannum LG, Haberman AM, Anderson SM & Shlomchik MJ (2000) Germinal center initiation, variable gene region hypermutation, and mutant B cell selection without detectable immune complexes on follicular dendritic cells. *J Exp Med* 192(7):931-942.

Hardy GA, Sieg S, Rodriguez B, Anthony D, Asaad R, Jiang W, Mudd J, Schacker T, Funderburg NT, Pilch-Cooper HA, Debernardo R, Rabin RL, Lederman MM & Harding CV (2013) Interferon-alpha is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PLoS ONE* 8(2):e56527.

Hardy MP, Owczarek CM, Trajanovska S, Liu X, Kola I & Hertzog PJ (2001a) The soluble murine type I interferon receptor Ifnar-2 is present in serum, is independently regulated, and has both agonistic and antagonistic properties. *Blood* 97(2):473-482.

Hardy MP, Sanij EP, Hertzog PJ & Owczarek CM (2003) Characterization and transcriptional analysis of the mouse Chromosome 16 cytokine receptor gene cluster. *Mamm Genome* 14(2):105-118.

Hardy RR & Hayakawa K (2001b) B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19:595-621.

Harker JA, Dolgoter A & Zuniga EI (2013) Cell-intrinsic IL-27 and gp130 cytokine receptor signaling regulates virus-specific CD4(+) T cell responses and viral control during chronic infection. *Immunity* 39(3):548-559.

Harker JA, Lewis GM, Mack L & Zuniga EI (2011) Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science* 334(6057):825-829.

Havenar-Daughton C, Lindqvist M, Heit A, Wu JE, Reiss SM, Kendric K, Belanger S, Kasturi SP, Landais E, Akondy RS, McGuire HM, Bothwell M, Vagefi PA, Scully E, Investigators IPCP, Tomaras GD, Davis MM, Poignard P, Ahmed R, Walker BD, Pulendran B, McElrath MJ, Kaufmann DE & Crotty S (2016) CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 10.1073/pnas.1520112113.

Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR & Herzenberg LA (1983) The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. *J Exp Med* 157(1):202-218.

Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N & Cyster JG (2007) Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol* 179(8):5099-5108.

He B, Qiao X, Klasse PJ, Chiu A, Chadburn A, Knowles DM, Moore JP & Cerutti A (2006) HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol* 176(7):3931-3941.

Hensley SE, Cun AS, Giles-Davis W, Li Y, Xiang Z, Lasaro MO, Williams BR, Silverman RH & Ertl HC (2007) Type I interferon inhibits antibody responses induced by a chimpanzee adenovirus vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15(2):393-403.

Hill RL, Delaney R, Fellows RE & Lebovitz HE (1966) The evolutionary origins of the immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56(6):1762-1769.

Ho BC, Laudette-Aboulhab J, Se-Thoe SY, Chan SP, Ling AE & Leo YS (2000) Correlation of baseline quantitative plasma human immunodeficiency (HIV) type 1 RNA viral load with clinical status and CD4+ T-cell counts in treatment-naive HIV-positive patients in Singapore. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 29(6):708-713.

Honda K, Yanai H, Takaoka A & Taniguchi T (2005) Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol* 17(11):1367-1378.

Honke N, Shaabani N, Merches K, Gassa A, Kraft A, Ehrhardt K, Haussinger D, Lohning M, Dittmer U, Hengel H, Recher M, Lang PA & Lang KS (2016) Immunoactivation induced by chronic viral infection inhibits viral replication and drives immunosuppression through sustained IFN-I responses. *Eur J Immunol* 46(2):372-380.

Hou B, Saudan P, Ott G, Wheeler ML, Ji M, Kuzmich L, Lee LM, Coffman RL, Bachmann MF & DeFranco AL (2011) Selective utilization of Toll-like receptor and MyD88 signaling in B cells for enhancement of the antiviral germinal center response. *Immunity* 34(3):375-384.

Houghton M (2011) Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunol Rev* 239(1):99-108.

Huang H, Hao S, Li F, Ye Z, Yang J & Xiang J (2007) CD4+ Th1 cells promote CD8+ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology* 120(2):148-159.

Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ, Ciurea A, Freigang S, Hengartner H & Zinkernagel RM (2003) Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol* 4(4):343-349.

Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, Debbeche O, Tremblay C, Toma E, Routy JP & Ahmad A (2010) Dynamics and consequences of IL-21 production in HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study. *J Immunol* 184(1):114-126.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW & Campbell KP (1992) Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355(6362):696-702.

Inamine A, Takahashi Y, Baba N, Miyake K, Tokuhisa T, Takemori T & Abe R (2005) Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *Int Immunol* 17(5):581-589.

Jack RS, Imanishi-Kari T & Rajewsky K (1977) Idiotypic analysis of the response of C57BL/6 mice to the (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl group. *Eur J Immunol* 7(8):559-565.

Jacob J, Kassir R & Kelsoe G (1991a) In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* 173(5):1165-1175.

Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K & Weiss U (1991b) Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354(6352):389-392.

Jacob J, Przylepa J, Miller C & Kelsoe G (1993) In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J Exp Med* 178(4):1293-1307.

Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V & Banchereau J (2003) Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19(2):225-234.

Jin HT, Anderson AC, Tan WG, West EE, Ha SJ, Araki K, Freeman GJ, Kuchroo VK & Ahmed R (2010) Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33):14733-14738.

Kagi D, Seiler P, Pavlovic J, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM & Hengartner H (1995) The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur J Immunol* 25(12):3256-3262.

Kalinke U, Bucher EM, Ernst B, Oxenius A, Roost HP, Geley S, Kofler R, Zinkernagel RM & Hengartner H (1996) The role of somatic mutation in the generation of the protective humoral immune response against vesicular stomatitis virus. *Immunity* 5(6):639-652.

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T & Akira S (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441(7089):101-105.

Kawamoto H, Sakaguchi K, Takaki A, Ogawa S & Tsuji T (1993) Autoimmune responses as assessed by hypergammaglobulinemia and the presence of autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. *Acta medica Okayama* 47(5):305-310.

Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Weinstein JS, Delano MJ, Cuenca AG, Nacionales DC, Wynn JL, Lee PY, Kumagai Y, Efron PA, Akira S, Wasserfall C, Atkinson MA & Moldawer LL (2011) B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *J Exp Med* 208(8):1673-1682.

Klenerman P & Hill A (2005) T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol* 6(9):873-879.

Ko HJ, Yang H, Yang JY, Seo SU, Chang SY, Seong JK & Kweon MN (2012) Expansion of Tfh-like cells during chronic Salmonella exposure mediates the generation of autoimmune hypergammaglobulinemia in MyD88-deficient mice. *Eur J Immunol* 42(3):618-628.

Kolar GR & Capra JD (2003) *Structure and function of immunoglobulins.* Raven Press, New York

Kong F, Zhang W, Feng B, Zhang H, Rao H, Wang J, Cong X & Wei L (2015) Abnormal CD4 + T helper (Th) 1 cells and activated memory B cells are associated with type III asymptomatic mixed cryoglobulinemia in HCV infection. *Virol J* 12:100.

Kowdley KV, Lawitz E, Poordad F, Cohen DE, Nelson DR, Zeuzem S, Everson GT, Kwo P, Foster GR, Sulkowski MS, Xie W, Pilot-Matias T, Liossis G, Larsen L, Khatri A, Podsadecki T & Bernstein B (2014) Phase 2b trial of interferon-free therapy for hepatitis C virus genotype 1. *N Engl J Med* 370(3):222-232.

Kumararatne DS, Bazin H & MacLennan IC (1981) Marginal zones: the major B cell compartment of rat spleens. *Eur J Immunol* 11(11):858-864.

Lanzavecchia A (1985) Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314(6011):537-539.

Laposova K, Pastorekova S & Tomaskova J (2013) Lymphocytic choriomeningitis virus: invisible but not innocent. *Acta virologica* 57(2):160-170.

Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F & Tough DF (2001) Type i interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14(4):461-470.

Lee G, Namen AE, Gillis S, Ellingsworth LR & Kincade PW (1989) Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. *J Immunol* 142(11):3875-3883.

Lehmann-Grube F (1972) Persistent infection of the mouse with the virus of lymphocytic choriomeningitis. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 6:8-21.

Lehmann-Grube F, Lohler J, Utermohlen O & Gegin C (1993) Antiviral immune responses of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice lacking CD8+ T lymphocytes because of disruption of the β2- microglobulin gene. *Journal of Virology* 67(1):332-339.

Leroy MD, D. (2006) Les interférons de type I et leur fonction antivirale. *Ann Med Vet* 150:73-107.

Liang HE, Reinhardt RL, Bando JK, Sullivan BM, Ho IC & Locksley RM (2012) Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. *Nat Immunol* 13(1):58-66.

Lichty BD, Power AT, Stojdl DF & Bell JC (2004) Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med* 10(5):210-216.

Lien C, Fang CM, Huso D, Livak F, Lu R & Pitha PM (2010) Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(10):4664-4668.

Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, Flanders MD, Cutler S, Yudanin N, Muller MI, Davis I, Farber D, Hartjen P, Haag F, Alter G, Schulze zur Wiesch J & Streeck H (2012) Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 122(9):3271-3280.

Linterman MA, Denton AE, Divekar DP, Zvetkova I, Kane L, Ferreira C, Veldhoen M, Clare S, Dougan G, Espeli M & Smith KG (2014) CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *Elife* 3.

Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, Srivastava M, Divekar DP, Beaton L, Hogan JJ, Fagarasan S, Liston A, Smith KG & Vinuesa CG (2011) Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 17(8):975-982.

Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P & Cerutti A (2002) DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 3(9):822-829.

Liu X, Chen X, Zhong B, Wang A, Wang X, Chu F, Nurieva RI, Yan X, Chen P, van der Flier LG, Nakatsukasa H, Neelapu SS, Chen W, Clevers H, Tian Q, Qi H, Wei L & Dong C (2014) Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* 507(7493):513-518.

Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, Su LF, Cubas R, Davis MM, Sette A, Haddad EK, International AVIPCPI, Poignard P & Crotty S (2013) Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 39(4):758-769.

Lopez-Macias C, Kalinke U, Cascalho M, Wabl M, Hengartner H, Zinkernagel RM & Lamarre A (1999) Secondary rearrangements and hypermutation generate sufficient B cell diversity to mount protective antiviral immunoglobulin responses. *J Exp Med* 189(11):1791-1798.

Louten J, van Rooijen N & Biron CA (2006) Type 1 IFN deficiency in the absence of normal splenic architecture during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 177(5):3266-3272.

Luthje K, Kallies A, Shimohakamada Y, GT TB, Light A, Tarlinton DM & Nutt SL (2012) The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat Immunol* 13(5):491-498.

Male D, Brostoff J, Roth DB & Roitt I (2010) Les défenses contre les agents infectieux. *Immunologie*, Masson E (Édit.). p 274.

Manz RA, Thiel A & Radbruch A (1997) Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388(6638):133-134.

Marcus PI, Rodriguez LL & Sekellick MJ (1998) Interferon induction as a quasispecies marker of vesicular stomatitis virus populations. *J Virol* 72(1):542-549.

Martin F & Kearney JF (2002) Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2(5):323-335.

Matthews AJ, Zheng S, DiMenna LJ & Chaudhuri J (2014) Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv Immunol* 122:1-57.

Mayo MJ (2003) Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *Am J Med Sci* 325(3):135-148.

McHeyzer-Williams MG, Nossal GJ & Lalor PA (1991) Molecular characterization of single memory B cells. *Nature* 350(6318):502-505.

McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A & O'Garra A (2015) Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15(2):87-103.

Mead DG, Ramberg FB, Besselsen DG & Mare CJ (2000) Transmission of vesicular stomatitis virus from infected to noninfected black flies co-feeding on nonviremic deer mice. *Science* 287(5452):485-487.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG & Barnes E (2015) Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 61(1):77-87.

Mestecky J & McGhee JR (1987) Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* 40:153-245.

Miller JF & Mitchell GF (1968) Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* 128(4):801-820.

Milne CD & Paige CJ (2006) IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol* 18(1):20-30.

Milstein C, Neuberger MS & Staden R (1998) Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15):8791-8794.

Minamino K, Takahara K, Adachi T, Nagaoka K, Iyoda T, Taki S & Inaba K (2012) IRF-2 regulates B-cell proliferation and antibody production through distinct mechanisms. *Int Immunol* 24(9):573-581.

Mitchell GF & Miller JF (1968) Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* 128(4):821-837.

Mitchison NA (1971a) The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. I. Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis. *Eur J Immunol* 1(1):10-17.

Mitchison NA (1971b) The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation. *Eur J Immunol* 1(1):18-27.

Mitchison NA (1971c) The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. V. Use of antilymphocyte serum to deplete animals of helper cells. *Eur J Immunol* 1(2):68-75.

Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS & Kincade PW (1991) Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med* 173(3):599-607.

Moir S & Fauci AS (2013) Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol Rev* 254(1):207-224.

Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, Roby G, Kottilil S, Arthos J, Proschan MA, Chun TW & Fauci AS (2008) Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 205(8):1797-1805.

Moir S, Malaspina A, Pickeral OK, Donoghue ET, Vasquez J, Miller NJ, Krishnan SR, Planta MA, Turney JF, Justement JS, Kottilil S, Dybul M, Mican JM, Kovacs C, Chun TW, Birse CE & Fauci AS (2004) Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *J Exp Med* 200(7):587-599.

Moorman JP, Zhang CL, Ni L, Ma CJ, Zhang Y, Wu XY, Thayer P, Islam TM, Borthwick T & Yao ZQ (2011) Impaired hepatitis B vaccine responses during chronic hepatitis C infection: involvement of the PD-1 pathway in regulating CD4(+) T cell responses. *Vaccine* 29(17):3169-3176.

Moresco EM, LaVine D & Beutler B (2011) Toll-like receptors. *Curr Biol* 21(13):R488-493.

Morimoto S, Kanno Y, Tanaka Y, Tokano Y, Hashimoto H, Jacquot S, Morimoto C, Schlossman SF, Yagita H, Okumura K & Kobata T (2000) CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses. *J Immunol* 164(8):4097-4104.

Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabzghabaei N, Lavecchio EM, Punaro M, Pascual V, Banchereau J & Ueno H (2011) Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and

contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34(1):108-121.

Moseman EA & McGavern DB (2013) The great balancing act: regulation and fate of antiviral T-cell interactions. *Immunol Rev* 255(1):110-124.

Moskophidis D, Cobbold SP, Waldmann H & Lehmann-Grube F (1987) Mechanism of recovery from acute virus infection: treatment of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice with monoclonal antibodies reveals that Lyt-2+ T lymphocytes mediate clearance of virus and regulate the antiviral antibody response. *J Virol* 61(6):1867-1874.

Moskophidis D, Lechner F, Pircher H & Zinkernagel RM (1993) Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 362(6422):758-761.

Mueller SN & Ahmed R (2009) High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21):8623-8628.

Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y & Honjo T (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102(5):553-563.

Murira A, Lapierre P & Lamarre A (2016) Evolution of the Humoral Response during HCV Infection: Theories on the Origin of Broadly Neutralizing Antibodies and Implications for Vaccine Design. *Adv Immunol* 129:55-107.

Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M, Shaked A, Olthoff K, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ & Chang KM (2008) Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 134(7):1927-1937, 1937 e1921-1922.

Nakayamada S, Poholek AC, Lu KT, Takahashi H, Kato M, Iwata S, Hirahara K, Cannons JL, Schwartzberg PL, Vahedi G, Sun HW, Kanno Y & O'Shea JJ (2014) Type I IFN induces binding of STAT1 to Bcl6: divergent roles of STAT family transcription factors in the T follicular helper cell genetic program. *J Immunol* 192(5):2156-2166.

Ng CT, Mendoza JL, Garcia KC & Oldstone MB (2016) Alpha and Beta Type 1 Interferon Signaling: Passage for Diverse Biologic Outcomes. *Cell* 164(3):349-352.

Ng CT, Sullivan BM & Oldstone MB (2011) The role of dendritic cells in viral persistence. *Current opinion in virology* 1(3):160-166.

Ng CT, Sullivan BM, Teijaro JR, Lee AM, Welch M, Rice S, Sheehan KC, Schreiber RD & Oldstone MB (2015) Blockade of interferon Beta, but not interferon alpha, signaling controls persistent viral infection. *Cell Host Microbe* 17(5):653-661.

Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR & Zou YR (2004) The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* 200(9):1145-1156.

Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH & Dong C (2009) Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325(5943):1001-1005.

Nutt SL & Tarlinton DM (2011) Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol* 12(6):472-477.

Odermatt B, Eppler M, Leist TP, Hengartner H & Zinkernagel RM (1991) Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18):8252-8256.

Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C & Baltimore D (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248(4962):1517-1523.

Oldstone MB (2002) Biology and pathogenesis of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:83-117.

Oldstone MB (2015) A Jekyll and Hyde Profile: Type 1 Interferon Signaling Plays a Prominent Role in the Initiation and Maintenance of a Persistent Virus Infection. *J Infect Dis* 212 Suppl 1:S31-36.

Osokine I, Snell LM, Cunningham CR, Yamada DH, Wilson EB, Elsaesser HJ, de la Torre JC & Brooks D (2014) Type I interferon suppresses de novo virus-specific CD4 Th1 immunity during an established persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(20):7409-7414.

Owusu Sekyere S, Suneetha PV, Kraft AR, Zhang S, Dietz J, Sarrazin C, Manns MP, Schlaphoff V, Cornberg M & Wedemeyer H (2015) A heterogeneous hierarchy of co-regulatory receptors regulates exhaustion of HCV-specific CD8 T cells in patients with chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 62(1):31-40.

Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, 3rd, Lipsky PE & Leonard WJ (2004) Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 173(9):5361-5371.

Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, Morse HC, 3rd, Liu C, Schwartzberg PL & Leonard WJ (2002) A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298(5598):1630-1634.

Paladino N, Fainboim H, Theiler G, Schroder T, Munoz AE, Flores AC, Galdame O & Fainboim L (2006) Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. *J Virol* 80(18):9144-9150.

Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, Pahwa R & Pahwa S (2012) Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* 120(5):985-993.

Pape KA, Catron DM, Itano AA & Jenkins MK (2007) The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26(4):491-502.

Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A & Brink R (2006) Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* 203(4):1081-1091.

Perez M & de la Torre JC (2003) Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 77(2):1184-1194.

Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H & Cheng G (2005) The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* 15(6):407-422.

Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL, Patel AH, Meisel H, Baumert J, Viazov S, Rispeter K, Blum HE, Roggendorf M & Baumert TF (2007) Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(14):6025-6030.

Pestka S, Krause CD & Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202:8-32.

Phetsouphanh C, Xu Y & Zaunders J (2014) CD4 T Cells Mediate Both Positive and Negative Regulation of the Immune Response to HIV Infection: Complex Role of T Follicular Helper Cells and Regulatory T Cells in Pathogenesis. *Frontiers in immunology* 5:681.

Pichlmair A & Reis e Sousa C (2007) Innate recognition of viruses. *Immunity* 27(3):370-383.

Pietrangeli CE, Hayashi S & Kincade PW (1988) Stromal cell lines which support lymphocyte growth: characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to growth factors. *Eur J Immunol* 18(6):863-872.

Pillai S, Cariappa A & Moran ST (2005) Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23:161-196.

Pinschewer DD, Perez M, Jeetendra E, Bachi T, Horvath E, Hengartner H, Whitt MA, de la Torre JC & Zinkernagel RM (2004) Kinetics of protective antibodies are determined by the viral surface antigen. *J Clin Invest* 114(7):988-993.

Planz O, Ehl S, Furrer E, Horvath E, Brundler MA, Hengartner H & Zinkernagel RM (1997) A critical role for neutralizing-antibody-producing B cells, CD4(+) T cells, and interferons in persistent and acute infections of mice with lymphocytic choriomeningitis virus: implications for adoptive immunotherapy of virus carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):6874-6879.

Platanias LC (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5(5):375-386.

Pleass RJ, Dunlop JI, Anderson CM & Woof JM (1999) Identification of residues in the CH2/CH3 domain interface of IgA essential for interaction with the human fcalpha receptor (FcalphaR) CD89. *J Biol Chem* 274(33):23508-23514.

Porter RR (1958) Separation and isolation of fractions of rabbit gamma-globulin containing the antibody and antigenic combining sites. *Nature* 182(4636):670-671.

Preite S, Baumjohann D, Foglierini M, Basso C, Ronchi F, Rodriguez BM, Corti D, Lanzavecchia A & Sallusto F (2015) Somatic mutations and affinity maturation are impaired by excessive

numbers of T follicular helper cells and restored by Treg cells or memory T cells. *Eur J Immunol* 10.1002/eji.201545920.

Qi H, Egen JG, Huang AY & Germain RN (2006) Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312(5780):1672-1676.

Qiao X, He B, Chiu A, Knowles DM, Chadburn A & Cerutti A (2006) Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol* 7(3):302-310.

Racanelli V, Frassanito MA, Leone P, Galiano M, De Re V, Silvestris F & Dammacco F (2006) Antibody production and in vitro behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J Virol* 80(8):3923-3934.

Raff MC, Megson M, Owen JJ & Cooper MD (1976) Early production of intracellular IgM by B-lymphocyte precursors in mouse. *Nature* 259(5540):224-226.

Randall TD, Heath AW, Santos-Argumedo L, Howard MC, Weissman IL & Lund FE (1998) Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity* 8(6):733-742.

Rasheed MA, Latner DR, Aubert RD, Gourley T, Spolski R, Davis CW, Langley WA, Ha SJ, Ye L, Sarkar S, Kalia V, Konieczny BT, Leonard WJ & Ahmed R (2013) Interleukin-21 is a critical cytokine for the generation of virus-specific long-lived plasma cells. *J Virol* 87(13):7737-7746.

Ravetch JV & Bolland S (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275-290.

Ray JP, Marshall HD, Laidlaw BJ, Staron MM, Kaech SM & Craft J (2014) Transcription factor STAT3 and type I interferons are corepressive insulators for differentiation of follicular helper and T helper 1 cells. *Immunity* 40(3):367-377.

Recher M, Lang KS, Hunziker L, Freigang S, Eschli B, Harris NL, Navarini A, Senn BM, Fink K, Lotscher M, Hangartner L, Zellweger R, Hersberger M, Theocharides A, Hengartner H & Zinkernagel RM (2004) Deliberate removal of T cell help improves virus-neutralizing antibody production. *Nat Immunol* 5(9):934-942.

Reinhardt RL, Liang HE & Locksley RM (2009) Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 10(4):385-393.

Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premsri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH & Investigators M-T (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361(23):2209-2220.

Richard J, Veillette M, Ding S, Zoubchenok D, Alsahafi N, Coutu M, Brassard N, Park J, Courter JR, Melillo B, Smith AB, 3rd, Shaw GM, Hahn BH, Sodroski J, Kaufmann DE & Finzi A (2016) Small CD4 Mimetics Prevent HIV-1 Uninfected Bystander CD4 + T Cell Killing Mediated by Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity. *EBioMedicine* 3:122-134.

Richter K, Agnellini P & Oxenius A (2010) On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int Immunol* 22(1):13-23.

Rivers TM & Scott TF (1936) Meningitis in Man Caused by a Filterable Virus : Ii. Identification of the Etiological Agent. *J Exp Med* 63(3):415-432.

Roberts A, Buonocore L, Price R, Forman J & Rose JK (1999) Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* 73(5):3723-3732.

Ronnblom L, Alm GV & Eloranta ML (2009) Type I interferon and lupus. *Current opinion in rheumatology* 21(5):471-477.

Rowe WP, Pugh WE, Webb PA & Peters CJ (1970) Serological relationship of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 5(3):289-292.

Rumfelt LL, Zhou Y, Rowley BM, Shinton SA & Hardy RR (2006) Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp Med* 203(3):675-687.

Sage PT, Alvarez D, Godec J, von Andrian UH & Sharpe AH (2014) Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J Clin Invest* 124(12):5191-5204.

Saji F, Koyama M & Matsuzaki N (1994) Current topic: Human placental Fc receptors. *Placenta* 15:453-466.

Samuel CE (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14(4):778-809, table of contents.

Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Tharp GK, Boritz E, Levin D, Wijeyesinghe S, Makamdop KN, del Prete GQ, Hill BJ, Timmer JK, Reiss E, Yarden G, Darko S, Contijoch E, Todd JP, Silvestri G, Nason M, Norgren RB, Jr., Keele BF, Rao S, Langer JA, Lifson JD, Schreiber G & Douek DC (2014) Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511(7511):601-605.

Sandlie I & Michaelsen TE (1991) Engineering monoclonal antibodies to determine the structural requirements for complement activation and complement mediated lysis. *Mol Immunol* 28(12):1361-1368.

Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N & Taniguchi T (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13(4):539-548.

Saunders AA, Ting JP, Meisner J, Neuman BW, Perez M, de la Torre JC & Buchmeier MJ (2007) Mapping the landscape of the lymphocytic choriomeningitis virus stable signal peptide reveals novel functional domains. *J Virol* 81(11):5649-5657.

Schittek B & Rajewsky K (1990) Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 346(6286):749-751.

Schlissel MS & Baltimore D (1989) Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell* 58(5):1001-1007.

Schmidt EE, MacDonald IC & Groom AC (1993) Comparative aspects of splenic microcirculatory pathways in mammals: the region bordering the white pulp. *Scanning microscopy* 7(2):613-628.

Schmittgen TD & Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3(6):1101-1108.

Schnell MJ, Buonocore L, Boritz E, Ghosh HP, Chernish R & Rose JK (1998) Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *EMBO J* 17(5):1289-1296.

Schreiber G & Piehler J (2015) The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends Immunol* 36(3):139-149.

Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H & Cannons JL (2009) SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* 9(1):39-46.

Schwickert TA, Victora GD, Fooksman DR, Kamphorst AO, Mugnier MR, Gitlin AD, Dustin ML & Nussenzweig MC (2011) A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J Exp Med* 208(6):1243-1252.

Seeff LB (2002) Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36(5 Suppl 1):S35-46.

Seki M, Gearhart PJ & Wood RD (2005) DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Rep* 6(12):1143-1148.

Sen GC (2001) Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 55:255-281.

Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A, Wolfowicz CB, Rothstein TL & Weigert MG (1987) The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* 328(6133):805-811.

Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, Lainez B, Esplugues E, Flavell RA, Craft JE & Nussenzweig MC (2014) Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* 345(6200):1058-1062.

Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, Manku H, Vyse TJ, Roncador G, Huttley GA, Goodnow CC, Vinuesa CG & Cook MC (2010) Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 62(1):234-244.

Singh MK, Fuller-Pace FV, Buchmeier MJ & Southern PJ (1987) Analysis of the genomic L RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 161(2):448-456.

Skinner HH & Knight EH (1979) Epidermal tissue as a primary site of replication of lymphocytic choriomeningitis virus in small experimental hosts. *The Journal of hygiene* 82(1):21-30.

Smelt SC, Borrow P, Kunz S, Cao W, Tishon A, Lewicki H, Campbell KP & Oldstone MB (2001) Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics. *J Virol* 75(1):448-457.

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT & Simmonds P (2014) Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59(1):318-327.

Southern PJ, Singh MK, Riviere Y, Jacoby DR, Buchmeier MJ & Oldstone MB (1987) Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157(1):145-155.

Spaan M, Kreefft K, de Graav GN, Brouwer WP, de Knegt RJ, ten Kate FJ, Baan CC, Vanwolleghem T, Janssen HL & Boonstra A (2015) CD4+ CXCR5+ T cells in chronic HCV infection produce less IL-21, yet are efficient at supporting B cell responses. *Journal of hepatology* 62(2):303-310.

Spolski R & Leonard WJ (2009) IL-21 and T follicular helper cells. *Int Immunol* 22(1):7-12.

Stavnezer J, Guikema JE & Schrader CE (2008) Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26:261-292.

Steinhauer DA, de la Torre JC & Holland JJ (1989) High nucleotide substitution error frequencies in clonal pools of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 63(5):2063-2071.

Steinhoff U, Muller U, Schertler A, Hengartner H, Aguet M & Zinkernagel RM (1995) Antiviral protection by vesicular stomatitis virus-specific antibodies in alpha/beta interferon receptor-deficient mice. *J Virol* 69(4):2153-2158.

Strecker T, Eichler R, Meulen J, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W & Lenz O (2003) Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J Virol* 77(19):10700-10705.

Sullivan BM, Emonet SF, Welch MJ, Lee AM, Campbell KP, De La Torre JC & Oldstone MB (2011) Point mutation in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is necessary for receptor binding, dendritic cell infection, and long-term persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(7):2969-2974.

Sullivan BM, Teijaro JR, de la Torre JC & Oldstone MB (2015) Early virus-host interactions dictate the course of a persistent infection. *PLoS Pathog* 11(1):e1004588.

Suresh M, Molina H, Salvato MS, Mastellos D, Lambris JD & Sandor M (2003) Complement component 3 is required for optimal expansion of CD8 T cells during a systemic viral infection. *J Immunol* 170(2):788-794.

Swanson CL, Wilson TJ, Strauch P, Colonna M, Pelanda R & Torres RM (2010) Type I IFN enhances follicular B cell contribution to the T cell-independent antibody response. *J Exp Med* 207(7):1485-1500.

Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KC, Welch M, Schreiber RD, de la Torre JC & Oldstone MB (2013) Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340(6129):207-211.

Thomsen AR, Johansen J, Marker O & Christensen JP (1996) Exhaustion of CTL memory and recrudescence of viremia in lymphocytic choriomeningitis virus-infected MHC class II-deficient mice and B cell-deficient mice. *J Immunol* 157(7):3074-3080.

Titus JA, Perez P, Kaubisch A, Garrido MA & Segal DM (1987) Human K/natural killer cells targeted with hetero-cross-linked antibodies specifically lyse tumor cells in vitro and prevent tumor growth in vivo. *J Immunol* 139(9):3153-3158.

Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, Decamp AC, Parks RJ, Ashley VC, Lucas JT, Cohen M, Eron J, Hicks CB, Liao HX, Self SG, Landucci G, Forthal DN, Weinhold KJ, Keele BF, Hahn BH, Greenberg ML, Morris L, Karim SS, Blattner WA, Montefiori DC, Shaw GM, Perelson AS & Haynes BF (2008) Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* 82(24):12449-12463.

Tompkins MB & Tompkins WA (2008) Lentivirus-induced immune dysregulation. *Vet Immunol Immunopathol* 123(1-2):45-55.

Traub E (1936) The Epidemiology of Lymphocytic Choriomeningitis in White Mice. *J Exp Med* 64(2):183-200.

Traub E (1939) Epidemiology of Lymphocytic Choriomeningitis in a Mouse Stock Observed for Four Years. *J Exp Med* 69(6):801-817.

Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK & Sekaly RP (2006) Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12(10):1198-1202.

Tubo NJ, Pagan AJ, Taylor JJ, Nelson RW, Linehan JL, Ertelt JM, Huseby ES, Way SS & Jenkins MK (2013) Single naive CD4+ T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell* 153(4):785-796.

Victora GD & Nussenzweig MC (2012) Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 30:429-457.

Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML & Nussenzweig MC (2010) Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143(4):592-605.

Virgin S (2007) Pathogenesis of viral infection. *Fields Virology*, Lippincott W (Édit.)Philadelphia Vol 1. p 352.

Wagner RR & Rose JK (Édit) (1996) *Rhabdoviridae: the viruses and their replication.* Lippincott-Raven. 1121-1136 p.

Wahid A & Dubuisson J (2013) Virus-neutralizing antibodies to hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 20(6):369-376.

Walsh KB, Teijaro JR, Zuniga EI, Welch MJ, Fremgen DM, Blackburn SD, Von Tiehl KF, Wherry EJ, Flavell RA & Oldstone MBA (2012) Toll-like receptor 7 is required for effective adaptive

immune responses that prevent persistent virus infection. *Cell Host and Microbe* 11(6):643-653.

Wang B, Rieger A, Kilgus O, Ochiai K, Maurer D, Fodinger D, Kinet JP & Stingl G (1992) Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc epsilon RI. *J Exp Med* 175(5):1353-1365.

Wang D, Zhou D, Du Q, Liang Q, Wang Q, Fang L, Wang G, Fan Q, Liu B, Zhou J, Tang Z, Wu H, Guo X, Jiao Y & Zhang G (2013) Aberrant production of soluble inducible T-cell co-stimulator (sICOS) and soluble programmed cell death protein 1 (sPD-1) in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med Rep* 7(4):1197-1202.

Wang JH, Li J, Wu Q, Yang P, Pawar RD, Xie S, Timares L, Raman C, Chaplin DD, Lu L, Mountz JD & Hsu HC (2010) Marginal zone precursor B cells as cellular agents for type I IFN-promoted antigen transport in autoimmunity. *J Immunol* 184(1):442-451.

Wang JH, Wu Q, Yang P, Li H, Li J, Mountz JD & Hsu HC (2011) Type I interferon-dependent CD86(high) marginal zone precursor B cells are potent T cell costimulators in mice. *Arthritis and rheumatism* 63(4):1054-1064.

Wang Y, Swiecki M, Cella M, Alber G, Schreiber RD, Gilfillan S & Colonna M (2012) Timing and magnitude of type I interferon responses by distinct sensors impact CD8 T cell exhaustion and chronic viral infection. *Cell Host Microbe* 11(6):631-642.

Welsh Jr RM (1977) Host cell modification of lymphocytic choriomeningitis virus and Newcastle disease virus altering viral inactivation by human complement. *Journal of Immunology* 118(1):348-354.

Wertz GW, Perepelitsa VP & Ball LA (1998) Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7):3501-3506.

Williams AF & Barclay AN (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6:381-405.

Williams GT, Venkitaraman AR, Gilmore DJ & Neuberger MS (1990) The sequence of the mu transmembrane segment determines the tissue specificity of the transport of immunoglobulin M to the cell surface. *J Exp Med* 171(3):947-952.

Wilson EB, Kidani Y, Elsaesser H, Barnard J, Raff L, Karp CL, Bensinger S & Brooks DG (2012) Emergence of distinct multiarmed immunoregulatory antigen-presenting cells during persistent viral infection. *Cell Host Microbe* 11(5):481-491.

Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, Aronow BJ, Karp CL & Brooks DG (2013) Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340(6129):202-207.

Wilson TM, Vaisman A, Martomo SA, Sullivan P, Lan L, Hanaoka F, Yasui A, Woodgate R & Gearhart PJ (2005) MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase eta, suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *J Exp Med* 201(4):637-645.

Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernandez A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J & Graca L (2011) Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J Immunol* 187(9):4553-4560.

Wright KE & Buchmeier MJ (1991) Antiviral antibodies attenuate T-cell-mediated immunopathology following acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Journal of Virology* 65(6):3001-3006.

Wright KE, Spiro RC, Burns JW & Buchmeier MJ (1990) Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 177(1):175-183.

Wu TT & Kabat EA (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132(2):211-250.

Wurster AL, Rodgers VL, White MF, Rothstein TL & Grusby MJ (2002) Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J Biol Chem* 277(30):27169-27175.

Xu H, Li X, Liu D, Li J, Zhang X, Chen X, Hou S, Peng L, Xu C, Liu W, Zhang L & Qi H (2013) Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* 496(7446):523-527.

Yao ZQ & Moorman JP (2013) Immune exhaustion and immune senescence: two distinct pathways for HBV vaccine failure during HCV and/or HIV infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 61(3):193-201.

York J & Nunberg JH (2006) Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 80(15):7775-7780.

Yusuf I, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, Ditoro D, Hansen K, Barnett B & Crotty S (2010) Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* 185(1):190-202.

Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD & Ahmed R (1998) Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188(12):2205-2213.

Zinkernagel RM (2002) Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:1-5.

Zinkernagel RM, LaMarre A, Ciurea A, Hunziker L, Ochsenbein AF, McCoy KD, Fehr T, Bachmann MF, Kalinke U & Hengartner H (2001a) Neutralizing antiviral antibody responses. *Advances in Immunology, Vol 79,* (Advances in Immunology: Vol 79. p 1-53.

Zinkernagel RM, LaMarre A, Ciurea A, Hunziker L, Ochsenbein AF, McCoy KD, Fehr T, Bachmann MF, Kalinke U & Hengartner H (2001b) Neutralizing antiviral antibody responses. *Adv Immunol* 79:1-53.

Zinkernagel RM, Leist T, Hengartner H & Althage A (1985) Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T cell

activity, as well as with footpad swelling reaction, and all three are regulated by H-2D. *J Exp Med* 162(6):2125-2141.