

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**IMPACT DU RÉPERTOIRE DES LYMPHOCYTES B SUR LE DÉVELOPPEMENT DE
RÉPONSES IMMUNITAIRES CELLULAIRES ANTIVIRALES**

Par

Tania CHARPENTIER

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de *Magister Scientiae*, M.Sc.
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examinateur interne

Pascale Duplay
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Hélène Decaluwe
Centre de recherche du CHU Sainte-Justine
Université de Montréal

Directeur de recherche

Alain Lamarre
INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Les anticorps naturels (AcNat) font partie du système immunitaire inné et offrent la première ligne de défense contre des pathogènes étant entrés dans la circulation sanguine. Leur liaison à des particules infectieuses engendre la formation de complexes-immuns, qui eux, favorisent le recrutement des microorganismes aux organes lymphoïdes secondaires, là où les réponses immunitaires adaptatives sont développées. La présence des AcNat s'avère importante pour le développement de réponses humorales adaptatives contre différents virus, mais leur importance dans le développement de réponses immunitaires cellulaires a peu été étudiée. Des études de recrutement du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) aux organes lymphoïdes secondaires, virus dont l'infection est contrôlée par les réponses immunitaires cellulaires, ont démontrées que la présence d'AcNat facilitait ce transport.

Comme ces démonstrations ont soit été faites avec des souris de type sauvage ou des souris sans anticorps, nous avons voulu évaluer l'impact d'une restriction dans la diversité du répertoire des AcNat sur le développement de réponses cellulaires spécifiques au LCMV. Pour ce faire, nous avons utilisé des souches de souris restreintes dans leur capacité à générer un répertoire diversifié d'anticorps. Les souris QM possèdent un segment V(D)J déjà réarrangé pour lier spécifiquement l'haptène nitrophényl; les souris HC1 peuvent recombiner des segments d'immunoglobulines humaines à partir d'un minilocus transgénique, les souris J_HT ne possèdent pas de lymphocytes B matures, dû à l'élimination de tous les segments J de la chaîne lourde de leurs immunoglobulines. Ces trois souches murines ont été obtenues sur fond génétique C57Bl/6, qui elles ont servi de témoin positif. D'abord, nous avons comparé, chez nos différentes souches de souris naïves, le taux sérique d'AcNat et la fréquence des cellules les sécrétant. Nous avons ensuite comparé leur capacité de présentation antigénique, de développement et de maintien de réponses cellulaires suite à une infection par le LCMV.

Nos résultats démontrent que les AcNat de souris possédant une diversité de répertoire B restreinte ont une capacité de liaison à des particules purifiées de LCMV moins grande que celle des souris de type sauvage. De plus, l'analyse de la capacité des cellules dendritiques à apprêter et à présenter les antigènes viraux pour l'activation de lymphocytes T CD8 de souris P14, de même que l'analyse de l'ampleur des réponses cellulaires développées au jour 8 post-infection avec le LCMV est en corrélation directe avec la diversité prédite du répertoire des lymphocytes B. Le transfert passif de sérum de souris C57Bl/6 naïves à des souris J_HT a permis une restauration partielle des réponses cellulaires obtenues au jour 8 après l'infection, confirmant l'importance des AcNat dans le développement de réponses cellulaires antivirales. De façon intéressante, nous avons observé le maintien d'un nombre similaire de lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV 50 jours après l'infection dans les souches de souris à l'étude, et ce de façon indépendante à la diversité de répertoire des lymphocytes B. En conclusion, nos résultats suggèrent que le répertoire des lymphocytes B influence les étapes précoces du développement des réponses immunitaires cellulaires spécifiques au LCMV.

ABSTRACT

Natural antibodies (NatAb), which are part of the first line of defence against bloodborne pathogens, have been shown to provide immediate and broad protection against viral or bacterial infections through the formation of immune-complexes. Binding of NatAb to microorganisms enhances their trapping to secondary lymphoid organs, where antigen presenting cells (APC) internalize, process and present antigens to effector cells of the adaptive immune system. Presence of NatAb has been shown important to initiate humoral adaptive immune responses against different viruses, but their role in antiviral cytotoxic T cell (CTL) responses has been less studied. However, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), infection of which is controlled by CTL responses, was shown to be significantly recruited to secondary lymphoid organs when natural antibodies were present.

Most studies evaluating the roles of natural antibodies were done using either wild type or antibody deficient mice, so we wondered if a limited primary antibody diversity repertoire might gradually affect protective immune responses development against viral infections. To answer this question, we studied specific CTL responses development against LCMV in mice strains showing reduced capacity to generate a diverse primary B cell repertoire. We chose QM mice, which have a V(D)J segment already rearranged to bind nitrophenyl hapten, HC1 mice, which can recombine human antibody segments from a transgenic minilocus, J_HT mice, which cannot mature B cells, due to the targeted deletion of heavy chain J segments and C57Bl/6 mice as complete repertoire diversity controls. First, we compared NatAb serum levels as well as frequency of the cells that secrete them in our naive mice strains, and then compared antigenic presentation, development and sustainment of CTL responses following LCMV infection.

We show here that NatAb from mice with limited B cell diversity bind less efficiently to purified LCMV particles than wild type mice. Moreover, analysis of the capacity of splenic dendritic cells to process and present viral antigens to P14 CD8 T cells, as well as the strength of CTL responses analysed at day 8 post LCMV-infection correlated with the predicted B cell repertoire diversity. Passive transfer of serum from naive C57Bl/6 to J_HT mice increased primary antiviral T cell responses against LCMV, demonstrating a role for NatAb in LCMV-specific CTL response development. Interestingly, preliminary experiments showed that 50 days post-infection, all mice strains maintained similar numbers of functional virus-specific CTL, suggesting that CTL maintenance is independent of B cell diversity. Taken together, our results show that B cell repertoire diversity impacts on the early steps of LCMV-specific CTL response development.

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais mentionner qu'à la mi-parcours de ma maîtrise, j'ai eu la malchance et la chance de réaliser que l'intégrité d'une souche de souris prévue pour mon projet était questionable... Malchance, parce que les expériences effectuées durant les deux premières années de ma maîtrise devaient être reprises. Chance, parce que j'ai été confrontée à l'échec à un moment plutôt inopportun et que j'ai eu la force et la volonté de mener à terme le projet dans lequel je m'étais investie au départ. Malgré les réserves que m'ont énoncées quelques personnes face à ma décision d'attendre plusieurs mois pour réobtenir les souris et reprendre mes expériences, je reste convaincue que l'effort en valait la peine! Les résultats présentés ici ont été obtenus en 16 mois, ce qui correspond à la maîtrise de deux ans que je projetais faire au départ (:D).

Cela étant dit, même avec la meilleure volonté du monde, je n'aurais pas pu poursuivre et mener à terme ce projet sans l'aide et le support de plusieurs personnes. Je soulignerai d'abord celui de mon directeur de recherche Alain Lamarre, qui a accepté de me prendre sous son aile. Merci pour les conseils et la patience qu'a requis la mise à terme de ce projet. Merci pour la latitude offerte dans la réalisation de certaines expériences ambitieuses et pour m'avoir offert l'opportunité de participer à des congrès internationaux! Merci d'avoir cru en moi tout au long de ma maîtrise!

Merci à Esther Tarrab pour les nombreuses discussions critiques sur la recherche (et la vie en général)! Merci pour les tétramères, l'aide au labo, les années d'expérience et les trucs d'initiés. Je garderai par contre toujours en souvenir la comparaison TRÈS injuste (et fausse) de l'épisode des HC1 avec «l'exploit» de Ryan O'Burn ayant compté dans son propre filet désert (:P)! Merci à Marcel Desrosiers pour le soutien en cytométrie en flux. Sans cette technique, je n'aurais pas eu de projet. Merci à Hakim Slimani pour son amitié, pour toutes les discussions et pour la logistique entourant les projets animaux.

Merci à Isabelle Meunier, Maude Bigras, Patrick Lacasse et Pascal Lapierre pour les explications techniques et les protocoles déjà optimisés. J'aimerais souligner le support moral, l'amitié et l'aide que m'ont offert mes collègues passés et actuels pour accomplir toutes mes grosses expériences et mes fameux «jour 8 post-infection» : Marie-Eve Bilodeau, Matthieu Dugan, Valérie Janelle, Marie-Eve Lebel et Emmanuel Moreau.

Au-delà de toutes les formations théoriques, les connaissances scientifiques et les expériences techniques acquises au cours de ma maîtrise, c'est l'expérience acquise lors de ma supervision de stagiaires qui m'a le plus marquée. Iuliana Cosmici et (la vraie!) Marie-Pierre Langlois m'ont toutes deux permis de réaliser qu'il y a bien plus dans la science que l'acquisition de connaissances et de données expérimentales. La transmission de connaissance est aussi, sinon plus importante que tout le reste! Dans le même ordre d'idées, j'aimerais souligner le grand plaisir que j'ai eu à participer au programme des Apprentis en biosciences au cours des années 2009 à 2011.

Je profite des dernières lignes de cette section pour remercier mon copain, ma famille et mes amis proches, qui m'ont encouragé tout au long de ma formation. Sans eux, la poursuite de mes études supérieures n'aurait pas eu le même sens.

TABLE DES MATIÈRES

RESUME.....	iii
ABSTRACT.....	iv
AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIERES	vii
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABREVIATIONS	xiii
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	5
1. Infections virales chroniques	7
1.1. Virus de l'hépatite C (VHC).....	7
1.1.1. Agent étiologique.....	8
1.1.2. Déroulement de l'infection par le VHC.....	9
1.1.3. Réponses immunitaires adaptatives contre le VHC.....	11
1.1.3.1. Réponses T CD4 contre le VHC.....	12
1.1.3.2. Réponses T CD8 contre le VHC.....	13
1.1.3.3. Réponses humorale contre le VHC	14
1.1.4. Modèles expérimentaux disponibles pour l'étude du VHC	15
1.2. Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)	17
1.2.1. Agent étiologique.....	18
1.2.2. Déroulement de l'infection par le LCMV-WE.....	18
1.2.3. Réponses immunitaires adaptatives contre le LCMV-WE	20
2. Activation de réponses immunitaires cellulaires.....	23
2.1. Présentation antigénique sur CMH-II.....	24
2.2. Présentation antigénique sur CMH-I.....	26
2.3. Présentation antigénique croisée sur CMH-I	26
3. Système immunitaire humoral inné	28
3.1. Lymphocytes B innés.....	31
3.1.1. Lymphocytes B de la zone marginale (ZM)	34
3.1.2. Lymphocytes B-1.....	35
3.1.2.1. Lymphocytes B-1a	39
3.1.2.2. Lymphocytes B-1b.....	40
3.2. Anticorps	42
3.2.1. Anticorps naturels (AcNat).....	45
3.2.1.1. Rôles attribués aux AcNat	46
4. Modèles murins à l'étude	49
4.1. C57Bl/6.....	49
4.2. QM (Quasi-monoclonale).....	49
4.3. HC1 (Heavy chain miniloci)	50
4.4. J _H T (ou J _H ^{-/-} ou J _H D).....	51
4.5. RAG-1 ^{-/-}	51

4.6.	P14 et P14.SJL	51
5.	Hypothèse de travail.....	52
6.	Objectifs du projet de recherche	53
MATERIEL ET METHODES		55
1.	Matériel.....	57
1.1.	Lignées cellulaires	57
1.2.	Virus LCMV-WE	58
2.	Manipulation des stocks viraux	58
2.1.	Production de particules de LCMV-WE.....	58
2.2.	Purification du LCMV-WE.....	58
2.3.	Titration des stocks infectieux de LCMV-WE.....	59
2.4.	Titration du LCMV-WE infectieux à partir d'organes.....	60
3.	Manipulation des souris.....	60
3.1.	Génotypage des souris HC1	60
3.2.	Phénotypage des souris P14 et P14.SJL.....	61
3.3.	Lavages péritonéaux	62
3.4.	Préparation de suspension cellulaire de splénocytes.....	62
3.5.	Transfert de sérum aux souris J _H T.....	62
3.6.	Infection avec LCMV-WE.....	63
3.7.	Récolte d'organes	63
4.	Analyse des souches de souris naïves.....	63
4.1.	Dosage par ELISA des IgM naturels.....	63
4.2.	Dosage par ELISA des IgM liant LCMV-WE.....	64
4.3.	Analyse des populations cellulaires péritonéale et splénique par cytométrie en flux	65
5.	Présentation antigénique.....	65
5.1.	Enrichissement et maturation de cellules CD11c ⁺	65
5.2.	Enrichissement de lymphocytes T CD8 de souris P14 ou P14.SJL.....	67
5.3.	Incorporation de thymidine- ³ H	67
6.	Analyse des réponses cellulaires contre LCMV-WE.....	68
6.1.	Quantification des lymphocytes T CD8 spécifiques à LCMV	68
6.2.	Analyse de marqueurs d'activation cellulaire.....	69
6.3.	Quantification des lymphocytes T CD4 et CD8 sécrétant des cytokines	69
6.4.	Test de relâche de chrome (test de cytotoxicité)	70
7.	Analyses statistiques.....	70
RESULTATS		71
1.	Comparaison des souches de souris naïves.....	73
1.1.	Sous-populations de lymphocytes B trouvées dans la cavité péritonéale	73
1.2.	Sous-populations lymphocytaires trouvées dans la rate de souris naïves	76
1.3.	Concentration des IgM naturels sériques.....	78
1.4.	Liaison des IgM naturels au LCMV-WE purifié.....	79
2.	Initiation de réponses cellulaires contre le LCMV	80
2.1.	Taille de la population totale de cellules dendritiques folliculaires spléniques	80
2.2.	Présentation antigénique <i>ex vivo</i> suite à une infection par LCMV-WE	81
3.	Réponses cellulaires primaires développées contre LCMV-WE	82
3.1.	Taille des sous-populations de LT spléniques au jour 8 post-infection	82
3.2.	Expression du CD62L à la surface des lymphocytes T CD8	83

3.3.	Quantification des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV	84
3.4.	Capacité de sécrétion de cytokines après stimulation <i>ex vivo</i>	87
3.5.	Activité lytique des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV.....	90
4.	Maintien des réponses cellulaires contre LCMV-WE.....	91
4.1.	Maintien des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV	91
4.2.	Maintien de la capacité de sécrétion de cytokines après stimulation <i>ex vivo</i>	92
4.3.	Élimination de l'infection par le LCMV-WE.....	94
DISCUSSION		97
1.	La diversité du répertoire des LB influence la capacité des AcNat à lier le LCMV-WE	99
1.1.	Malgré un segment V(D)J déjà réarrangé, les souris QM peuvent ajouter à la diversité de leur répertoire de LB.....	100
1.2.	La diversité du répertoire B affecte le développement des lymphocytes B-1a.....	101
1.3.	La diversité du répertoire des LB affecte la sécrétion d'AcNat.....	103
2.	La diversité du répertoire des LB influence les réponses immunitaires CTL développées contre le LCMV-WE	104
2.1.	La diversité du répertoire des LB affecte la diversité des LT spléniques	108
3.	La présence d'anticorps naturels influence l'ampleur des réponses cellulaires spécifiques au LCMV-WE	109
4.	Importance des LT CD4 dans l'activation des réponses CTL aiguës.....	111
5.	Importance des LB innés dans le développement de réponses cellulaires antivirales.....	111
5.1.	Une architecture splénique intacte facilite le développement des réponses immunitaires contre le LCMV.....	115
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		117
LISTE DES REFERENCES		123

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation du génome du VHC.....	9
Figure 2 : Réponses immunitaires cellulaires typiques développées suite à l'infection par le VHC.....	12
Figure 3 : Réponses immunitaires adaptatives développées contre l'infection aiguë par le LCMV.....	21
Figure 4 : Voies de présentation antigénique.....	24
Figure 5 : Différenciation des lignées hématopoïétiques.....	30
Figure 6 : Phénotype des sous-populations de lymphocytes B spléniques matures.....	33
Figure 7 : Développement des populations de lymphocytes B à l'état normal.....	38
Figure 8 : Recombinaison somatique et synthèse de la chaîne lourde des immunoglobulines murines...	43
Figure 9 : Rôles attribués aux anticorps naturels.....	48
Figure 10 : Organisation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines de souris C57Bl/6.	49
Figure 11 : Organisation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines de souris QM.....	50
Figure 12 : Carte du minilocus codant pour la chaîne lourde humaine transgénique HC1.....	50
Figure 13 : Organisation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines de souris J _H T.	51
Figure 14 : Sous-populations de lymphocytes B trouvées dans la cavité péritonéale de souris naïves.....	74
Figure 15 : Sous-populations lymphocytaires spléniques de souris naïves.....	77
Figure 16 : Concentration d'IgM sériques de souris naïves.....	78
Figure 17 : Liaison des IgM naturels sériques au LCMV-WE.....	79
Figure 18 : Taille de la population de cellules dendritiques splénique de souris infectées avec le LCMV-WE.....	80
Figure 19 : Prolifération de lymphocytes T CD8 de souris P14 après co-incubation avec des cellules dendritiques splénique de souris infectées avec le LCMV-WE.....	81
Figure 20 : Expansion des lymphocytes T spléniques 8 jours après l'infection avec le LCMV-WE.....	82
Figure 21 : Expression du marqueur d'activation CD62L à la surface des lymphocytes T CD8.....	84
Figure 22 : Identification de lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV-WE.....	86
Figure 23 : Production de cytokines par les lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques au LCMV-WE.....	88

Figure 24 : Activité cytolytique des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV-WE.	90
Figure 25 : Maintien des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV-WE 50 jours après l'infection.....	91
Figure 26 : Maintien de la capacité de production de cytokines par les lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques au LCMV-WE.	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Synthèse des différences génotypiques des souches de souris utilisées.....	51
Tableau 2 : Détection du LCMV-WE dans le sang de souris infectées à faible dose.....	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

7-AAD : 7-amino-actinomycine D

[³H] : Tritium

[⁵¹Cr] : chromate de sodium

°C : degré Celcius

α : alpha

β : beta

β-ME : β-Mercaptoéthanol

γ : gamma

κ : kappa

λ : lambda

μCi : microcurie

μg : microgramme

μL : microlitre

μm : micron

AcNat : Anticorps naturels

ALT : alanine amino transférase

APC : Allophycocyanine

ARFP : *alternate reading frame*

ARN : acide ribonucléique

ATCC : *American Type Culture Collection*

BCR : récepteur des lymphocytes B (*B cell receptor*)

BSA : albumine sérique bovine

CavP : cavité péritonéale

CDR-3 : région déterminant la complémentarité

CO₂ : dioxyde de carbone

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CPM : coups par minute

CR : récepteur du complément

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CTL : lymphocytes T cytotoxiques

D : segments de diversité

DCs: cellules dendritiques

DN : double négatif

DO : densité optique

DP : double positif

ELISA : *enzyme-linked immunosorbant assay*

F : *frameshift*

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FO : folliculaire

GM-SCF : *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*

GP : glycoprotéine

haptène NP : haptène *(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-acetyl*

HBSS : *Hanks' Balanced Salt Solution*

HRP : *horseradish peroxidase*

IFN : interféron

Ig : Immunoglobuline (IgM, IgD, IgG, IgA et IgE)

IL : interleukine

IMDM : *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

i.p. : intrapéritonéal

ISG : *interferon stimulated gene*

i.v. : intraveineux

J : segments de jonction

J_HT+S : souris J_HT ayant reçu du sérum de souris C57Bl/6 naïves

kb : kilo-bases

LB : lymphocytes B

LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire

LDL : *low density lipoprotein*

LT : lymphocytes T

mM : millimolaire

MEM : *Modified Essential Medium*

mg : milligramme

mL : millilitre

NatAb : *natural antibodies*

Nb : nombre

ND : non déterminé

ng : nanogramme

nm : nanomètre

NP : nucléoprotéine

ns : non significatif

OLS: organes lymphoïdes secondaires

OPD : Ortho-phenylenediamine

ORF : *open reading frame*

p/v : poids/volume

PAMPs : *Pathogen-associated molecular patterns*

PD-1 : *programmed cell death-1*

PBS : tampon phosphate (*phosphate buffered saline*)

PCR : *polymerase chain reaction*

PE : phycoérythrine

PGM : cellule progénitrice granulocyte-monocyte

pIgR : récepteur d'Ig polymériques

PLC : cellule progénitrice lymphoïde commune

PMC : cellule progénitrice myéloïde commune

PME : cellule progénitrice mégacaryocyte-érythrocyte

PRR : *pattern recognition receptor*

RAG: *recombination activated genes*

RIG-I : *retinoic acid inducible gene-1*

rpm : rotation par minute

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

SEM : erreur moyenne standard

SP : simple positif

SR-B1 : *Scavenger receptor class member B 1*

SVF : sérum de veau fœtal

TAP : *transporter associated with antigen processing*

TCR : *T-cell receptor*

TdT : *Terminal deoxynucleotidyl transférase*

T_H1 : lymphocyte T auxiliaire 1

T_H2 : lymphocyte T auxiliaire 2

TI : T-indépendant

TLR : *Toll-like Receptors*

TP : température pièce

U : unité

uff : unité formant des foyers

UTR : *untranslated region*

V : segments variables

v/v : volume/volume

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VSV : virus de la stomatite vésiculaire

ZM : zone marginale

INTRODUCTION

Les infections virales chroniques constituent un problème de santé publique majeur. En effet, on estime à plus de 2 milliards le nombre de personnes qui, à travers le monde, sont affectées par des infections virales chroniques causées entre autres par les virus de l'immunodéficience humaine (VIH), de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite C (VHC) (Frebel *et al.* 2010). À l'exception du VHB, aucun vaccin n'assure de protection contre ces infections. De plus, les traitements disponibles actuellement ne permettent pas leur élimination efficace (Major 2009). Par contre, 15 à 30% des patients infectés par le VHC arrivent à résoudre spontanément l'infection et on sait maintenant que l'élimination virale est associée au développement et au maintien de réponses immunitaires cellulaires multi-spécifiques (Lauer *et al.* 2004; Schulze zur Wiesch *et al.* 2005; Smyk-Pearson *et al.* 2006). Comme les mécanismes menant au développement de ces réponses protectrices n'ont pas été élucidés, il apparaît donc important de mieux comprendre les interactions entre le VHC et son hôte.

Suite à l'infection par le VHC, un délai de quelques semaines sépare le moment de l'infection et la détection des premiers effecteurs fonctionnels de l'immunité spécifique. Certains croient d'ailleurs que l'issue de l'infection par le VHC serait fixée durant ce délai (Bertolino *et al.* 2008), mais le manque flagrant d'informations concernant les étapes précoces de cette infection empêche de confirmer cette hypothèse (Cox *et al.* 2009). Les réponses immunitaires peuvent être divisées en deux catégories : les réponses immunitaires innées et adaptatives (Dranoff 2004). Depuis plusieurs années, il est reconnu que les effecteurs de ces deux types de réponses travaillent de concert pour combattre un large éventail de microorganismes pathogènes et que le développement de réponses immunitaires spécifiques efficaces dépend de leur interaction efficiente (Janeway & Medzhitov 2002). Les éléments du système immunitaire inné assurent la première ligne de défense contre les pathogènes, tandis que les lymphocytes T et B adaptatifs sont responsables des réponses immunitaires spécifiques et assurent une protection de longue durée.

Comme le VHC pénètre l'organisme majoritairement par la voie veineuse, un des premiers effecteurs du système immunitaire inné étant rencontrés par les particules virales sont les anticorps naturels (AcNat). Le fait qu'ils « patrouillent » l'organisme indépendamment des

infections rend attrayante l'étude de leur interaction avec des pathogènes ayant pénétré la circulation sanguine. Les AcNat sont majoritairement d'isotype IgM (immunoglobulines M) et sont présents dans le sang d'individus immunologiquement naïfs (Avrameas 1991). Dans des modèles murins, il a été établi que les AcNat sont capables d'offrir une protection précoce contre des infections virales et bactériennes par la formation de complexes-immuns (avec ou sans la liaison au complément), qui suite à leur formation sont recrutés aux organes lymphoïdes secondaires (Ochsenbein, Fehr *et al.* 1999; Ochsenbein, Pinschewer *et al.* 1999). C'est grâce à la liaison de récepteurs spécifiques aux anticorps ou au système du complément que les complexes-immuns sont retirés de la circulation sanguine et peuvent être redirigés vers les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), qui elles pourront internaliser et présenter les antigènes aux cellules effectrices du système immunitaire adaptatif (Durrbach *et al.* 2007; Ehrenstein & Notley 2010). L'importance des AcNat dans la protection précoce et le développement de réponses immunitaires humorales spécifiques contre des infections virales a été démontrée, entre autres, dans le cas d'infections avec les virus de l'influenza et de la stomatite vésiculaire (VSV) (Baumgarth *et al.* 2000; Ochsenbein, Fehr *et al.* 1999).

Malheureusement, l'analyse de l'impact de la présence des AcNat dans le développement de réponses immunitaires spécifiques au VHC est compliquée par le fait que la seule autre espèce animale susceptible à cette infection est le chimpanzé. Comme cette espèce est actuellement en danger, que son utilisation est limitée et très coûteuse et qu'aucun modèle adéquat de petits animaux de laboratoires n'est actuellement disponible pour l'étude de l'infection par le VHC, plusieurs groupes de recherche ont opté pour l'utilisation d'un modèle murin d'infections virales persistantes (Kim & Ahmed 2010). Ce modèle d'infection chronique est le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), dont l'hôte naturel est la souris. Le LCMV est, comme VHC, un virus à ARN dont l'infection peut être soit contrôlée par les réponses immunitaires ou devenir persistante. Bien que les infections par le VHC et le LCMV soient différentes sous plusieurs aspects, les réponses immunitaires développées contre ces deux virus sont similaires. Dans les deux cas, les réponses immunitaires cellulaires sont cruciales pour éliminer la virémie et une apparition tardive d'anticorps neutralisants est observée (Virgin *et al.* 2009).

Au cours des dernières années, notre laboratoire s'est notamment consacré à l'étude du rôle des AcNat dans le développement de réponses antivirales (Bigras 2008; Meunier 2007). Comme très peu d'études ont eu pour objet d'évaluer l'importance de ces anticorps dans le développement de réponses adaptatives cellulaires antivirales, nous avons choisi d'étudier la question dans le cadre d'une infection avec le LCMV. La grande majorité des études évaluant le rôle des AcNat utilisent des souris de types sauvage et des souris sans anticorps (Baumgarth 2011; Ehrenstein & Notley 2010). Comme cette situation est loin de la réalité observée dans des espèces animales non congéniques, nous proposons d'ajouter une variable à notre étude, soit l'utilisation de deux souches murines ayant un répertoire d'AcNat intermédiaire aux deux groupes de souris de référence. Nous avons choisi les souris QM, possédant un segment V(D)J déjà réarrangé pour lier spécifiquement l'haptène nitrophényl (Cascalho *et al.* 1996); les souris HC1, pouvant recombiner des segments d'immunoglobulines humaines à partir d'un minilocus transgénique (Xu & Davis 2000) et les souris J_HT, ne possédant pas de lymphocytes B matures, dû à l'élimination de tous les segments J des chaînes lourdes de leurs immunoglobulines (Chen, Trounstine, Alt *et al.* 1993). À titre de souche témoin exprimant une diversité d'AcNat complète, nous avons utilisé les souris C57Bl/6 et nous avons émis l'hypothèse suivante : Les souris ayant une diversité de répertoire des lymphocytes B limitée auront une capacité réduite à développer des réponses immunitaires cellulaires suite à une l'infection par le LCMV.

Pour tester cette hypothèse, nous avons d'abord comparé par cytométrie en flux la représentation de différentes sous-populations de lymphocytes B et T trouvées dans la cavité péritonéale et la rate des différentes souches de souris naïves. Nous avons ensuite quantifié les IgM sanguins pré-immuns et évalué la capacité de ces anticorps à lier des particules de LCMV-WE purifiées, à l'aide de tests ELISA.

Afin d'évaluer si la capacité des IgM naturels à lier les particules de LCMV-WE purifiées *in vitro* peut se traduire en une meilleure activation des réponses immunitaires adaptatives, nous avons comparé la capacité des cellules dendritiques de nos différentes souris à présenter des antigènes viraux suite à une infection avec LCMV-WE.

Nous avons ensuite comparé les réponses immunitaires cellulaires développées par les différentes souches de souris au jour 8 après l'infection avec le LCMV-WE. Pour ce faire, nous avons évalué l'intensité des réponses immunitaires en analysant par cytométrie en flux l'expansion des populations totales de lymphocytes T CD4 et CD8, de même que la diminution d'expression du marqueur d'activation CD62L à la surface des lymphocytes T CD8. Nous avons également évalué par cytométrie en flux la fréquence et le nombre de CTL spécifiques pour le LCMV, grâce à l'utilisation de tétramères de classe-I, et la fonctionnalité de ces CTL en analysant la production de TNF- α et d'IFN- γ suite à une stimulation peptidique *ex vivo*. Finalement, nous avons évalué la capacité des CTL à lyser spécifiquement des cellules cibles *ex vivo*.

Afin d'uniquement évaluer l'impact de la présence des AcNat sur les réponses cellulaires développées contre le LCMV-WE, nous avons injecté 2 mL de sérum de souris C57Bl/6 naïves à des souris J_HT (J_HT+S). Le transfert de cette quantité de sérum rétablit, au moment de l'infection, le taux d'IgM sanguins des souris J_HT+S à un niveau comparable à celui des souris de type sauvage. Suite au transfert de sérum, nous avons évalué l'intensité, la spécificité et la fonctionnalité des réponses immunitaires cellulaires antivirales obtenues au jour 8 après l'infection.

Nous avons finalement évalué la capacité de maintien des réponses CTL, plusieurs semaines après l'infection avec le LCMV-WE, de nos différentes souches de souris en reprenant quelques analyses faites au jour 8 après l'infection. Le contrôle de la virémie a également été suivi par des titrages viraux effectués à partir du sang de nos animaux infectés.

Nos résultats démontrent que les AcNat peuvent non seulement favoriser la détection rapide et le recrutement du LCMV à la rate, mais semblent augmenter la capacité de présentation d'antigènes viraux, améliorant donc l'induction de réponses cellulaires antivirales. Nos résultats suggèrent également qu'une corrélation directe existe entre la diversité du répertoire des lymphocytes B et l'intensité des réponses cellulaires antivirales.

Chapitre 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Infections virales chroniques

Toute infection virale peut mener à une de trois issues : l'élimination de l'infection (infection aiguë), la mort de l'hôte ou l'établissement d'une infection chronique. Au moins deux conditions doivent être atteintes pour permettre l'établissement de la persistance virale. D'abord, le virus doit échapper à l'élimination complète par le système immunitaire et ce dernier doit s'ajuster à la présence continue d'antigènes viraux, tout en limitant les dommages immunopathologiques (Rouse & Sehrawat 2010).

Une stratégie permettant la persistance virale est la réplication continue de virions infectieux, alors que des réponses antivirales sont fonctionnelles. Les virus persistant de cette façon induisent une activation constante des réponses immunitaires adaptatives, pouvant mener à l'épuisement des effecteurs spécifiques au pathogène (Klenerman & Hill 2005; Shin & Wherry 2007; Wherry *et al.* 2003; Zajac *et al.* 1998). Des exemples de virus profitant de cette méthode de persistance incluent chez l'humain le VIH, le VHB et le VHC et chez les souris le LCMV (Virgin *et al.* 2009).

1.1. Virus de l'hépatite C (VHC)

Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 170 million de personnes à travers le monde (environ 3% de la population mondiale) sont actuellement infectées par le virus de l'hépatite C, dont de 60 à 80% le sont de façon chronique (Rehermann 2009). Depuis sa découverte en 1989 (Choo *et al.* 1989), le VHC est associé à des problèmes importants de santé publique et représente en Amérique du Nord la principale cause de troubles hépatiques, comme par exemple le développement progressif de fibrose hépatique, de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire (Alter & Seeff 2000; Liang *et al.* 2000; Seeff 2002). Ces complications de l'infection mettent ainsi le VHC en tête de liste des causes de transplantations hépatiques (Bertolino *et al.* 2008).

Avant l'identification du VHC, les transfusions sanguines contaminées ont été une source majeure de transmission du virus à travers le monde. Malgré les techniques disponibles à l'heure actuelle pour la détection du VHC, les transfusions sanguines et l'utilisation de matériel médical contaminé restent encore des modes de transmission importants dans les pays en

développement. Les nouveaux cas d'infection par le VHC dans les pays développés sont plutôt associés à l'échange de seringues contaminées, à des piqûres ou blessures de travailleurs de la santé avec du matériel contaminé, ou plus rarement par transmission sexuelle ou périnatale (Alter 2002; Dore *et al.* 2003; Maheshwari *et al.* 2008).

L'infection aiguë par le VHC est rarement symptomatique, rendant difficile l'analyse de la progression de la maladie avant qu'elle ne devienne chronique. De tous les cas de maladies hépatiques aiguës symptomatiques répertoriées aux États-Unis, seulement 15 % pourraient être causés par le VHC (Armstrong *et al.* 2000). Puisque l'infection peut prendre de 20 à 40 ans pour causer des dommages hépatiques, il n'est pas rare que des patients consultant pour ces raisons soient déclarés séropositifs pour le VHC plusieurs années après avoir contracté l'infection (Bertolino *et al.* 2008). Cette situation rend donc la détection, le traitement rapide et l'étude des réponses immunitaires précoces difficiles à accomplir. Pour remédier au manque de données scientifiques associées à l'infection humaine aiguë, certains groupes de recherche ont orienté leurs efforts vers l'obtention de cohortes de patients infectés de façon aiguë (Cox *et al.* 2009). Les résultats qu'obtiendront ces groupes de recherche permettront, espérons le, de compléter les informations recueillies sur les étapes précoces de l'infection chez le chimpanzé et de perfectionner les stratégies de prophylaxie et de traitements contre l'infection par le VHC (Rehermann 2009). À l'heure actuelle, aucun vaccin n'est disponible et le seul traitement disponible (combinaison de l'interféron (IFN) pégylé à la ribavirine) n'est efficace que dans 50% des cas (Pearlman 2004) et a peu d'effet contre le génotype le plus représenté en Amérique du Nord et en Europe (Dienstag & McHutchison 2006; Hnatyszyn 2005).

1.1.1. Agent étiologique

Le virus de l'hépatite C est un virus enveloppé à ARN (acide ribonucléique) simple brin de polarité positive du genre *hepacivirus*, appartenant à la famille des *Flaviviridae* (Lindenbach *et al.* 2007). En absence d'immunosuppression, le VHC est non-cytopathique, et infecte de façon prédominante les hépatocytes (Thimme *et al.* 2002; Thimme *et al.* 2001; Timm *et al.* 2004).

Le génome du VHC a une taille approximative de 9,6 kilo-bases (kb) et code pour les protéines virales structurales core, E1 et E2 et les sept protéines virales non-structurales P7, NS2, NS3,

NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (Figure 1) (Bartenschlager *et al.* 2004; Lindenbach *et al.* 2007; Moradpour *et al.* 2007). La petite protéine F (*frameshift*) est encodée dans un cadre de lecture alternatif ouvert (*alternate open reading frame*, ARFP), mais sa fonction et son immunogénicité restent encore obscures (Drouin *et al.* 2010; Rehmann 2009). Le séquençage d'isolats viraux à permis d'identifier 6 génotypes majeurs (1 à 6) et plus de 100 sous-types (Rehmann 2009; Simmonds *et al.* 2005).

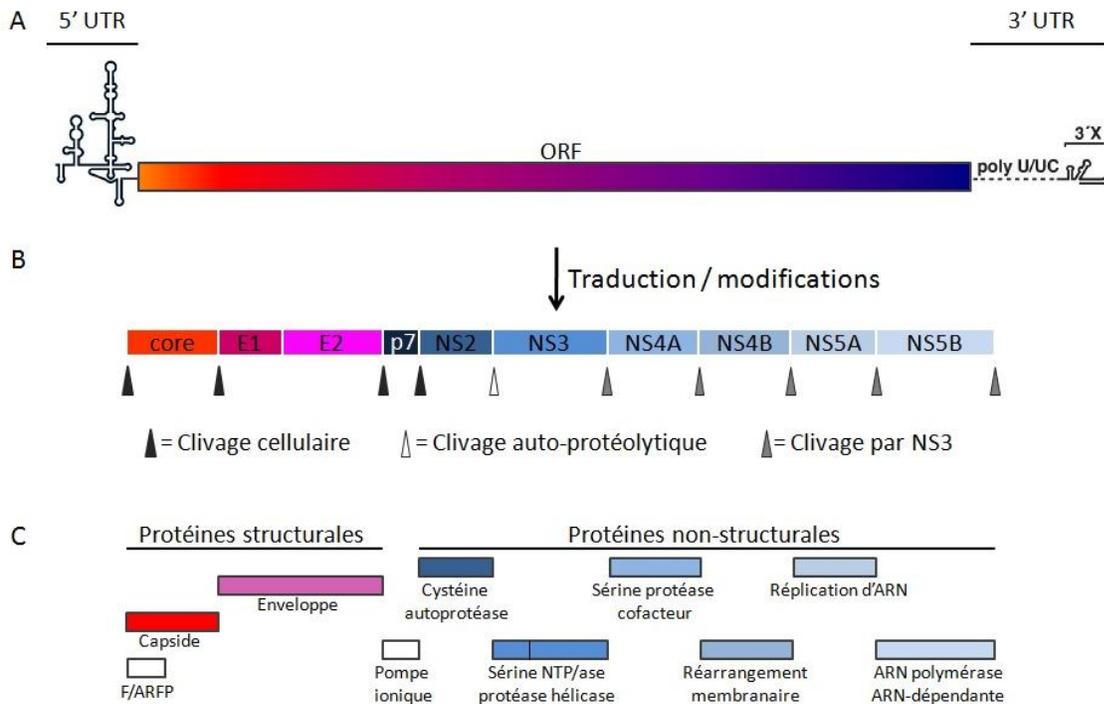


Figure 1 : Organisation du génome du VHC.

A) Structure du génome d'ARN simple brin du VHC. La traduction du génome d'ARN est initiée dans la région 5' et engendre une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés. B) Modifications co- et post-traductionnelles de la polyprotéine du VHC. Des protéases cellulaires et virales clivent la polyprotéine pour donner lieu aux protéines structurales core, E1 et E2, trouvées près de la partie N-terminale et aux protéines non-structurales p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B, trouvées près de la partie C-terminale. C) Fonctions associées aux protéines du VHC. U: uridine; C: cytidine; UTR: *untranslated region*; ORF: *open reading frame*. Figure adaptée de (Rehmann 2009).

1.1.2. Déroulement de l'infection par le VHC

Les protéines virales E1 et E2 sont impliquées dans l'entrée du VHC dans les cellules cibles et, jusqu'à présent, quatre protéines des cellules hôtes ont été identifiées essentielles à l'entrée du virus (Ploss *et al.* 2009). Ces protéines sont : la tétraspanine CD81 (Pileri *et al.* 1998), le *scavenger receptor class member B 1* (SR-B1; Scarselli *et al.* 2002)) et les protéines de jonction serrée claudin-1 (Evans *et al.* 2007) et occludin (Benedicto *et al.* 2009; Liu, Yang *et al.* 2009). Il a

aussi été démontré que d'autres protéines cellulaires facilitent l'entrée du virus sans être suffisantes à l'infection, dont le récepteur des LDL (*low density lipoprotein*; (Molina *et al.* 2007)), les lectines de type C associées aux cellules dendritiques ou au foie et ganglions lymphatiques (DC-SIGN et L-SIGN respectivement; (Cormier *et al.* 2004; Lozach *et al.* 2003; Lozach *et al.* 2004)) et les glycosaminoglycans (Barth *et al.* 2006).

Dès l'entrée du virus dans les hépatocytes de l'hôte, la reconnaissance du génome d'ARN viral engendre la synthèse d'interféron-beta (IFN- β). Cette synthèse peut être activée par les deux voies majeures des défenses innées de l'hôte, soit TLR-3 (*Toll-Like Receptor-3*) et RIG-I (*Retinoic acid Inducible Gene-1*) (Gale Jr & Foy 2005; Thimme *et al.* 2006). L'IFN- β sécrété par les cellules infectées permet la protection des cellules avoisinantes en induisant la transcription de gènes antiviraux, nommés ISG (*interferon stimulated genes*). Ces gènes ont pour rôle de déstabiliser la transcription et la traduction d'ARN viraux et cellulaires et d'amplifier les réponses en interféron de type I (Rehermann 2009). Par contre, pour assurer la persistance du VHC, plusieurs protéines virales sont impliquées dans l'inhibition de l'activation des réponses immunitaires innées (Cummings *et al.* 2009; Dash *et al.* 2008).

L'infection par le VHC peut être divisée en trois phases distinctes (Figure 2). La phase pré-aiguë correspond aux premières semaines suivant l'infection et est caractérisée par une réplication virale rapide permettant de détecter l'ARN viral dans le sang quelques jours après l'infection. La virémie atteint un sommet de entre 6 et 10 semaines après l'infection, et ce, sans considérer l'issue de celle-ci (Shoukry *et al.* 2003; Thimme *et al.* 2001). Des lymphocytes T spécifiques au virus peuvent être détectés dans la circulation sanguine entre 5 et 9 semaines après l'infection, mais ceux-ci ne sont pas immédiatement fonctionnels (Lechner *et al.* 2000; Urbani *et al.* 2002). La phase aiguë est caractérisée par une hépatite aiguë transitoire survenant entre 8 et 12 semaines après l'infection. Les dommages hépatiques sont évalués par le niveau sérique de l'enzyme hépatique alanine amino transférase (ALT) et sont causés par l'infiltration dans le foie de lymphocytes T CD8 spécifiques au VHC (Walker 2010). L'activité lytique de ces cellules est associée à la diminution du titre viral et des études de cas suggèrent que, malgré le retard considérable des réponses cellulaires, les patients présentant des signes de jaunisse durant la phase aiguë sont plus prompts à la résolution spontanée de l'infection par le VHC (Maheshwari

et al. 2008). La phase post-aiguë correspond à l'issue de l'infection, soit l'élimination ou la persistance virale.

1.1.3. Réponses immunitaires adaptatives contre le VHC

Un phénomène caractérisant l'infection par le VHC est que les réponses immunitaires spécifiques sont retardées et qu'une longue période de silence immunologique est observée alors que la virémie est élevée (Cooper *et al.* 1999). La Figure 2 illustre trois types de réponses immunitaires cellulaires développées contre l'infection par le VHC. Le premier déroulement correspond à l'élimination spontanée de l'infection et survient chez environ 15 à 30 % des patients infectés (Figure 2 A). Malgré le délai de détection des réponses immunitaires, la résolution spontanée de l'infection par le VHC, tant chez le chimpanzé que chez l'humain, est associée à de fortes réponses multi-spécifiques assurées par les lymphocytes T CD4 auxiliaires et CD8 cytotoxiques (Day *et al.* 2002; Thimme *et al.* 2001; Ferrari *et al.* 1994). Ces réponses multi-spécifiques assurent le contrôle de la virémie et le maintien à long terme de lymphocytes T CD4 et CD8 mémoire (Lauer *et al.* 2004; Yerly *et al.* 2008).

Le second déroulement représente une infection au cours de laquelle la virémie est partiellement contrôlée (Figure 2 B). Comme dans le cas de l'élimination spontanée, la réplication virale semble être contrôlée rapidement, mais le développement de réponses T CD4 et CD8 ciblant un nombre restreint d'épitopes (oligoclonales) favorise l'épuisement des réponses T CD4, causant la persistance virale (Gerlach *et al.* 1999). Malgré la chronicité de l'infection, certains individus maintiennent des réponses T CD8 d'ampleur variable, qui se traduisent par des épisodes d'élévation des ALT sériques (Abe *et al.* 1992; Mosley *et al.* 2008).

Le troisième déroulement correspond à une infection au cours de laquelle la virémie n'est jamais contrôlée (Figure 2 C). Dans ce cas, les réponses T CD4 et CD8 sont généralement faibles et oligoclonales. Malgré que des réponses cellulaires puissent être détectées, la perte des réponses T CD4 induit un phénotype d'épuisement des réponses T CD8 (Blackburn *et al.* 2009; Wherry *et al.* 2007). L'issue de l'infection est invariablement la persistance virale, dont le niveau de virémie varie d'un individu à l'autre (Arase *et al.* 2000; Fanning *et al.* 2000; Thomas *et al.* 2000).

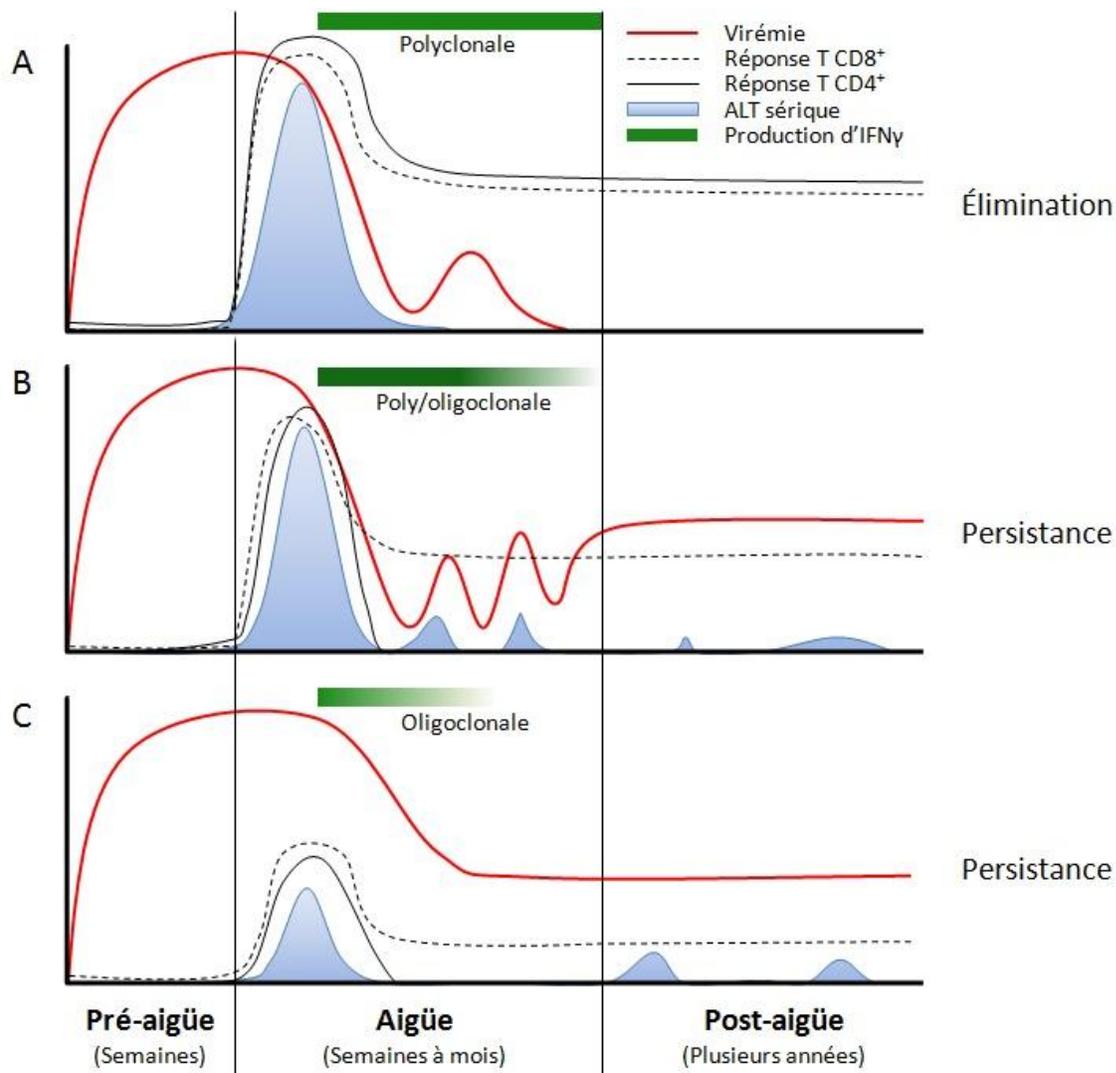


Figure 2 : Réponses immunitaires cellulaires typiques développées suite à l'infection par le VHC.

Patrons sérologiques de réponses immunitaires développées lors de A) résolution spontanée, B) contrôle partiel ou C) persistance de l'infection par le VHC. ALT : alanine amino transférase. Figure inspirée de (Bowen & Walker 2005).

Comme nous sommes particulièrement intéressés par les mécanismes d'élimination spontanée de l'infection par le VHC, les prochaines sous-sections seront dédiées à la description des réponses immunitaires adaptatives permettant le contrôle efficace de l'infection.

1.1.3.1. Réponses T CD4 contre le VHC

Les réponses T CD4 soutenues ont été démontrées essentielles à l'élimination de l'infection par le VHC (Eckels *et al.* 2000; Grakoui *et al.* 2003). Il est d'ailleurs accepté que la perte de prolifération de ces cellules est également associée à la persistance de plusieurs infections

virales (Matloubian *et al.* 1994; Shin & Wherry 2007). Chez l'humain, la capacité de sécrétion d'IL-2 (interleukine-2) et d'IFN- γ (interféron-gamma), de même que la prolifération des lymphocytes T (LT) CD4 sont associées à la presque totalité des patients ayant résolu l'infection par le VHC, comparativement à environ 50% des patients infectés de façon chronique. De plus, l'ampleur de ces réponses est entre 2.5 à 5 fois plus élevée dans le groupe ayant résolu l'infection (Semmo *et al.* 2007) et il est démontré que la sécrétion de ces cytokines favorise le développement des réponses T CD8 (CTL) lors de la phase aiguë d'infection (Urbani, Amadei, Fisicaro *et al.* 2006). Malgré qu'aucune immunodominance n'ait été identifiée (Ishii & Koziel 2008), de fortes réponses T CD4 multi-spécifiques dirigées contre les protéines non-structurales du VHC ont été associées à l'élimination de l'infection (Day *et al.* 2002), de même qu'au maintien de cette population cellulaire, assurant ainsi une réponse mémoire (Schulze zur Wiesch *et al.* 2005).

Par opposition, le développement de réponses T CD4 moins diversifiées (Day *et al.* 2002) ou orientées vers des réponses humorales (T_{H2}), par la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 (Tsai *et al.* 1997), durant la phase aiguë de l'infection peut mener à la perte de l'activité auxiliaire des lymphocytes T CD4 (Urbani *et al.* 2002; Gerlach *et al.* 1999). Cette perte de fonction n'empêche pas le développement de réponses CTL ou humorales, mais celles-ci n'offriront qu'un contrôle transitoire de la virémie et mèneront à la persistance virale (Kaplan *et al.* 2007).

Un facteur possiblement impliqué dans la détermination de l'issue de l'infection par le VHC est la nature allélique des molécules de présentation antigénique appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité de classe-II (CMH-II) exprimées par chaque individu (Fitzmaurice & Klenerman 2008).

1.1.3.2. Réponses T CD8 contre le VHC

La résolution de l'infection par le VHC est généralement associée au développement de réponses T CD8 multi-spécifiques (Bowen & Walker 2005). Les CTL jouent un rôle plus direct que les lymphocytes T CD4 dans la médiation des effets antiviraux, grâce à deux fonctions principales, soit la lyse directe des cellules infectées et la relâche de cytokines antivirales (Guidotti & Chisari 2001). Grâce à l'utilisation de tétramères de classe-I, la fréquence

périphérique de lymphocytes T CD8 spécifiques au VHC a pu être estimée à plus de 3 ou 4 % pour chaque épitope testé (Lechner *et al.* 2000). Malgré que le développement des réponses CTL suit une cinétique d'expansion normale après l'infection par le VHC, un retard dans l'acquisition des fonctions effectrices est observé (Shoukry *et al.* 2003; Thimme *et al.* 2001). Ce phénomène n'est pas encore très bien compris, mais il a été démontré que ces lymphocytes acquièrent la capacité de sécrétion de cytokines (TNF- α et IFN- γ), de perforine et de granzyme B plus tardivement que lors d'autres infections virales aiguës, et ce, sans égard à l'issue de l'infection (Lechner *et al.* 2000; Urbani *et al.* 2002).

Lors de leur phase d'expansion, les lymphocytes T CD8 expriment temporairement la molécule d'inhibition PD-1 (*programmed cell death 1*), dont un niveau d'expression plus faible semble associé à l'élimination de l'infection (Golden-Mason *et al.* 2007; Kasproicz *et al.* 2008; Radziewicz *et al.* 2008; Urbani, Amadei, Tola *et al.* 2006). Suite à l'élimination du virus, il y a contraction de la population CTL, diminution de l'expression de PD-1 (Bowen *et al.* 2008; Kasproicz *et al.* 2008; Radziewicz *et al.* 2007) et augmentation de l'expression de marqueurs de la réponse mémoire, dont Bcl-2 et CD127 (Badr *et al.* 2008; Golden-Mason *et al.* 2006; Urbani, Amadei, Fiscaro *et al.* 2006).

Comme pour les réponses T CD4, la nature allélique des molécules de présentation antigénique appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité de classe-I (CMH-I) est un facteur possiblement impliqué dans l'issue de l'infection par le VHC (Fitzmaurice & Klenerman 2008).

1.1.3.3. Réponses humorale contre le VHC

Les réponses humorales ne semblent pas essentielles à l'élimination de l'infection par le VHC, puisque des patients sécrétant peu d'anticorps peuvent contrôler l'infection (Semmo *et al.* 2006). L'apparition d'anticorps contre plusieurs épitopes non neutralisants survient entre 6 et 8 semaines après l'infection (Netski *et al.* 2005; Rahman *et al.* 2004), mais ne semble pas influencer l'issue de l'infection (Bartosch, Bukh *et al.* 2003). Il a par contre récemment été suggéré que la cinétique d'apparition des anticorps neutralisants pouvait influencer l'issue de l'infection (Pestka *et al.* 2007; Zeisel *et al.* 2007). En effet, plusieurs études ont démontré que la réponse en anticorps neutralisant était plus diversifiée, mais surtout, détectée plus tardivement

chez les patients infectés de façon chronique, que chez les patients ayant éliminé l'infection (Logvinoff *et al.* 2004; Meunier *et al.* 2005). Malheureusement, la détection des anticorps neutralisants survient généralement après la mutation des régions ciblées par ceux-ci, les rendant inefficaces dû au décalage dans le temps (Dowd *et al.* 2009; Keck *et al.* 2009; von Hahn *et al.* 2007). Plusieurs épitopes neutralisants impliqués dans la liaison au CD81 et/ou au SR-B1 ont été identifiés sur la protéine E2, tant dans des séquences linéaires que conformationnelles (Johansson *et al.* 2007; Law *et al.* 2008; Owsianka *et al.* 2001) et il a par ailleurs récemment été suggéré que le site de neutralisation véritable du VHC serait masqué par une région hypervariable très immunogène (Tarr *et al.* 2007). Cette région couvre physiquement le domaine de la protéine E2 impliqué dans la liaison au CD81, qui lui n'est reconnu que par un très faible pourcentage d'anticorps chez l'humain (Bankwitz *et al.* 2010).

1.1.4. Modèles expérimentaux disponibles pour l'étude du VHC

Malgré la quantité impressionnante d'information accumulée sur l'infection par le VHC, son étude reste encore laborieuse dû à la difficulté de cultiver le virus *in vitro* et au manque de systèmes modèles complets (Boonstra *et al.* 2009; Lindenbach *et al.* 2007). Dès le clonage du génome du VHC en 1989 (Choo *et al.* 1989) la possibilité d'infecter des hépatocytes primaires de chimpanzés et d'humains avec des isolats de patients infectés a été démontrée, mais la réplication du génome viral n'a été rendue possible qu'à partir du développement de réplicons subgénomiques (Bartenschlager & Lohmann 2000). Ce n'est par contre qu'à partir de la construction du clone JFH-1 que la production *in vitro* de virions infectieux a pu être obtenue (Kato *et al.* 2003). En 2003, un second modèle infectieux était développé, soit le système de pseudoparticules du VHC (Bartosch, Dubuisson *et al.* 2003). C'est d'ailleurs grâce à ces deux modèles infectieux que plusieurs récepteurs d'entrée cellulaire ont été identifiés (voir section 1.1.2 de ce chapitre). Malgré que le développement de ces modèles réplicatifs aient permis l'obtention d'informations sur la réplication et les étapes précoces de l'infection par le VHC, un problème reste : les propriétés de ces clones ne correspondent pas à celles des virions infectant l'humain.

La seule autre espèce animale naturellement susceptible à l'infection par le VHC est le chimpanzé, mais malgré une très grande similitude entre le déroulement de l'infection par le

VHC chez le chimpanzé et l'humain, certaines divergences sont observées. Les chimpanzés ont une propension plus élevée que l'humain à résoudre spontanément l'infection par le VHC et ne développent pas les atteintes hépatiques observées chez l'humain (Walker 2010). Malgré ces différences, le chimpanzé reste le seul modèle animal chez lequel la pathogénèse virale et les réponses immunitaires adaptatives peuvent être étudiées en détail lors d'une infection expérimentale (Boonstra *et al.* 2009). Malgré les atouts de ce modèle, des inconvénients éthiques majeurs limitent l'utilisation de cette espèce en danger de disparition.

Pour permettre l'étude *in vivo* de l'infection par le VHC, de nouveaux modèles animaux ont dû être développés. La diversité génétique et la rapidité de reproduction des rongeurs de laboratoire rendent attrayante leur utilisation, par contre ces derniers ne sont pas susceptibles à l'infection par le VHC. Plusieurs modèles de rongeurs de laboratoire ont donc été développés pour échapper à cette problématique. Un modèle de rats rendus tolérants à la présence de cellules d'hépatome humain (Wu *et al.* 2005) et deux modèles de souris, soit un modèle d'immunosuppression combinée à la greffe hétérotopique de foie humain (Galun *et al.* 1995; Maeda *et al.* 2004) et un modèle de transplantation d'hépatocytes humains dans des souris uPA-SCID (Mercer *et al.* 2001), ont récemment été développés. Même si ces trois modèles animaux permettent la réplication virale, la virémie de courte durée et la difficulté de conception de ces animaux rendent laborieuse leur utilisation. De plus, malgré qu'ils permettent l'étude des mécanismes de défense innés, ces modèles ne permettent pas l'étude des réponses immunitaires adaptatives (Boonstra *et al.* 2009). Afin de remédier à ce problème, un nouveau modèle de souris immunocompétentes exprimant les quatre protéines humaines permettant l'entrée du VHC dans les cellules cibles a récemment été développé. Ce modèle animal étant ainsi susceptible à l'infection par différents génotypes du VHC, il pourra éventuellement permettre l'étude de réponses immunitaires adaptatives (Dorner *et al.* 2011).

Malgré l'introduction de ce nouveau modèle animal, il est fort possible que les réponses immunitaires développées par ces souris ne soient pas récapitulatives de celles développées chez l'humain. C'est d'ailleurs pour cette raison que plusieurs groupes de recherche ont opté pour l'étude des réponses immunitaires développées contre le LCMV, modèle d'infection chronique ayant pour hôte naturel la souris.

1.2. Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)

Le LCMV fut, en 1933, le premier arenavirus zoonotique à être identifié chez l'humain suite à une épidémie d'encéphalites dans la ville de St-Louis (Armstrong & Lillie 1934). Ce virus cause des infections asymptomatiques chroniques chez les souris sauvages partout autour du globe et là où ces animaux infectés sont présents, on peut détecter chez l'humain la présence d'anticorps spécifiques au virus. Chez l'humain, l'infection par le LCMV cause une panoplie de symptômes, allant de symptômes grippaux aux pneumonies, mais peut également causer des encéphalites aseptiques rarement mortelles (Buchmeier *et al.* 2007). Les sources d'infection humaines par le LCMV incluent la cohabitation avec des rongeurs infectés et dans un contexte de laboratoire, la manipulation d'animaux ou de matériel biologique contaminés (lignées cellulaires et tumorales) (Buchmeier *et al.* 2001).

L'utilisation du LCMV dans les centres de recherche où des modèles murins sont hébergés est potentiellement risquée, puisque *Mus musculus* et *M. domesticus* sont reconnus être les hôtes naturels et réservoirs de ce virus (Buchmeier *et al.* 2001). La transmission horizontale du LCMV chez la souris peut se faire par les morsures et l'inhalation d'aérosols provenant de décharges mucosales contaminées (salive, urine), mais ce type de transmission chez des souris adultes mène rarement à la chronicité (Barthold & Smith 2007). Par contre, la transmission *in utero* est particulièrement efficace et engendre habituellement la persistance virale (Traub 1936, 1939).

Le LCMV est un modèle infectieux expérimental très répandu et largement étudié tant du point de vue virologique qu'immunologique (Lee & de la Torre 2002). C'est grâce à ce modèle infectieux qu'il a, entre autres, été possible de démontrer : que des pathologies peuvent être causées par l'immunité; que des dommages immunopathologiques peuvent être causés par des CTL spécifiques au LCMV, l'importance de la restriction de CMH dans la régulation des réponses CTL anti-LCMV et la cinétique de développement et de maintien des réponses immunitaires mémoires (Zinkernagel 2002). L'utilisation du LCMV a également permis la compréhension de plusieurs mécanismes de persistance virale chez son hôte (Oldstone 2006). Certaines de ces observations ont d'ailleurs pu être transposées dans d'autres types d'infections virales chroniques, dont les infections virales causées par le VHC et le VIH chez l'humain (Klenerman & Hill 2005; Liu, Woltman *et al.* 2009). Le LCMV est donc un outil indispensable pour l'étude des

mécanismes de défenses immunitaires lors d'infections non-cytolytiques. À l'heure actuelle, aucun vaccin n'a été commercialisé contre les infections arenavirales, mais très dernièrement Dr Lukas Flatz et collègues ont développé un vecteur non répliatif de LCMV permettant l'induction de fortes réponses cellulaires *in vivo* (Flatz *et al.* 2010).

1.2.1. Agent étiologique

Le LCMV est un virus enveloppé ayant un génome d'ARN simple brin bi-segmenté de polarité négative. Il fait partie du groupe antigénique des virus du vieux monde (Old World), du genre *Arenavirus* et appartient à la famille des *Arenaviridae* (Buchmeier *et al.* 2007). C'est un virus non-cytolytique pléomorphe ayant une apparence « sablonneuse », dû à l'incorporation de ribosomes lors de sa sortie cellulaire (Rowe *et al.* 1970). Plusieurs isolats du LCMV ont été décrits et malgré qu'ils peuvent difficilement être distingués par des tests sérologiques conventionnels, certains d'entre eux exhibent un tropisme et des immunopathologies qui leurs sont spécifiques (Homann 2002).

Le génome de tous les arenavirus est composé de deux segments, S (short), d'environ 3.4 kb et L (long), d'environ 7.2 kb, contenant des séquences codantes ne s'entrecoupant pas et ayant une organisation ambisense unique aux arenavirus. Le segment S code pour les protéines structurales majeures (nucléoprotéine (NP) et les glycoprotéines 1 et 2 (GP1 et GP2)) et le segment L code pour les protéines non-structurales (ARN polymérase ARN-dépendante (L) et la petite protéine régulatrice à doigt de zinc (Z)) (Meyer *et al.* 2002).

Comme notre objectif est d'étudier la résolution d'infections chroniques, l'attention des prochaines sous-sections sera dirigée vers le déroulement et les réponses immunitaires développées lors d'infections aiguës causées par le LCMV chez des souris C57Bl/6.

1.2.2. Déroulement de l'infection par le LCMV-WE

L'entrée du LCMV dans les cellules cibles se fait par la liaison de la protéine virale GP1 à la protéine de surface α -dystroglycan (Cao *et al.* 1998; Sevilla *et al.* 2000). Le fait que cette protéine soit exprimée dans plusieurs tissus, tant chez les rongeurs que les primates (Borrow & Oldstone 1992; Durbeej *et al.* 1998), pourrait expliquer le polytropisme du LCMV. Certaines souches du LCMV liant très fortement l' α -dystroglycan (par exemple clone 13) voient leur

infectiosité drastiquement diminuée en absence de la protéine, tandis que d'autres souches du LCMV sont moins (ARM) voir indépendantes (WE) de son expression pour l'infection de cellules cibles (Sevilla *et al.* 2000; Smelt *et al.* 2001). De façon intéressante, une corrélation directe a été établie entre la force de liaison à l' α -dystroglycan et la capacité à infecter certaines cellules dendritiques spléniques pour causer une immunosuppression globale, associée à la persistance virale (Sevilla *et al.* 2003).

Une forte production d'IFN- α est induite suite à l'infection par le LCMV (Montoya *et al.* 2005). Normalement, la production d'IFN de type I favorise la production d'IL-12 et d'IFN de type II par les cellules NK, mais l'inverse est observé lors de l'infection par le LCMV (Biron *et al.* 2002; Orange & Biron 1996). Malgré que leur capacité de sécrétion de cytokines soit affectée, l'effet cytotoxique des cellules NK est par contre intact et ces cellules agissent très rapidement après une infection avec ce virus (Pfizenmaier *et al.* 1975; Welsh & Zinkernagel 1977). Le LCMV n'étant pas particulièrement sensible aux fonctions antivirales de l'IFN- α (Moskophidis *et al.* 1994), sa forte sécrétion lors des étapes précoces de l'infection aurait plutôt un effet bénéfique sur la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ par les CTL (Cousens *et al.* 1999; Gallimore *et al.* 1998; Muller *et al.* 1994). Une contrepartie de cette forte sécrétion d'IFN de type I est que lorsqu'infectées avec une faible dose de LCMV-WE, les souris C57Bl/6 sont sujettes à développer une panleucopénie transitoire au cours des premières semaines de l'infection (Binder *et al.* 1997).

L'infection expérimentale de souris adultes immunocompétentes avec des souches de LCMV non persistantes (tel ARM et WE) cause une infection aiguë et disséminée. Lorsqu'inoculé par voie intraveineuse, le LCMV-WE est hépatotropique et infecte principalement les cellules de Kupffer (Borrow & Oldstone 1997). Le contrôle de l'infection survient dans ces cas à l'intérieur d'une à deux semaines par des processus dépendants de la perforine (Kagi *et al.* 1994; Walsh *et al.* 1994) et des CTL (Ahmed *et al.* 1984; Buchmeier *et al.* 1980; Byrne & Oldstone 1984; Zinkernagel & Doherty 1979). L'infiltration des CTL dans le foie cause une importante hépatite immunologique atteignant son apogée alors que la virémie est à son sommet, soit 5 à 7 jours après infection, et se résorbant progressivement suite au contrôle de l'infection (Barthold & Smith 2007). Deux à trois jours après l'infection par le LCMV, avec un effet maximum 7 jours

après l'infection, un phénomène de destruction partielle de l'architecture splénique est observé dans la rate (McNally *et al.* 2001). Ces modifications font en sorte que plusieurs types cellulaires voient leur nombre diminuer, principalement par des mécanismes associés à l'inflammation tissulaire (Matter *et al.* 2006; Matter & Ochsenbein 2008), causant une immunosuppression transitoire (Razvi & Welsh 1995).

Dans les souches de souris immunocompétentes, une hypergammaglobulinémie polyclonale majoritairement non-spécifique au LCMV atteint un sommet 20 jours après l'infection avec une faible dose de LCMV-WE. Ce phénomène semble dépendant de LT CD4 reconnaissant des peptides présentés en contexte CMH-II par des lymphocytes B (LB) infectés (Coutelier *et al.* 1994; Hunziker *et al.* 2003) et pourrait possiblement être en cause dans l'apparition très tardive des anticorps neutralisants (Recher *et al.* 2004).

Malgré les dommages immunologiques causés suite à l'infection par le LCMV, la résolution de l'infection aiguë par le LCMV mène toujours au maintien lymphocytes B et T mémoires (Buchmeier *et al.* 1980; Lau *et al.* 1994; Ochsenbein *et al.* 2000), de même qu'à la production d'anticorps antiviraux (Kimmig & Lehmann-Grube 1979; Slifka *et al.* 1995; Slifka *et al.* 1998).

1.2.3. Réponses immunitaires adaptatives contre le LCMV-WE

Il a été démontré que le LCMV-WE se réplique de façon optimale chez des souris ayant un fond génétique C57Bl/6. Comme ces souris développent de très fortes réponses CTL contre le virus, cette souche virale semble la plus appropriée pour étudier le développement de réponses immunitaires adaptatives chez des souris ayant des restrictions immunitaires (Bocharov *et al.* 2004). La cinétique des réponses CTL développées contre le LCMV-WE suit trois phases classiques associées aux infections virales aiguës (Figure 3). D'abord, lors de la phase effectrice, les lymphocytes T CD8 naïfs sont activés, prolifèrent massivement, se différencient en CTL et acquièrent des fonctions effectrices (capacité cytolytique et de sécrétion de cytokines et chimiokines). L'expansion des CTL est environ vingt fois plus importante que celle des LT CD4, inversant temporairement le ratio de représentation des lymphocytes T CD4 versus CD8 (Varga & Welsh 1998). Le nombre de CTL atteint son sommet environ 8 jours après l'infection avec le LCMV (Homann *et al.* 2001) et l'utilisation de tétramères de classe-I a permis de démontrer que

plus de 60 % des CTL trouvés à ce moment de l'infection sont spécifiques au virus (Butz & Bevan 1998; Gallimore *et al.* 1998; Murali-Krishna *et al.* 1998). Suite à la résolution de l'infection, les CTL subissent une phase de contraction au cours de laquelle 90 à 95 % des cellules sont éliminées pour ensuite initier la phase de différenciation et de maintien des cellules mémoires (Ahmed & Gray 1996; Zimmerman *et al.* 1996). D'ailleurs, plus de 10 % des lymphocytes T CD8 trouvés après la résolution de l'infection sont spécifiques au LCMV (Murali-Krishna *et al.* 1998; Selin *et al.* 1999).

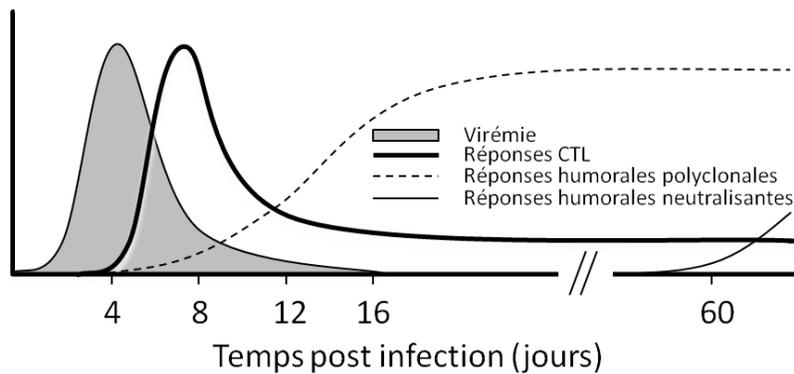


Figure 3 : Réponses immunitaires adaptatives développées contre l'infection aiguë par le LCMV.

L'infection de souris adultes immunocompétentes induit de fortes réponses CTL contrôlant la réplication virale en-deçà des niveaux de détection expérimentaux. Par contre, malgré le contrôle apparent de l'infection, le virus n'est possiblement pas complètement éliminé. Les réponses humorales adaptatives ne sont pas nécessaires à la résolution de la phase aiguë de l'infection et une réponse neutralisante peut être développée à partir de 50 à 80 jours après l'infection. Figure inspirée de (Hangartner *et al.* 2006).

Lors de la phase effectrice, les CTL subissent plusieurs changements phénotypiques, dont la diminution temporaire de l'expression des molécules de « homing » aux organes lymphoïdes secondaires CD62L et CCR7, ainsi que l'augmentation de l'expression de protéines permettant le contact avec les cellules cibles CD44, CD11a et Ly-6C. La production de molécules effectrices, tels l'IFN- γ , le TNF- α et le granzyme B, est augmentée, de même que le niveau d'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD69 (Kalia *et al.* 2010). Ces changements font en sorte qu'une fois activés, les CTL migrent vers la périphérie et assurent leurs fonctions effectrices, dont la sécrétion d'IFN- γ et la lyse des cellules infectées.

Les réponses T CD4 suivent une cinétique d'activation similaire à celle des CTL et atteignant un sommet environ 9 jours après l'infection, mais acquièrent des fonctions différentes de celles des CTL, dont la régulation des réponses en anticorps neutralisants (Homann *et al.* 2001).

Plusieurs études ont démontré que les LT CD4 ne sont pas essentiels à la résolution de l'infection aiguë par les souches non persistantes du LCMV (Kasaian *et al.* 1991; Moskophidis *et al.* 1987; Rahemtulla *et al.* 1991). Par contre, d'autres études ont démontré que l'absence de ces cellules affecterait l'intensité (Ahmed *et al.* 1988; Leist *et al.* 1987) et le maintien à long terme des réponses CTL (Tishon *et al.* 1995; von Herrath *et al.* 1996). La nature exacte des interactions entre les LT CD4 et CD8 n'a pas encore été éclaircie, mais de nombreuses publications démontrent que les CPA seraient des intermédiaires importants pour cette interaction (Bachmann *et al.* 1999; Borrow *et al.* 1996; Borrow *et al.* 1998; Kopf *et al.* 1999; Oxenius *et al.* 1996).

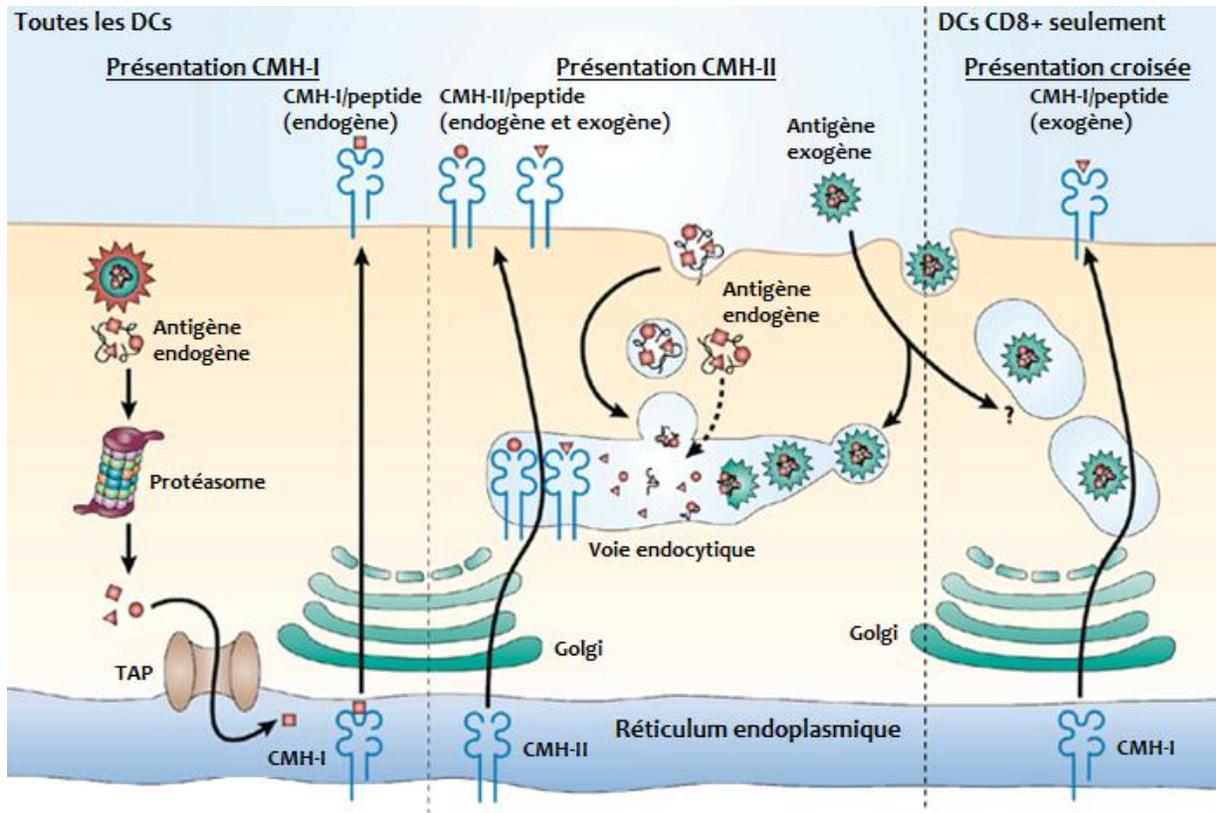
Le nombre de lymphocytes B sécrétant des anticorps spécifiques au virus dans la rate est à son sommet 8 jours après l'infection et subit une diminution d'environ 95% au cours des semaines suivantes (Moskophidis & Lehmann-Grube 1984; Slifka *et al.* 1995). Une caractéristique de l'infection par le LCMV est l'apparition tardive, environ 60 à 120 jours après l'infection, et à faible titre des réponses en anticorps neutralisants (Planz *et al.* 1996; Hotchin 1962). L'importance des LB dans l'élimination de l'infection par le LCMV est, encore aujourd'hui, controversée. En effet, quelques groupes de recherche ont déclaré que ces cellules ne sont pas essentielles au contrôle rapide de l'infection primaire avec une faible dose de LCMV-WE (Asano & Ahmed 1996; Brundler *et al.* 1996; Homann *et al.* 1998). En contrepartie, ces études ont été faites avec les souris μ MT (Kitamura *et al.* 1991), qui, malgré une mutation ciblée pour éliminer l'expression d'IgM à la surface cellulaire, ont été montrés capables de permettre le développement d'un faible taux de LB ayant la capacité de sécréter d'autres isotypes d'anticorps que les IgM (Macpherson *et al.* 2001). Des études plus récentes ont plutôt démontré l'inverse, soit que les LB sont importants pour la réduction de la virémie et la protection, conjointement avec les CTL, contre une réinfection (Slifka 2002). De plus, il a été démontré que les LB, par la production d'anticorps spécifiques au LCMV, sont essentiels pour l'élimination de celui-ci (Bergthaler *et al.* 2009).

2. Activation de réponses immunitaires cellulaires

L'activation efficace des réponses immunitaires adaptatives passe par l'interaction entre les CPA, plus spécialement les cellules dendritiques (DCs), et les cellules effectrices du système immunitaire adaptatif.

Les DCs sont donc à l'interface des systèmes immunitaires inné et adaptatif et ont pour principale fonction de préparer et présenter des antigènes aux LT (Guermonprez *et al.* 2002). Deux catégories de DCs existent, les DCs plasmacytoïdes et les DCs conventionnelles. La seconde catégorie peut être subdivisée en deux groupes, soit les DCs migratoires et les DCs des organes lymphoïdes. Toutes les DCs proviennent de précurseurs de la moelle osseuse et migrent par la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS). La seule exception est les DCs des organes lymphoïdes qui sont développées directement dans les OLS, sans migrer dans l'organisme (Villadangos & Schnorrer 2007). La reconnaissance de pathogènes par des DCs migratoires induit leur activation, leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires, leur maturation et leur capacité d'internalisation et de présentation des antigènes aux cellules du système immunitaire adaptatif (He *et al.* 2006). L'activation des DCs cause également l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation requises pour l'activation efficace des LT, tels le CD40, CD80 et CD86, ainsi que l'augmentation de la synthèse de cytokines et d'IFN de type I (Lanzavecchia & Sallusto 2000, 2002).

Afin d'être présentés de façon efficace, les antigènes doivent être orientés vers les compartiments cellulaires adéquats des DCs pour y être dégradés et couplés à des molécules de CMH-I ou -II (Figure 4). Les lymphocytes T expriment à leur surface un récepteur (*T-cell receptor*, TCR) pouvant reconnaître ces complexes CMH/peptide. Les lymphocytes T CD4 et CD8 reconnaissent des peptides présentés sur des CMH distincts, soit les molécules CMH-II et CMH-I respectivement. Lorsque les LT reconnaissent spécifiquement des antigènes viraux et sont proprement activés par les DCs, il y a initiation d'une cascade d'activation et de prolifération des cellules effectrices. L'orientation des réponses adaptatives (cellulaire ou humorale) dépend du type de peptide présenté et de la nature des cytokines sécrétées par les DCs.



Nature Reviews | Immunology

Figure 4 : Voies de présentation antigénique.

Toutes les cellules dendritiques (DCs) ont des voies de présentation antigénique CMH-I et CMH-II fonctionnelles. Les CMH-I présentent principalement des peptides dérivés de protéines cytosoliques, tandis que les CMH-II présentent des peptides dérivant de la dégradation de matériel endocyté (peut inclure du matériel exogène et/ou endogène (autophagie)). Les DCs CD8⁺ ont la capacité particulière de présenter des peptides exogènes sur CMH-I (présentation croisée). Les mécanismes de présentation croisée ne sont pas très bien compris et la flèche à deux issues suggère qu'il existe possiblement une compétition pour les antigènes exogènes entre les voies de présentation croisée et CMH-II ou qu'un signal dont la nature est inconnue pourrait diriger ces mêmes antigènes vers une de ces deux voies. TAP: *transporter associated with antigen processing*. Figure traduite de (Villadangos & Schnorrer 2007).

2.1. Présentation antigénique sur CMH-II

Le CMH-II lie des peptides de 12 à 18 acides aminés générés dans les compartiments endosomaux, c'est-à-dire provenant de la pinocytose ou de matériel endocyté (Figure 4 panneau central) (Wilson & Villadangos 2005). Ces peptides d'origine exogène sont destinés à la présentation aux lymphocytes T CD4, qui eux assurent plusieurs rôles fonctionnels associés à la présentation antigénique. Seulement les cellules phagocytaires dotées de capacité de présentation antigénique expriment le CMH-II (monocytes/macrophages, DC folliculaires, DC et les LB-2 ayant reconnu un antigène). Les DCs favorisent la présentation en CMH-II de peptides

provenant de phagosomes contenant des ligands de PRR (*pattern-recognition receptors*) (Blander & Medzhitov 2006). Dans l'éventualité où les peptides présentés sont d'origine étrangère, des lymphocytes T CD4 auxiliaires reconnaissant ces peptides initieront les réponses immunitaires adaptatives.

Les DCs peuvent produire l'IL-12, favorisant l'activation de lymphocytes T CD4 promouvant les réponses immunitaires cellulaires (T_H1). Ces lymphocytes produisent en retour l'IL-2, l'IFN- γ et le TNF- α , qui sont des cytokines requises pour l'activation des CTL. Les réponses cellulaires sont chargées d'éliminer les antigènes cytoplasmiques en éliminant les cellules infectées. Les lymphocytes T CD4 T_H1 sécrètent également l'IL-3, le GM-CSF (*granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor*) et le TNF- β qui stimulent la moelle osseuse à produire une plus grande quantité de leucocytes.

Les DCs peuvent également sécréter l'IL-4, qui promeut l'activation des lymphocytes T CD4 responsables des réponses immunitaires humorales (T_H2). Ces lymphocytes sécrètent en retour l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13, activant les lymphocytes B associés au système immunitaire adaptatif. Les réponses humorales consistent en la production d'anticorps spécifiques à l'antigène ayant pénétré l'organisme. Ces réponses permettent la neutralisation des pathogènes et l'opsonisation des particules infectieuses pour favoriser leur élimination de l'organisme. Les cytokines sécrétées par les lymphocytes T CD4 T_H2 agissent également sur la fonction des macrophages.

Les lymphocytes T CD4 peuvent également communiquer avec les DCs grâce aux liaisons CD40L-CD40 et TRANCE-RANK et favoriser l'activation et la maturation de ces dernières (Anderson *et al.* 1997; Schoenberger *et al.* 1998; Wong *et al.* 1997). Une importante ramification de la présentation sur CMH-II est que les réponses T CD4 peuvent être activées simplement par la présence de particules virales (infectieuses ou défectives) ou de « *virus-like particles* » dans le milieu extracellulaire, d'où elles pourront être internalisées, préparées et présentées par les CPA. De cette façon, des peptides viraux dérivant de protéines structurales peuvent être présentés sur CMH-II sans que les particules virales ne soient infectieuses (Keller *et al.* 2010; Noad & Roy 2003; Pinet *et al.* 1994).

2.2. Présentation antigénique sur CMH-I

Le CMH-I lie des peptides de 8 à 10 acides aminés dérivant de la dégradation par le protéasome de l'ensemble des protéines endogènes, c'est-à-dire synthétisées dans le cytosol des DCs (Figure 4 panneau de gauche) (Wilson & Villadangos 2005). Ces peptides endogènes sont destinés à la présentation aux lymphocytes T CD8, qui lorsqu'activés, patrouillent l'organisme à la recherche de cellules présentant l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. Les CTL assurent plusieurs fonctions associées à la protection de l'organisme, dont la lyse spécifique de cellules cibles (perforine, granzyme B) et la relâche de cytokines antivirales (TNF- α , IFN- γ). Par opposition à la présentation antigénique sur CMH-II, la presque totalité des cellules de l'organisme expriment et présentent sur le CMH-I, permettant l'identification et l'élimination de cellules présentant des peptides anormaux ou viraux.

Pour permettre l'activation efficace des lymphocytes T CD8, les CTL doivent reconnaître une combinaison CMH-I/peptide et requièrent la présence des cytokines IL-12 et IL-2, sécrétées respectivement par les DCs et les lymphocytes T CD4 T_H1. Pour faciliter ces conditions d'activation, les antigènes viraux doivent être présentés sur CMH-I et CMH-II simultanément par la même DC (Smith 2004). Cette situation est potentiellement désavantageuse, puisque pour être présentés de la sorte les particules virales doivent se répliquer dans le cytosol des DCs.

Dans l'éventualité où les DCs ne pourraient être infectées par un virus, un second mode de présentation antigénique sur CMH-I permet de présenter des antigènes viraux. Cette méthode ne requière pas la présence de virions infectieux dans les CPA et est appelée présentation croisée.

2.3. Présentation antigénique croisée sur CMH-I

La présentation croisée par les DCs peut être faite soit par internalisation de cellules infectées, de virions libres ou de complexes-immuns et peut permettre aux DCs de surpasser l'interférence à la présentation antigénique causée par plusieurs virus (Figure 4 panneau de droite) (Larsson *et al.* 2004; He *et al.* 2006). Ces peptides exogènes sont destinés à la présentation aux lymphocytes T CD8 et les seules cellules possédant la machinerie cellulaire

permettant ce type de présentation antigénique sont les DCs (Jung 2002). Toutes n'ont pas la même capacité à faire la présentation croisée et, malgré que les mécanismes précis de préparation de ces antigènes soient encore incertains (Villadangos & Schnorrer 2007), il est connu que les DCs des organes lymphoïdes, plus précisément celles exprimant le CD8, sont les plus aptes à ce type de présentation (den Haan *et al.* 2000; Pooley *et al.* 2001). L'internalisation de cellules infectées peut être faite en périphérie par les DCs migratoires, qui transfèrent les antigènes aux DCs des organes lymphoïdes trouvées dans les OLS avoisinants (Allan 2006).

Que la présentation en CMH-I soit directe ou croisée, l'activation des CTL requiert au moins trois signaux d'activation : 1) la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR, induisant une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'internalisation et la dégradation du TCR (Nguyen *et al.* 2002); 2) la liaison supplémentaire à la molécule de co-stimulation CD28, assurant l'activation des CTL (Bachmann *et al.* 1997) et 3) la sécrétion de cytokines par les DCs, dont l'IL-12, les IFN-I et possiblement l'IL-21 (Kalia *et al.* 2010). D'autres facteurs, comme l'intensité et la durée de la stimulation antigénique, la liaison à des molécules de co-stimulation accessoires ou à des récepteurs d'inhibition, de même que la composition du mélange de cytokines avoisinant peuvent également être impliqués dans l'acquisition des fonctions effectrices des CTL (Crawford & Wherry 2009).

3. Système immunitaire humoral inné

Après les barrières physiques, le système immunitaire inné est le premier système de défense de l'hôte rencontré par les microorganismes. Ce mécanisme de défense est trouvé chez tous les animaux, suggérant qu'il dérive de mécanismes ancestraux de défense de l'hôte ayant été adaptés au cours de l'évolution des espèces (Du Pasquier 2004). D'ailleurs, l'analyse des éléments composant les systèmes de défenses innés végétal et animal suggère qu'il était même déjà présent avant que ces deux règnes ne soient séparés (Nurnberger *et al.* 2004).

Le rôle principal du système immunitaire inné est de restreindre la progression d'infections en favorisant l'activation et l'amplification de réponses immunitaires protectrices (Chan *et al.* 2006). Les mécanismes de défense innée ont longtemps été associés à une réponse non spécifique et à une absence de mémoire immunologique. Par contre, depuis la découverte de récepteurs exprimés par des cellules appartenant au système immunitaire inné et ayant la capacité de reconnaître et de réagir à des patrons moléculaires bien précis, il est maintenant accepté que des réponses spécifiques à des antigènes peuvent être associées à ce système de défense (Janeway & Medzhitov 2002; Pasare & Medzhitov 2005). De plus, le concept d'absence de mémoire immunologique dans les réponses immunitaires innées a récemment été remis en question, puisque les cellules NK (O'Leary *et al.* 2006; Sun *et al.* 2011) et les lymphocytes B-1b (Alugupalli *et al.* 2004; Haas *et al.* 2005; Racine & Winslow 2009) ont la capacité de développer et maintenir une réponse spécifique jusqu'à plusieurs mois après être entré en contact avec un antigène donné. Les réponses immunitaires innées sont donc maintenant caractérisées comme étant invariables et ayant une cinétique d'activation rapide. Ces caractéristiques permettent une protection presque immédiate contre plusieurs pathogènes opportunistes (Moser & Leo 2010).

Pour permettre la détection efficace de pathogènes, le système immunitaire inné dépend de l'expression d'une grande variété de récepteurs reconnaissant des déterminants antigéniques partagés par de nombreux pathogènes (Akira *et al.* 2006; Meylan *et al.* 2006). Ces récepteurs, qu'on nomme *pattern-recognition receptors* (PRR), sont exprimés par différents types de cellules immunitaires et non-immunitaires, et ce, à partir d'un ensemble de récepteurs innés directement encodés dans la lignée germinale (Kawai & Akira 2010). Un grand avantage des

PRR est qu'ils ne s'adaptent pas aux mutations des microorganismes, mais permettent plutôt la reconnaissance de structures possiblement essentielles à la stabilité de ces derniers (Vollmers & Brandlein 2006). Ces récepteurs sont dits « non spécifiques », puisqu'ils reconnaissent des structures moléculaires associées à plusieurs pathogènes (*pathogen-associated molecular pattern*; PAMP), tel les hydrates de carbone associés aux glycoprotéines et glycolipides, ainsi que des structures répétées, tel les polysaccharides et les acides nucléiques (Briles *et al.* 1981; Janeway 1989; Medzhitov 2001; Pasare & Medzhitov 2005).

Les cellules du système immunitaire inné sont toutes d'origine hématopoïétique (Figure 5) et malgré que leurs rôles soient très diversifiés, certaines de leurs fonctions sont redondantes. Cette particularité est une des forces du système immunitaire inné, puisque l'accumulation de signaux de danger favorise l'activation des réponses immunitaires spécifiques. Suite à la reconnaissance de corps étrangers, les macrophages, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mastocytes, lymphocytes B, cellules dendritiques plasmacytoïdes et monocytes sécrètent une combinaison d'interférons de type I et de différentes cytokines, chimiokines et défensines ayant des propriétés immunomodulatoires ou antimicrobiennes (Klotman & Chang 2006). Les cellules NK, NKT et les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont la capacité de reconnaître des cellules anormales par la détection d'altérations induites par différents types de dérèglements, peuvent directement éliminer ces cellules et peuvent relâcher des cytokines pro-inflammatoires (Karre 2002; Poccia *et al.* 2005; Yokoyama 2005). Les monocytes, macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques reconnaissent et détruisent les pathogènes en les phagocytant. En plus de leur fonction phagocytaire, les macrophages et cellules dendritiques ont la capacité de préparer et de présenter des fragments antigéniques aux effecteurs du système adaptatif, créant un pont direct entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif (Pozzi *et al.* 2005). Des éléments non cellulaires, sont également associés au système immunitaire inné, dont les facteurs plasmatiques (collectines et pentraxines), le système du complément et les anticorps naturels (Klotman & Chang 2006; Ochsenbein & Zinkernagel 2000).

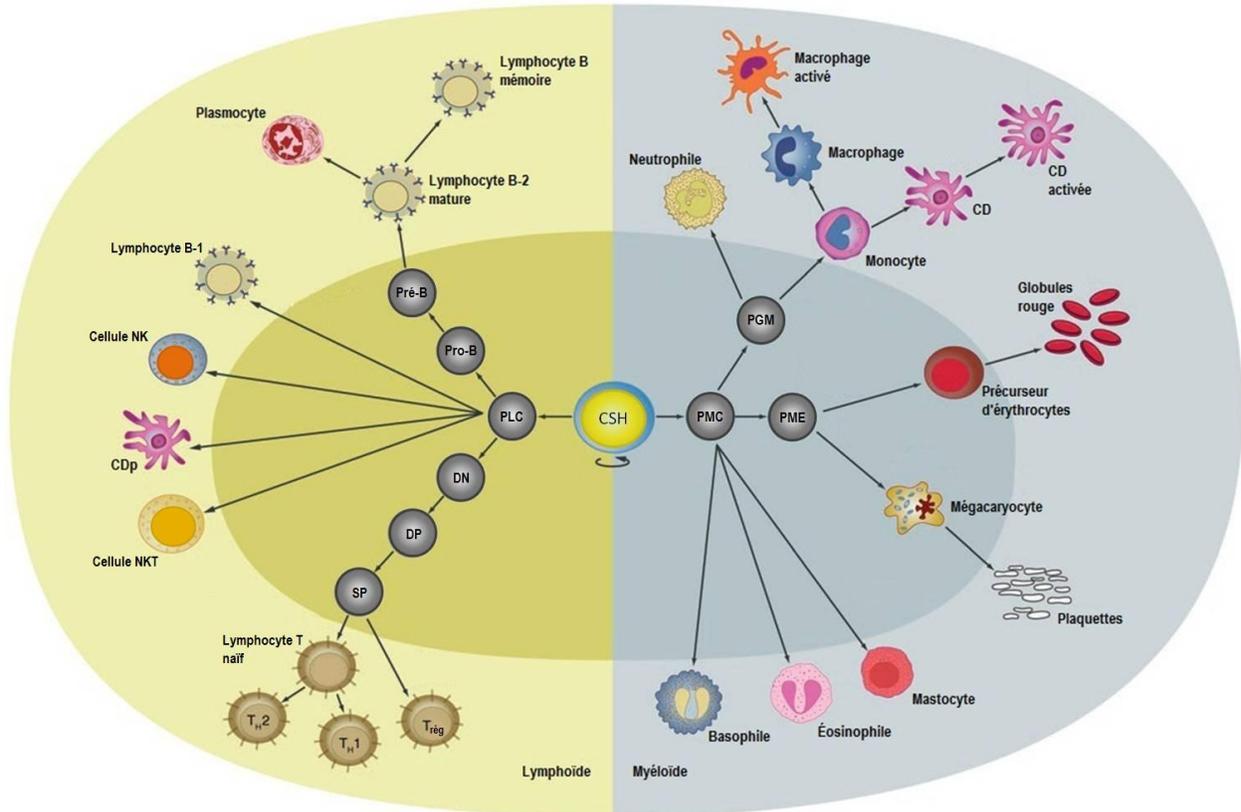


Figure 5 : Différenciation des lignées hématopoïétiques.

Tous les types cellulaires impliqués dans les réponses immunitaires innées ou adaptatives ont pour origine les cellules souches hématopoïétiques (CSH). PLC : cellule progénitrice lymphoïde commune; DN : double négatif; DP : double positif; SP : simple positif; PMC : cellule progénitrice myéloïde commune; PME : cellule progénitrice mégacaryocyte-érythrocyte; PGM : cellule progénitrice granulocyte-monocyte. Figure modifiée de (Baltimore *et al.* 2008).

Suite à la reconnaissance de microorganismes, une signalisation cellulaire est engendrée et, dépendamment du type cellulaire activé et des PRR liés, mène à la sécrétion de combinaisons variables de cytokines et à des modifications cellulaires affectant tant les cellules activées que les cellules avoisinantes (Kawai & Akira 2010). Ces modifications cellulaires incluent le déclenchement de réponses inflammatoires locales et généralisées, l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et de la perméabilité des capillaires sanguins, la maturation des cellules dendritiques, ainsi que la maturation d'affinité et la commutation de classes des lymphocytes B (Bekeredjian-Ding & Jegu 2009). Ces phénomènes, combinés à un gradient de migration dans les tissus affectés, favorisent la mobilisation de neutrophiles vers la périphérie et le recrutement de cellules effectrices au site d'infection, induisant ainsi une boucle d'activation de la réponse immunitaire (Luster *et al.* 2005). L'atteinte d'un état d'alerte

global dans l'organisme, favorise le recrutement et augmente les fonctions de nouvelles CPA, facilitant l'activation des réponses immunitaires adaptatives.

Les sections suivantes aborderont un mécanisme bien précis de reconnaissance précoce de particules virales, soit la présence d'anticorps pré-immuns dans la circulation sanguine. Une partie de ces anticorps est sécrétée de façon ubiquitaire et sans stimulation antigénique, assurant ainsi la reconnaissance précoce de pathogènes et facilitant le développement des réponses immunitaires spécifiques (Ehrenstein & Notley 2010). Plusieurs sous-types de LB assurent les réponses humorales innées et les sections suivantes ont pour objectif de décrire les rôles et l'importance de ces cellules dans la protection rapide de l'organisme contre des infections virales et bactériennes. À moins de mention contraire, les mécanismes décrits dans les sections suivantes représentent les réponses humorales innées murines.

3.1. Lymphocytes B innés

Les LB associés au système immunitaire inné partagent une caractéristique associée aux autres types cellulaires du système immunitaire inné, soit l'expression de PRR invariants ou semi-invariants à leur surface cellulaire (Kearney 2005). Ceux-ci sont des récepteurs des lymphocytes B (BCR) dont la diversité est limitée et la séquence correspond presque exactement à celle de la lignée germinale (Bendelac *et al.* 2001; Lopes-Carvalho & Kearney 2004). Cette caractéristique confère aux LB associés au système immunitaire inné un répertoire de reconnaissance distinct de celui des lymphocytes B folliculaires (FO), qui eux sont associés au système immunitaire adaptatif (Dorshkind & Montecino-Rodriguez 2007; Schelonka *et al.* 2007). Les BCR exprimés par les LB associés au système immunitaire inné ont la capacité de reconnaître plus d'un antigène, mais surtout de reconnaître des antigènes non-protéiques, comme par exemple des lipides oxydés, phospholipides, glycolipides et des motifs d'hydrate de carbone. Ces structures sont généralement partagées par différents microorganismes commensaux et pathogènes, mais sont également exprimés par l'hôte (Baumgarth 2011). À ce propos, de plus en plus d'études démontrent que les LB associés au système immunitaire inné sont sélectionnés pour reconnaître faiblement les antigènes du soi et que l'intensité de ce signal pourrait orienter la différenciation vers un type ou l'autre de lymphocyte B inné (Hayakawa *et al.* 1999; Hayakawa

et al. 2003; Wen *et al.* 2005). Cette auto-réactivité s'avèrerait d'ailleurs importante pour le maintien de l'homéostasie tissulaire, ainsi que pour la reconnaissance de microorganismes arborant des structures similaires à celles de l'hôte (Allman & Pillai 2008; Baumgarth *et al.* 2005).

Les LB peuvent être divisés en deux catégories, soit les LB-1 et LB-2 (Figure 6). À l'origine, cette terminologie avait été proposée pour distinguer phénotypiquement les LB. Cette classification a par contre causé de nombreuses confusions, puisque l'expression d'un marqueur de surface donné peut varier en fonction du microenvironnement, et ce, à l'intérieur même d'un sous-type lymphocytaire (Hardy 2006). La terminologie B-1 est maintenant associée aux LB provenant du développement fœtal et exprimant un répertoire de BCR limité requérant une sélection positive dépendante des antigènes du soi (Hayakawa & Hardy 2000). On associe plutôt la terminologie B-2 aux LB dérivant de précurseurs de la moelle osseuse, différenciation survenant plus tard dans l'ontogénèse ainsi qu'à l'âge adulte, et exprimant un très large répertoire de BCR réagissant peu ou pas aux antigènes du soi (Wen *et al.* 2005).

Les LB associés au système immunitaire inné comptent deux sous-populations lymphocytaires, soit les lymphocytes B de la zone marginale (ZM) et les lymphocytes B-1 (Figure 6). À l'état d'équilibre, ces cellules ne circulent pas activement à travers l'organisme, mais peuvent par contre se déplacer et se convertir rapidement en cellules sécrétrices d'anticorps suite à une insulte de l'organisme (Ansel *et al.* 2002; Pillai *et al.* 2005). Il a par exemple été démontré que lorsqu'activés, les lymphocytes B ZM migrent à la jonction B-T de la rate (Martin & Kearney 2002), tandis que les lymphocytes B-1 peuvent migrer aux intestins, au tractus respiratoire, à la rate ou aux organes lymphoïdes secondaires pour s'approcher du site d'infection (Baumgarth *et al.* 2008; Fagarasan & Honjo 2004; Yang *et al.* 2007).

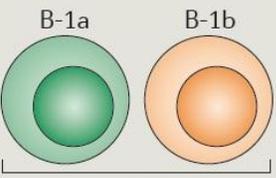
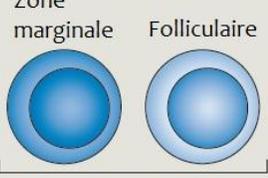
Phénotype des marqueurs de surface	CD5 ⁺	CD5 ⁻	CD5 ⁻	CD5 ⁻
	CD19 ^{hi}	CD19 ^{hi}	CD19 ^{mid}	CD19 ^{mid}
	CD1d ^{mid}	CD1d ^{mid}	CD1d ^{hi}	CD1d ^{mid}
	CD23 ⁻	CD23 ⁻	CD23 ⁻	CD23 ⁺
	CD43 ⁺	CD43 ⁺	CD43 ⁻	CD43 ⁻
	IgM ^{hi}	IgM ^{hi}	IgM ^{hi}	IgM ^{low}
	IgD ^{low}	IgD ^{low}	IgD ^{low}	IgD ^{hi}
Fréquence dans la population totale de lymphocytes B splénique	2%	<1%	15%	>70%
	 Lymphocytes B-1		 Lymphocytes B-2	

Figure 6 : Phénotype des sous-populations de lymphocytes B spléniques matures.

Quatre sous-populations de lymphocytes B matures sont abordées dans ce mémoire. Malgré qu'ils y soient très faiblement représentés, les lymphocytes B-1 se distinguent phénotypiquement des autres sous-types cellulaires trouvés dans la rate. Ils sont subdivisés en deux sous-populations, les lymphocytes B-1a et B-1b, qu'on peut différencier par leur expression du CD5 à leur surface. Les lymphocytes B-2 sont présents dans la rate en plus grande proportion et sont subdivisés en deux sous-populations: les lymphocytes B folliculaires et de la zone marginale. On retrouve ces populations cellulaires respectivement dans les follicules B et dans la zone marginale. Niveaux d'expression : hi = fortement, mid = intermédiaire et low = faiblement. Modifiée de (Baumgarth 2011).

Les antigènes reconnus par les LB associés au système immunitaire inné sont généralement stables *in vivo* et difficilement préparés et présentés en contexte CMH-II (Lesinski & Westerink 2001). Ces antigènes sont appelés T-indépendants (TI), puisqu'ils ne requièrent pas l'aide des LT auxiliaires pour stimuler la sécrétion d'anticorps. Ils peuvent être divisés en deux catégories : les antigènes T-indépendants de classe 1 (TI-1), qui activent les lymphocytes B par leurs PRR et induisent ainsi une réponse polyclonale (par exemple, les LPS) (Bachmann *et al.* 1995; Bachmann & Zinkernagel 1997) et les antigènes T-indépendants de classe 2 (TI-2), qui sont généralement de grande taille moléculaire et de structure répétée et qui activent les LB par leur BCR (Vos *et al.* 2000). Ces mécanismes d'activation sont réservés aux LB associés au système immunitaire inné, puisque les LB FO requièrent absolument l'aide des lymphocytes T auxiliaires pour sécréter des anticorps de haute affinité (Allman & Pillai 2008).

Après la première ligne de défense offerte par les AcNat, l'activation des LB innés offre une protection humorale transitoire, alors que les réponses humorales adaptatives sont en préparation. Les LB innés assurent ainsi un pont entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif (Matter & Ochsenbein 2008).

3.1.1. Lymphocytes B de la zone marginale (ZM)

Puisqu'ils dérivent de précurseurs trouvés dans la moelle osseuse, les lymphocytes B ZM sont classés parmi les LB-2 (Figure 6 et Figure 7). Leur phénotype est par contre intermédiaire à celui des LB-1 et FO, étant donné qu'ils partagent l'expression de marqueurs cellulaires normalement réservés à chacune de ces deux sous-populations (Figure 6). Ils expriment par contre plus fortement à leur surface des molécules de présentation antigénique classiques (CMH-II et les molécules de co-stimulation CD80/CD86) ainsi que le CD1d, servant à présenter des antigènes lipidiques. Ces caractéristiques distinguent les LB ZM des LB FO, puisqu'ils sont mieux équipés que ces derniers pour la présentation antigénique respective aux lymphocytes T et NKT (Allman & Pillai 2008).

Les LB ZM sont principalement localisés dans le sinus marginal de la rate, les rendant très susceptibles à entrer en contact rapidement avec des pathogènes ayant pénétré la circulation sanguine (MacLennan *et al.* 2003; Martin *et al.* 2001). À l'état de stabilité, les lymphocytes B ZM ne circulent pas dans l'organisme, mais il a par contre été démontré qu'ils ont la capacité de proliférer, se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps et migrer hors de la ZM suite à la stimulation de leurs PRR ou suite à leur activation par des LT auxiliaires (Gururajan *et al.* 2007; Rubtsov *et al.* 2008).

Ces lymphocytes assurent plusieurs fonctions, dont fixer des complexes antigène/anticorps (complexes-immuns) et les transporter aux CPA avoisinantes (Cinamon *et al.* 2008). Ils peuvent également répondre à la reconnaissance spécifique d'antigènes TI-2 en sécrétant rapidement des anticorps dont l'affinité n'a pas été améliorée (Martin & Kearney 2000; Martin *et al.* 2001). Une autre fonction associée aux LB ZM est le dépôt, par un mécanisme dépendant de récepteurs du complément, de complexes-immuns à la surface de DCs présentes dans les follicules B (Ferguson *et al.* 2004). Cette fonction a été démontrée importante pour diminuer le

niveau de bactériémie causé par certaines infections chez la souris (Alugupalli *et al.* 2003; Belperron *et al.* 2005; Belperron *et al.* 2007), de même que pour faciliter le développement des réponses humorales innées contre le virus de l'influenza (Baumgarth *et al.* 2008).

De plus en plus de preuves démontrent que les LB ZM peuvent également répondre à des antigènes T dépendants, initier la formation de centres germinaux et subir des modifications de maturation d'affinité (hypermutation somatique et commutation de classe) (Allman & Pillai 2008). Ce phénomène semble d'ailleurs avoir été démontré suite à l'infection par le virus de l'influenza, alors que la détection d'anticorps ayant subi une commutation de classe dès les jours 2-3 post-infection pouvait être démontrée dans les OLS drainant le site d'infection (Baumgarth *et al.* 2008).

3.1.2. Lymphocytes B-1

Les lymphocytes B-1 ont été identifiés pour la première fois au début des années 1980 par le groupe du Dr Herzenberg alors qu'ils révélaient la présence d'une population de LB splénique exprimant le marqueur de surface CD5 et sécrétant constitutivement des anticorps d'isotype IgM (Hayakawa *et al.* 1983). On retrouve principalement les LB-1 dans les cavités pleurale et péritonéale, ainsi que dans la *lamina propria* intestinale. On en retrouve également une faible quantité dans la rate et une très faible fréquence dans la moelle osseuse, la circulation sanguine, les ganglions lymphatiques et le parenchyme pulmonaire. Ils ont une taille légèrement plus grande que celle des lymphocytes B-2 et expriment une combinaison de marqueurs cellulaires permettant de les distinguer de ces derniers (Figure 6).

Comme les LB-2 naïfs, les LB-1 expriment les marqueurs de surface CD19, CD45R/B220 et IgM. Malgré qu'ils soient partagés par les deux groupes de lymphocytes B, leur niveau d'expression varie en fonction du type cellulaire. Contrairement aux lymphocytes B-2, les lymphocytes B-1 expriment le CD43, mais n'expriment pas le CD23, qui est exclusivement exprimé à la surface des lymphocytes B FO (Baumgarth & Roederer 2000; Hayakawa *et al.* 1986; Wells *et al.* 1994). Il existe deux sous-populations de lymphocytes B-1 clairement définies, les B-1a et B-1b, qui sont phénotypiquement semblables en ce qui concerne les marqueurs de surface, à l'exception du CD5 qui est exprimé uniquement par les lymphocytes B-1a (Stall *et al.* 1992). Récemment, une

troisième sous-population de lymphocytes B-1 exprimant à leur surface le CD45R/B220, le CD5 mais pas le CD11b (ou Mac-1) semble avoir été identifiée par le groupe de Rothstein (Hastings, Gurdak *et al.* 2006). Les auteurs de cet article se sont basés sur le paradigme que les lymphocytes B-1 expriment faiblement le CD11b à leur surface pour proposer la découverte de cette nouvelle sous-population. Quelques rapports subséquents ont fait référence à ces cellules comme des lymphocytes B-1c, par contre il n'y a pas encore consensus quant à la reconnaissance et l'attribution de rôles à ces cellules (Ehrenstein & Notley 2010; Malkiel *et al.* 2009). En effet, le groupe de Dr Herzenberg propose plutôt que ces cellules correspondraient à des lymphocytes B-1a à un stade précoce de maturation, puisque l'expression du CD11b augmente graduellement à la surface des lymphocytes B-1 avec l'âge des animaux (Ghosn *et al.* 2008). Puisqu'il n'est pas encore accepté que la sous-population B-1c en soit vraiment une, elle ne sera pas traitée plus longuement dans cet ouvrage.

Les lymphocytes B-1 sont responsables de la sécrétion des IgA trouvés dans la lumière intestinale et les voies respiratoires, de même que de la sécrétion d'une partie importante des anticorps et auto-anticorps naturels d'isotype IgM trouvés à l'état de stabilité dans la circulation sanguine (McIntyre *et al.* 1991; Suzuki *et al.* 2010; Tumang *et al.* 2005). Les lymphocytes B-1 expriment un répertoire de BCR qui leur est propre. Par exemple, environ 10 à 15 % de ces lymphocytes B reconnaissent spécifiquement le phospholipide membranaire phosphatidylcholine et cette spécificité est assurée par l'utilisation de certains segments variables de la chaîne lourde (Kantor *et al.* 1997; Arnold & Haughton 1992).

La majorité des LB-1 sont générés durant le développement fœtal et les premières semaines suivant la naissance (Figure 7) (Herzenberg 2000). Les lymphocytes B-1 trouvés chez un animal adulte sont donc réputés autoréguler la taille de leur population par prolifération homéostatique, qui elle, est possiblement contrôlée par la détection d'IgM solubles (Boes *et al.* 1998; Deenen & Kroese 1992). Par contre, malgré que le phénomène survienne rarement, de plus en plus de données expérimentales supportent l'idée qu'en condition normale un certain pourcentage de lymphocytes B-1 peut dériver de précurseurs de la moelle osseuse (Esplin *et al.* 2009; Montecino-Rodriguez *et al.* 2006; Vale *et al.* 2010).

Deux hypothèses s’opposent encore afin d’expliquer l’origine des lymphocytes B-1 : l’hypothèse d’une lignée cellulaire distincte et l’hypothèse d’une différenciation induite (Hardy 2006). L’analyse détaillée des arguments en faveur de chacune des deux théories dépasse largement l’objectif de cet ouvrage, par contre il est intéressant de constater que cette controverse n’ait encore à ce jour été résolue. L’hypothèse d’une lignée cellulaire distincte est de plus en plus prisée (Alter-Wolf *et al.* 2009; Esplin *et al.* 2009; Rosado *et al.* 2009), par contre il est également accepté que des lymphocytes B possédant des caractéristiques associées aux LB-1 puissent provenir de LB-2 ou de leurs précurseurs (Berland & Wortis 2000). Considérant qu’un modèle unique de développement n’est pas encore fixé, un consensus semble se faire : des mécanismes de régulation plus complexes que ces deux théories indépendantes existent pour expliquer le développement des LB-1 (Figure 7).

Chez l’humain, l’identification des lymphocytes B-1 a été compliquée par le manque de marqueurs de surface réservés à cette sous-population. On trouve par contre depuis longtemps des lymphocytes B exprimant à la fois le CD5 et des IgM à leur surface dans plusieurs tissus et il a été observé que leur fréquence est augmentée dans certaines maladies autoimmunitaires (Burastero *et al.* 1988; Dauphinee *et al.* 1988; Donze *et al.* 1997). Des similitudes ontogéniques de même que leur capacité à sécréter des anticorps autoréactifs semblent être comparables entre les LB-1 humains et murins (Bhat *et al.* 1992; Bofill *et al.* 1985; Solvason & Kearney 1992). Par contre, ce n’est que très récemment que le phénotype précis des lymphocytes B-1 humain a été élucidé (Griffin *et al.* 2011). La confirmation de l’existence de LB-1 phénotypiquement distincts chez l’humain offre maintenant la possibilité de réévaluer plus précisément les rôles et l’importance de ces cellules, tant dans les maladies autoimmunitaires et les leucémies lymphocytaires, que dans la sécrétion d’anticorps naturels et la protection contre des infections.

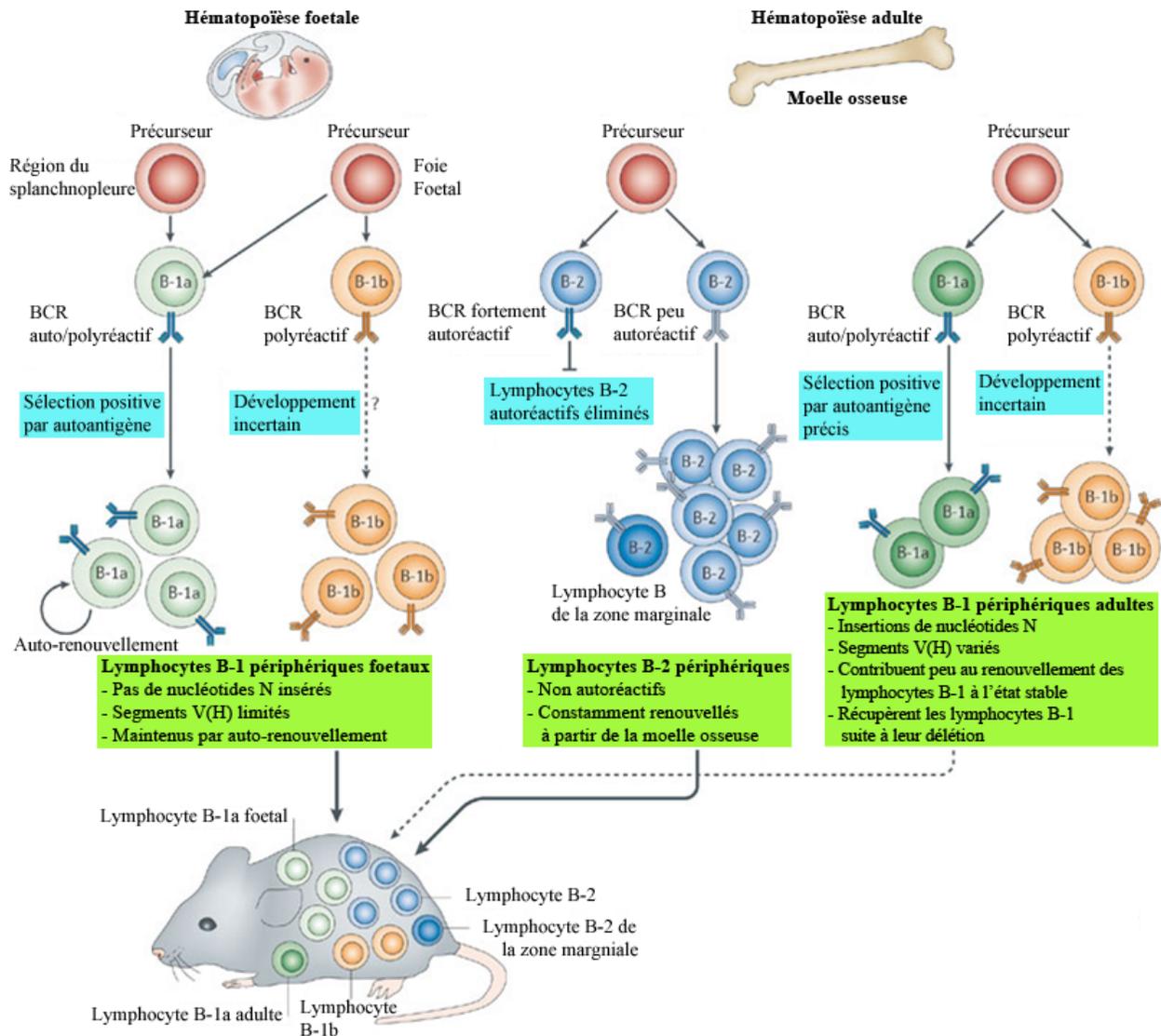


Figure 7 : Développement des populations de lymphocytes B à l'état normal.

Des données expérimentales supportent un modèle de développement des lymphocytes B innés dérivant d'une lignée cellulaire distincte et de différenciation induite, permettant de générer des lymphocytes B-1 durant toute la vie de l'animal. Vers la fin de la vie foetale et peu après la naissance, les lymphocytes B-1a sont principalement sélectionnés grâce à la reconnaissance spécifique des antigènes du soi. Ce mode de sélection génère un répertoire de BCR biaisé pour l'utilisation de certains segments V_H n'incluant pas d'ajout de nucléotides N, puisque l'enzyme responsable de ces ajouts (*Terminal deoxynucleotidyl transférase; TdT*) n'est pas exprimé dans les lymphocytes B avant la naissance. Par opposition, les lymphocytes B-2 reconnaissant les antigènes du soi sont éliminés. À l'âge adulte, les lymphocytes B-1a sont maintenus par auto-renouvellement, tandis que les lymphocytes B-2 sont renouvelés de façon constante à partir de précurseurs nichés dans la moelle osseuse. Si le maintien des lymphocytes B-1 est perturbé, on peut observer la génération de nouveaux lymphocytes B-1 provenant de précurseurs de la moelle osseuse. Ces lymphocytes B-1 « adultes » utilisent un répertoire plus large de segments V_H et possèdent plusieurs ajouts de nucléotides N. Figure modifiée de (Baumgarth 2011).

3.1.2.1. Lymphocytes B-1a

Tel que mentionné plus haut, les lymphocytes B-1a peuvent être distingués des autres sous-types de LB par l'expression du CD5 à leur surface. Cette molécule agit à titre de régulateur négatif de la signalisation par le BCR, rendant donc les lymphocytes B-1a insensibles à ce type de stimulation (Bikah *et al.* 1996). Ceci s'explique possiblement par le fait qu'ils sont sélectionnés pour la reconnaissance des antigènes du soi et qu'il soit ainsi nécessaire de limiter leur activation inappropriée par des auto-antigènes (Montecino-Rodriguez *et al.* 2006). Par contre, les lymphocytes B-1a répondent fortement, tant pour leur activation que leur migration, aux signaux innés déclenchés lors d'assauts à l'organisme (Bikah *et al.* 1996; Morris & Rothstein 1993; Yang *et al.* 2007).

On retrouve de façon majoritaire les lymphocytes B-1a dans les cavités péritonéale et pleurale, mais on en retrouve également dans la *lamina propria* intestinale, la rate, les muqueuses pulmonaires et la moelle osseuse (Choi & Baumgarth 2008). Ce sont ces cellules qui sont responsables de la production de la presque totalité des IgA trouvés dans la lumière intestinale et ces anticorps ne sont sécrétés qu'en présence de bactéries dans ce compartiment (Bos *et al.* 1988; Rosado *et al.* 2009).

Les lymphocytes B-1a ont la capacité de répondre à des antigènes TI-1 (Martin *et al.* 2001). En effet, il a été démontré que la présence de deux déterminants antigéniques de *S. pneumoniae*, la phosphorylcholine et la phosphocholine, augmentent la sécrétion d'anticorps spécifiques par les lymphocytes B-1a (Haas *et al.* 2005; Masmoudi *et al.* 1990; Wallick *et al.* 1983). Un phénomène similaire a également été observé pour le β -glucan exprimé à la surface de *Pneumocystis murina* (Rapaka *et al.* 2010), de même que pour les LPS (Yang *et al.* 2007).

De plus en plus de preuves scientifiques suggèrent que le site de sécrétion des AcNat par les lymphocytes B-1a serait la rate (Notley *et al.* 2010). Le groupe de Dr Herzenberg a d'ailleurs récemment démontré que l'activation de lymphocytes B-1a résidant dans la rate, entraîne leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps sans subir de division cellulaire, fournissant ainsi la première vague de sécrétion d'AcNat (Yang *et al.* 2007). Après stimulation par leurs PRR, les lymphocytes B-1a trouvés dans la cavité péritonéale, eux, migrent vers les OLS drainant le

site d'insulte et se différencient rapidement en cellules sécrétrices d'anticorps (Bekeredjian-Ding & Jegou 2009; Ha *et al.* 2006; Yang *et al.* 2007). Il a été proposé que les anticorps sécrétés dans cette situation protégeraient l'hôte contre des infections secondaires (Martin & Kearney 2000) et ce phénomène a été confirmé dans des cas d'infections causées par *Pneumocystis murina* (Rapaka *et al.* 2010) et par le virus de l'influenza (Choi & Baumgarth 2008). Ces deux démonstrations renforcent l'idée que les LB-1a joueraient activement un rôle dans la protection précoce de l'organisme lors d'infections.

Le rôle des lymphocytes B-1a qui nous intéresse particulièrement est leur capacité de sécréter des anticorps « naturels » sans nécessiter de stimulation antigénique (Forster & Rajewsky 1987; Haas *et al.* 2005). Seulement une petite quantité de lymphocytes B-1a trouvés dans la rate possèdent cette capacité et leur fréquence est estimée à 4 pourcent des lymphocytes B-1a spléniques (Yang *et al.* 2007). Les rôles et l'importance de ces anticorps dans la protection de l'organisme seront traités dans la section 3.2.1.1.

3.1.2.2. Lymphocytes B-1b

L'analyse des réponses humorales assurées par les lymphocytes B-1b est relativement ardue, puisqu'il n'existe pas de marqueurs phénotypiques associés uniquement à cette sous-population de LB (Alugupalli 2008). L'évaluation précise du nombre de précurseurs ou de cellules matures est donc possiblement sous estimée et leur distribution dans l'organisme est difficile à démontrer. Néanmoins, des expériences de transfert adoptif de lymphocytes B-1b ont permis de démontrer qu'on retrouve principalement ces cellules dans les cavités pleurale et péritonéale et que leur activation induit leur migration vers les OLS, par un mécanisme dépendant des chimiokines (Ha *et al.* 2006), et leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps (Watanabe *et al.* 2000).

L'analyse de la séquence des anticorps sécrétés par les lymphocytes B-1b indique que ces cellules peuvent, de façon plus importante que les B-1a mais moins que les B-2, augmenter la diversité de leur répertoire de liaison par l'ajout de nucléotides N entre les segments variables réarrangés (Kantor *et al.* 1997; Vale *et al.* 2010). Ceci pourrait possiblement expliquer pourquoi les antigènes reconnus par les lymphocytes B-1b sont si diversifiés et hétérogènes; allant des

hydrates de carbone, dans le cas de *S. pneumoniae*, à des antigènes protéiques, dans le cas de *B. hermsii* (Alugupalli 2008; Haas *et al.* 2005). La capacité qu'ont les lymphocytes B-1b à ajouter à leur répertoire de diversité renforce la croyance que certains de leurs précurseurs proviendraient de la moelle osseuse, puisque l'expression de l'enzyme TdT est restreinte aux LB dérivant de l'hématopoïèse adulte (Alugupalli & Gerstein 2005). En effet, une population de cellules précurseur donnant lieu aux lymphocytes B-1b a récemment été identifiée tant dans le foie fœtal que dans la moelle osseuse de souris adulte (Montecino-Rodriguez *et al.* 2006).

Contrairement aux lymphocytes B-1a, les lymphocytes B-1b ne sécrètent des anticorps qu'après stimulation antigénique. L'importance de ces cellules dans la protection rapide de l'organisme a d'ailleurs été démontrée contre les infections bactériennes causées par *Borrelia hermsii* (Alugupalli *et al.* 2004), *Streptococcus pneumoniae* (Haas *et al.* 2005) et *Ehrlichia* (Racine & Winslow 2009). Dans ces trois cas, il a été démontré que ces réponses sont spécifiques et maintenues à long terme suite au contact avec l'antigène. Une observation similaire a également été faite avec un antigène modèle TI-2, soit l'haptène NP (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl) (Hsu *et al.* 2006). Pour tous ces exemples, les réponses humorales mémoires innées diffèrent de leurs contreparties adaptatives par le fait qu'elles surviennent et sont maintenues en absence de lymphocytes T auxiliaires (Alugupalli *et al.* 2004).

Malgré que la classification actuelle des sous-populations de LB soit relativement bien définie, plusieurs études suggèrent qu'une grande plasticité phénotypique existe. En effet, en fonction du microenvironnement dans lequel se trouvent ces cellules, tant l'expression génique que de certains marqueurs de surface peuvent être affecté (Hastings, Tumang *et al.* 2006). Le CD11b en est un bon exemple (voir section 3.1.2 de ce chapitre), mais le CD43 peut parfois ne pas être exprimé à la surface des LB trouvés dans la cavité péritonéale, alors qu'ils expriment d'autres marqueurs associés aux lymphocytes B-1. De plus, l'expression du CD5 peut être augmentée à la surface de certains LB FO rendus anergiques. Malgré que la présence de cellules au phénotype divergent ait été notée, peu de données ont été recueillies quant aux fonctions assurées par ces cellules (Baumgarth *et al.* 2008). Cela étant dit, comme une certaine déviation phénotypique semble exister entre les sous-populations de LB, il apparaît plausible que le

tableau décrivant la nature et les fonctions des effecteurs humoraux se complexifie au cours des prochaines années.

3.2. Anticorps

Au début des années 1900, Paul Ehrlich fut le premier à proposer la présence à la surface de cellules immunitaires, de récepteurs qui permettraient la reconnaissance spécifique de substances dangereuses pour l'organisme. Il proposa même que ces cellules puissent relâcher des excès de ces récepteurs « side chains » ou « cast off » afin de protéger l'organisme. Cette théorie a été prouvée et nous savons aujourd'hui que ces récepteurs sont des anticorps et que les cellules les produisant sont les LB.

Les anticorps sont des protéines globulaires qu'on retrouve principalement dans la circulation sanguine sous forme d'un mélange hétérogène. Chaque LB contribue à la diversité de ce mélange en synthétisant des anticorps ayant une séquence unique. La structure de base de tous les d'anticorps est identique et correspond à un homodimère dont chacun des monomères est constitué d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère de taille équivalente à la moitié de celle de la chaîne lourde. Les anticorps sont également appelés immunoglobulines (Ig) et 5 isotypes, soit IgA, IgD, IgE, IgG et IgM, peuvent être différenciés par la nature de leur chaîne lourde (Figure 8). Deux chaînes légères, kappa (κ) et lambda (λ), sont disponibles pour la recombinaison génique et l'association aux différentes chaînes lourdes.

On trouve les Ig sous deux formes : associées à la membrane des LB et solubles. Les anticorps associés à la membrane sont monomériques, ou dimériques dans le cas des IgM, et représentent le BCR. En fonction de leur isotype, les anticorps solubles peuvent être sécrétés sous forme de monomères, dimères ou pentamères (Figure 8) et leur fonction principale est de lier des particules pour faciliter la rencontre de ces derniers avec les phagocytes.

Trois principales situations permettent la sécrétion d'anticorps : 1) les lymphocytes B-1a sécrètent des anticorps de façon constitutive et stimulée par des antigènes TI; 2) la reconnaissance d'antigènes engendre la différenciation rapide, hors des follicules B, des lymphocytes B-1b et de la ZM en cellules sécrétrices d'anticorps; 3) l'activation des lymphocytes

B FO par un antigène trouvé dans les centres germinaux engendre la sécrétion d'anticorps de haute affinité lors de réponses humorales adaptatives (MacLennan *et al.* 2003).

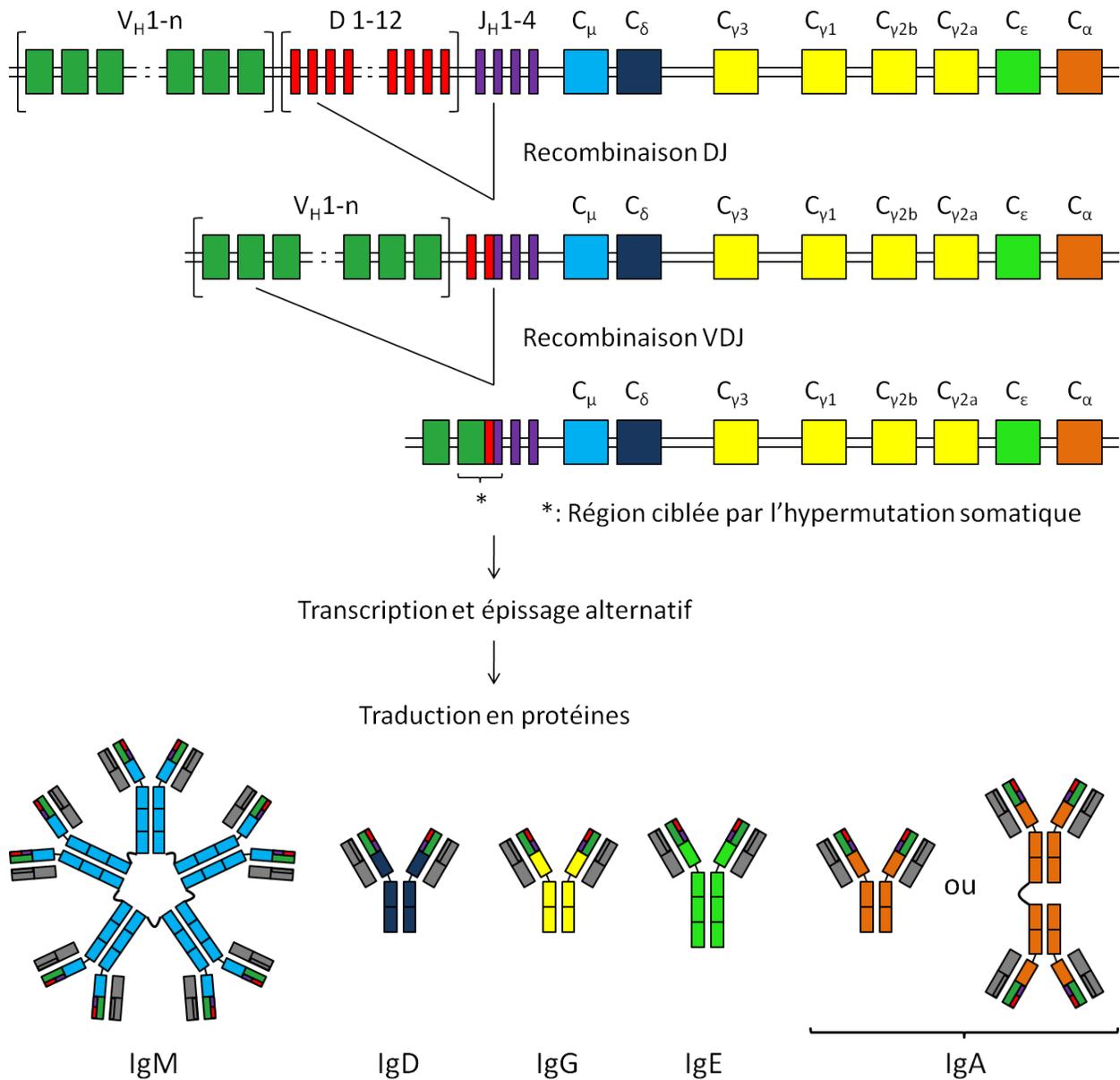


Figure 8 : Recombinaison somatique et synthèse de la chaîne lourde des immunoglobulines murines.

La séquence germinale (rangée du haut) contient des séquences signal (non montrées), un jeu de segments variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) ainsi que des régions constantes (C) spécifiques à chaque isotype d'anticorps (IgM, IgD, quatre sous-types d'IgG, IgE et IgA). Lors de la recombinaison DJ (deuxième rangée), un segment D est joint à un segment J; lors de la recombinaison VDJ (troisième rangée), un segment V est joint aux segments DJ déjà réarrangés. Par un phénomène similaire à la recombinaison VDJ, la commutation isotypique implique le rapprochement d'une nouvelle région constante près du segment VDJ réarrangé. L'hypermutation somatique a lieu exclusivement dans la région VDJ déjà réarrangée. Après transcription en ARN messager et épissage alternatif de ces transcrits, les protéines sont traduites et organisées en monomères, dimères ou pentamères.

Pour permettre la maturation des LB et leur production subséquente de molécules d'Ig, une recombinaison génique doit avoir lieu entre les segments variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) de la chaîne lourde (Blackwell & Alt 1989). Ce phénomène, assuré par les enzymes RAG-1 et RAG-2 (*recombination activated genes*), est appelé recombinaison V(D)J (Figure 8) et donne lieu à la région déterminant la complémentarité 3 (CDR-3) (Tonegawa 1983). Le CDR-3 est en position N-terminale des Ig et est la principale portion des anticorps permettant la liaison aux antigènes (Kabat *et al.* 1992). Les LB ont la capacité de produire plus de 10^{11} régions variables d'anticorps et plusieurs mécanismes sont à la base de la diversité de ce répertoire. Ces mécanismes incluent: 1) la diversité combinatoire, soit le choix des segments utilisés lors de la recombinaison V(D)J de la région variable des chaînes lourdes d'Ig (Xu & Davis 2000); 2) la diversité jonctionnelle, soit la perte ou l'ajout de nucléotides P dans la partie terminale des segments V(D)J lors de leur recombinaison (Lafaille *et al.* 1989); 3) l'appariement des chaînes légères et lourdes réarrangées offre une diversité de liaison supplémentaire aux anticorps (Rajewsky 1996) 4) la diversité aléatoire, soit l'ajout de nucléotides N par l'enzyme TdT dans les lymphocytes B provenant du développement post-natal (Alt & Baltimore 1982; Tonegawa 1983); 5) le remplacement de certains segments géniques, soit la révision des BCR, peut survenir pour diversifier le répertoire des LB (Nemazee 2000) et 6) les mutations aléatoires de la région variable des Ig, soit l'hypermutation somatique survenant à l'état basal (Han *et al.* 2007) ou induite lors de réponses immunitaires adaptatives (Neuberger & Milstein 1995).

Malgré tous ces mécanismes de diversification du répertoire des anticorps, un certain pourcentage des combinaisons ne sera jamais exprimé par des LB. En effet, certains appariements de chaînes lourde et légère sont non productifs; certaines combinaisons de segments V(D)J autoréactives sont éliminées du répertoire adaptatif et tel que mentionné dans la section 3.1 de ce chapitre, les sous-types de lymphocytes B associés au système immunitaire inné favorisent l'utilisation de certains segments géniques pour la recombinaison somatiques du CDR-3 (Ivanov *et al.* 2005). De plus, il a été démontré qu'une hiérarchie existe dans la propension des sous-populations de LB à ajouter des nucléotides N lors de la recombinaison V(D)J et que les LB péritonéaux sont moins prompts à ce mécanisme de diversification (Vale *et al.* 2010).

Le fait que les mécanismes de diversification soient limités chez les LB innés permet aux anticorps sécrétés par ces sous-types cellulaires de reconnaître des patrons antigéniques bien particuliers. Donc en fonction du type cellulaire sécrétant les anticorps, il est possible de diviser ces derniers en deux catégories : les anticorps naturels et les anticorps immuns (adaptatifs) (Ehrenstein & Notley 2010; Racine & Winslow 2009). Les prochaines sous-sections sont dédiées à la description des caractéristiques et rôles propres aux anticorps naturels.

3.2.1. Anticorps naturels (AcNat)

Avant même la découverte des LB responsables de leur sécrétion, on reconnaissait la présence d'anticorps « normaux » pouvant lier différents antigènes sans que leur hôte ne les aient rencontrés auparavant (Boyden 1966). Les anticorps dits « naturels » (AcNat) sont définis comme des anticorps circulant chez des individus immunologiquement naïfs (Avrameas 1991). Ils ont été nommés ainsi, puisqu'on peut détecter leur présence chez des animaux de laboratoire maintenus dans un environnement exempt d'antigènes (Bos *et al.* 1989; Hooijkaas *et al.* 1984), chez des individus n'ayant pas de stimulation antigénique apparente ainsi que dans le sang de cordon ombilical humain (Avrameas 1991; Boes 2000). Les AcNat sont uniques, puisqu'ils ne semblent être dirigés contre aucun antigène particulier et qu'ils sont en partie sécrétés en absence de stimulation antigénique exogène (Haury *et al.* 1997).

Les AcNat sont majoritairement d'isotype IgM, malgré qu'on en détecte également d'isotype IgA et IgG3 (Avrameas & Ternynck 1995). Tel que mentionné plus haut, les lymphocytes B-1a sont réputés être la source sécrétrice des AcNat et contribuent à la sécrétion d'environ 80 pourcent des IgM naturels sériques (Baumgarth *et al.* 1999). L'analyse de la séquence des transcrits d'ARN codant pour les AcNat correspond généralement à celle de la lignée germinale et aucune maturation d'affinité n'est faite sur ces molécules (Feeney 1990; Gu *et al.* 1990). Récemment, il a été démontré que les LB-1 favorisent le réarrangement de régions variables hydrophobes (Ippolito *et al.* 2006; Schelonka *et al.* 2008), expliquant possiblement pourquoi les AcNat ont une propension très élevée à reconnaître des structures antigéniques conservées et répétées, tels les acides nucléiques, les hydrates de carbone, certaines protéines et phospholipides (Baumgarth *et al.* 2005; Boes 2000). Les IgM naturels sont généralement de

faible affinité pour les antigènes qu'ils lient, mais leur structure de pentamère augmente leur valence et leur avidité de liaison. À défaut de lier avec forte affinité des antigènes précis, les AcNat sont reconnus être polyréactifs et avoir la capacité de lier des autoantigènes (Avrameas 1991; Coutinho *et al.* 1995). Cette caractéristique semble d'ailleurs être d'intérêt pour la reconnaissance de particules virales, puisque leur patron de glycosylation est nécessairement acquis des cellules hôtes (Durrbach *et al.* 2007).

Les IgM et IgA polymériques solubles (les IgA polymériques sont exclusivement sécrétés par les lymphocytes B-1; Figure 8) peuvent être transportés à la surface des muqueuses respiratoires et intestinales afin d'offrir une première ligne de protection contre les pathogènes. Un récepteur spécifique à ces deux isotypes d'anticorps, le récepteur d'Ig polymériques (pIgR), est exprimé sur la surface basale des cellules épithéliales mucosales et permet le transport transépithélial de ces anticorps (Kaetzel 2005). Deux autres récepteurs peuvent également lier spécifiquement les IgM seuls ou complexés à des antigènes, soit les récepteurs Fc α / μ R et Fc μ R (TOSO/FAIM3). Le premier lie les IgM et les IgA et est exprimé à la surface de LB matures, macrophages et cellules dendritiques FO trouvés dans différents organes lymphoïdes secondaires (Kikuno *et al.* 2007; Sakamoto *et al.* 2001; Shibuya *et al.* 2000). Le second est actuellement le seul récepteur liant uniquement les IgM et a récemment été identifié tant chez l'humain que chez la souris (Kubagawa *et al.* 2009; Shima *et al.* 2010). Ces deux études ont démontré que le Fc μ R est exprimé à la surface des lymphocytes B et T (chez l'humain seulement), mais n'ont pas permis de déterminer l'importance de son expression à la surface de ces cellules. Il est par contre suggéré que la liaison de complexes-immuns par ces récepteurs favoriserait le développement des réponses immunitaires adaptatives par l'internalisation des pathogènes, suivi de leur présentation aux effecteurs de l'immunité spécifique (Kubagawa *et al.* 2009; Ochsenbein & Zinkernagel 2000).

3.2.1.1. Rôles attribués aux AcNat

Les AcNat ont d'abord été associés à l'autoimmunité, puisqu'il a été démontré que ces anticorps étaient présents en plus grande quantité chez des souris prônes aux réactions autoimmunes que chez leurs congénères normales (Hayakawa *et al.* 1983). Aujourd'hui, on

associe plutôt la capacité des AcNat à reconnaître des antigènes du soi au maintien homéostatique de l'organisme (Ehrenstein & Notley 2010). De nombreuses études démontrent que les AcNat peuvent lier certains antigènes du soi modifiés, dont les plaques athérosclérotiques et des cellules apoptotiques, nécrotiques, précancéreuses ou cancéreuses afin de faciliter leur élimination (Binder 2010; Ehrenstein & Notley 2010; Vollmers & Brandlein 2009). Malheureusement, la tolérance immunologique de l'organisme est parfois rompue, permettant le développement de maladies autoimmunes associées à la déposition de complexes-immuns à travers l'organisme, comme par exemple l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé (Murakami *et al.* 1995). Par contre, dans la majorité des cas, la présence d'IgM solubles limite le développement des maladies autoimmunes par la diminution des réactions pro-inflammatoires (Boes *et al.* 2000; Ehrenstein *et al.* 2000; Lewis *et al.* 2009; Chen *et al.* 2009; Peng *et al.* 2005).

Les AcNat jouent une grande variété de rôles dans l'organisme, mais celui sur lequel nous avons porté notre attention est leur capacité de liaison à des particules infectieuses. Malgré leur faible affinité et leur polyspécificité, il a été démontré que les AcNat peuvent directement neutraliser ou limiter rapidement la réplication de pathogènes (Gobet *et al.* 1988; Zhou *et al.* 2007), former des complexes-immuns avec ou sans le recrutement du système du complément (Jayasekera *et al.* 2007) et faciliter le transport de pathogènes vers les OLS (Figure 9) (Ochsenbein, Fehr *et al.* 1999; Ehrenstein & Notley 2010). Les IgM, liés à un antigène, sont de puissants activateurs de la cascade du complément (Carroll 2004). Il a d'ailleurs été démontré que cette activation sert d'adjuvant endogène pour le développement de réponses cellulaires protectrices induites par la vaccination contre *Leishmania* (Stager *et al.* 2003). Un phénomène similaire a également été noté lors d'une infection par le virus de la rougeole (Durrbach *et al.* 2007). La formation de complexes-immuns facilite le dépôt des microorganismes sur les cellules dendritiques FO dans les OLS. De plus, leur reconnaissance par les DC périphériques augmente la capacité de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, la maturation et la migration de celles-ci vers les OLS avoisinants (Rapaka *et al.* 2010).

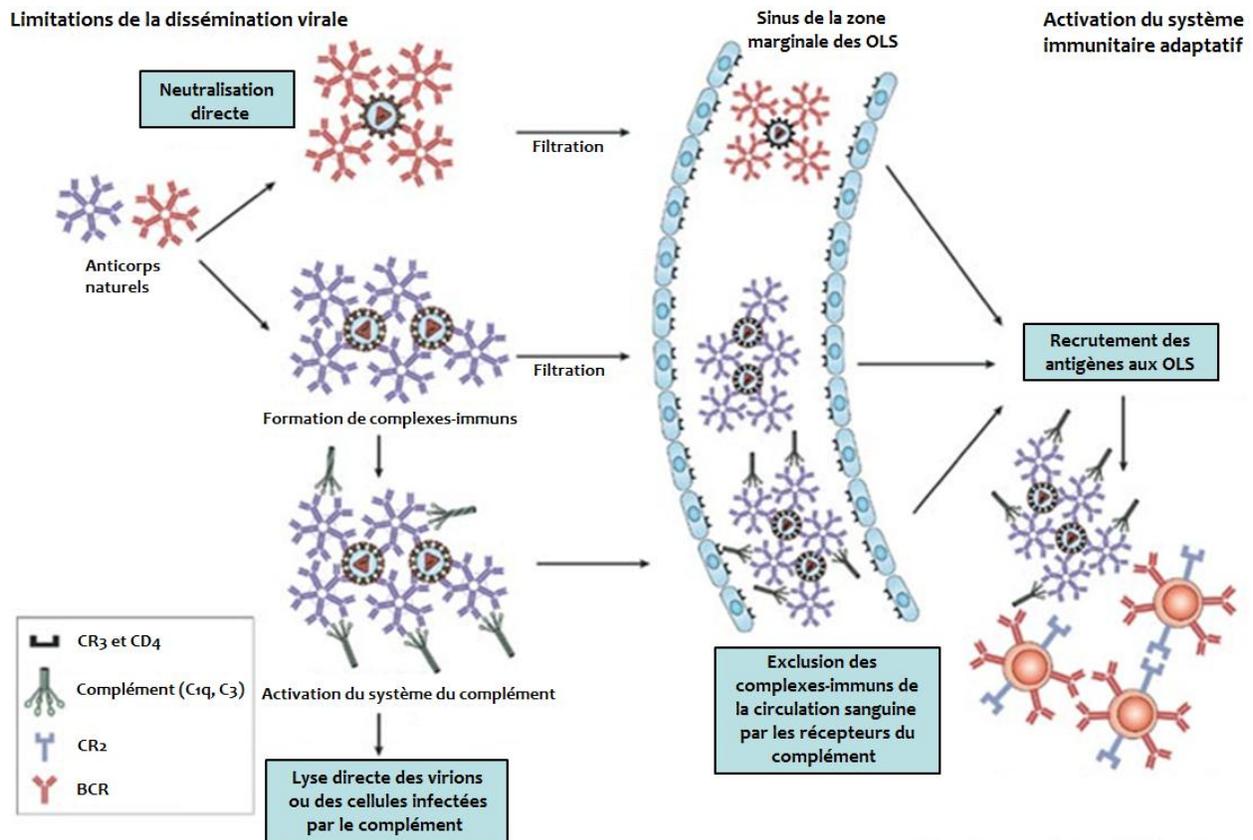


Figure 9 : Rôles attribués aux anticorps naturels.

Les AcNat assurent un lien important entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Ils peuvent limiter la dissémination virale par la neutralisation directe, l'activation du système du complément et l'exclusion des microorganismes dans le sinus de la zone marginale des organes lymphoïdes secondaires avant que les réponses immunitaires adaptatives ne soient activées. Les AcNat favorisent ainsi le développement des réponses immunitaires adaptatives en facilitant le recrutement des antigènes aux organes lymphoïdes secondaires. BCR : récepteur des lymphocytes B; CR : récepteur du complément; OLS : organes lymphoïdes secondaires. Modifiée de (Hangartner *et al.* 2006).

La capacité des AcNat murins à lier des particules infectieuses de nature variée a été démontrée pour le LCMV, le VSV, le virus de l'influenza et le virus de la vaccine, de même que pour la bactérie intracellulaire *Listeria monocytogenes* (Baumgarth *et al.* 1999; Baumgarth *et al.* 2000; Ochsenbein, Fehr *et al.* 1999). D'un aspect plus fonctionnel, les AcNat sont importants pour le contrôle des étapes précoces de l'infection par *S. pneumoniae* (Baumgarth *et al.* 2005; Haas *et al.* 2005), limiter la mortalité associée à l'infection bactérienne causée par *Salmonella typhimurium* (O'Brien *et al.* 1979) et contrôler l'infection par un mutant intracellulaire de *Brucella abortus virB* (Rolan *et al.* 2009).

4. Modèles murins à l'étude

La majorité des études ayant évalué le rôle des AcNat ont utilisé des souris ayant un répertoire d'Ac complet, sans anticorps IgM (sigM) ou sans lymphocytes B (μ MT, $J_H T$ ou $RAG^{-/-}$). Afin d'évaluer l'impact de la diversité du répertoire des AcNat, nous avons choisi d'étudier le développement de réponses immunitaires adaptatives des souches de souris QM et HC1 en comparaison avec les souches de souris témoins C57Bl/6 et $J_H T$. Les sous-sections suivantes ont pour objectif de décrire les limitations de répertoire primaire (résumées dans le Tableau 1) de chaque souche murine à l'étude.

4.1. C57Bl/6

Les souris C57Bl/6 que nous utilisons dans nos études proviennent de source commerciale (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada). Ces souris possèdent tous les segments géniques disponibles pour la recombinaison des gènes de la chaîne lourde des Ig murines (Figure 10), ont la possibilité de réarranger les deux types de chaînes légères et correspondent ainsi à notre groupe témoin de diversité de répertoire d'Ig complète. Toutes les souches de souris décrites ici ont été obtenues à partir du fond génétique des souris C57Bl/6, nous permettant ainsi de limiter les divergences entre nos groupes expérimentaux.

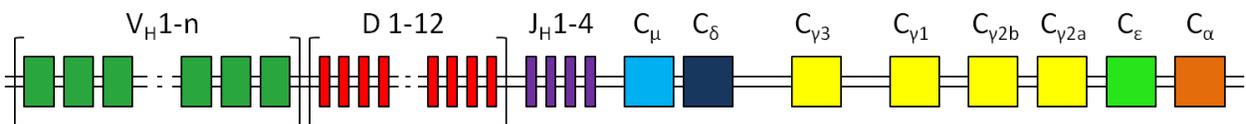


Figure 10 : Organisation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines de souris C57Bl/6.

4.2. QM (Quasi-monoclonale)

Les souris QM ont été créées par le remplacement dirigé des segments J de la chaîne lourde endogène par un transgène codant pour les segments réarrangés $V_H D J_H$ 17.2.25 (Figure 11) (Casalho *et al.* 1996). Ces souris ayant été créées hémizygotiques pour le transgène, elles ont également subi la délétion ciblée des segments J de l'autre locus disponible, afin de prévenir le réarrangement des gènes endogènes (Chen, Trounstine, Alt *et al.* 1993). Une restriction supplémentaire à la diversification du répertoire des anticorps a été imposée aux souris QM, soit l'inactivation de leur capacité à réarranger la chaîne légère kappa endogène (Chen, Trounstine,

Kurahara *et al.* 1993). La combinaison de la chaîne lourde encodée par le transgène avec une chaîne légère lambda endogène procure aux anticorps un répertoire de liaison quasi spécifique pour l'haptène NP (de là leur nom de quasi-monoclonales) (Cascalho *et al.* 1996). Les souris QM que nous utilisons ont été croisées afin d'obtenir des animaux homozygotes pour le transgène.

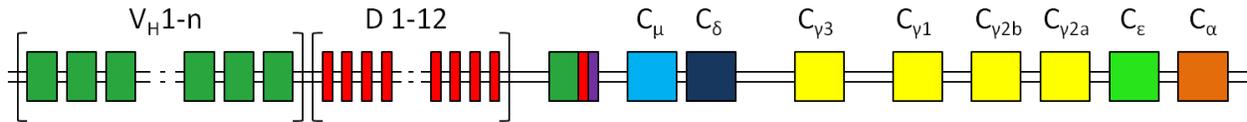


Figure 11 : Organisation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines de souris QM.

4.3. HC1 (Heavy chain miniloci)

Les souris HC1 possèdent un minilocus codant pour la séquence germinale d'un segment génique V (V_H5-51), de dix segments D, des six segments J ainsi que des régions constantes mu et gamma 1 de la chaîne lourde des immunoglobulines humaines (Figure 12) (Taylor *et al.* 1994; Taylor *et al.* 1992). Afin de réarranger exclusivement le minilocus humain, les souris HC1 sont rendues incapables à réarranger leur chaîne lourde endogène. Les souris HC1 ont donc été croisées avec des souris ayant subi une délétion dirigée des segments J de la chaîne lourde endogène (Chen, Trounstine, Alt *et al.* 1993) et pour limiter davantage le répertoire des anticorps sécrétés par les souris HC1, elles ont également été croisées avec des souris ne pouvant réarranger les chaînes légères kappa endogènes (Chen, Trounstine, Kurahara *et al.* 1993). De cette manière, les seules immunoglobulines fonctionnelles pouvant être générées combinent la région V_H5-51 humaine avec une des trois régions variables de la chaîne légère lambda murine (Xu & Davis 2000). Les souris telles que décrites ci-haut ($HC1^{+/0} IgH^{-/-} Igk^{-/-}$) ont été maintenues dans le laboratoire du docteur Mark M. Davis, qui nous les a gracieusement fournies.



Figure 12 : Carte du minilocus codant pour la chaîne lourde humaine transgénique HC1.

4.4. J_HT (ou J_H^{-/-} ou J_HD)

Les souris J_HT ont subi une délétion complète des segments J de la chaîne lourde des Ig (Figure 13) (Chen, Trounstein, Alt *et al.* 1993). Comme les segments J sont nécessaires à la recombinaison des gènes d'Ig, les souris J_HT ne possèdent pas de lymphocytes B matures dans la moelle osseuse ni en périphérie et ne peuvent donc sécréter aucun isotype d'anticorps.

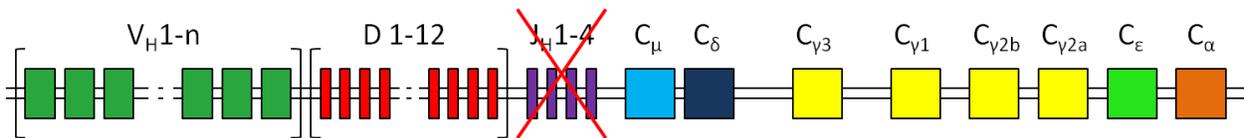


Figure 13 : Organisation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines de souris J_HT.

4.5. RAG-1^{-/-}

Les souris RAG-1^{-/-} sont homozygotes négatives pour le gène codant pour l'enzyme de recombinaison génique RAG-1. Puisque ces souris n'ont pas la capacité de recombinaison des gènes des immunoglobulines ou des TCR, elles ne peuvent assurer le développement de LB ou de LT.

Tableau 1 : Synthèse des différences génétiques des souches de souris utilisées

Souche de souris	Chaînes légères disponibles	Chaîne lourde (origine)	Autres modifications	Populations cellulaires affectées
C57Bl/6	κ et λ Murines	Murine	Aucune	Aucune
QM	λ Murine	Murine	Segment VDJ réarrangé	Lymphocytes B
HC1	λ Murine	Humaine	Répertoire partiel	Lymphocytes B
J _H T	κ et λ Murine	Murine	Aucun segment J	Lymphocytes B
RAG-1 ^{-/-}	κ et λ Murine	Murine	Enzyme RAG éliminée	Lymphocytes B et T

4.6. P14 et P14.SJL

Les souris P14 que nous détenons au laboratoire possèdent un transgène codant pour un TCR CD8 reconnaissant de façon spécifique le peptide gp₃₃₋₄₁ du virus LCMV présenté sur la chaîne lourde H-2D^b (CMH-I). Ces souris ont été développées en Suisse vers la fin des années 1980 (Pircher *et al.* 1989; Pircher *et al.* 1987) et ont été obtenues par la co-injection des

constructions géniques V β 8.1 et V α 2 dans des ovocytes de souris. Les souris transgéniques ainsi obtenues ont ensuite été rétrocroisées de façon hémizygote durant dix générations sur fond génétique C57Bl/6. La presque totalité des lymphocytes T CD8 trouvés en périphérie des souris P14 expriment le TCR transgénique.

Le seul facteur permettant de distinguer les souches de souris P14 et P14.SJL est l'isoforme du CD45 que chacune des souches exprime : les souris P14 expriment l'isoforme CD45.2 et les P14.SJL, l'isoforme CD45.1.

5. Hypothèse de travail

Les AcNat ont été démontrés importants pour la liaison rapide à des particules infectieuses, leur recrutement aux OLS et le développement subséquent de réponses immunitaires humorales leur étant spécifiques (Matter & Ochsenbein 2008). Leur importance dans le développement de réponses immunitaires cellulaires antivirales est par contre inconnue. Pour répondre à cette question, nous avons choisi le modèle d'infection virale murine LCMV, puisqu'il est efficacement contrôlé par les réponses CTL.

Il a déjà été démontré que, comparativement à des souris sans anticorps, les souris C57Bl/6 recrutent plus efficacement les particules infectieuses du LCMV à la rate dans les premières heures après l'infection (Ochsenbein, Fehr *et al.* 1999). Nous avons donc décidé de pousser l'analyse en comparant le développement des réponses cellulaires dans des souches murines ayant un répertoire primaire de LB intermédiaire aux deux souches témoins mentionnées plus haut. Notre raisonnement est que des souris ayant la capacité de sécréter des AcNat dont le répertoire est limité auront, comparativement aux souris de type sauvage, une capacité réduite à lier des particules virales. Nous croyons également que ces limitations affecteront à la baisse le recrutement du LCMV aux OLS, affaiblissant conséquemment le développement de réponses immunitaires cellulaires spécifiques au virus.

6. Objectifs du projet de recherche

Afin d'évaluer si la capacité des IgM naturels à lier les particules de LCMV-WE purifiées *in vitro* peut se traduire en une meilleure activation des réponses immunitaires adaptatives, nous avons comparé la capacité de présentation antigénique de nos différentes souches de souris après infection avec LCMV-WE.

Nous avons ensuite disséqué les réponses immunitaires cellulaires développées par nos différentes souches de souris au jour 8 après l'infection avec le LCMV-WE. Pour ce faire, nous avons évalué l'intensité des réponses immunitaires en analysant en cytométrie en flux l'expansion des populations totales de lymphocytes T CD4 et CD8, de même que la diminution de l'expression du marqueur d'activation CD62L à la surface des LT CD8. Nous avons aussi évalué par cytométrie en flux la spécificité des CTL pour le LCMV, grâce à un marquage avec des tétramères de classe-I. Nous avons également évalué la fonctionnalité des CTL spécifiques au virus en analysant par cytométrie en flux la production de TNF- α et d'IFN- γ et évalué la capacité de ces cellules à lyser spécifiquement des cellules cibles *ex vivo*.

Finalement, nous avons évalué la capacité de nos différentes souches de souris à maintenir ces réponses CTL plusieurs semaines après l'infection avec le LCMV-WE en répétant certaines des analyses faites au jour 8 après l'infection. La virémie a également été suivie à travers le temps, grâce à des titrages viraux effectués à partir du sang de nos animaux infectés.

Chapitre 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

1.1. Lignées cellulaires

La lignée L929 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA : CCL-1TM) est dérivée de tissus connectif sous-cutané murin provenant de la souche de souris C3H/An. Cette lignée cellulaire a été dérivée de la souche L, première souche cellulaire établie en culture continue. La lignée MC57G (ATCC : CRL-2295TM) est un fibrosarcome murin provenant de la souche de souris C57Bl/6. Cette lignée cellulaire a été établie à partir d'une tumeur ayant été induite par un traitement au méthylcholanthrène. Ces deux lignées cellulaires proviennent de l'ATCC et ont été maintenues dans du milieu *Earle's Minimum Essential Medium* (MEM; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplémenté de 5 % volume/volume (v/v) de sérum de veau foetal décomplémenté par une incubation de 30 minutes à 56 degrés Celsius (°C) (SVF; PAA Lab Inc, Etobicoke, ON, Canada).

Les cellules EL4 (ATCC : TIB-39TM) sont un lymphome murin provenant de la souche de souris C57Bl/6. Le CMH (H-2^b) exprimé par ces cellules est donc le même que celui exprimé par les souches de souris que nous avons utilisé pour les expériences décrites dans cet ouvrage. Ces cellules nous ont été fournies par le Dr. Rolf M. Zinkernagel (Institute of Experimental Immunology, University of Zurich, Zurich, Suisse) et ont été maintenues dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI; Invitrogen) supplémenté de 5 % (v/v) de SVF.

La lignée VL4 est un hybridome de rat produisant des IgG spécifiques à la nucléoprotéine du LCMV. La lignée KL-25 est un hybridome murin (Balb/c) produisant des IgG1 neutralisant le LCMV (spécifiques à la glycoprotéine). Ces deux lignées cellulaires nous ont été fournies par le Dr. Rolf M. Zinkernagel et ont été maintenues dans du milieu *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM; Thermo Scientific, South Logan, UT) supplémenté de 5 % (v/v) SVF et de 55 micromolaire de β -Mercaptoéthanol (β -ME; Invitrogen).

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère de 5% de dioxyde de carbone (CO₂).

1.2. Virus LCMV-WE

Le virus LCMV-WE nous a été fourni par le Dr. Rolf M. Zinkernagel.

2. Manipulation des stocks viraux

2.1. Production de particules de LCMV-WE

Les stocks de LCMV-WE sont produits dans des flacons F150 et dans des 2-STACK CellSTACK® (Corning, Corning, NY, USA) avec les cellules L929. À environ 80 % de confluence, le milieu de culture est remplacé par une suspension de LCMV-WE à une multiplicité d'infection de 0,01 dans 10 ou 80 millilitres (mL) de milieu MEM/2 % (v/v) SVF dans chaque flacon ou 2-STACK, respectivement. Les cellules sont incubées une heure à température pièce (TP) sur un plateau à balancement, puis 20 mL ou 160 mL de milieu MEM/2 % (v/v) SVF sont ajoutés à chaque flacon ou 2-STACK, respectivement. Après une incubation de 48 heures à 37°C et 5 % de CO₂, le surnageant est récolté, séparé en aliquots et identifié comme surnageant 48 heures. 30 mL ou 240 mL de milieu MEM/2 % (v/v) SVF frais est ajouté à chaque flacon ou 2-STACK, respectivement, pour une incubation supplémentaire de 24 heures. Le surnageant est à nouveau récolté, séparé en aliquots et identifié comme surnageant 72 heures.

2.2. Purification du LCMV-WE

Afin d'éliminer les débris et agrégats cellulaires, le surnageant des cellules infectées est centrifugé (rotor JA-10, dans l'appareil J2-21M; Beckman, Palo Alto, CA, USA) à 9500 rotation par minute (rpm) durant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est récolté et la solution est lentement amenée à 2.3 % poids/volume (p/v) de NaCl (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) et 7 % (p/v) de PEG 8000 (Sigma-Aldrich), pour ensuite l'incuber avec agitation douce à 4°C durant environ 16 heures. Afin de récolter les particules virales précipitées, la solution est à nouveau centrifugée 30 minutes à 9500 rpm et 4°C. Le surnageant est retiré et le culot est mis en suspension dans environ 5 mL de tampon TNE¹. La solution virale est ensuite déposée au dessus d'un gradient discontinu de 50 et 10 % (p/v) d'Histodenz (Sigma-Aldrich) dans des tubes Ultra-Clear (Beckman) de format adéquat pour un rotor SW32 Ti (Beckman). Afin d'isoler les

¹ Tampon TNE : 150 millimolaire (mM) de NaCl (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), 10 mM de Tris-HCl (Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) et 1 mM d'EDTA (Fisher).

particules virales, les tubes sont ultracentrifugés (Optima L-100K, Beckman) durant 3 heures 45 minutes à 25 000 rpm et 4°C (sans frein). L'anneau obtenu à l'interphase contient les particules virales et est récupéré à l'aide d'une longue pipette pasteur. Les particules virales sont ensuite dialysées trois fois à 4°C dans une solution de TNE, séparées en aliquots et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

2.3. Titration des stocks infectieux de LCMV-WE

Le titre de LCMV-WE est déterminé sur la lignée cellulaire adhérente MC57G dans des plateaux 24 puits. Les stocks viraux sont dilués directement dans les plateaux par un facteur de 10 dans du milieu de culture MEM/5 % (v/v) SVF pour obtenir un volume final par puits de 200 microlitre (μL). Ensuite, 200 μL de suspension de MC57G à 8×10^5 cellules/mL sont ajoutés à tous les puits et les plateaux sont incubés de 4 à 6 heures à 37°C et 5 % CO_2 . Trois cent μL de solution MEM/1 % Méthylcellulose² sont ensuite ajoutés à tous les puits et les plateaux sont à nouveau incubés à 37°C et 5 % CO_2 pour 48 heures. Toutes les étapes de révélation des foyers infectieux sont effectuées à TP. La solution MEM/1 % Méthylcellulose est enlevée par inversion et la monocouche cellulaire est rincée avec du *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS; Invitrogen). Les cellules sont fixées avec 250 μL par puits de PBS (*phosphate buffered saline*)/25 % (v/v) Formaldéhyde 37 % (Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) durant 30 minutes. Trois cycles de lavage au PBS sont effectués avant toutes les étapes suivantes. Les cellules sont perméabilisées avec 250 μL par puits de 0.5 % (v/v) Triton X-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) dilué dans du HBSS rouge phénol (Invitrogen) durant 20 à 30 minutes. Les sites non-spécifiques sont bloqués durant 90 minutes avec 200 μL par puits de PBS/10 % (v/v) SVF. Les foyers infectieux sont détectés par l'ajout successif de trois anticorps durant 90 minutes chacun : 200 μL par puits de surnageant d'hybridome VL4 (spécifique à la nucléoprotéine de LCMV); 200 μL par puits d'anticorps chèvre anti-rat couplé à l'enzyme HRP (*horseradish peroxidase*; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) dilué 1:160 dans du HBSS rouge phénol et 200 μL par puits d'anticorps porc anti-chèvre couplé à la HRP (Biosource, Camarillo, CA, USA) dilué 1:400 dans du HBSS rouge phénol.

² MEM/1 % Méthylcellulose: 1 % (p/v) de Méthylcellulose (Fluka, Buchs, Suisse), 10 % (v/v) de MEM-Earle 10X (Invitrogen), 5 % (v/v) de SVF, 1 % (v/v) de Pénicilline/Streptomycine 100X (Invitrogen), 0.5 % (v/v) de L-Glutamine 100X (Invitrogen) et 1.7 % (v/v) de Bicarbonate de Sodium 7.5 % (Invitrogen) dilués dans l'eau distillée stérile.

Les foyers infectieux sont révélés par l'ajout durant 30 minutes de 300 µL par puits de substrat OPD³. La solution de substrat est retirée et les plateaux sont lavés trois fois à l'eau distillée afin de permettre le décompte des foyers infectieux. Les titres viraux sont exprimés en unités formant des foyers par mL (uff/mL) et sont calculés selon la formule suivante : [(nombre de foyers) / (volume de l'échantillon x dilution de l'échantillon)].

2.4. Titrage du LCMV-WE infectieux à partir d'organes

Les organes sont d'abord décongelés rapidement et pesés. Ils sont ensuite broyés à l'aide d'un homogénéisateur de tissus (Polytron modèle PT2100; Kinematica Inc., Bohemia, NY, USA), puis centrifugés 5 minutes à 1 200 rpm à 4°C dans l'appareil Centrifuge 5415D (Eppendorff, Hamburg, Allemagne) afin de culotter le matériel fibreux. Pour le titrage à partir du sang, les tubes sont simplement décongelés avant l'analyse. Les échantillons sont dilués en série par un facteur de 4 directement dans les plateaux de culture de 24 puits avec le milieu de culture MEM/5 % (v/v) SVF afin d'obtenir un volume final par puits de 180 µL. Pour les étapes suivantes, se référer à la section 2.3 de ce chapitre.

3. Manipulation des souris

3.1. Génotypage des souris HC1⁴

Dans les semaines suivant le sevrage (entre 4 et 8 semaines d'âge), les souris sont anesthésiées à l'aide d'isoflurane (Baxter, Mississauga, ON, Canada) pour les identifier et récolter un bout de queue d'environ 3 millimètres de long. Chaque bout de tissus est traité individuellement dans 200 µL de tampon de digestion⁵ pour la nuit à 55°C avec agitation légère (300 rpm) dans le plateau chauffant Thermomixer (Eppendorff). L'enzyme présente dans le tampon de digestion est inactivée à 95°C durant 10 minutes et les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à TP à 13 200 rpm dans l'appareil Centrifuge 5415D.

³ Substrat OPD: 0.04 % (p/v) d'ortho-phénylènediamine (OPD; Sigma-Aldrich), 0.1 M de C₆H₈O₇ (Fisher), 0.2 M de Na₂HPO₄*2H₂O (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) et 0.04 % (v/v) de H₂O₂ 30 % (Sigma-Aldrich) dilués dans l'eau distillée.

⁴ Fournies par le Dr. Mark M. Davis, Stanford University, Stanford, CA, USA.

⁵ Tampon de digestion: 10 mM Tris-HCl pH9, 50 mM KCl (USB Corporation), 0.5 % (v/v) NP 40 (Sigma-Aldrich), 0.5 % (v/v) Tween 20 et 0.1 mg/mL protéinase K (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) dilués dans de l'eau distillée.

Chaque échantillon est soumis à une réaction de PCR (*polymerase chain reaction*) dans le thermocycleur PTC-220 (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) dans un volume final de 20 µL. 2 µL de chaque surnageant de digestion est ajouté à 2 µL de tampon PCR 10X (New England Biolabs, Pickering, ON, Canada), 1.2 µL de MgCl₂ 25 millimolaire (mM; Roche Applied Science, Laval, QC, Canada), 0.5 µL de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 1 µL de l'amorce HC1-Forward 10 ng/mL (Sigma-Genosys, Oakville, ON, Canada; 5' GCCTCAGGAGATGAGCTAGAGC 3'), 1 µL de l'amorce HC1-Reverse 10 nanogrammes (ng)/mL (Sigma-Aldrich; 5' TAGAGACAGCACTGTGCGTTGG 3'), 0.4 µL de Polymérase Taq 5 unités (U)/mL (New England Biolabs) et 13.1 µL d'eau distillée stérile. La réaction de PCR est effectuée selon le programme suivant : 5 minutes à 94°C, 35 cycles de 40 secondes à 95°C, 40 secondes à 60°C et 40 secondes à 72°C, suivi de 4 minutes à 72°C.

Environ 6 µL des résultats d'amplification sont migrés sur un gel d'agarose 2 % (p/v) coloré avec 0.005 % (v/v) de bromure d'éthidium (Fluka, Buchs, Suisse) pour 30 minutes à 100 Volts. Le gel est ensuite révélé aux rayons ultra-violets dans l'appareil Alphamager 3400 (AlphaInnotech, San Leandro, CA, USA) et les échantillons ayant amplifié un segment d'environ 171 paires de base sont identifiés positifs pour le minilocus HC1.

3.2. Phénotypage des souris P14⁶ et P14.SJL⁷

Dans les semaines suivant le sevrage (entre 4 et 8 semaines d'âge), les souris P14 et P14.SJL sont identifiées et environ 200 µL de sang est prélevé par la veine saphène et déposé dans des tubes à cytométrie en flux contenant 200 µL de PBS/Héparine 20 U/mL (Sigma-Aldrich). Les cellules sont lavées dans du tampon de cytométrie⁸ (centrifugation de 5 minutes à 1500 rpm à 4°C dans la centrifugeuse Sorvall Legend RT). Le surnageant est jeté et les culots remis en suspension dans 100 µL de tampon de cytométrie contenant les anticorps monoclonaux rat anti-souris CD8a couplé à la phycoérythrine (-PE) et Vα2 couplé à la fluorescéine (-FITC) (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Les cellules sont incubées 20 minutes à 4°C, à l'abri de la

⁶ Fournies par la Dre. Pamela S. Ohashi, Princess Margaret Hospital, Toronto, ON, Canada.

⁷ C57Bl/6.SJL fournies par le Dr. Claude Perreault, Institut de recherche en immunologie et en oncologie, Montréal, QC, Canada.

⁸ Tampon de cytométrie: 1 % (p/v) d'albumine sérique bovine (BSA; Fisher) et 0.1 % (p/v) de NaN₃ (USB) dilués dans du PBS.

lumière et ensuite lavées. Afin d'éliminer les érythrocytes, 1 mL de solution de lyse (BD Biosciences) est ajouté à chaque tube pour 10 minutes à TP. Les cellules sont lavées deux fois et remises en suspension dans 300 µL de tampon de cytométrie avant d'être analysées par cytométrie en flux à l'aide de l'appareil FACSCalibur (BD Biosciences). Au moins 10 000 cellules lymphoïdes par échantillon sont analysées pour l'expression des différents marqueurs visés à l'aide du logiciel d'acquisition et d'analyse CellQuest Pro (BD Biosciences) ou FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Les souris possédant au-delà de 85 % de lymphocytes T CD8 possédant la chaîne V α 2 sont considérées positives pour le TCR transgénique P14.

3.3. Lavages péritonéaux

Après avoir été sacrifiées au CO₂, l'abdomen des souris est aspergé d'éthanol 70 % et une petite incision est effectuée sur la peau du ventre afin de la séparer du péritoine par dissection moussée. Une seringue de 5 mL (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) remplie de PBS/Héparine 20 U/mL est insérée dans la cavité péritonéale à la base du ventre avec une aiguille 18G 1½" (BD), en prenant soin de ne pas transpercer les intestins ou autres organes internes. Tout le contenu de la seringue est introduit dans la cavité péritonéale et l'abdomen de la souris est massé afin de déloger le plus de cellules libres possible. Le liquide est retiré et la manœuvre est reprise deux fois sans enlever l'aiguille de l'abdomen. Le contenu des trois lavages est mis en commun et un décompte cellulaire est effectué.

3.4. Préparation de suspension cellulaire de splénocytes

Après prélèvement, les rates sont déposées dans 5 mL de milieu de culture MEM/5 % (v/v) SVF et écrasées à travers un tamis cellulaire de 100 microns (µm; BD) à l'aide du piston d'une seringue de 3 mL (BD) dans un plat de pétri stérile (Fisher). Afin d'éliminer les agrégats, la suspension cellulaire est pipetée à répétition avant d'être transférée dans un tube. Un décompte cellulaire est ensuite effectué.

3.5. Transfert de sérum aux souris J_HT

Environ seize heures avant l'infection des souris avec LCMV-WE, 2 mL de sérum de souris C57Bl/6 (Innovative Research, Novi, MI, USA) est filtré (0.2 µm) et injecté par voie intra-péritonéale (i.p.) à des souris J_HT naïves.

3.6. Infection avec LCMV-WE

Pour les infections à faible dose, une suspension virale est préparée à une concentration de 1×10^3 uff/mL. Pour les infections à haute dose, une suspension virale est préparée à une concentration de 1×10^7 uff/mL. Deux cent μL de la suspension appropriée sont ensuite injectés par voie intraveineuse (i.v.), via la veine caudale des souris, à l'aide de seringues insuline 28G $\frac{1}{2}$ " (BD). Les doses infectieuses correspondent ainsi à 200 uff et 2×10^6 uff, respectivement.

3.7. Récolte d'organes

Après euthanasie au CO_2 , le sang des souris est prélevé par ponction cardiaque. Le sang complet est obtenu en mélangeant 200 μL de sang à 200 μL de PBS/Héparine 20 U/mL. Le sérum est obtenu en déposant le reste du sang dans un tube Microtainer™ avec gel séparateur (BD), qui est centrifugé 10 minutes à 3 000 rpm à TP après coagulation du sang. Les échantillons de sang complet et de sérum sont entreposés à -20°C en attente d'être traités. Les organes, tels la rate, un rein et le grand lobe du foie sont récoltés et déposés chacun dans un tube de 14 mL à fond rond (BD) contenant 2 mL de MEM/5 % (v/v) de SVF. Si la rate doit être traitée pour l'analyse des populations cellulaires, 2 aliquots de 1 mL de la suspension totale de splénocytes (10 mL) sont congelés individuellement. Les organes ou suspensions cellulaires sont maintenus à -80°C avant d'être traités pour la détermination du titre viral.

4. Analyse des souches de souris naïves

4.1. Dosage par ELISA des IgM naturels

Cinquante μL d'anticorps chèvre anti-souris IgM (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) ou chèvre anti-humain IgM (Jackson ImmunoResearch) dilués à 2 microgrammes (μg)/mL dans du tampon carbonate pH 9.2⁹ sont adsorbés pour la nuit à 4°C au fond de plateaux pour ELISA (*enzyme-linked immunosorbant assay*) à 96 puits (Corning). Toutes les étapes suivantes sont effectuées à TP et toutes les dilutions sont effectuées dans du tampon de blocage¹⁰. Les plateaux sont vidés par inversion et lavés une fois avec du PBS. Les sites libres sont bloqués

⁹ Tampon carbonate: 0.1 M Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich) et 0.1 M NaHCO_3 (Sigma Aldrich) dilués dans l'eau distillée et ajusté à pH 9,2.

¹⁰ Tampon de blocage: 10 % (v/v) SVF et 0.2 % (v/v) de Tween-20 (Sigma Aldrich) dilués dans du PBS 1X.

durant une heure avec 150 µL par puits de tampon de blocage. Les plateaux sont vidés par inversion et 100 µL de sérum de souris transgéniques ou d'anticorps de référence dilués en série par un facteur de 3 (débutant à 1:300 pour les échantillons et à une concentration de 750 ng/mL pour les anticorps de référence) sont ajoutés aux puits correspondants et incubés 60 minutes. Les anticorps IgM-λ et IgM-κ murins et les anticorps IgM humains sont utilisés en référence pour des courbes standards de concentration (tous de Sigma Aldrich). Deux lavages avec du PBS/0.05 % (v/v) Tween 20 suivis d'un lavage au PBS sont effectués afin d'éliminer tout le matériel non lié. Après avoir vidé par inversion le dernier lavage, 100 µL d'anticorps secondaire couplé à la biotine (lequel a préalablement été incubé avec de la streptavidine-HRP (*horseradish peroxidase*) 1:5 000; Southern Biotech) ou directement à la HRP est ajouté à chaque puits pour 60 minutes (chèvre anti-λ de souris 1:10 000 (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA), chèvre anti-κ de souris 1:2 500 (Southern Biotech)). Après trois lavages avec du PBS/0.05 % (v/v) Tween 20 et un lavage au PBS, 100 µL de substrat OPD est ajouté aux puits et incubé 15 minutes à la noirceur. La réaction est arrêtée par l'ajout à chaque puits de 50 µL de HCl 1M (Sigma-Aldrich) et le développement de la réaction est quantifié par spectrophotométrie à 490 nanomètres (nm) dans le lecteur de plaques modèle 680 (Bio-Rad).

4.2. Dosage par ELISA des IgM liant LCMV-WE

Cinquante ng de virus purifié sont adsorbés pour la nuit à 4°C au fond de plateaux pour ELISA à 96 puits dans un volume final de 50 µL de tampon carbonate (pH 9.2). Toutes les étapes suivantes sont effectuées à TP et toutes les dilutions sont effectuées dans du PBS/0.1 % (p/v) d'albumine sérique bovine (BSA; Fisher). Les sites libres sont bloqués par l'ajout de 100 µL par puits de PBS/1 % (p/v) BSA pendant une heure. Un lavage au PBS est effectué et 50 µL de sérum de souris transgéniques dilué en série par facteur de 2 (débutant à 1:4 pour les échantillons et 1:100 pour l'anticorps monoclonal KL-25 purifié, spécifique à la glycoprotéine de LCMV) sont ajoutés aux puits correspondants et incubés 90 minutes. Après 4 cycles de lavage au PBS/0.05 % (v/v) Tween-20, les plateaux sont incubés 90 minutes avec 50 µL d'anticorps secondaire couplés à la HRP dilué 1:5 000 (chèvre anti-IgM de souris et chèvre anti-IgM humain pour la souris HC1; Jackson Immunoresearch). Après 4 cycles de lavage au PBS/0.05 % (v/v) Tween-20, 100 µL de substrat OPD est ajouté aux puits et incubé 15 minutes à la noirceur. La réaction est

arrêtée par l'ajout à chaque puits de 50 µL de HCl 1M et le développement de couleur est quantifié par spectrophotométrie à 490 nm.

4.3. Analyse des populations cellulaires péritonéale et splénique par cytométrie en flux

Un million de cellules de cavité péritonéale ou de splénocytes sont déposés dans des tubes à cytométrie et lavés (centrifugation à 1 500 rpm pour 5 minutes et à 4°C) pour une première fois dans du tampon de cytométrie. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 100 µL de tampon de cytométrie pour être marquées pour une période de 20 minutes à 4°C avec une combinaison de certains des anticorps rat anti-souris suivants : CD4-PE ou -FITC, CD8a-PE ou -FITC (tous de BD Biosciences), CD19-PE, CD3-Allophycocyanine (APC), CD5-APC et CD43-FITC (tous de eBioscience, San Diego, CA, USA). Après un lavage avec du tampon de cytométrie, les cellules non-viables sont marquées 10 minutes à TP avec 5 µL de 7-Amino-actinomycine D (7-AAD; BD Biosciences). Après un dernier lavage avec du tampon de cytométrie, les cellules sont remises en suspension dans 300 µL de paraformaldéhyde 1 % (v/v) dilué dans du tampon de cytométrie et entreposées à 4°C avant d'être analysées en cytométrie en flux (FACSCalibur). Au moins 10 000 cellules lymphoïdes vivantes par échantillon sont analysées pour l'expression des marqueurs visés à l'aide des logiciels d'acquisition et d'analyse CellQuest Pro et FlowJo.

5. Présentation antigénique

Des souris de 2 à 3 mois d'âge sont d'abord infectées à haute dose avec LCMV-WE (section 3.6 de ce chapitre). Vingt-quatre heures post-infection, les souris sont sacrifiées et leurs organes sont récoltés (section 3.7 de ce chapitre). À titre de témoins négatifs d'infection (groupe Mock), des souris C57Bl/6 non infectées d'âge équivalent à celui des animaux expérimentaux ont été hébergées et assujetties à des conditions identiques à celles des groupes expérimentaux. Pour simuler l'infection, ces animaux ont reçu par voie intraveineuse un volume de milieu de culture (MEM sans sérum) équivalent au volume de virus injecté aux animaux infectés.

5.1. Enrichissement et maturation de cellules CD11c⁺

Les rates sont déposées dans des tubes de 15 mL (Corning) contenant 5 mL collagénase D (Roche) à une concentration de 160 U/mL ou 1 milligramme (mg)/mL diluée dans du PBS

contenant du Ca^{2+} (Invitrogen). Le contenu de chaque tube est versé dans des pétris stériles (Fisher) et les rates sont découpées en très petits morceaux, à l'aide de pinces et de scalpels stériles (Feather, Osaka, Japon). Après une incubation d'une heure à 37°C et 5 % de CO_2 , les morceaux de rate sont transférés dans des tamis cellulaires de $100\ \mu\text{m}$ et écrasés à l'aide du piston d'une seringue de 3 mL. Les suspensions cellulaires sont transférées dans des tubes de 15 mL et lavées (centrifugation de 5 minutes à 1 300 rpm). Après avoir jeté le surnageant, les globules rouges sont lysés avec 5 mL de NH_4Cl 0.83 % (p/v; Sigma-Aldrich) durant 5 minutes à TP. La lyse est arrêtée par l'ajout de 10 mL de PBS à chaque tube et les cellules sont ensuite lavées. Après avoir jeté le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 10 mL de tampon d'échantillon pour autoMACS¹¹ et filtrées à travers de nouveaux tamis cellulaires de $100\ \mu\text{m}$. Un décompte cellulaire est fait et les cellules sont à nouveau lavées. Après avoir jeté le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans $400\ \mu\text{L}$ de tampon d'échantillon pour autoMACS par tranche de 10^8 cellules. Cent μL de billes magnétiques anti-CD11c (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) sont ajoutés à chaque tube par tranche de 10^8 cellules et après avoir été mélangées, les cellules sont incubées 20 minutes à 4°C . Les cellules sont lavées avec 10 à 20 fois le volume de marquage de tampon d'échantillon pour autoMACS. Après avoir jeté le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans $500\ \mu\text{L}$ de tampon d'échantillon pour autoMACS par tranche de 10^8 cellules et les cellules CD11c sont séparées par tri magnétique automatisé grâce à une sélection double positive (autoMACS; Miltenyi Biotec). La fraction positive est récoltée et un nouveau décompte cellulaire est fait. Les cellules sont lavées avec du milieu de maintien¹² et mises en suspension à une concentration de 5×10^5 cellules/mL. Cent μL de ces suspensions cellulaires sont déposés dans des puits séparés de plateaux de culture à fond rond de 96-puits. Afin de favoriser la maturation des cellules dendritiques isolées, $1\ \mu\text{g/mL}$ de lipopolysaccharides (LPS; Sigma-Aldrich) est ajouté aux puits expérimentaux, ainsi qu'à certains puits témoins. Les plateaux sont ensuite incubés durant 16 heures à 37°C et 5 % de CO_2 .

¹¹ Tampon d'échantillon pour autoMACS: 0.5 % (p/v) BSA (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) et 2 mM de EDTA (Fisher) dilués dans du PBS sans Ca^{2+} au pH 7.2.

¹² Milieu de maintien: RPMI supplémenté de 10 % (v/v) de SVF, 1 % (v/v) de Pénicilline/Streptomycine 100X, 1 % (v/v) de L-Glutamine 100X et $10\ \mu\text{M}$ de β -ME.

Afin de retirer le LPS des puits, les cellules sont lavées deux fois avec du milieu de maintien en centrifugeant directement les plateaux 96-puits durant 5 minutes à 400 rpm. Après le second lavage, 100 μ L d'une suspension de lymphocytes T CD8 de souris P14 ou P14.SJL sont ajoutés aux puits contenant des cellules dendritiques.

5.2. Enrichissement de lymphocytes T CD8 de souris P14 ou P14.SJL

La rate de souris P14 ou P14.SJL phénotypées positives pour le TRC transgénique P14 est récoltée et préparée pour obtenir deux suspensions cellulaires indépendantes, tel que décrit à la section 3.4 de ce chapitre. Les cellules sont lavées (centrifugation de 5 minutes à 1 500 rpm) et remises en suspension dans 10 mL de tampon d'échantillon pour autoMACS. Avant de procéder au décompte cellulaire, les agrégats cellulaires sont éliminés en filtrant à travers de nouveaux tamis cellulaires de 100 μ m. Les cellules sont ensuite lavées et après avoir jeté le surnageant, sont remises en suspension dans 90 μ L de tampon d'échantillon pour autoMACS par tranche de 10^7 cellules totales. Dix μ L de billes magnétiques anti-CD8a (Ly-2; Miltenyi Biotec) par tranche de 10^7 cellules sont ajoutés à chaque tube et après avoir été mélangées, les cellules sont incubées 20 minutes à 4°C. Les cellules sont lavées avec 10 à 20 fois le volume de marquage de tampon d'échantillon pour autoMACS. Après avoir jeté le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 1 mL de tampon d'échantillon pour autoMACS par tranche de 10^8 cellules et les cellules CD8a sont séparées en tri magnétique automatisé par sélection positive simple au mode sensible (autoMACS). La fraction positive est récoltée et un nouveau décompte cellulaire est fait. Les cellules sont lavées avec du milieu de maintien et mises en suspension à une concentration de 10^6 cellules/mL. Cent μ L de ces suspensions cellulaires sont ajoutés aux puits contenant des cellules dendritiques, en prenant soin d'utiliser les CTL transgéniques exprimant l'isoforme du CD45 correspondant à celui de chacune des souches de souris à l'étude. Les plateaux sont incubés durant 72 heures à 37°C et 5 % de CO₂.

5.3. Incorporation de thymidine-³H

Afin d'évaluer la prolifération des lymphocytes T CD8 mis en co-culture avec les cellules dendritiques, 0.44 microcurie (μ Ci) de thymidine [méthyl-tritium (³H)] (Perkin Elmer, Boston,

MA, USA) dilué dans du milieu de maintien est ajouté à chaque puits. Les plateaux sont à nouveau incubés durant 16 heures à 37°C et 5 % de CO₂.

Pour quantifier l'incorporation de thymidine-tritiée [méthyl-³H] par les cellules en prolifération, le contenu des plateaux est transféré sur des membranes filtermat (Perkin Elmer) à l'aide du Harvester (Tomtec, Handem, CT, USA). Après avoir séché les membranes, ces dernières sont imbibées de liquide à scintillation Ultima Gold (Perkin Elmer) dans un sac à échantillons (Perkin Elmer). Après avoir scellé les sacs, la radioactivité retenue sur les membranes est lue dans l'appareil Trilux 1450 MicroBeta (Perkin Elmer).

6. Analyse des réponses cellulaires contre LCMV-WE

Des souris de 2 à 3 mois d'âge sont infectées à faible dose avec LCMV-WE (section 3.6 de ce chapitre). Huit jours post-infection ou plus de 40 jours post-infection, les souris sont sacrifiées et leurs organes sont récoltés (section 3.7 de ce chapitre) pour l'analyse respective des réponses primaires ou mémoires contre LCMV-WE. Les rates sont préparées selon les indications de la section 3.4 de ce chapitre.

Afin d'évaluer l'élimination virale, du sang est récolté à différents jours post-infection via la veine saphène. Tel que mentionné dans la section 5 de ce chapitre, des souris C57Bl/6 non infectées et d'âge similaire à celui des animaux expérimentaux sont utilisées à titre de témoins négatifs d'infection (groupe Mock).

6.1. Quantification des lymphocytes T CD8 spécifiques à LCMV

Un million de splénocytes sont déposés dans des tubes à cytométrie en flux avant d'être lavés avec du tampon de cytométrie. Les cellules sont d'abord incubées 30 minutes à 37°C avec les tétramères gp₃₃₋₄₁, np₃₉₆₋₄₀₅ ou gp₂₇₆₋₂₈₆. Les peptides gp₃₃₋₄₁: KAVYNFATC (LCMV-GP, H-2D^b), np₃₉₆₋₄₀₅: FQPQNGQFI (LCMV-NP, H-2D^b) et gp₂₇₆₋₂₈₆: SGVENPGGYCL (LCMV-GP, H-2D^b) proviennent de chez Sigma-Genosys. Sans laver les cellules, les anticorps monoclonaux rat anti-souris CD62L-APC ou CD44-APC et CD8a-FITC (tous de BD Biosciences) sont directement ajoutés aux tubes et incubés durant 20 minutes à 4°C. Après un lavage avec du tampon de cytométrie, les cellules non-viables sont marquées 10 minutes à TP avec 5 µL de 7-AAD. Après un dernier lavage avec du tampon de cytométrie, les cellules sont remises en suspension dans 300 µL de

paraformaldéhyde 1 % (v/v) dilué dans du tampon de cytométrie et entreposées à 4°C avant d'être analysées en cytométrie en flux (FACSCalibur). Au moins 10 000 cellules lymphoïdes vivantes par échantillon sont analysées pour l'expression des différents marqueurs visés à l'aide du logiciel d'acquisition et d'analyse CellQuest Pro ou FlowJo.

6.2. Analyse de marqueurs d'activation cellulaire

Un million de cellules de chacune des suspensions de splénocytes sont déposées dans des tubes à cytométrie avant d'être marquées pour analyse en cytométrie en flux, tel que décrit dans la section 4.3 de ce chapitre. Les anticorps rat anti-souris CD62L-APC ou CD44-APC et CD8a-FITC sont utilisés pour ce marquage.

6.3. Quantification des lymphocytes T CD4 et CD8 sécrétant des cytokines

Un million de cellules de chacune des suspensions de splénocytes sont déposées dans des puits d'une plaque 96-puits à fond rond dans un volume de 100 µL. Les cellules sont diluées dans du RPMI/ 5 % (v/v) SVF supplémenté de 100 U/mL d'IL-2 recombinante de souris (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) et de 10 µg/mL de Brefeldine A (Sigma), soit tel quel ou avec 10 µM de peptides purifiés gp₃₃₋₄₁ ou gp₆₁₋₈₀ (GLNGPDIYKGVYQFKSVEFD (LCMV-GP, I-A^b); Sigma-Genosys) pour stimuler respectivement les réponses T CD8 et CD4 spécifiques au LCMV. Après cinq heures d'incubation à 37°C et 5 % de CO₂, les cellules sont transférées dans des tubes à cytométrie en flux avant d'être lavées avec du tampon de cytométrie. La surface des cellules est ensuite marquée durant 20 minutes à 4°C, à l'aide des anticorps monoclonaux rat anti-souris CD4-PE ou CD8a-PE (BD Biosciences). Les cellules sont à nouveau lavées avec du tampon de cytométrie avant de marquer les cellules non-viables 10 minutes à TP avec 5 µL de 7-AAD. Après un lavage avec du tampon de cytométrie, les cellules sont fixées durant 20 minutes à TP avec 100 µL de IC fixation buffer (eBioscience). Deux lavages sont ensuite fait avec chacun 1 mL de tampon de perméabilisation 1X (eBioscience). La présence de cytokines est ensuite détectée dans le cytoplasme des cellules avec l'utilisation des anticorps monoclonaux rat anti-souris TNF-α-APC et IFN-γ-FITC durant 20 minutes à TP (eBioscience). Après un dernier lavage avec 1 mL de tampon de perméabilisation, les cellules sont remises en suspension dans 300 µL de paraformaldéhyde 1 % (v/v) dilué dans du tampon de cytométrie et entreposées à 4°C avant

d'être traitées en cytométrie en flux (FACSCalibur). Au moins 10 000 cellules lymphoïdes vivantes par échantillon sont analysées pour la sécrétion des cytokines visées à l'aide du logiciel d'acquisition et d'analyse CellQuest Pro ou FlowJo.

6.4. Test de relâche de chrome (test de cytotoxicité)

Des cellules EL4 en phase exponentielle de croissance (cellules cibles) sont radiomarquées avec du chromate de sodium [^{51}Cr] à une concentration finale de 500 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ (Perkin Elmer) avec ou sans peptide gp₃₃₋₄₁ à une concentration finale de 0.5 μM pour une durée de 2 heures à 37°C avec agitation légère. Après trois lavages avec du milieu MEM/ 2 % (v/v) SVF, les cellules cibles sont diluées à une concentration de 10⁵ cellules/mL. Durant l'incubation des cellules cibles, les splénocytes de souris infectées sont préparés à une concentration de 9 x 10⁶ cellules/mL avant d'être dilués en série par un facteur de 3. Un volume de 100 μL des dilutions de cellules cibles est ajouté dans les puits de plaques de culture 96-puits à fond rond, auxquels un volume de 100 μL des suspensions de splénocytes dilués en série sont ajoutés. Les plaques sont centrifugées 30 secondes à 200 g et incubées 5 heures à 37°C et 5 % de CO₂. Les plaques sont centrifugées à 400 g pour 5 minutes afin de culoter les cellules. Trente μL de surnageant est récolté de chacun des puits et mélangés à 150 μL de SuperMix (Perkin Elmer) dans un plateau à 96 puits pour radioactivité (Perkin Elmer). Un papier scellant Top-SealTM-A (Perkin Elmer) est apposé à chaque plaque et ces dernières sont incubées 30 minutes à TP sur un agitateur. Le pourcentage de relâche spécifique de [^{51}Cr] est calculé dans l'appareil Trilux 1450 MicroBeta (Perkin Elmer) ou l'appareil Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer) selon la formule suivante : [(relâche expérimentale – relâche spontanée) x 100/ (relâche totale – relâche spontanée)].

7. Analyses statistiques

Des analyses statistiques sont effectuées entre les groupes expérimentaux, à l'exception des témoins négatifs d'infection, et correspondent à un test d'analyse de la variance, suivi du test de comparaison multiple Bonferroni. Les barres d'erreur représentent l'erreur moyenne standard (SEM). Les échantillons sont considérés significatifs à partir de $P < 0.05$.

Chapitre 3

RÉSULTATS

1. Comparaison des souches de souris naïves

L'objectif des analyses faites dans cette section est d'évaluer s'il existe des différences phénotypiques et fonctionnelles au niveau du système immunitaire humoral inné de souches de souris possédant une diversité de répertoire de lymphocytes B restreinte. Nous avons d'abord comparé la taille des populations de lymphocytes B trouvées dans la cavité péritonéale et la rate de nos différentes souches de souris. Nous avons ensuite quantifié les IgM pré-immuns trouvés dans la circulation sanguine et évalué la capacité de ces AcNat à lier des particules virales de LCMV-WE purifiées. Nous avons également fait l'analyse qualitative et quantitative des sous-populations de lymphocytes T spléniques, afin d'évaluer avant leur infection si des différences de fréquence existent entre les souches de souris à l'étude.

1.1. Sous-populations de lymphocytes B trouvées dans la cavité péritonéale

Afin de comparer la fréquence et la taille des sous-populations de LB trouvées dans la cavité péritonéale des souches de souris transgéniques utilisées dans cette étude, nous avons procédé à un lavage péritonéal (section 3.3 du chapitre 2) pour ensuite marquer les cellules récupérées (section 4.3 du chapitre 2) selon une stratégie de marquage permettant de distinguer les lymphocytes B-1a des autres types de LB. Cette stratégie est inspirée d'une publication du groupe du Dr Nitschke dans laquelle ils utilisent l'analyse de la co-expression du CD43 et du CD5 à partir de la population positive pour l'expression du CD19 (Hoffmann *et al.* 2007). Les lymphocytes B-1a ($CD19^{hi} CD43^{int} CD5^{int}$) peuvent ainsi être distingués des B-1b ($CD19^{hi} CD43^{int} CD5^{nég}$) et des B-2 ($CD19^{hi} CD43^{nég} CD5^{nég}$).

L'analyse des cellules lymphoïdes vivantes exprimant le CD19 permet de distinguer deux populations cellulaires par leur taille et leur niveau d'expression du CD19 (Figure 14 A panneaux de gauche). L'analyse comparative de ces deux populations permet d'apprécier certaines différences morphologiques distinguant les lymphocytes B-1 des B-2. En effet, la population CD19 positive de petite taille est majoritairement constituée de lymphocytes B-2 ($CD19^{pos} CD43^{nég} CD5^{nég}$), tandis que celle de plus grande taille est majoritairement constituée de lymphocytes B-1a ($CD19^{hi} CD43^{int} CD5^{int}$) et B-1b ($CD19^{hi} CD43^{int} CD5^{nég}$) (Figure 14 A panneaux de droite). De plus, lorsque le niveau de granulosité de ces deux mêmes populations est

comparé (non montré), on peut observer que les cellules de plus grande taille ont un contenu cellulaire plus dense que leur contrepartie de petite taille. Cette densité intracellulaire plus importante peut être expliquée par le fait qu'une partie des LB innés est prête à sécréter des anticorps avant même leur stimulation.

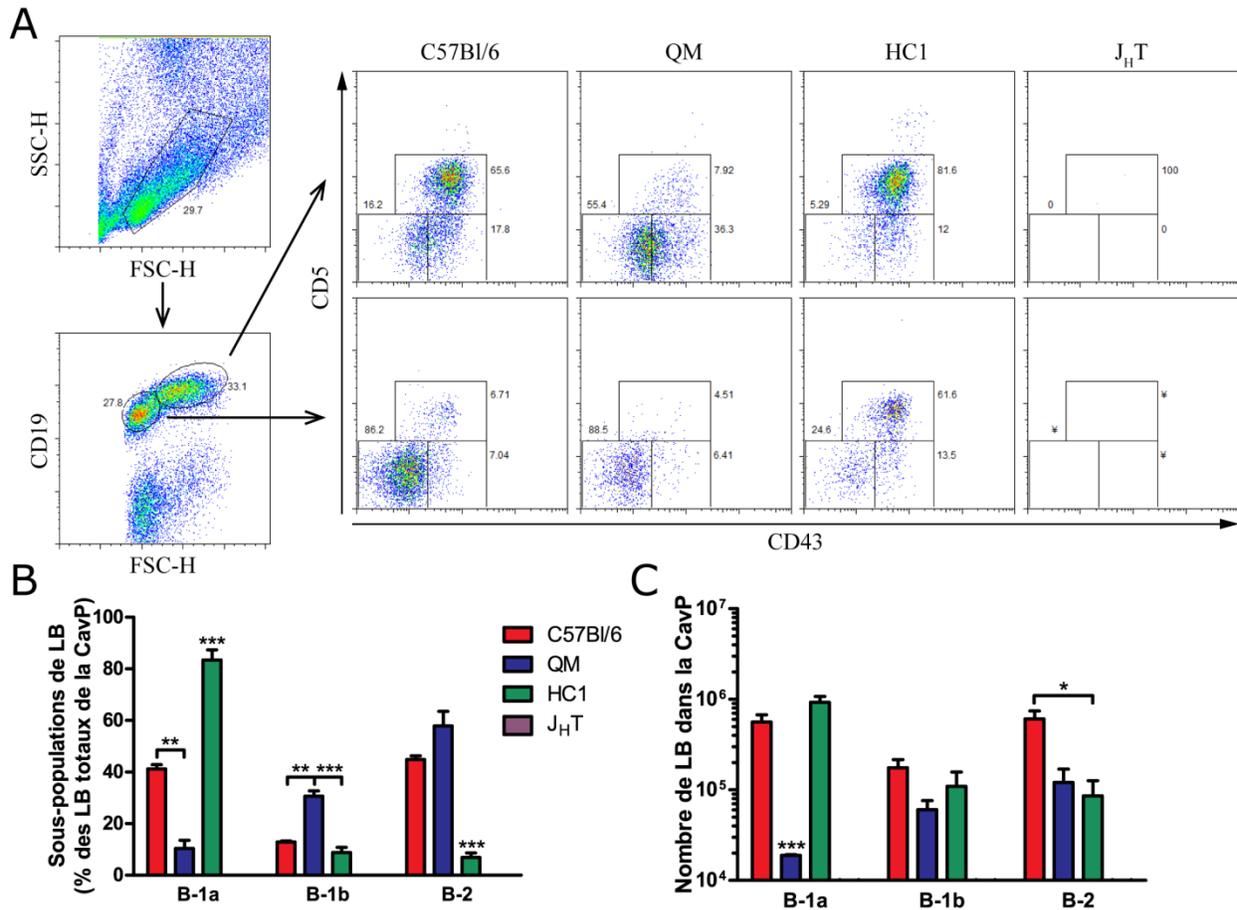


Figure 14 : Sous-populations de lymphocytes B trouvées dans la cavité péritonéale de souris naïves.

A) Stratégie d'analyse par cytométrie en flux des populations de LB péritonéaux trouvées dans des souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves. Un animal représentatif de chaque groupe est montré dans l'encadré. B) Pourcentage relatif et C) nombre estimé de lymphocytes B-1a, B-1b et B-2 trouvés dans la cavité péritonéale de souris naïves. Le pourcentage relatif représente le ratio de contribution des différentes sous-populations dans la population totale de LB péritonéaux. La moyenne de trois animaux par groupe est montrée en B) et C). Représentatif de deux expériences. LB : lymphocytes B; CavP : cavité péritonéale. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Tel qu'attendu, aucun lymphocyte B mature n'est détectable dans la cavité péritonéale des souris J_HT (Figure 14 A). L'analyse des sous-populations de LB de petite taille (Figure 14 A, panneaux de droite, rangée du bas) indique, à première vue, que les souris HC1 ont une fréquence plus faible de lymphocytes B-2 et plus forte de lymphocytes B-1a que les souris

C57Bl/6 et QM. L'observation des sous-populations de lymphocytes B de grande taille (Figure 14 A, panneaux de droite, rangée du haut) montre plutôt que chez les souris QM, la fréquence de lymphocytes B-1a est très faible par rapport aux souris C57Bl/6 et HC1. Ceci se traduit d'ailleurs par une fréquence relative plus élevée de lymphocytes B-1b et B-2 chez les souris QM. En rapportant les observations précédentes en fonction de la population totale de lymphocytes B trouvée dans la cavité péritonéale (Figure 14 B), nous remarquons une nette différence de représentation des sous-populations de LB péritonéaux chez chacune des souches de souris à l'étude. Les souris C57Bl/6 ont un pourcentage relatif similaire de lymphocytes B-1a et B-2 et un plus faible pourcentage de lymphocytes B-1b. Les souris QM ont un pourcentage croissant de chacune des sous-populations, avec les LB-1a en plus faible proportion et les LB-2 en plus forte représentation. Les souris HC1, quant à elles, semblent avoir une très grande population relative de LB-1a par rapport aux LB-1b et LB-2. Les souris HC1 semblent grandement favoriser le développement des lymphocytes B-1a par rapport aux deux autres souches de souris, alors que les souris QM semblent plutôt limiter le développement de cette même sous-population. La comparaison de la fréquence des lymphocytes B-1b montre que les souris C57Bl/6 et HC1 ont un ratio équivalent de ces cellules et que les souris QM favorisent la différenciation de ce sous-type cellulaire. La représentation des lymphocytes B-2 est, quant à elle, comparable entre les souches de souris C57Bl/6 et QM, mais est nettement moins importante chez les souris HC1. En somme, le ratio de représentation des différentes sous-populations de lymphocytes B péritonéaux semble être propre à chaque souche murine.

En estimant le nombre absolu de cellules appartenant aux différentes sous-populations de LB trouvées dans la cavité péritonéale des différentes souches de souris, nous remarquons que malgré une imposante représentation de la sous-population de lymphocytes B-1a chez les souris HC1, l'estimation du nombre de ces cellules équivaut à celui trouvé chez les souris de type sauvage. La très faible représentation de ces cellules chez les souris QM se traduit en effet par un nombre total plus faible que celui des deux autres souches de souris étudiées. Malgré une plus forte représentation de lymphocytes B-1b chez les souris QM, le nombre absolu de ces cellules est équivalent pour toutes les souches de souris. L'estimation du nombre total de lymphocytes B-2 indique que cette sous-population a tendance à être plus importante chez les

souris C57Bl/6 que chez les deux autres souches de souris étudiées ici. En somme, malgré que le pourcentage relatif des sous-populations de lymphocytes B diffère entre les souches murines à l'étude, le nombre total de cellules (à deux exceptions près) est relativement similaire d'une souche murine à l'autre.

1.2. Sous-populations lymphocytaires trouvées dans la rate de souris naïves

Après avoir récolté la rate de nos souris naïves, nous avons comparé la distribution et la taille des populations lymphocytaires disponibles pour le développement de réponses immunitaires. Afin d'identifier les lymphocytes B-1a spléniques (Figure 15 A-B), les cellules récupérées ont été marquées selon la stratégie décrite plus haut (section 1.1 de ce chapitre). Nous avons également comparé, à partir des cellules CD3 positives, le taux et le nombre de cellules des sous-populations de lymphocytes T CD4 et CD8 (Figure 15 C-D).

Puisque l'analyse phénotypique des populations de lymphocytes B splénique est relativement complexe, nous nous sommes restreints à l'estimation de la taille de la population des lymphocytes B totaux et de la sous-population de lymphocytes B-1a. Nous avons considéré toutes les cellules exprimant le CD19 comme appartenant à la première et la seconde a été distinguée par le phénotype $CD19^{hi} CD43^{int} CD5^{int}$.

Tel qu'attendu, des lymphocytes B matures ne peuvent être détectés dans la rate des souris J_{HT} (Figure 15 A-B). Lorsqu'analysées en fonction de la population lymphoïde totale (non montré) et de la population totale de lymphocytes B spléniques, des différences significatives de pourcentage de lymphocytes B-1a sont obtenues entre les groupes de souris (Figure 15 A). En effet, les souris HC1 ont un pourcentage de LB-1a spléniques nettement plus élevé que les deux autres groupes de souris à l'étude et les souris QM ont également un pourcentage relatif plus élevé de LB-1a que celui des souris C57Bl/6 (Figure 15 A).

Lorsque le nombre absolu de lymphocytes B-1a est estimé pour la rate totale, nous obtenons des valeurs équivalentes entre chacun des groupes expérimentaux (Figure 15 B). Nous pouvons également observer que les souris C57Bl/6 ont un nombre total de lymphocytes B spléniques significativement plus élevé que celui des souris QM et HC1 (Figure 15 B).

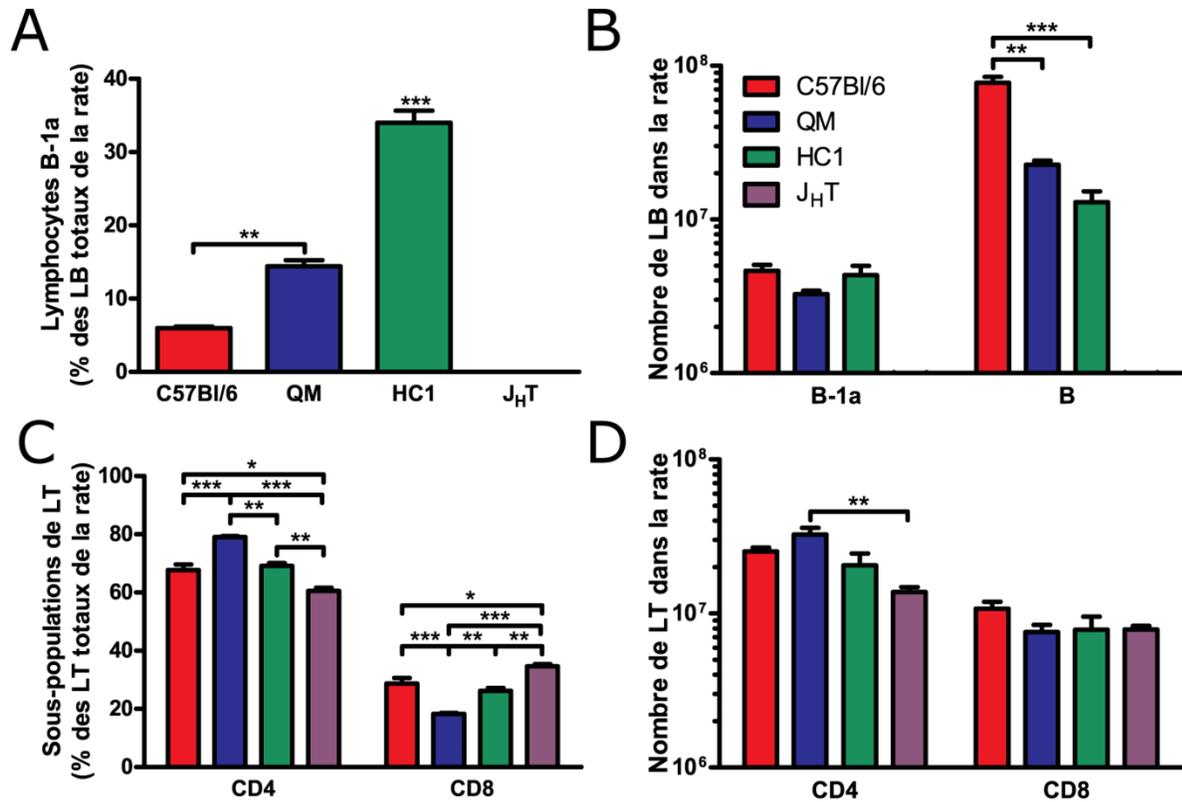


Figure 15 : Sous-populations lymphocytaires spléniques de souris naïves.

La rate de souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves a été prélevée pour analyser par cytométrie en flux les populations de LB et LT spléniques. Pourcentage relatif (A et C) et nombre estimé (B et D) de lymphocytes B-1a et B (A et B) et de lymphocytes T CD4 et CD8 (C et D) spléniques. Le pourcentage relatif représente le ratio de contribution des différentes sous-populations dans la population totale de LB ou de LT spléniques. Le nombre total est calculé par la multiplication du pourcentage total de ces populations par le décompte des splénocytes totaux. La moyenne de trois animaux par groupe est montrée. Représentatif de deux expériences. LB : lymphocytes B; LT : lymphocytes T. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

L'analyse de la contribution des sous-populations de lymphocytes T CD4 et CD8 à la population totale de lymphocytes T spléniques démontre des différences statistiquement significatives entre chacun des groupes expérimentaux (Figure 15 C). Lorsqu'analysées en fonction de la population lymphoïde totale (non montré) et de lymphocytes T spléniques totaux, des différences significatives de distribution des deux sous-populations de lymphocytes T sont observées entre les groupes. Nous pouvons remarquer que les souris QM ont un déséquilibre du ratio de représentation des LT favorisant les LT CD4, tandis que les souris J_HT semblent permettre une plus grande représentation des LT CD8 comparativement aux autres souches de souris.

Malgré la distribution différente des deux sous-populations de lymphocytes T splénique entre chaque groupe, la transposition en nombre absolu s'équivaut (Figure 15 D). Le seul cas échappant à cette tendance est le nombre total plus élevé de lymphocytes T CD4 chez les souris QM par rapport aux autres groupes.

1.3. Concentration des IgM naturels sériques

Afin de comparer la concentration d'IgM sérique pré-immun des souches de souris transgéniques à l'étude, nous avons prélevé le sérum de souris naïves et effectué des tests ELISA sandwich (section 4.1 du chapitre 2). Les résultats bruts de cette sous-section ont été générés par Marie-Pierre Langlois lors d'un stage sous ma supervision. Je suis par contre responsable de l'élaboration des stratégies ainsi que de l'analyse des résultats présentés ici (Figure 16).

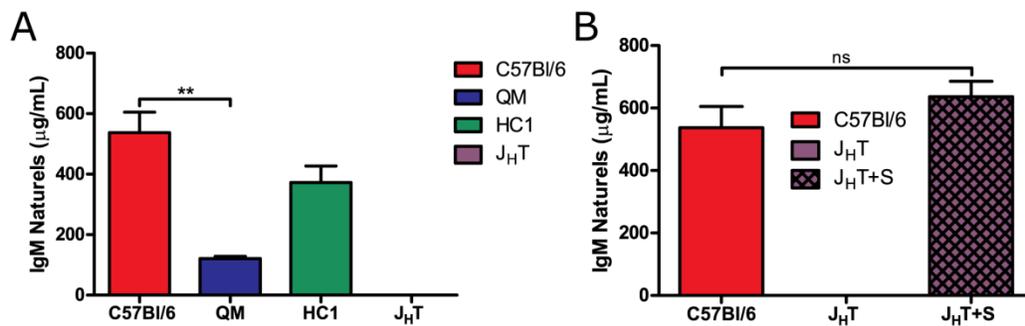


Figure 16 : Concentration d'IgM sériques de souris naïves.

Le sérum de souris C57Bl/6, QM, HC1 et JHT non modifiées (A) ou de souris JHT+S (B) naïves a été prélevé et la concentration d'IgM naturels a été évaluée par test ELISA sandwich. La moyenne de trois à six animaux par groupe est montrée. Représentatif de une à trois expériences. ns : non significatif. **, $P < 0.01$.

Tel qu'attendu, nous n'avons pas détecté d'anticorps dans le sérum des souris JHT. De plus, nous n'avons pas trouvé d'anticorps chez les souris HC1 lors de la détection par la chaîne Ig lourde murine, ni décelé d'anticorps pour les souris C57Bl/6 et QM lors de la détection des sérums par la chaîne Ig lourde humaine.

Selon nos analyses, les souris C57Bl/6 ont une concentration d'IgM sériques pré-immuns de $537 \pm 67.8 \mu\text{g/mL}$, les souris QM une concentration de $121 \pm 7.3 \mu\text{g/mL}$ et les souris HC1 une concentration de $372 \pm 54.5 \mu\text{g/mL}$ (Figure 16 A).

Dans l'objectif d'évaluer la capacité de transfert d'IgM naturels à des souris sans anticorps, nous avons injecté 2 mL de sérum de souris C57Bl/6 naïves par voie intrapéritonéale à des souris J_HT (J_HT+S; section 3.5 du chapitre 2) et évalué 16 heures après l'injection, la concentration d'IgM trouvée dans le sang de ces souris (Figure 16 B). La stratégie de détection des IgM naturels pour ce groupe est la même que celle choisie pour les souris C57Bl/6.

Le transfert de 2 mL de sérum à des souris J_HT recouvre le taux d'IgM sanguin des souris J_HT+S à $636 \pm 49.2 \mu\text{g/mL}$. Cette concentration est légèrement plus élevée que celle normalement trouvée chez les souris C57Bl/6 normales, mais cette augmentation n'est pas statistiquement différente (Figure 16 B).

1.4. Liaison des IgM naturels au LCMV-WE purifié

Afin d'évaluer la capacité des IgM naturels à lier des particules virales, nous avons fait un test ELISA avec le sérum de nos souches de souris naïves contre des virions de LCMV-WE purifiés (section 4.2 du chapitre 2). Les résultats présentés dans cette sous-section ont été obtenus et fournis par Dre Esther Tarrab.

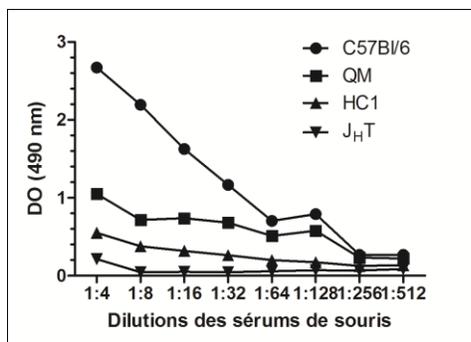


Figure 17 : Liaison des IgM naturels sériques au LCMV-WE.

Le sérum de souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves a été prélevé et la capacité des IgM naturels à lier des particules virales purifiées de LCMV-WE a été évaluée en test ELISA direct. La moyenne de trois animaux par groupe est montrée. Représentatif de deux expériences. DO : densité optique.

Chez toutes les souches de souris ayant la capacité de sécréter des anticorps, nous observons une diminution de la densité optique associée à la dilution des sérums, phénomène qui n'est pas observé chez les souris témoins J_HT (Figure 17). Selon le signal de détection des IgM, les AcNat de souris C57Bl/6 semblent avoir la capacité la plus élevée à l'étude à lier des particules virales purifiées de LCMV-WE. Les valeurs obtenues avec les sérums de souris QM et HC1

naïves, bien que relativement près de celles des souris J_HT, montrent également une capacité des IgM naturels à lier le LCMV.

2. Initiation de réponses cellulaires contre le LCMV

Afin d'évaluer l'importance de la diversité du répertoire des LB dans les étapes précoces d'initiation de réponses immunitaires cellulaires, nous avons infecté les souches de souris avec une haute dose de LCMV-WE (section 3.6 du chapitre 2) et évalué, 24 heures après l'infection, le nombre de DCs trouvées dans la rate. Nous avons ensuite évalué leur capacité de présentation de peptides viraux à des CTL de souris P14 ou P14.SJL, en mesurant le niveau de prolifération de ces dernières (section 5 du chapitre 2).

2.1. Taille de la population totale de cellules dendritiques folliculaires spléniques

D'abord, nous avons estimé le nombre total de cellules CD11c positives trouvées dans la rate des souches de souris à l'étude, afin d'évaluer grossièrement leur potentiel de présentation antigénique. Ces quantités ont été estimées à partir du décompte cellulaire fait après la purification des cellules CD11c positives à l'AutoMACS (Figure 18; voir section 5.1 du chapitre 2).

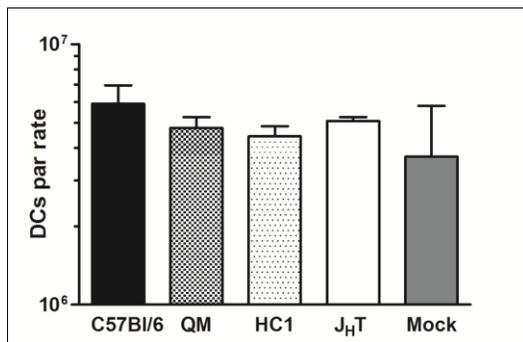


Figure 18 : Taille de la population de cellules dendritiques splénique de souris infectées avec le LCMV-WE.

24h après l'infection de souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT avec une haute dose de LCMV-WE, les cellules CD11c positives sont isolées de la rate par tri magnétique. Le nombre total est estimé d'après le décompte cellulaire fait suite au tri magnétique. La moyenne de deux animaux par groupe est montrée. Représentatif de quatre expériences. DCs : cellules dendritiques.

Selon nos résultats, 24h après une infection par le LCMV-WE, la quantité de cellules dendritiques spléniques ne semble pas différer significativement d'une souche de souris à l'autre (Figure 18).

2.2. Présentation antigénique *ex vivo* suite à une infection par LCMV-WE

Nous avons ensuite comparé la capacité intrinsèque des DCs de souris infectées à présenter le peptide gp₃₃₋₄₁ à des lymphocytes T CD8 de souris P14 ou P14.SJL, en évaluant la quantité de thymidine radiomarquée incorporée suite à la prolifération de ces CTL (Figure 19; voir la section 5 du chapitre 2).

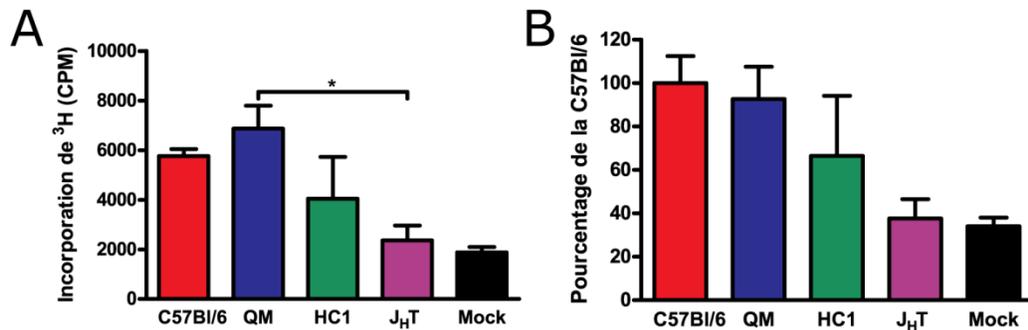


Figure 19 : Prolifération de lymphocytes T CD8 de souris P14 après co-incubation avec des cellules dendritiques spléniques de souris infectées avec le LCMV-WE.

24h après l'infection de souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT avec une haute dose de LCMV-WE, les cellules CD11c positives sont isolées de la rate par tri magnétique et co-incubées durant 36h avec des lymphocytes T CD8 de souris P14. Afin d'évaluer la prolifération des CTL, de la thymidine-³H est ajoutée durant environ 16h avant la lecture d'incorporation de la radioactivité. A) Valeur moyenne d'incorporation de radioactivité pour des puits contenant 5×10^4 cellules CD11c. B) Estimation de la capacité de présentation antigénique pour la rate totale. L'estimation de la présentation totale est obtenue en divisant les valeurs de CPM par le nombre de DCs par puits et en multipliant ce ratio de CPM par DC par le nombre total de DCs par rate. La moyenne de deux animaux par groupe est montrée. Représentatif de deux expériences. ³H : tritium; CPM : coups par minute. *, P < 0.05.

L'analyse du taux moyen d'incorporation de thymidine-³H par des CTL de souris P14 incubées avec 5×10^4 cellules CD11c positives indique que les souris C57Bl/6 ont une tendance plus élevée à présenter du peptide viral gp₃₃₋₄₁ que les souris HC1 et J_HT. Les souris J_HT semblent quant à elles avoir un net désavantage de présentation de ce peptide viral par rapport aux autres souches murines à l'étude, puisque leur capacité d'activation des CTL de souris P14 est presque équivalente à celle des souris non infectées (groupe Mock). Par contre, bien que les souris QM aient une diversité de répertoire des LB plus restreinte que celle des souris C57Bl/6, elles semblent avoir une capacité de présentation antigénique supérieure à celle de toutes les autres souches de souris à l'étude (Figure 19 A).

Étant donné que l'analyse précédente est basée sur la capacité de présentation antigénique d'un nombre fixe de cellules CD11c, nous avons fait la projection de ces résultats sur la capacité

de présentation du peptide viral gp₃₃₋₄₁ pour la rate entière (Figure 19 B). Malgré qu'aucune différence significative n'ait été obtenue entre les groupes expérimentaux, nous pouvons remarquer une tendance de capacité de présentation antigénique décroissante qui semble être associée à la restriction de la diversité du répertoire des LB.

3. Réponses cellulaires primaires développées contre LCMV-WE

Afin d'évaluer si la présence et la diversité de répertoire des LB ont un impact sur les réponses CTL obtenues au jour 8 post-infection, nous avons infecté toutes nos souches de souris avec une faible dose de LCMV-WE (section 3.6 du chapitre 2). Au sommet des réponses cellulaires développées contre le LCMV, soit 8 jours après l'infection, nous avons évalué par cytométrie en flux la capacité d'expansion des sous-populations de lymphocytes T, le niveau d'expression du marqueur d'activation CD62L à la surface des lymphocytes T CD8, de même que l'intensité et la fonctionnalité des réponses cellulaires spécifiques au LCMV-WE. Nous avons également évalué la capacité fonctionnelle des CTL spécifiques au LCMV à lyser spécifiquement des cellules cibles radio-marquées.

3.1. Taille des sous-populations de LT spléniques au jour 8 post-infection

Pour comparer la capacité d'expansion des populations lymphocytaires spléniques des différentes souches de souris, nous avons évalué par cytométrie en flux le nombre total de lymphocytes T trouvés dans la rate 8 jours après l'infection par le LCMV-WE (Figure 20 A).

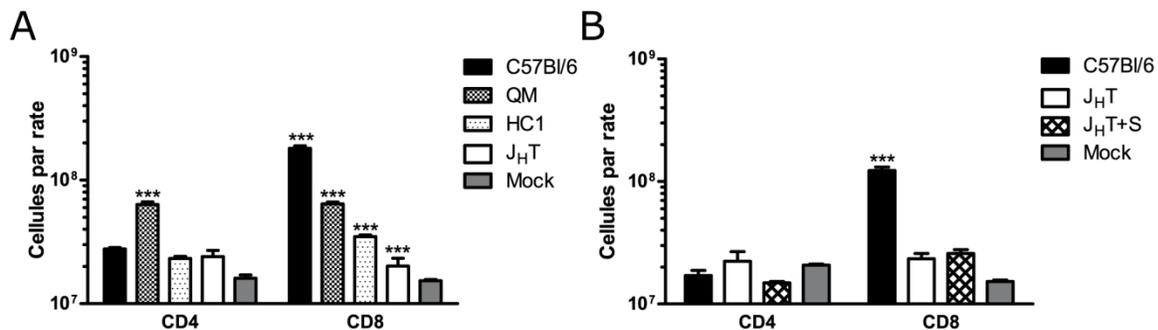


Figure 20 : Expansion des lymphocytes T spléniques 8 jours après l'infection avec le LCMV-WE.

Huit jours après l'infection à faible dose de LCMV-WE, le nombre total de lymphocytes T CD8 et CD4 spléniques est analysé par cytométrie en flux. Les cellules lymphoïdes vivantes sont sélectionnées en fonction de l'expression du CD8 ou du CD4 à leur surface. L'expansion des lymphocytes T a été évaluée chez les souches de souris tel quelles (A) ou les souris J_HT+S (B). Le nombre total est calculé par la multiplication du pourcentage total de ces populations par le décompte des splénocytes totaux. La moyenne de trois à quatre animaux par groupe est montrée. Représentatif de quatre à six expériences. ***, P < 0.001.

De façon intéressante, l'infection par le LCMV-WE induit une augmentation considérable du nombre de lymphocytes T CD4 chez les souris QM. À l'exception de ces souris, aucune différence dans la quantité de lymphocytes T CD4 n'est observée entre les souches de souris testées (Figure 20 A). L'analyse de l'expansion des lymphocytes T CD8 totaux révèle plutôt une augmentation graduelle de la taille de cette population en fonction de la diversité prédite de répertoire des LB des différentes souches de souris. En effet, les souris C57Bl/6 ont une quantité de lymphocytes T CD8 plus importante que celle de toutes les autres souches de souris; les souris QM, une quantité plus importante que celle des souris HC1 et les souris J_HT, une quantité plus faible que celle de toutes les autres souches de souris testées (Figure 20 A). L'expansion globale des LT CD8 semble donc être influencée par la diversité de répertoire des LB.

Nous avons ensuite évalué l'impact de la présence des AcNat sur l'expansion des lymphocytes T CD4 et CD8 au sommet de la réponse immunitaire contre LCMV-WE, en injectant 2 mL de sérum de souris C57Bl/6 à des souris J_HT (J_HT+S) (Figure 20 B; voir la section 3.5 du chapitre 2). Tel que mentionné plus haut, le transfert de cette quantité de sérum rétablit le taux d'IgM sanguins des souris J_HT+S à un niveau comparable à celui des souris de type sauvage (Figure 16). Aucune différence dans le nombre de LT CD4 n'est observée entre le groupe de souris J_HT+S et les groupes témoins C57Bl/6, J_HT et non-infectées (Mock; Figure 20 B). En comparaison avec les souris non-infectées, tous les groupes expérimentaux (C57Bl/6, J_HT et J_HT+S) ont par contre vu leur population totale de LT CD8 augmenter suite à l'infection, quoique ce phénomène soit clairement plus marqué chez les souris de type sauvage (Figure 20 B).

3.2. Expression du CD62L à la surface des lymphocytes T CD8

Nous avons ensuite évalué par cytométrie en flux le niveau d'activation des CTL totaux en évaluant, au jour 8 après l'infection, la diminution de l'expression du marqueur d'activation CD62L (Figure 21). Ce marqueur permet, lorsqu'exprimé à la surface cellulaire, la mobilisation des CTL non activés aux OLS afin qu'ils puissent entrer en contact avec des CPA et parvenir à rencontrer les antigènes pour lesquels ils sont spécifiques. Suite à l'activation des CTL, l'expression du CD62L est diminuée afin de permettre l'élimination des cellules périphériques

exprimant le même antigène et d'éviter l'élimination des CPA le présentant. Cette analyse a été faite avec les souches de souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT non modifiées (Figure 21 A), de même que suite au transfert passif d'AcNat à des souris J_HT (Figure 21 B).

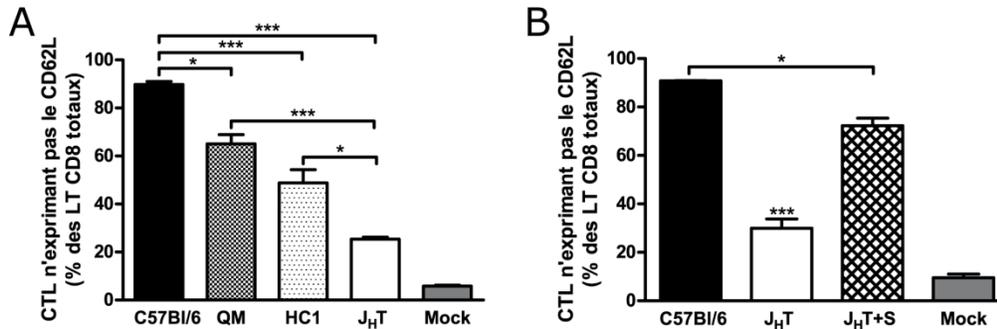


Figure 21 : Expression du marqueur d'activation CD62L à la surface des lymphocytes T CD8.

Huit jours après l'infection à faible dose de LCMV-WE, le niveau d'expression du CD62L sur les lymphocytes T CD8 spléniques est analysé par cytométrie en flux. L'expression du marqueur d'activation CD62L a été évalué chez les souches de souris tel quelles (A) ou les souris J_HT+S (B). Le pourcentage relatif représente le ratio de lymphocytes T doubles positifs (CD8 et CD62L) dans la population totale de lymphocytes T CD8 spléniques. La moyenne de trois à quatre animaux par groupe est montrée. Représentatif de quatre à six expériences. LT : lymphocytes T. *, P < 0.05; ***, P < 0.001.

L'analyse du niveau d'expression du CD62L à la surface des CTL de nos différentes souches de souris indique qu'elles ont, 8 jours après l'infection avec le LCMV-WE, des différences majeures d'activation cellulaire (Figure 21 A). Nos résultats proposent que l'activation des CTL soit, du moins en apparence, dépendante de la diversité du répertoire des LB, puisqu'une corrélation directe semble exister entre l'activation des CTL et la diversité de répertoire des LB.

Nos résultats suggèrent également l'importance de la présence d'AcNat au moment de l'infection, puisque les souris J_HT+S ont un niveau d'expression du CD62L significativement plus faible que celui du groupe témoin J_HT (Figure 21 B).

3.3. Quantification des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV

Afin de quantifier les lymphocytes T CD8 reconnaissant spécifiquement certains peptides présentés de façon prédominante lors d'une infection par le LCMV, nous avons utilisé des complexes tétramériques H-2D^b préparés tel que décrit précédemment (Altman *et al.* 1996). Nous avons testé par cytométrie en flux la liaison spécifique des lymphocytes T CD8 à trois tétramères différents (gp₃₃₋₄₁, np₃₉₆₋₄₀₅ et gp₂₇₆₋₂₈₆; section 6.1 du chapitre 2). Cette analyse a

été faite pour les souches de souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT (Figure 22 A-C), de même qu'avec les souris J_HT ayant reçu par transfert passif du sérum de souris C57Bl/6 naïves (Figure 22 D-E).

Le pourcentage relatif des CTL spécifiques au tétramère gp₃₃₋₄₁ est similaire entre les groupes de souris C57Bl/6, HC1 et J_HT, bien que ce pourcentage soit légèrement plus élevé chez les souris de type sauvage (Figure 22 A et B). Les souris QM, quant à elles, affichent un pourcentage de CTL spécifiques au gp₃₃₋₄₁ beaucoup plus élevé que celui des autres souches de souris testées (Figure 22 A et B). Le pourcentage relatif des CTL spécifiques au tétramère np₃₉₆₋₄₀₅ est similaire entre les groupes de souris C57Bl/6, QM et J_HT, malgré que l'expansion de cette population cellulaire semble être favorisée chez les souris HC1 (Figure 22 A et B). Pour la population de CTL spécifiques au tétramère gp₂₇₆₋₂₈₆, nous obtenons des valeurs semblables entre les groupes de souris C57Bl/6, QM et HC1, mais les souris J_HT démontrent une fréquence nettement moins importante de cette population cellulaire que celle des autres souches de souris à l'étude (Figure 22 A et B).

La comparaison du nombre absolu de CTL spécifiques aux tétramères indique une diminution progressive de leur représentation correspondant aux limitations de diversité du répertoire des LB des souches de souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT. Les souris C57Bl/6 en ayant la plus grande quantité et les souris J_HT, la plus faible (Figure 22 C).

Huit jours après l'infection avec le LCMV-WE, nous obtenons, suite au transfert passif de sérum de souris C57Bl/6 naïves à des souris J_HT, un pourcentage relatif très similaire de CTL spécifiques au tétramère gp₃₃₋₄₁ entre les groupes de souris C57Bl/6 et J_HT+S (Figure 22 D). Ces deux groupes expérimentaux obtiennent d'ailleurs des valeurs de pourcentage plus élevées que celles obtenues par les souris témoins J_HT (Figure 22 D). La comparaison du pourcentage relatif de CTL spécifiques au tétramère np₃₉₆₋₄₀₅ entre les groupes expérimentaux n'est pas significativement différente, mais nous pouvons remarquer que le groupe de souris J_HT semble avoir une limitation d'expansion de cette population cellulaire par rapport aux groupes de souris C57Bl/6 et J_HT+S (Figure 22 D). Pour la population de CTL spécifiques au tétramère gp₂₇₆₋₂₈₆, nous observons que les souris C57Bl/6 ont un taux significativement plus élevé de ces cellules que les deux autres groupes de souris à l'étude (Figure 22 D).

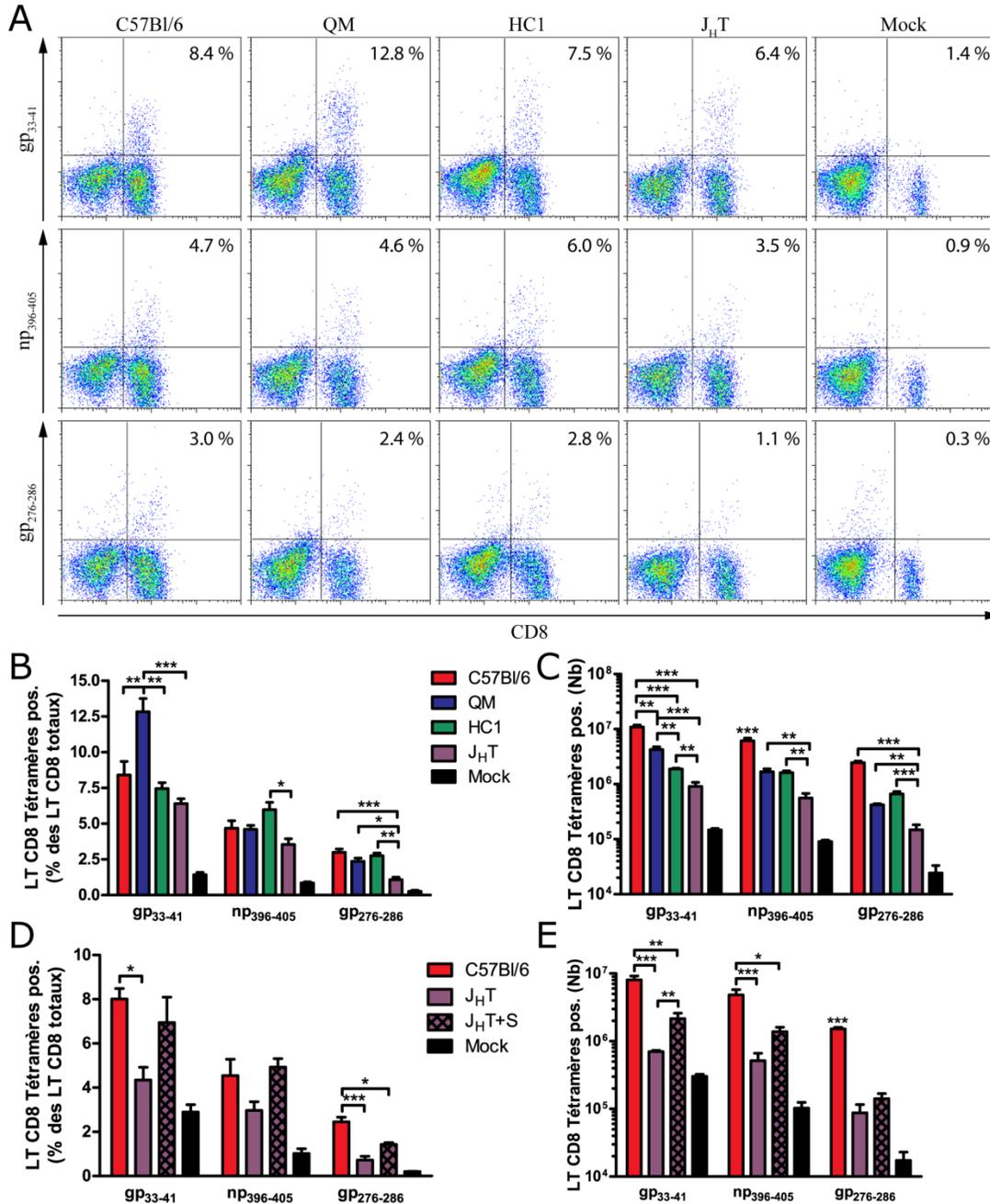


Figure 22 : Identification de lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV-WE.

Huit jours après l'infection à faible dose de LCMV-WE, les lymphocytes T CD8 spécifiques pour trois tétramères LCMV sont analysés par cytométrie en flux. (A) Les cellules lymphoïdes vivantes sont sélectionnées et analysées pour la liaison à un des trois tétramères combinée à l'expression du CD8. Un animal représentatif de chaque groupe est montré dans l'encadré. (B et D) Pourcentage relatif et (C et E) nombre absolu de lymphocytes T CD8 spécifiques aux tétramères a été évalué chez les souches de souris tel quel (A à C) ou les souris J_HT+S (D et E). Le pourcentage relatif représente le ratio de lymphocytes T doubles positifs (CD8 et tétramère) dans la population totale de lymphocytes T CD8 spléniques. Le nombre total est calculé par la multiplication du pourcentage total des populations par le décompte des splénocytes totaux. La moyenne de trois à quatre animaux par groupe est montrée. Représentatif de quatre à six expériences. LT: lymphocytes T; pos. : positifs. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Nous observons un nombre plus important de CTL spécifiques aux tétramères gp₃₃₋₄₁ et np₃₉₆₋₄₀₅ chez les souris J_HT+S par rapport aux souris J_HT, mais à des niveaux n'atteignant pas celui des souris C57Bl/6. En contrepartie, le transfert adoptif de sérum de souris C57Bl/6 naïves aux souris J_HT ne semble pas faciliter l'expansion des CTL spécifiques au tétramère gp₂₇₆₋₂₈₆, puisque les souris C57Bl/6 ont une quantité bien plus importante de ces cellules que les deux autres groupes expérimentaux (Figure 22 E).

3.4. Capacité de sécrétion de cytokines après stimulation *ex vivo*

Afin d'évaluer la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques au LCMV, nous avons évalué après stimulation *ex vivo*, la capacité de sécrétion de TNF- α et d'IFN- γ de lymphocytes T CD4 et CD8 réagissant spécifiquement à deux peptides synthétiques différents (gp₆₁₋₈₀ pour les CD4 et gp₃₃₋₄₁ pour les CD8; section 6.3 du chapitre 2). Cette analyse a été faite avec nos souches de souris non modifiées (Figure 23 A-D) ainsi qu'avec des souris J_HT ayant reçu par transfert passif du sérum de souris C57Bl/6 naïves (Figure 23 E-H).

Le pourcentage relatif de lymphocytes T CD4 sécrétant seulement le TNF- α est significativement plus élevé chez les souris C57Bl/6 que chez les groupes de souris HC1 et J_HT (Figure 23 A). Par contre, seul le groupe de souris témoins J_HT obtient un taux significativement plus faible de lymphocytes T CD4 sécrétant uniquement l'IFN- γ que celui des souris C57Bl/6 (Figure 23 A). Pour la population de lymphocytes T CD4 sécrétant les deux cytokines testées, les souris C57Bl/6 ont un taux significativement plus élevé de ces cellules comparativement aux groupes de souris HC1 et J_HT (Figure 23 A).

Le pourcentage relatif de CTL sécrétant seulement le TNF- α est significativement plus élevé pour les souris QM que pour les groupes de souris HC1 et J_HT (Figure 23 C). Par contre, le taux de CTL sécrétant uniquement l'IFN- γ ne diffère pas significativement entre les groupes de souris à l'étude (Figure 23 C). Pour la population de CTL sécrétant les deux cytokines testées, nous obtenons des différences significatives de pourcentages relatifs entre tous les groupes, mais étonnamment, les souris QM présentent un pourcentage plus élevé de CTL répondant spécifiquement au gp₃₃₋₄₁ que celui de toutes les souches de souris testées (Figure 23 C).

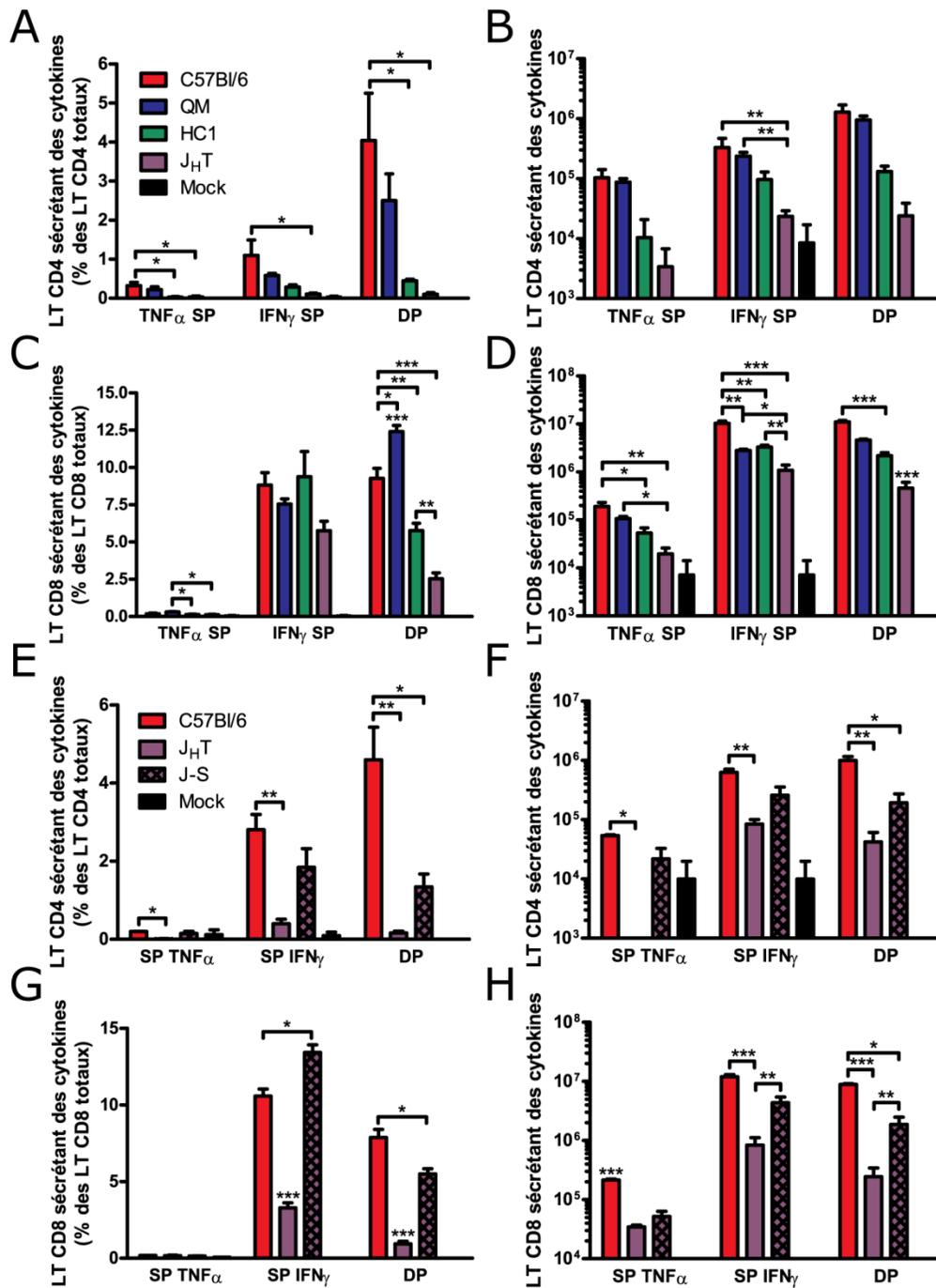


Figure 23 : Production de cytokines par les lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques au LCMV-WE.

Huit jours après l'infection à faible dose de LCMV-WE, la capacité de sécrétion du TNF- α et de l'IFN- γ par les LT CD4 et CD8 spécifiques au LCMV est évaluée à l'aide d'un marquage intracellulaire suivi d'une analyse en cytométrie en flux. Pourcentage relatif (A, C, E et G) et nombre absolu (B, D, F et H) de LT CD4 (A, B, E et F) et CD8 (C, D, G et H) sécrétant des cytokines évalué chez les souches de souris tel quel (A à D) ou les souris J_HT+S (E à H). Le pourcentage relatif représente le ratio de LT double ou triple positifs (CD4 ou CD8 et une ou les deux cytokines) dans les populations totales de LT CD4 et CD8 spléniques. Le nombre total est calculé par la multiplication du pourcentage total des populations par le décompte des splénocytes totaux. La moyenne de trois à quatre animaux par groupe est montrée. Représentatif de quatre à six expériences. LT : lymphocytes T; Nb : nombre; SP : simple positives pour une des deux cytokines; DP : double positives pour les deux cytokines. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

L'analyse du nombre absolu de lymphocytes T CD4 sécrétant une seule ou les deux cytokines indique une tendance de diminution progressive de ces cellules en fonction des limitations de diversité du répertoire des LB des souches de souris. Les souris C57Bl/6 ayant la plus grande quantité de ces cellules et les souris J_HT, la plus faible quantité (Figure 23 B). On observe le même phénomène entre les groupes expérimentaux lorsqu'on compare le nombre de CTL sécrétant les cytokines testées (Figure 23 D).

Huit jours après l'infection de souris J_HT ayant reçu un transfert adoptif de sérum, nous remarquons que seules les souris C57Bl/6 ont un pourcentage relatif significativement plus élevé de LT CD4 sécrétant uniquement le TNF- α ou l'IFN- γ que le groupe témoin de souris J_HT (Figure 23 E). Pour la population de lymphocytes T CD4 sécrétant simultanément les deux cytokines testées, nous observons que les souris C57Bl/6 ont un taux significativement plus élevé de ces cellules par rapport aux autres groupes de souris à l'étude (Figure 23 E).

Aucune différence significative de pourcentage relatif de CTL sécrétant seulement le TNF- α n'est observée entre les groupes expérimentaux suite au transfert adoptif de sérum aux souris J_HT (Figure 23 G). Le taux de CTL sécrétant uniquement l'IFN- γ est par contre significativement plus faible chez les souris J_HT que chez les deux autres souches de souris. De plus, les souris J_HT+S ont un taux significativement plus élevé de ces cellules par rapport aux souris C57Bl/6 (Figure 23 G). Pour la population de CTL sécrétant les deux cytokines testées, les souris J_HT obtiennent un taux significativement plus faible de ces cellules que les deux autres souches de souris et les souris C57Bl/6 en ont un pourcentage plus élevé que celui des souris J_HT+S (Figure 23 G).

De façon intéressante, le transfert adoptif de sérum de souris C57Bl/6 naïves à des souris J_HT semble restaurer le nombre de LT CD4 sécrétant uniquement le TNF- α ou l'IFN- γ de ces souris à des niveaux similaires à ceux des souris de type sauvage (Figure 23 F). Une différence significative entre les groupes C57Bl/6 et J_HT+S est par contre observée pour les LT CD4 sécrétant simultanément les deux cytokines (Figure 23 F). Les résultats obtenus pour le nombre de CTL sécrétant des cytokines suggèrent que le transfert de sérum améliore la fonctionnalité des réponses spécifiques au LCMV-WE, puisque des différences significatives de sécrétion d'IFN- γ (couplée ou non au TNF- α) sont observées entre les groupes J_HT et J_HT+S (Figure 23 H).

3.5. Activité lytique des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV

L'évaluation fonctionnelle des CTL obtenus au jour 8 après l'infection avec le LCMV-WE s'est conclue avec l'analyse de leur capacité de lyse de cibles cellulaires étant recouverte du peptide gp₃₃₋₄₁ (Figure 24 A; section 6.4 du chapitre 2). Cette analyse fut également faite avec des souris J_HT ayant reçu, par transfert passif, du sérum de souris C57Bl/6 naïves (Figure 24 B).

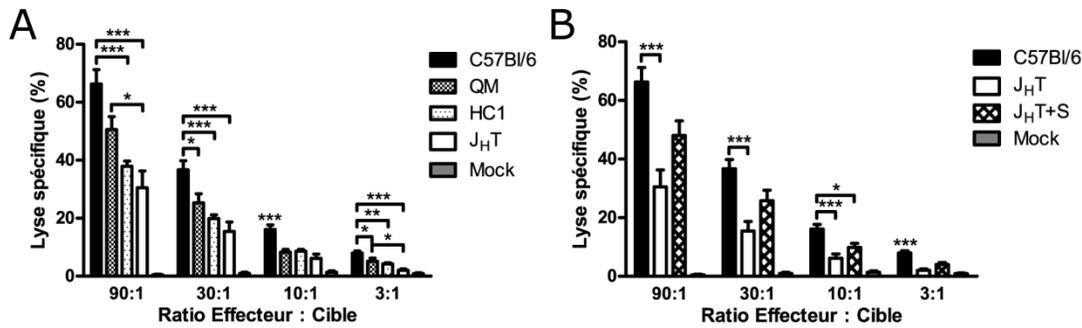


Figure 24 : Activité cytolitique des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV-WE.

Huit jours après l'infection à faible dose de LCMV-WE, l'activité cytolitique des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV a été analysée à l'aide d'un test de relâche de chrome. Cette expérience a été faite avec les souches de souris tel quel (A) ou les souris J_HT+S (B). La moyenne de trois animaux par groupe est montrée. Représentatif de quatre à six expériences. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Chez toutes les souches de souris ayant été infectées, nous observons une corrélation inverse entre la dilution des CTL et leur capacité lytique (Figure 24). La comparaison des souches de souris entre elles permet d'apprécier la plus forte capacité cytolitique des CTL de souris C57Bl/6 par rapport à ceux des autres souches murines à l'étude. Quoique les données statistiques ne soient pas significatives, nous observons une diminution de la capacité lytique des CTL en fonction de la diversité du répertoire des LB des souches de souris (Figure 24 A).

Le transfert adoptif de sérum de souris C57Bl/6 naïves à des souris J_HT semble améliorer la capacité cytolitique des CTL de souris J_HT. En effet, des différences significatives sont observées entre les groupes de souris C57Bl/6 et J_HT et seul le ratio 10:1 de cellules effectrices indique une différence entre les groupes de souris C57Bl/6 et J_HT+S. Toutefois, bien les valeurs obtenues ne soient pas statistiquement significatives, nous observons que les souris J_HT+S ont une tendance plus élevée à lyser les cibles cellulaires comparativement aux souris témoin J_HT (Figure 24 B).

4. Maintien des réponses cellulaires contre LCMV-WE

Afin d'évaluer si la présence et la diversité du répertoire des LB ont un impact sur la capacité de maintien de LT spécifiques au LCMV, nous avons infecté toutes nos souches de souris avec une faible dose de LCMV-WE (section 3.6 du chapitre 2). Plus de 40 jours après l'infection, nous avons évalué par cytométrie en flux le maintien des CTL spécifiques à trois tétramères de classe-I, de même que la capacité des LT spécifiques au virus à sécréter des cytokines après stimulation *ex vivo*. Nous avons également évalué l'importance de la présence et de la diversité du répertoire des LB dans la résolution de l'infection par le LCMV-WE en évaluant la charge virale sanguine à différents temps après l'infection.

4.1. Maintien des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV

Afin d'évaluer la capacité de maintien des CTL spécifiques au LCMV, nous avons testé par cytométrie en flux la liaison spécifique des lymphocytes T CD8 totaux pour chacun des trois tétramères utilisés au jour 8 post-infection (Figure 25; voir section 3.3 de ce chapitre).

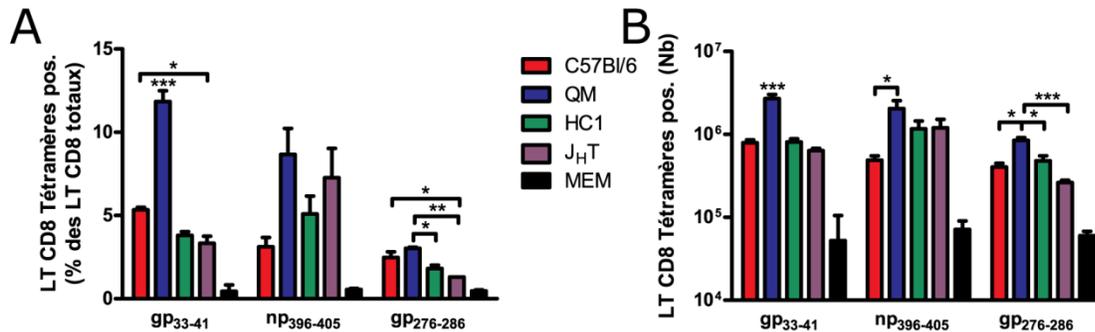


Figure 25 : Maintien des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV-WE 50 jours après l'infection.

Cinquante jours après l'infection à faible dose de LCMV-WE, les lymphocytes T CD8 spécifiques pour trois tétramères LCMV sont analysés par cytométrie en flux. Le pourcentage relatif (A) et le nombre absolu (B) de lymphocytes T CD8 spécifiques aux tétramères a été évalué chez les souches de souris C57Bl/6, QM, HC1, J_HT et non infectées (Mock). Le pourcentage relatif représente le ratio de lymphocytes T doubles positifs (CD8 et tétramère) dans la population totale de lymphocytes T CD8 spléniques. Le nombre total est calculé par la multiplication du pourcentage total des populations par le décompte des splénocytes totaux. La moyenne de trois animaux par groupe est montrée. Représentatif de trois expériences. LT: lymphocytes T; pos.: positifs. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Le pourcentage relatif de CTL spécifiques au tétramère gp₃₃₋₄₁ maintenus 50 jours après une infection par le LCMV est significativement plus élevé chez les souris QM que chez tous les groupes de souris testés (Figure 25 A). Des différences de maintien de ces cellules sont également observées entre les groupes de souris C57Bl/6 et J_HT, malgré que l'écart soit moins

important qu'avec le groupe de souris QM (Figure 25 A). Aucune différence significative n'est obtenue entre les groupes de souris à l'étude pour le maintien de CTL spécifiques au tétramère np₃₉₆₋₄₀₅ (Figure 25 A). Néanmoins, on peut observer une tendance pour les souris QM et J_HT à favoriser le maintien de cette population cellulaire (Figure 25 A). Pour le maintien de la population de CTL spécifiques au tétramère gp₂₇₆₋₂₈₆, quelques différences de taux peuvent être observées entre les groupes et il semble que les souris C57Bl/6 et QM aient plus de facilité à maintenir cette sous-population que les autres souches de souris à l'étude (Figure 25 A).

La comparaison du nombre absolu de CTL spécifiques aux différents tétramères confirme que les souris QM ont une propension plus élevée que les autres groupes de souris à l'étude à maintenir ces cellules plusieurs semaines après l'infection avec le LCMV-WE (Figure 25 B).

4.2. Maintien de la capacité de sécrétion de cytokines après stimulation *ex vivo*

Afin d'évaluer le maintien de la fonction de sécrétion de TNF- α et d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques au LCMV, nous avons analysé par cytométrie en flux, la production de ces cytokines après stimulation *ex vivo* (Figure 26; section 3.4 de ce chapitre).

Les souris QM semblent pouvoir maintenir un pourcentage relatif de lymphocytes T CD4 sécrétant uniquement le TNF- α plus élevé que les autres groupes de souris à l'étude (Figure 26 A). Le groupe de souris C57Bl/6 peut quant à lui maintenir un taux de LT CD4 sécrétant uniquement l'IFN- γ plus élevé que celui des souches de souris HC1 et J_HT (Figure 26 A). Pour la population de lymphocytes T CD4 sécrétant les deux cytokines testées, nous remarquons que les souris QM maintiennent un taux plus important de ces cellules par rapport aux autres souches de souris à l'étude (Figure 26 A).

Le pourcentage relatif de CTL sécrétant seulement le TNF- α est significativement plus élevé chez les souris QM que chez les groupes de souris C57Bl/6 et HC1 (Figure 26 C). Pour ce qui est des CTL sécrétant uniquement l'IFN- γ , aucune différence significative n'est observée entre les groupes de souris à l'étude (Figure 26 C). En ce qui concerne la population de CTL sécrétant les deux cytokines testées, nous pouvons observer un net avantage de maintien de ces cellules chez les souris QM par rapport aux autres souches de souris infectées (Figure 26 C).

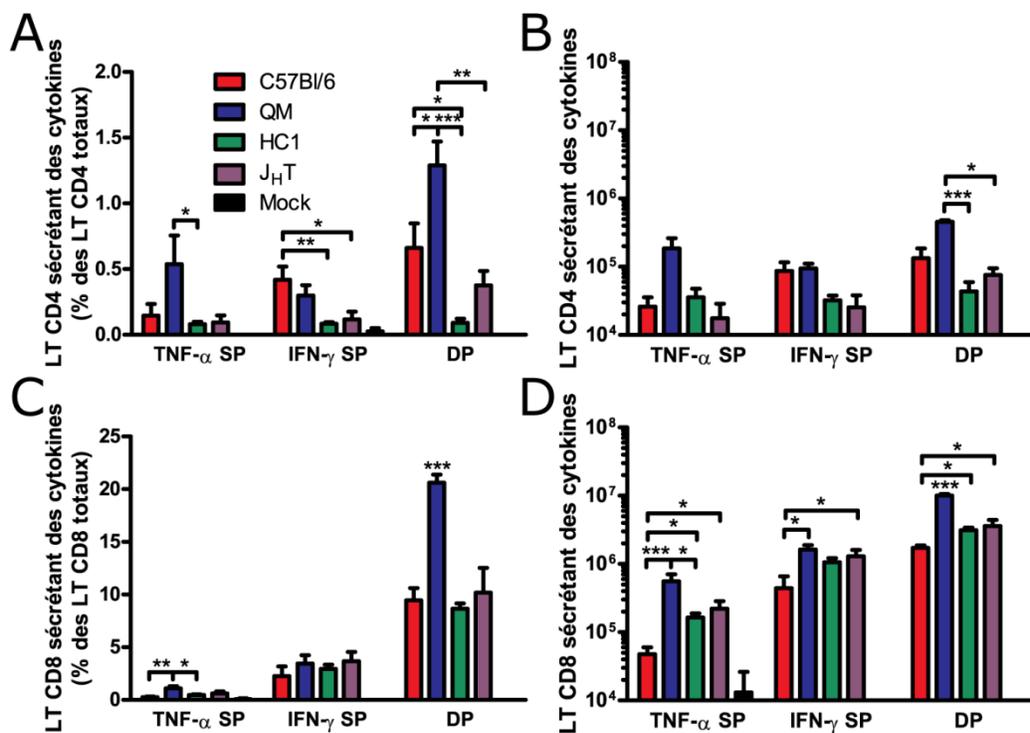


Figure 26 : Maintien de la capacité de production de cytokines par les lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques au LCMV-WE.

Cinquante jours après l'infection à faible dose de LCMV-WE, la capacité de sécrétion du TNF- α et de l'IFN- γ par les LT CD4 et CD8 spécifiques au LCMV a été évaluée à l'aide d'un marquage intracellulaire suivi d'une analyse en cytométrie en flux. Le pourcentage relatif (A et C) et le nombre absolu (B et D) de LT CD4 (A et B) et CD8 (C et D) sécrétant des cytokines a été évalué chez les souches de souris C57Bl/6, QM, HC1, J_HT et non infectées (Mock). Le pourcentage relatif représente le ratio de LT double ou triple positifs (CD4 ou CD8 et une ou les deux cytokines) dans les populations totales de LT CD4 et CD8 spléniques. Le nombre total est calculé par la multiplication du pourcentage total des populations par le décompte des splénocytes totaux. La moyenne de trois animaux par groupe est montrée. Représentatif de trois expériences. LT : lymphocytes T; Nb : nombre; SP : simple positives pour une des deux cytokines; DP : double positives pour les deux cytokines. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

L'analyse du nombre absolu de LT CD4 sécrétant les cytokines seules ou en combinaison suggère qu'au jour 50 après l'infection par le LCMV-WE, toutes les souches de souris à l'étude ont une capacité équivalente à maintenir des populations fonctionnelles de taille similaire. Le seul groupe échappant à cette observation est le groupe de souris QM, qui semble maintenir une plus grande population de cellules sécrétant les deux cytokines que les souches HC1 et J_HT (Figure 26 B). Le nombre absolu de CTL sécrétant, seules ou en combinaison, les deux cytokines testées après stimulation *ex vivo* indique plutôt une corrélation inverse entre le maintien des populations sécrétant des cytokines et la diversité du répertoire des LB. La seule exception à cette observation est le groupe de souris QM, qui a la capacité de maintenir une quantité plus élevée de cellules fonctionnelles par rapport aux autres groupes expérimentaux (Figure 26 D).

4.3. Élimination de l'infection par le LCMV-WE

Afin de comparer la cinétique d'élimination du LCMV-WE suite à une infection à faible dose (section 3.6 du chapitre 2), la présence du virus en périphérie a été évaluée dans le sang des souris infectées à différents temps post-infection (Tableau 2), grâce à un test de formation de foyers infectieux (section 2.4 du chapitre 2) (Battegay *et al.* 1991).

Tableau 2 : Détection du LCMV-WE dans le sang de souris infectées à faible dose

Souris		Sang							Rate	
		J0pi	J5pi	J7pi	J8pi	J13pi	J20pi	J28pi	J43pi	J8pi
C57Bl/6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	++
	2	-	-	+	-	-	-	-	-	++
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	++
QM	1	-	+	+++	-	-	-	-	-	++++
	2	-	+	++	-	-	-	-	-	+++
	3	-	-	++++	-	-	-	-	-	++++
HC1	1	-	-	-	++	-	-	-	-	++
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	++
J _H T	1	-	-	-	++	-	-	-	-	+++
	2	-	-	-	++	-	-	-	-	+++
	3	-	-	-	++	-	-	-	-	+
RAG-1 ^{-/-}	1	-	-	+++	ND	++++	++++	++++	++++	ND
	2	-	-	+++	ND	++++	++++	++++	++++	ND
	3	-	+	++++	ND	++++	++++	++++	++++	ND
Mock	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Puisqu'il est relativement difficile de déterminer avec précision le titre viral à partir du sang (difficile de récolter un volume standardisé lors de la prise de sang) et que le titrage de la rate a été fait à partir d'une suspension cellulaire préparée lors de l'analyse des réponses cellulaires spécifiques (poids de l'organe non disponible), une valeur arbitraire de titre viral (de – pour aucun virus détecté à ++++ pour la détection du virus jusqu'au 4^e puits de dilution (1:256)). ND : non déterminé.

L'analyse de la virémie indique que toutes les souches murines à l'étude ont la capacité d'éliminer l'infection à faible dose de LCMV-WE (Tableau 2). En effet, dès le jour 13 après l'infection, aucun virus n'est plus détecté dans le sang des souris infectées. Par opposition, dès le jour 7 après l'infection, une forte virémie est observée dans le groupe témoin RAG-1^{-/-} et des particules virales sont détectées chez ces animaux pour toute la durée de l'expérience. Des particules infectieuses ont été détectées dans le sang d'un seul individu C57Bl/6 au jour 7 après l'infection et aucun autre échantillon d'animaux de cette souche n'a permis la détection de virions infectieux. Chez les souris QM, le virus semble détecté plus rapidement que chez les

autres groupes expérimentaux et la virémie semble plus forte que celle observée chez les autres groupes de souris. La virémie chez les souris HC1 et J_HT semble plus faible que chez les souris C57Bl/6 et QM et semble décalée de 24h par rapport à ces dernières. Nous remarquons également que des particules virales répliquatives sont détectées dans la rate de toutes les souris infectées au jour 8 après l'infection et il semble qu'à ce moment de l'infection, les souris QM et J_HT aient un niveau de réplication virale plus élevé que les souris C57Bl/6 et HC1.

Chapitre 4

DISCUSSION

1. La diversité du répertoire des LB influence la capacité des AcNat à lier le LCMV-WE

Plusieurs études ont démontré que les AcNat, qui sont majoritairement d'isotype IgM, sont multi-spécifiques et peuvent lier des structures antigéniques conservées (Briles *et al.* 1981). Ces caractéristiques leur confèrent la capacité de lier une grande variété de microorganismes, et ce, dès leur entrée dans l'organisme (Ehrenstein & Notley 2010).

La capacité des AcNat de souris C57Bl/6 à lier différentes particules virales a déjà été démontrée, entre autres, pour les virus de l'influenza, de la vaccine, le VSV et le LCMV (Baumgarth *et al.* 2000; Ochsenbein, Fehr *et al.* 1999). Ces publications sont à la source de notre raisonnement et nous ont amené à évaluer l'importance de la diversité du répertoire des lymphocytes B dans la capacité des AcNat à lier des particules de LCMV. Pour répondre à ce questionnement, nous avons choisi d'utiliser les souris QM, possédant un segment V(D)J déjà réarrangé pour lier spécifiquement l'haptène NP (Cascalho *et al.* 1996); les souris HC1, pouvant recombiner des segments d'immunoglobulines humaines à partir d'un minilocus transgénique (Xu & Davis 2000); les souris C57Bl/6, comme souche témoin exprimant une diversité d'AcNat complète et les souris J_HT, ne possédant pas de lymphocytes B matures, dû à l'élimination de tous les segments J de la chaîne lourde de leurs immunoglobulines (Chen, Trounstein, Alt *et al.* 1993).

La capacité de liaison des IgM naturels de nos différentes souches de souris à lier des particules de LCMV-WE a été évaluée à l'aide d'un test ELISA dirigé contre des virions purifiés. Nous avons observé un lien direct entre la dilution des sérums et la diminution de la densité optique, et ce, pour toutes les souches de souris ayant des lymphocytes B fonctionnels (Figure 17). En accord avec notre hypothèse de départ, les AcNat de souris C57Bl/6 ont une capacité plus élevée que ceux des souris QM et HC1 à lier des virions purifiés de LCMV-WE. Bien que les souris QM aient une concentration d'IgM sérique près de trois fois inférieure à celle des souris HC1 (Figure 16 A), leur plus grande diversité de répertoire semble suffisante pour permettre une meilleure liaison au LCMV. Les courbes de liaison que nous avons obtenues pour les souris C57Bl/6 et J_HT concordent avec celles obtenues par le groupe du Dr Zinkernagel (Ochsenbein, Fehr *et al.* 1999) et, à notre connaissance, notre laboratoire est le premier à faire cette analyse avec les souris

QM et HC1. Cette expérience a par contre été faite à quelques reprises dans notre laboratoire et des résultats reproductibles ont été obtenus non seulement pour la liaison au LCMV-WE, mais également pour la liaison au VSV (Meunier 2007; Bigras 2008).

Nos résultats *in vitro* de liaison des IgM naturels au LCMV-WE portent à croire que les AcNat de souches de souris ayant des restrictions dans la diversité de leur répertoire B auraient également des différences de liaison au virus *in vivo*. Le groupe du Dr Zinkernagel a déjà démontré que la présence des AcNat favorise le recrutement du LCMV à la rate dans les premières heures après l'infection virale (Ochsenbein, Fehr *et al.* 1999). Partant de ce constat, nous avons choisi de reprendre cette expérience en y incluant les groupes de souris QM et HC1. Suite à l'infection de nos différentes souches de souris avec une haute dose de LCMV-WE, nous avons pu observer que la capacité de recrutement des particules de LCMV-WE à la rate dans les premières heures suivant l'infection semble être directement liée à la diversité du répertoire des lymphocytes B (Meunier 2007). Mis en commun, les résultats obtenus dans notre laboratoire suggèrent pour la première fois que la diversité du répertoire des lymphocytes B, et conséquemment de celui des AcNat, joue un rôle important dans la capacité de reconnaissance et de recrutement rapide de particules infectieuses trouvées dans la circulation sanguine.

1.1. Malgré un segment V(D)J déjà réarrangé, les souris QM peuvent ajouter à la diversité de leur répertoire de LB

Quatre-vingt pourcent des lymphocytes B de souris QM sont spécifiques à l'haptène NP et les 20 pourcent restants sont modifiés par un réarrangement secondaire des gènes d'Ig. L'augmentation de la diversité des lymphocytes B périphériques (Lopez-Macias *et al.* 1999; Pelanda *et al.* 1997; Papavasiliou *et al.* 1997) est associée à une modification des BCR et survient suite à la recombinaison du transgène à de nouveaux segments V_H ou V_HD se trouvant en amont de celui-ci (Cascalho *et al.* 1996; Cascalho *et al.* 1997). La publication décrivant pour la première fois la souche de souris QM mentionne que ce phénomène de diversification est particulièrement fréquent dans la sous-population de lymphocytes B-1a, puisque plus de 50 pourcent des lymphocytes B trouvés dans la cavité péritonéale et exprimant le CD5 ne lient plus l'haptène NP (Cascalho *et al.* 1997). Les cellules n'exprimant plus la séquence transgénique ont toutes subi des réarrangements secondaires et ces modifications semblent être favorisées lors

de réponses immunitaires spécifiques, puisque plus de 90 pourcent des IgG1 sécrétés par les souris QM ne sont plus spécifiques à l'haptène (Cascalho *et al.* 1997).

1.2. La diversité du répertoire B affecte le développement des lymphocytes B-1a

L'analyse de la fréquence et de la taille de la sous-population de lymphocytes B-1a péritonéaux et spléniques nous a permis de constater des différences majeures entre nos différentes souches de souris naïves (Figure 14 et Figure 15 A-B). D'abord, nos résultats démontrent dans la rate qu'une tendance de relation directe peut être observée entre la restriction de la taille de la population totale de lymphocytes B et celle de leur diversité de répertoire (Figure 15 B). Cette diminution du nombre total de lymphocytes B spléniques par rapport aux souris de type sauvage est d'ailleurs la raison pour laquelle les lymphocytes B-1a semblent surreprésentés chez les souris ayant des limitations de diversité de répertoire des lymphocytes B (Figure 15 A). Par contre, l'estimation de la taille de la population de lymphocytes B-1a n'indique aucune différence significative entre les souches de souris C57Bl/6, QM et HC1 (Figure 15 B). Dans la cavité péritonéale, nous observons une surreprésentation des LB-1a dans la population de lymphocytes B totaux des souris HC1, bien que leur nombre absolu soit équivalent à celui des souris C57Bl/6 (Figure 14). Chez les souris QM, nous observons plutôt un pourcentage et une quantité de lymphocytes B-1a nettement plus faible que chez les souris C57Bl/6 et HC1. De plus, bien que les souris QM aient un pourcentage de lymphocytes B-1b plus élevé que celui des autres groupes, le nombre absolu de ces cellules est statistiquement semblable (Figure 14). Les résultats de l'analyse de distribution des lymphocytes B péritonéaux présentée ici ne concordent pas avec ceux obtenus par Isabelle Meunier (Meunier 2007), puisqu'elle n'observait pas de différence de pourcentage de lymphocytes B-1a entre les souches de souris. La comparaison de nos résultats est difficile à accomplir puisque la stratégie de marquage et la correspondance des pourcentages étaient différentes de celles présentées ici.

Nous avons observé, tant dans la rate que dans la cavité péritonéale, que la taille de la population totale de lymphocytes B chez les souris QM et HC1 est plus restreinte que celle des souris C57Bl/6 (Figure 15 B et non montré). Nos résultats concordent avec des données publiées pour les souris QM homozygotes (Kanayama *et al.* 2005) et les souris $HC1^{+/0} IgH^{-/-} Ig\kappa^{-/-}$ (Xu & Davis 2000) et nous croyons que la diminution du nombre total de lymphocytes B totaux

chez ces souris peut, entre autres, être due à l'élimination de leur capacité à réarranger les gènes des chaînes légère κ endogènes. En effet, au moins deux groupes de recherche ont démontré que des souris $\kappa^{-/-}$ ont entre deux et trois fois moins de LB totaux que des souris $\kappa^{+/+}$ (Cascalho *et al.* 1996; Chen, Trounstein, Kurahara *et al.* 1993).

Une explication potentielle aux différences de représentation dans la population totale de lymphocytes B observées pour la sous-population de lymphocytes B-1a entre les souches de souris est que ces cellules sont sélectionnées durant le développement fœtal et que cette sélection favorise le développement de lymphocytes B autoréactifs (Hayakawa *et al.* 1999; Hayakawa *et al.* 2003; Ikeda *et al.* 2004; Wen *et al.* 2005). En effet, puisque les souris QM expriment un transgène réarrangé pour reconnaître spécifiquement l'haptène NP, les chances que des lymphocytes exprimant cette spécificité soient poly- ou auto-réactifs sont plutôt faibles, diminuant ainsi les chances de développement des lymphocytes B-1a. Les résultats que nous avons obtenu pour la quantification de cette sous-population dans la cavité péritonéale sont en accord avec cette hypothèse (Figure 14), mais ne correspondent pas aux observations originales du groupe du Dr Wabl. En effet, la publication originale décrivant les souris QM hémizygotés notent qu'elles ne démontrent pas de défauts majeurs, à l'exception que la population totale de lymphocytes B est plus restreinte chez certains individus (Cascalho *et al.* 1996). Ils démontrent également que la majorité des souris QM possèdent des cellules péritonéales exprimant le CD5 et le B220/CD45R à un pourcentage comparable à celui des souris de type sauvage (Cascalho *et al.* 1997). Malheureusement, les résultats que nous présentons ici peuvent difficilement être comparés à ceux d'autres groupes de recherche, puisque l'analyse détaillée de la représentation des sous-populations de lymphocytes B matures trouvées chez les souris QM homozygotes ne semble pas avoir été faite. Chez les souris HC1, les segments d'anticorps disponibles pour la recombinaison des gènes d'immunoglobulines proviennent de l'humain. L'introduction de segments d'Ig exogènes augmente la chance que les anticorps réarrangés par les HC1 reconnaissent des antigènes murins, augmentant subséquemment la probabilité que des lymphocytes B-1a soient présents dans leur organisme. Nos résultats indiquent que les souris HC1 ont effectivement une plus forte représentation de LB-1a dans la population totale de lymphocytes B que les souris

témoins C57Bl/6, et ce, tant dans la cavité péritonéale que dans la rate (Figure 14 B et Figure 15 A). Ces résultats concordent avec les observations originales du groupe du Dr Lonberg (Taylor *et al.* 1994), mais la comparaison de la totalité de nos résultats avec d'autres travaux est difficile puisqu'aucune étude n'a fait l'analyse exhaustive des sous-populations de lymphocytes B chez les souris HC1.

1.3. La diversité du répertoire des LB affecte la sécrétion d'AcNat

Puisque nous avons déterminé que nos souches de souris ont un nombre équivalent de lymphocytes B-1a spléniques (Figure 15 B) et que ces cellules sont considérées être la source de sécrétion des AcNat, nous nous attendions à obtenir un taux d'AcNat sérique comparable entre les groupes. Au contraire, nos résultats indiquent une différence importante entre les groupes de souris C57Bl/6 et QM (Figure 16 A). Pour la première fois dans notre laboratoire, des valeurs de quantification des AcNat sont obtenues pour les souris HC1 et nos données indiquent qu'elles ont un taux d'IgM sérique comparable à celui des souris C57Bl/6 (Figure 16 A). Aucune publication à l'heure actuelle ne fait mention des taux d'anticorps naturels sériques détectés chez les souris QM homozygotes ou chez les souris HC1. Par contre, les concentrations d'IgM naturels que nous présentons ici pour les souris C57Bl/6 et QM sont comparables à celles obtenues précédemment par Maude Bigras (Bigras 2008). Néanmoins, nos analyses indiquent que les souris C57Bl/6 auraient une concentration d'IgM sériques pré-immuns deux fois plus importante que les valeurs obtenues par Isabelle Meunier (Meunier 2007) et d'autres groupes de recherche (Cascalho *et al.* 1996; Klein-Schneegans *et al.* 1989; Macpherson *et al.* 2001). Ces différences proviennent possiblement de la stratégie de détection que nous avons choisie pour notre test ELISA. En effet, la capture et la détection par la chaîne lourde (non montré) donnait un signal réduit d'environ deux fois par rapport à la combinaison des détections par les chaînes légères κ et λ . Nous croyons que l'utilisation d'anticorps de capture et de détection polyclonaux ciblant des portions identiques de l'antigène pourrait causer un encombrement stérique et diminuer les valeurs de détection. L'addition des concentrations estimées avec des détections indépendantes par les deux chaînes légères murines est peu orthodoxe, mais cette stratégie de détection nous a permis d'estimer que les souris C57Bl/6 sécrètent près de 90% d'anticorps exprimant la chaîne légère κ et près de 10% la chaîne légère λ . Ces valeurs sont comparables au

ratio théorique d'expression de chacune des chaînes légères chez la souris (McGuire & Vitetta 1981) et c'est pour cette raison que nous avons justifié notre méthode de détection.

2. La diversité du répertoire des LB influence les réponses immunitaires CTL développées contre le LCMV-WE

Puisque la diversité du répertoire B, par la diversité des AcNat, semble pouvoir affecter la capacité de reconnaissance du LCMV-WE *in vitro*, nous avons évalué l'impact de la restriction de la diversité du répertoire B dans le développement de réponses cellulaires spécifiques à ce virus.

Les réponses humorales développées contre le LCMV-WE ont récemment été analysées dans des modèles murins similaires aux nôtres (Bergthaler *et al.* 2009). Les auteurs démontrent que l'élimination de l'infection avec une haute dose de ce virus est directement liée à la capacité de développement de réponses humorales spécifiques au LCMV-WE. Au même titre que les souris sans LB, les souris incapables d'effectuer des réarrangements secondaires ou de diversifier leur répertoire par l'hypermutation somatique n'éliminent pas l'infection. Ainsi, malgré les restrictions de répertoire primaire des souris QM, la diversification des BCR (assurée par les réarrangements secondaires et l'hypermutation somatique) permet le développement de réponses humorales protectrices contre le LCMV-WE (Lopez-Macias *et al.* 1999). Bien qu'aucune publication ne fasse mention de l'infection des souris HC1 avec le LCMV, il a été démontré que ces souris ont la capacité de développer des réponses humorales spécifiques. En effet, au moins deux études démontrent qu'à la suite d'immunisations répétées, les souris HC1 peuvent développer des réponses humorales de haute spécificité contre différents types d'antigènes (Xu & Davis 2000; Taylor *et al.* 1994).

Comme les souches de souris C57Bl/6, QM et HC1 ont toutes trois la capacité de développer des réponses humorales spécifiques, elles devraient toutes avoir la capacité d'éliminer l'infection avec une faible dose de LCMV-WE. Notre analyse du contrôle de la virémie indique qu'en comparaison aux témoins de persistance virale RAG-1^{-/-}, toutes les souches de souris à l'étude ont effectivement la capacité d'éliminer rapidement le LCMV (Tableau 2). Partant des observations du groupe du Dr Pinschewer (Bergthaler *et al.* 2009) et du fait que l'élimination du

LCMV est associée à de fortes réponses CTL, nous avons évalué l'impact d'une restriction de diversité de répertoire B dans le développement de réponses CTL spécifiques au LCMV.

Huit jours après l'infection avec une faible dose de LCMV-WE, nous avons observé chez toutes les souches de souris à l'étude une expansion globale des LT CD4 et CD8 (Figure 20 A). Tel qu'attendu, l'expansion globale des populations lymphocytaires est plus importante pour les lymphocytes T CD8 que pour les CD4 (Varga & Welsh 1998). La capacité proliférative des CTL semble de façon intéressante correspondre à la diversité de répertoire des lymphocytes B, tandis que celle des LT CD4 semble en être indépendante (Figure 20 A). Les différences d'expansion des populations totales de LT entre les souches de souris à l'étude ne semblent pas être dues à des nombre de départ plus faibles, puisque l'analyse des souches de souris naïves indique que la taille des populations de départ est équivalente (Figure 15 D). Ces résultats concordent d'ailleurs avec des données publiées par d'autres groupes de recherche (AbuAttieh *et al.* 2007; Chen, Trounstine, Alt *et al.* 1993).

Bien que le nombre de DCs trouvés dans la rate ne soit pas significativement différent entre les groupes de souris à l'étude (Figure 18), la capacité de présentation du peptide viral gp₃₃₋₄₁ par les cellules CD11c spléniques suit une tendance associée à la diversité du répertoire des LB (Figure 19). Cette tendance semble affecter l'activation des CTL spécifiques au LCMV, puisque nous observons des différences majeures d'activation globale des CTL 8 jours après l'infection. En effet, nos résultats démontrent une corrélation directe entre la diminution de l'expression du CD62L et la diversité du répertoire des LB (Figure 21 A).

L'analyse du pourcentage relatif et du nombre absolu de CTL spécifiques au LCMV indique qu'au jour 8 après l'infection, toutes des souches de souris infectées respectent une immunodominance décroissante, allant du tétramère gp₃₃₋₄₁ jusqu'au tétramère gp₂₇₆₋₂₈₆ (Figure 22). Ces observations concordent avec plusieurs publications (Lin *et al.* 2000; Raue & Slifka 2009; Selin *et al.* 1999) et suggèrent que le ratio de fréquence des précurseurs CTL naïfs pour chacune de ces spécificités est similaire entre les groupes de souris à l'étude (Obar *et al.* 2008). Par opposition, la comparaison des groupes de souris entre eux indique que la diversité du répertoire des LB affecte la fréquence et le nombre d'effecteurs spécifiques au LCMV, et ce, pour les trois tétramères testés (Figure 22 A-C). Bien que les pourcentages et le nombre des CTL

spécifiques au LCMV soient significativement différents entre les groupes de souris, toutes les cellules ayant lié les tétramères avaient diminué l'expression du CD62L à leur surface, suggérant indiquant qu'elles ont bien été activées par la présence du virus et non par des mécanismes non-spécifiques (résultat non montré). La comparaison du pourcentage et du nombre de CTL spécifiques au virus maintenus 50 jours après l'infection indique qu'à l'exception des souris QM, toutes les souches de souris infectées maintiennent un nombre équivalent de lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV (Figure 25). Ces résultats suggèrent que l'établissement des réponses long terme ne dépend pas de la diversité du répertoire B. De plus, tous les CTL ayant lié les tétramères 50 jours après l'infection expriment fortement le CD44 à leur surface, suggérant que ces cellules sont bel et bien associées aux réponses mémoires (résultat non montré).

La fonctionnalité des réponses spécifiques semble également être affectée par la diversité du répertoire des LB au jour 8 après l'infection, puisque nous observons des différences majeures dans la capacité de sécrétion de TNF- α et d'IFN- γ , de même que dans la capacité de lyse spécifique de cellules cible (Figure 23). Une tendance favorisant le développement de réponses fonctionnelles chez les souches murines possédant une diversité de répertoire B plus large peut être perçue dans l'analyse de la capacité des LT CD4 à sécréter des cytokines suite à leur stimulation *ex vivo* (Figure 23 A-B). Cinquante jours après l'infection, nous observons un ajustement du niveau des réponses T CD4 entre les souris C57Bl/6, HC1 et J_HT, bien que les pourcentages et nombres absolus soient très faibles (Figure 26 A-B). La capacité de sécrétion de ces mêmes cytokines par les CTL après stimulation *ex vivo* démontre au jour 8 après l'infection que les souris QM ont un pourcentage plus élevé de cellules sécrétant le TNF- α seul et les deux cytokines simultanément que la plupart des autres souches de souris à l'étude (Figure 23 C). La comparaison du nombre absolu de cellules sécrétant une seule ou les deux cytokines simultanément démontre plutôt une corrélation directe entre la force des réponses fonctionnelles et la diversité du répertoire des LB (Figure 23 D). Le maintien à long terme de CTL sécrétant ces cytokines indique, comme pour l'analyse des tétramères, que les souris C57Bl/6, HC1 et J_HT ajustent le pourcentage de cellules à des niveaux comparables (Figure 26 C). Par contre, l'analyse des nombres absolus de cellules sécrétant ces cytokines indique

étonnamment, à l'exception des souris QM, une corrélation inverse entre la capacité de sécrétion de cytokines et la diversité du répertoire B (Figure 26 D). Finalement, l'analyse de la capacité de lyse *ex vivo* de cellules cible par les CTL corrobore le nombre estimé de CTL fonctionnels spécifiques au peptide gp₃₃₋₄₁ (Figure 22, Figure 23 et Figure 24). En effet, nous observons que, pour un nombre équivalent de cellules par puits, la capacité de lyse des cellules cible par les CTL suit une tendance de diminution en fonction de la restriction de la diversité du répertoire des LB (Figure 24 A).

Très peu de données existent quant à l'utilisation des souris HC1 dans l'analyse de réponses immunitaires adaptatives, puisque leur conception visait plutôt la production d'anticorps mono- et polyclonaux humains chez la souris (Dessain *et al.* 2008; Jakobovits *et al.* 2007; Lonberg 2005). L'utilisation des souris QM visait plutôt l'analyse des mécanismes de développement des réponses humorales adaptatives (Lopez-Macias *et al.* 1999; Bergthaler *et al.* 2009). Dans les deux cas, très rares (voire aucune) sont les études ayant eu pour objet l'analyse des réponses CTL (AbuAttieh *et al.* 2007). Chez les souris ayant le fond génétique C57Bl/6, les réponses immunitaires développées contre le LCMV sont principalement dirigées contre des épitopes viraux dérivant des protéines virales GP1, GP2 et NP (Borrow & Oldstone 1997). D'ailleurs, il a été démontré dans une étude comparant les réponses humorales développées chez les souris QM et C57Bl/6 que le développement des réponses spécifiques à la nucléoprotéine du LCMV est plus efficace chez les souris de type sauvage, mais que les réponses neutralisantes contre le virus sont développées plus rapidement chez les souris QM (Lopez-Macias *et al.* 1999). Ces résultats suggèrent que les souris QM ont une plus grande propension à développer des réponses contre la GP par rapport aux souris sauvages. Nous observons effectivement, aux jours 8 et 50 après l'infection, des pourcentages très élevés de CTL spécifiques au peptide gp₃₃₋₄₁ chez les souris QM par rapport aux autres groupes (Figure 22 A-B et Figure 25 A). Néanmoins, 8 jours après l'infection, on détecte chez ces souris un nombre absolu de cellules moins important que chez les souris C57Bl/6 (Figure 22 C). Par contre, à des temps plus tardifs, on observe chez les souris QM le maintien d'un nombre nettement plus important de lymphocytes T CD8 spécifiques aux tétramères gp₃₃₋₄₁ et gp₂₇₆₋₂₈₆ que chez les autres souches de souris à l'étude (Figure 25 B). Des résultats identiques sont observés lors de

l'analyse de la capacité des CTL spécifiques au gp₃₃₋₄₁ à sécréter conjointement le TNF- α et l'IFN- γ , suggérant que ces cellules sont également fonctionnelles (Figure 23 C-D et Figure 26 C-D). Ces phénomènes sont possiblement liés au fait que ces souris voient, au jour 8 après l'infection, leur population totale de LT CD4 amplifiée de façon beaucoup plus importante que les autres souches de souris (Figure 20 A) et que cette imposante population cellulaire est maintenue jusqu'à 50 jours après l'infection (résultat non montré). Malheureusement, les raisons expliquant ce phénomène nous échappent, mais nous observons au jour 8 après l'infection, que les souris C57Bl/6 ont des réponses T CD4 plus fortes que celles des souris QM (Figure 23 A-B) et que l'inverse est observé au jour 50 après l'infection (Figure 26 A-B).

2.1. La diversité du répertoire des LB affecte la diversité des LT spléniques

Il a déjà été démontré que l'absence de lymphocytes B est associée au développement de réponses CTL contre le LCMV plus faibles (Homann *et al.* 1998). En effet, le groupe du Dr Zinkernagel a démontré que l'altération de l'architecture splénique de souris sans lymphocytes B est en partie la cause des limitations de développement des réponses immunitaires cellulaires (Muller *et al.* 2002). Plus récemment, le groupe de Dre Cascalho a démontré que la diminution de la diversité du répertoire B affecte à la baisse celui des lymphocytes T (Keshavarzi *et al.* 2003; Joao *et al.* 2004). Grâce à l'évaluation de la diversité des segments V β utilisés par les thymocytes de souris QM et J_HT, les auteurs démontrent que ces souris ont environ 0.01 % et 0.0005 %, respectivement, de la diversité du répertoire des LT de souris C57Bl/6. Malheureusement, les mécanismes permettant cette influence mutuelle n'ont pas été éclaircis, mais les auteurs proposent que cette interaction soit due à la capacité des lymphocytes B à présenter des antigènes (Joao *et al.* 2004). Bien que la diversité du répertoire des LT soit affectée par celle des LB, l'immunité cellulaire développée chez les souris sans lymphocytes B ne semble pas être drastiquement diminuée (AbuAttieh *et al.* 2007). En effet, malgré que le répertoire des TCR soit réduit d'environ 90 % et 99 % chez les souris QM et J_HT respectivement, des réponses CTL protectrices sont développées par les deux souches de souris contre *Pneumocystis murina* (AbuAttieh *et al.* 2007). Dans la même étude, les auteurs démontrent que la contraction de la diversité du répertoire des LT est balancée, c'est à dire que des précurseurs spécifiques pour un antigène donné peuvent être trouvés à des ratios similaires de ceux

observés chez des souris de type sauvage, mais à des nombre de départ plus faibles que chez des souris C57Bl/6.

Les groupes des Dr Jenkins et Lefrançois ont mis au point d'élégantes techniques d'isolement de LT CD4 et CD8 naïfs spécifique à un antigène (Moon *et al.* 2007; Obar *et al.* 2008). Leur méthode est basée sur l'utilisation de deux préparations du même tétramère, mais couplées à deux fluorochromes différents. Cette stratégie augmente la propreté du marquage, puisque seules les cellules liant fortement les deux tétramères sont considérées, éliminant le bruit de fond et les clones liant faiblement le peptide d'intérêt. Puisque les différences d'expansion des CTL spécifiques au LCMV pourraient être dues à des nombres de départ plus faibles chez les souris ayant une diversité de répertoire de LB limitée avant l'infection, il pourrait être pertinent d'évaluer ces nombres chez les souches de souris à l'étude.

3. La présence d'anticorps naturels influence l'ampleur des réponses cellulaires spécifiques au LCMV-WE

Le groupe du Dr Pinschewer a récemment démontré que le transfert passif d'anticorps neutralisant le LCMV (KL25) à des souris incapables d'effectuer des réarrangements secondaires sur les Ig rétablit la capacité de lyser spécifiquement des cibles cellulaires *in vivo* (Bergthaler *et al.* 2009). Ces résultats suggèrent que ce sont les anticorps spécifiques au virus, et non les cellules les sécrétant, qui permettraient la résolution de l'infection par le LCMV-WE.

Nous pouvons affirmer, grâce aux analyses faites suite au transfert passif de sérum de souris C57Bl/6 naïves à des souris J_HT, que les anticorps naturels jouent également un rôle dans le développement de réponses immunitaires cellulaires spécifiques au LCMV. D'abord, le transfert passif de 2 mL de sérum de souris de type sauvage restaure temporairement la concentration d'IgM sériques à un niveau similaire à celui des souris donneuses (Figure 16 B). Ceci suggère que les souris J_HT+S ont, au moment de l'infection, une capacité équivalente à celle des souris C57Bl/6 à former des complexes-immuns avec les particules du LCMV. L'analyse des réponses immunitaires développées par les souris J_HT+S, au jour 8 après l'infection, démontre une amélioration notable des réponses cellulaires de ces souris par rapport aux souris témoins J_HT. Le niveau d'expansion global des LT CD4 et CD8 ne semble pas être amélioré par le transfert

passif de sérum (Figure 20 B), mais la diminution de l'expression du CD62L à la surface des CTL indique en revanche une nette augmentation du niveau global d'activation des lymphocytes T CD8 des souris J_HT+S par rapport aux souris J_HT (Figure 21 B). Le marquage des CTL avec les tétramères indique que les cellules spécifiques au LCMV sont activées, puisque les cellules liant les tétramères expriment peu le CD62L à leur surface (résultat non montré). Une immunodominance décroissante allant du tétramère gp₃₃₋₄₁ jusqu'au tétramère gp₂₇₆₋₂₈₆ est également observée pour tous les groupes, et ce, tant en pourcentage relatif qu'en nombre absolu (Figure 22). Nous observons de plus que les souris J_HT+S obtiennent des pourcentages de CTL spécifiques au tétramères gp₃₃₋₄₁ et np₃₉₆₋₄₀₅ similaires à ceux des souris C57Bl/6 et ont tendance à être plus élevés que ceux des souris J_HT (Figure 22 D). L'estimation du nombre absolu de ces cellules indique que les souris J_HT+S amplifient plus efficacement les CTL spécifiques au LCMV que le groupe témoin J_HT, mais moins que les souris C57Bl/6. Les différences entre les groupes J_HT+S et C57Bl/6 est par contre moins élevée pour les tétramères gp₃₃₋₄₁ et np₃₉₆₋₄₀₅, qu'entre les deux groupes témoins (Figure 22 E).

Comme le nombre de LT CD4 ou CD8 reste inchangé entre les groupes J_HT et J_HT+S, nous croyons qu'un transfert unique de sérum pré-immun aux souris J_HT n'est pas suffisant pour influencer l'expansion globale de ces cellules (Figure 20 B). Néanmoins, le transfert passif de sérum semble favoriser le développement des réponses CTL spécifiques au LCMV. Nous observons dans la plupart des cas une augmentation, chez les souris J_HT+S par rapport aux souris J_HT, du pourcentage et de la quantité de CTL liant les tétramères (Figure 22), de même qu'une augmentation de l'activité antivirale des CTL spécifiques au LCMV, grâce aux tests de sécrétion de cytokines (Figure 23 E et F) et de lyse spécifique de cellules cibles (Figure 24). Bien que nous observions que le transfert passif d'une quantité d'IgM pré-immuns équivalente à celle des souris sauvages restaure le pourcentage d'effecteurs fonctionnels spécifiques au LCMV au niveau des souris C57Bl/6, leur nombre absolu n'est pas complètement récapitulé (Figure 22, Figure 23 et Figure 24). Il est possible que ces observations soient dues au fait que les souris C57Bl/6 peuvent augmenter la reconnaissance des complexes-immuns par l'entremise des lymphocytes B ZM, ce dont les souris J_HT sont privées. Une autre possibilité

serait que la présence d'une ou plusieurs sous-populations de lymphocytes B soit requise pour l'expansion efficace des effecteurs spécifiques au virus (AbuAttieh *et al.* 2007).

4. Importance des LT CD4 dans l'activation des réponses CTL aiguës

L'importance des réponses LT CD4 pour le développement et le maintien des réponses CTL mémoires est connue depuis plusieurs années (Bevan 2004). Par contre leur importance pour le développement des réponses CTL primaires est moins bien définie, malgré que quelques études de transfert adoptif aient suggéré que les LT CD4 ne soient pas essentiels au développement des réponses CTL aiguës (Sun *et al.* 2004).

Nos résultats suggèrent plutôt que les réponses T CD4 sont importantes pour l'expansion et la fonctionnalité des réponses CTL développées par les souris J_HT+S. Cet effet semble en partie être attribuable aux AcNat, puisque le transfert de sérum aux souris J_HT favorise la sécrétion de cytokines par les LT CD4. Seulement un léger retard de fonctionnalité, soit un plus faible pourcentage de LT CD4 sécrétant simultanément le TNF- α et l'IFN- γ (Harty & Badovinac 2008), peut être observé pour le groupe J_HT+S par rapport au groupe C57Bl/6 (Figure 23 E). Le nombre total de LT CD4 sécrétant une seule des deux cytokines testées s'équivaut également (entre les groupes J_HT+S et C57Bl/6) suggérant un rôle des AcNat dans l'acquisition de cette fonction (Figure 23 F). L'importance de la fonctionnalité des LT CD4 pour l'activation efficace des CTL peut être appréciée chez les souris J_HT+S, puisque la capacité de ces dernières à sécréter des cytokines (Figure 23 G et H) et à lyser des cellules cible *ex vivo* (Figure 24 B) semble associée à la sécrétion de cytokines par les LT CD4. Des résultats similaires sont également observés chez les souris QM (Figure 23 A-D et Figure 24 A) et pourraient permettre de comprendre, du moins en partie, les raisons pour lesquelles les réponses CTL de ces souris sont si fortes.

5. Importance des LB innés dans le développement de réponses cellulaires antivirales

Les différentes sous-populations de lymphocytes B assurent des fonctions diversifiées et il semble qu'une division des tâches soit faite entre elles (Allman & Pillai 2008; Alugupalli & Gerstein 2005). Les lymphocytes B-1a sécrètent sans stimulation antigénique les anticorps naturels, assurant une liaison rapide aux microorganismes dès leur entrée dans l'organisme.

Suite à la formation de complexes-immuns entre les AcNat et des particules virales, les lymphocytes B-1b et ZM assurent une réponse humorale innée spécifique rapide contre des antigènes T-indépendants, tandis que les lymphocytes B FO préparent une réponse spécifique contre des antigènes T-dépendants. Cette division des tâches assure dans bien des cas l'établissement d'une protection stérilisante contre une grande variété de pathogènes, et ce, à travers le temps (Alugupalli 2008). Cependant, l'association de fonctions précises aux différentes sous-populations de LB semble être moins rigide que les descriptions données dans le passé. Le fait que certains effecteurs humoraux innés puissent remplir des tâches normalement associées aux effecteurs humoraux adaptatifs (Baumgarth *et al.* 2008; Haas *et al.* 2005; Hsu *et al.* 2006; Martin & Kearney 2001) rend plus floue la séparation des sous-populations de lymphocytes B en deux catégories (inné et adaptatif). Afin d'évaluer la contribution des différentes sous-populations de lymphocytes B dans la protection de l'organisme contre différentes infections, il devient impératif de considérer les réponses humorales en tant que système complexe, et non comme des événements indépendants.

Nos résultats décrivant la distribution et la taille des sous-populations de lymphocytes B sont difficilement intégrables à la majorité des autres analyses faites dans le cadre de ce mémoire, mais ouvrent par contre une très grande porte expérimentale. Suivant la logique que les LB innés puissent rapidement être activés et dirigés vers les organes lymphoïdes secondaires drainant un site d'insulte (Baumgarth *et al.* 2008; Fagarasan & Honjo 2004; Yang *et al.* 2007), il serait très intéressant de disséquer la cinétique d'initiation des réponses humorales innées suite à l'infection par le LCMV. Cette analyse permettrait d'évaluer si une variation dans la taille de ces populations influence le développement de réponses immunitaires spécifiques, s'il existe une distribution des tâches entre les sous-populations de lymphocytes B innés lors d'une infection par ce virus (Yang *et al.* 2007) et d'évaluer si certaines d'entre elles contribuent à la sécrétion de cytokines immunomodulatrices dans des étapes très précoces de l'infection par ce virus.

L'analyse des populations de lymphocytes B spléniques est généralement compliquée par le fait que les marqueurs phénotypiques diffèrent en fonction du microenvironnement dans lequel ils se trouvent. L'identification absolue d'une population cellulaire est donc difficile à garantir

(Hardy 2006) et c'est pour cette raison que nous n'avons présenté que le pourcentage relatif et la quantité des lymphocytes B-1a et des lymphocytes B totaux spléniques. En optant pour des stratégies de marquage différentes de celle utilisée ici (par exemple l'analyse de plus de quatre paramètres), il serait possible d'approfondir l'analyse phénotypique des sous-populations de lymphocytes B trouvées dans nos différentes souches de souris et d'évaluer leur importance dans la résolution d'une infection par le LCMV (Baumgarth 2011; Notley *et al.* 2010).

Comme certains des résultats que nous avons obtenu avec les souris QM naïves ne concordent pas avec les publications originales (Figure 14 et Figure 16), nous croyons que des différences de génotype (hémizygotés versus homozygotés) soient partiellement responsables de ces différences (Cascalho *et al.* 1996; Cascalho *et al.* 1997). Une autre possibilité serait qu'une dérive génétique ait affecté les souris QM depuis leur génération, puisque, malgré que le taux d'anticorps pré-immuns n'ait pas été déterminé dans cette étude, Kanayama et collègues ont récemment observé que les souris QM ont une plus grande représentation de lymphocytes B ZM, ce dont la publication originale ne fait pas mention (Cascalho *et al.* 1996; Kanayama *et al.* 2005). L'étude du groupe du Dr Ohmori compare, à notre connaissance, pour la première fois des souris QM héli- et homozygotés et démontre que ces souris semblent favoriser le développement des lymphocytes B ZM, comparativement aux souris C57Bl/6 (Kanayama *et al.* 2005). Les auteurs rapportent que ces souris homozygotés sont plus sensibles à la signalisation par le BCR et que ce phénomène serait dû à une augmentation de sa densité d'expression, causant possiblement l'augmentation de la taille de la population de lymphocytes B ZM (Martin & Kearney 2000). Cette fréquence plus importante de lymphocytes B ZM chez les souris QM pourrait être liée à la faible concentration d'IgM sérique (Baker & Ehrenstein 2002). L'augmentation de la fréquence de lymphocytes B ZM pourrait surtout influencer le transport des complexes-immuns jusqu'aux DCs FO et ainsi avoir une influence positive sur le développement des réponses immunitaires adaptatives dans cette souche de souris. D'autres études ont récemment démontré que les lymphocytes B ZM ont la capacité de proliférer, se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps et migrer hors de la ZM suite à la stimulation de leurs PRR (Gururajan *et al.* 2007; Genestier *et al.* 2007; Rubtsov *et al.* 2008). Ces données ajoutent à l'importance de ces lymphocytes B dans la protection précoce de l'organisme

contre des infections véhiculées par le sang et ajoutent à la pertinence d'étudier le comportement de ces cellules lors des étapes précoces de l'infection par le LCMV. Dans un autre ordre d'idées, il a été noté que les souris QM favorisent l'expression des IgG2a comparativement aux souris sauvages (Cascalho *et al.* 1997). Comme cet isotype d'anticorps est associé aux réponses immunitaires adaptatives T_H1, il est suggéré que ces souris aient un biais pour le développement de ce type de réponses immunitaires (Lopez-Macias *et al.* 1999). La combinaison de toutes ces observations pourrait expliquer pourquoi, malgré une diversité de répertoire de lymphocytes B restreinte, les souris QM développent des réponses cellulaires contre le LCMV presque aussi fortes que celles des souris C57Bl/6 (Figure 21, Figure 22, Figure 23 et Figure 24).

Il a été démontré que des souris incapables de sécréter des IgM voient la fréquence de leurs lymphocytes B-1 péritonéaux augmentée d'environ trois fois comparativement à des souris témoin (Baker & Ehrenstein 2002; Boes *et al.* 1998). Un phénomène comparable semble être observé chez les souris HC1, puisque la représentation de ces cellules est beaucoup plus importante que chez les souris de type sauvage. Ceci est observé tant dans la rate (Figure 15) que dans la cavité péritonéale (Figure 14), sans pour autant que les souris HC1 n'aient un taux d'AcNat sérique plus élevé (Figure 16). Comme la chaîne lourde des anticorps générée par les souris HC1 est d'origine humaine, il est possible que les récepteurs des Ig murins ne puissent lier ces anticorps et qu'un phénomène de compensation associé à l'absence de détection des IgM survienne chez ces souris (Ehrenstein & Notley 2010).

Une des particularités ayant été associée aux lymphocytes B-1 est leur capacité de supprimer les réponses inflammatoires qui pourraient être déclenchées lors du maintien de l'homéostasie tissulaire (Shaw *et al.* 2003). Cette fonction est possiblement atteinte par la sécrétion constitutive d'IL-10 (O'Garra *et al.* 1992) et en combinaison avec la sécrétion d'IgM et d'IgA naturels, les lymphocytes B-1 pourraient limiter les risques de dommages tissulaires causés lors de réponses immunitaires (Baumgarth 2011; Bouaziz *et al.* 2008). Une sous-population récemment identifiée et n'ayant pas été mentionnée jusqu'à présent dans ce mémoire, les lymphocytes B régulateurs ou B10, serait responsable de la majorité de l'IL-10 sécrétée par les lymphocytes B-1 (Mizoguchi *et al.* 2002; Yanaba *et al.* 2008). Leur phénotype est intermédiaire

à celui des lymphocytes B-1a et ZM, mais leur relation avec ces deux types cellulaires, leur ontogénie et leurs rôles sont actuellement sous investigation (Yanaba *et al.* 2009; Yang *et al.* 2010). Le comportement de cette sous-population de LB lors d'étapes précoces de l'infection par le LCMV pourrait également être intéressant à décortiquer. Puisque les lymphocytes B10 partagent avec les LB-1a l'expression du marqueur CD5, il est probable que notre analyse de la sous-population de LB-1a ait inclus les lymphocytes B10. Comme les souris HC1 ont une imposante représentation de LB CD5 positifs, il serait intéressant d'évaluer si une partie de ces cellules correspondent en réalité à des lymphocytes B10. Si tel est le cas, il serait pertinent d'évaluer s'ils peuvent, chez ces souris, influencer à la baisse le développement des réponses immunitaires cellulaires spécifiques au LCMV.

5.1. Une architecture splénique intacte facilite le développement des réponses immunitaires contre le LCMV

Pour se répliquer efficacement, le LCMV-WE requiert une architecture splénique intacte (Odermatt *et al.* 1991). Le groupe du Dr Zinkernagel a d'ailleurs démontré que lorsqu'inoculé à faible dose, ce virus dépend d'une zone marginale intacte pour assurer une réplication virale rapide (Muller *et al.* 2002). Cette réplication, permettant une plus grande présence antigénique dans la rate, est essentielle au développement de réponses immunitaires cellulaires efficaces (Ochsenbein, Fehr *et al.* 1999; Zinkernagel *et al.* 1997).

Les souris J_HT ne possédant pas de lymphocytes B, n'ont donc pas de ZM et devraient limiter la réplication virale dans la rate. Nos résultats démontrent qu'au jour 8 après l'infection, ces souris semblent avoir une présence virale dans la rate plus élevée que les souris C57Bl/6 et HC1 (Tableau 2). Comme le sommet de virémie des souris J_HT et HC1 semble survenir 24h après celui des souris C57Bl/6 et QM, il est possible que les réponses CTL soient décalées dans le temps. Le suivi des réponses CTL pourrait être fait à partir du sang afin de déterminer les courbes de développement et de contraction des réponses CTL de chacune des souches de souris utilisées. Les souris QM, quant à elles, permettent une réplication virale à la rate plus élevée que les souris J_HT (Tableau 2) et développent, en pourcentage, des réponses immunitaires CTL plus fortes que celles des autres groupes de souris à l'étude (Figure 22 B et Figure 23 C). De plus, tel que mentionné plus haut, les souris QM semblent avoir un biais pour

le maintien de ces réponses (Figure 25 et Figure 26). Puisque les souris QM ont une représentation plus importante de lymphocytes B ZM que les autres souches de souris, il est possible qu'une meilleure capture des complexes-immuns soit assurée par ces cellules, facilitant ainsi l'infection des macrophages avoisinants, l'amplification des antigènes viraux et l'activation des réponses immunitaires cellulaires.

Chapitre 5

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Afin d'évaluer l'importance du répertoire des lymphocytes B dans la reconnaissance rapide des particules de LCMV-WE, nous avons analysé la capacité des IgM pré-immuns des souches de souris QM, HC1, C57Bl/6 et J_HT à lier ce virus. Nos résultats indiquent qu'une diversité de répertoire B plus large, de par l'augmentation de la diversité des AcNat, accroît *in vitro* la capacité de liaison des AcNat au LCMV-WE. *In vivo*, cette augmentation de liaison au virus semble se traduire par un meilleur recrutement des particules infectieuses à la rate (Meunier 2007).

Dans l'objectif d'évaluer l'importance du répertoire des lymphocytes B dans le développement de réponses cellulaires spécifiques au LCMV-WE, nous avons analysé les réponses antivirales cellulaires spécifiques développées 8 jours après l'infection. Nos résultats démontrent une corrélation directe entre la diversité du répertoire des lymphocytes B et l'intensité des réponses immunitaires spécifiques et fonctionnelles développées contre le LCMV-WE.

L'importance directe des AcNat dans le développement de réponses cellulaires spécifiques au LCMV-WE a été évaluée par le transfert passif de sérum de souris C57Bl/6 naïves à des souris J_HT. Nos résultats démontrent que la présence d'AcNat, sans les lymphocytes B, est suffisante pour accroître le pourcentage des lymphocytes T effecteurs spécifiques au virus à des niveaux comparables aux souris témoins. De plus, la seule présence d'AcNat au moment de l'infection augmente la capacité de sécrétion de cytokines antivirales et la capacité de lyser des cellules cible *ex vivo* à des niveaux comparables à ceux obtenus par les souris témoins C57Bl/6.

Mis en commun, nos résultats démontrent que les AcNat peuvent non seulement favoriser la détection rapide et le recrutement du LCMV-WE à la rate, mais favorisent l'induction de réponses cellulaires antivirales. Nos résultats suggèrent également qu'une corrélation directe existe entre la diversité du répertoire des lymphocytes B et l'intensité des réponses cellulaires antivirales développées contre le LCMV-WE.

Nos résultats suggèrent pour la première fois que la diversité du répertoire des LB, et conséquemment des AcNat, peut jouer un rôle important dans la reconnaissance précoce de particules infectieuses ayant pénétré la circulation sanguine. Cette reconnaissance accrue

semble d'ailleurs être impliquée dans le développement de fortes réponses cellulaires spécifiques au LCMV-WE.

Il serait maintenant intéressant d'évaluer si seule la diversité des AcNat est suffisante pour augmenter les réponses CTL. Afin de répondre à cette question, nous pourrions faire le transfert passif de sérum pré-immun de souris QM et HC1 à des souris J_HT. Cette analyse permettrait d'évaluer l'importance de la concentration sérique et de la diversité des AcNat dans la protection précoce contre l'infection par le LCMV.

L'importance des lymphocytes B innés dans la protection rapide contre l'infection par le LCMV n'a pas été élucidée. Il est possible qu'une synergie entre les AcNat, les complexe-immuns, les lymphocytes B ZM et les CPA soit responsable de l'activation des réponses immunitaires cellulaires antivirales. *In vitro*, la diversité de répertoire des AcNat semble indéniablement augmenter la détection de particules virales. Par contre, la transposition de ces résultats *in vivo* est plus complexe, considérant les diverses interactions cellulaires requises pour l'activation de réponses immunitaires adaptatives. Une analyse plus poussée du rôle de différentes sous-populations de lymphocytes B dans l'initiation des réponses immunitaires cellulaires contre le LCMV pourrait nous permettre de mieux comprendre le rôle du répertoire des lymphocytes B dans l'initiation de ces réponses. Le recours à l'imagerie intra-vitale nous permettrait de visualiser les interactions survenant entre les lymphocytes B ZM et les DCs FO suite à l'infection par le LCMV (Cinamon *et al.* 2008). L'utilisation de souris sur-exprimant ou sous-exprimant le CD19 (Haas *et al.* 2005) nous permettrait d'étudier respectivement l'importance des LB-1a et LB-1b lors des étapes précoces de l'infection par le LCMV. De plus, la conception de souris chimériques sécrétant des Ig d'allotypes spécifiques à une sous-populations de lymphocytes B (Choi & Baumgarth 2008) permettrait d'évaluer la contribution de différents lymphocytes B dans le développement de réponses humorales innées contre le LCMV. Malheureusement, ces deux modèles ne récapitulent pas complètement les réponses immunitaires endogènes, puisque ces souris sont affectées par des limitations immunitaires. Autrement, il pourrait être possible d'évaluer l'importance des sous-populations de lymphocytes B endogènes de nos différentes souches de souris dans la résolution d'une infection par le LCMV, en optant pour

des stratégies de marquage ciblant huit marqueurs de surface (Baumgarth 2011; Notley *et al.* 2010).

Afin de mieux comprendre la différence d'intensité des réponses cellulaires obtenues entre les groupes de souris au jour 8 après l'infection, il serait pertinent d'étudier les étapes précoces d'activation des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV. D'abord, il serait intéressant d'analyser par cytométrie en flux les modifications phénotypiques de sous-populations de cellules dendritiques spléniques suite à l'infection des différentes souches de souris (Lanzavecchia & Sallusto 2000, 2002). Ensuite, la cinétique d'activation et de prolifération des lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV devrait être analysée afin d'évaluer si un retard de ces réponses peut être observé et associé à la restriction de la diversité du répertoire des LB. Nous pourrions combiner à cette analyse, celle du développement de CTL précurseur des réponses mémoires spécifiques au LCMV. En effet, dès les premiers jours suivant l'infection, des modifications phénotypiques des CTL permettent de distinguer les cellules effectrices précoces, les cellules effectrices de courte durée et les précurseurs de la mémoire effectrice (Sarkar *et al.* 2008). La quantification des précurseurs naïfs et l'analyse des réponses endogènes pourraient être accomplies grâce au marquage de lymphocytes T CD8 avec deux tétramères identiques, mais couplés à des fluorochromes différents (Obar *et al.* 2008). Cette méthode permet l'analyse d'un très petit nombre de cellules spécifiques pour un peptide donné et la combinaison des deux signaux assure l'identification de cellules liant fortement les tétramères. Dans l'éventualité où la fréquence des précurseurs naïfs soit différente entre les groupes de souris, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 de souris P14 marqués au CFSE permettrait d'assurer un nombre équivalent de cellules spécifiques au gp₃₃₋₄₁ entre les souches de souris avant l'infection et d'analyser les étapes précoces d'activation et de prolifération de ces CTL (Moon *et al.* 2009). Les avantages majeurs de la première méthode sont qu'il est possible de suivre, en conditions physiologiques, l'évolution et l'immunodominance des réponses CTL contre plusieurs peptides du LCMV. Par contre, l'analyse de ces réponses durant les premiers jours de l'infection pourrait être relativement ardue, vu la très faible quantité de précurseurs naïfs. La seconde méthode offre l'avantage de pouvoir suivre les étapes précoces d'activation et de division cellulaire induites suite à leur activation (Pape *et al.* 1997). Par contre, pour assurer le suivi de ces

réponses, les quantités de cellules transférées sont souvent bien au-dessus des fréquences de précurseurs naïfs endogènes et il est rare que plus d'un épitope puisse être suivi lors d'une infection.

Bien que les infections par le VHC et le LCMV soient différentes sous plusieurs aspects, les réponses immunitaires développées contre ces deux virus sont similaires. Dans les deux cas, les réponses immunitaires cellulaires sont cruciales pour éliminer la virémie et une apparition tardive d'anticorps neutralisants est observée (Virgin *et al.* 2009). Un phénomène caractéristique de l'infection par le VHC est que les réponses immunitaires spécifiques sont retardées et qu'une longue période de silence immunologique est observée alors que la virémie est élevée (Cooper *et al.* 1999). Certains croient d'ailleurs que l'issue de l'infection par le VHC serait fixée durant ce délai (Bertolino *et al.* 2008), mais le manque flagrant d'informations concernant les étapes précoces de cette infection empêche de confirmer cette hypothèse (Cox *et al.* 2009). Nos résultats suggèrent fortement que le répertoire primaire des lymphocytes B est important pour le développement de réponses immunitaires cellulaires antivirales et nous croyons que ces résultats pourraient s'appliquer à d'autres infections virales. L'objectif final de ce projet de recherche est de transposer nos observations chez l'humain. Le recours à des cohortes de patients à risque d'être infectés par le VHC permettrait d'obtenir des échantillons sériques précédant l'infection et d'évaluer si un lien existe également entre la diversité du répertoire des lymphocytes B et la résolution de l'infection par le VHC.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abe, K., Inchauspe, G., Shikata, T. & Prince, A. M. (1992). Three different patterns of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 15 (4):690-695.
- AbuAttieh, M., Rebrovich, M., Wettstein, P. J., Vuk-Pavlovic, Z., Limper, A. H., Platt, J. L. & Cascalho, M. (2007). Fitness of cell-mediated immunity independent of repertoire diversity. *J Immunol* 178 (5):2950-2960.
- Ahmed, R., Butler, L. D. & Bhatti, L. (1988). T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J Virol* 62 (6):2102-2106.
- Ahmed, R. & Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272 (5258):54-60.
- Ahmed, R., Salmi, A., Butler, L. D., Chiller, J. M. & Oldstone, M. B. (1984). Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J Exp Med* 160 (2):521-540.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (4):783-801.
- Allan, R. S. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 25:153-162.
- Allman, D. & Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20 (2):149-157.
- Alt, F. W. & Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (13):4118-4122.
- Alter-Wolf, S., Blomberg, B. B. & Riley, R. L. (2009). Old mice retain bone marrow B1 progenitors, but lose B2 precursors, and exhibit altered immature B cell phenotype and light chain usage. *Mech Ageing Dev* 130 (6):401-408.
- Alter, H. J. & Seeff, L. B. (2000). Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 20 (1):17-35.
- Alter, M. J. (2002). Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 36 (5 Suppl 1):S93-98.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. & Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274 (5284):94-96.
- Alugupalli, K. R. (2008). A distinct role for B1b lymphocytes in T cell-independent immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 319:105-130.
- Alugupalli, K. R. & Gerstein, R. M. (2005). Divide and conquer: Division of labor by B-1 B cells. *Immunity* 23 (1):1-2.
- Alugupalli, K. R., Gerstein, R. M., Chen, J., Szomolanyi-Tsuda, E., Woodland, R. T. & Leong, J. M. (2003). The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. *J Immunol* 170 (7):3819-3827.
- Alugupalli, K. R., Leong, J. M., Woodland, R. T., Muramatsu, M., Honjo, T. & Gerstein, R. M. (2004). B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21 (3):379-390.
- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D. & Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390 (6656):175-179.
- Ansel, K. M., Harris, R. B. S. & Cyster, J. G. (2002). CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 16 (1):67-76.

- Arase, Y., Ikeda, K., Chayama, K., Murashima, N., Tsubota, A., Suzuki, Y., Saitoh, S., Kobayashi, M., Suzuki, F. & Kumada, H. (2000). Fluctuation patterns of HCV-RNA serum level in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 35 (3):221-225.
- Armstrong, C. & Lillie, R.D. (1934). Experimental Lymphocytic Choriomeningitis of Monkeys and Mice Produced by a Virus Encountered in Studies of the 1933 St. Louis Encephalitis Epidemic. *Public Health Report* 49 (35):1019-1027.
- Armstrong, G. L., Alter, M. J., McQuillan, G. M. & Margolis, H. S. (2000). The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 31 (3):777-782.
- Arnold, L. W. & Haughton, G. (1992). Autoantibodies to phosphatidylcholine. The murine antibromelain RBC response. *Ann N Y Acad Sci* 651:354-359.
- Asano, M. S. & Ahmed, R. (1996). CD8 T cell memory in B cell-deficient mice. *J Exp Med* 183 (5):2165-2174.
- Avrameas, S. (1991). Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 12 (5):154-159.
- Avrameas, S. & Ternynck, T. (1995). Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Res Immunol* 146 (4-5):235-248.
- Bachmann, M. F., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1995). T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur J Immunol* 25 (12):3445-3451.
- Bachmann, M. F., McCall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D. E., Mak, T. W. & Ohashi, P. S. (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 7 (4):549-557.
- Bachmann, M. F., Wong, B. R., Josien, R., Steinman, R. M., Oxenius, A. & Choi, Y. (1999). TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med* 189 (7):1025-1031.
- Bachmann, M. F. & Zinkernagel, R. M. (1997). Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu Rev Immunol* 15:235-270.
- Badr, G., Bedard, N., Abdel-Hakeem, M. S., Trautmann, L., Willems, B., Villeneuve, J. P., Haddad, E. K., Sekaly, R. P., Bruneau, J. & Shoukry, N. H. (2008). Early Interferon Therapy for Hepatitis C Virus Infection Rescues Polyfunctional, Long-Lived CD8(+) Memory T Cells. *Journal of Virology* 82 (20):10017-10031.
- Baker, N. & Ehrenstein, M. R. (2002). Cutting edge: selection of B lymphocyte subsets is regulated by natural IgM. *J Immunol* 169 (12):6686-6690.
- Baltimore, D., Boldin, M. P., O'Connell, R. M., Rao, D. S. & Taganov, K. D. (2008). MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 9 (8):839-845.
- Bankwitz, D., Steinmann, E., Bitzegeio, J., Ciesek, S., Friesland, M., Herrmann, E., Zeisel, M. B., Baumert, T. F., Keck, Z. Y., Fong, S. K., Pecheur, E. I. & Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol* 84 (11):5751-5763.
- Bartenschlager, R., Frese, M. & Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63:71-180.
- Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81 (Pt 7):1631-1648.
- Barth, H., Schnober, E. K., Zhang, F., Linhardt, R. J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F. L., Patel, A. H., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2006). Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *Journal of Virology* 80 (21):10579-10590.

- Barthold, S.W & Smith, A.L. (2007). Lymphocytic Choriomeningitis Virus. In *The Mouse in Biomedical Research*, edited by J. G. Fox, Barthold, S. W., Davisson, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W. & Smith, A. L. Burlington, MA, USA: Academic Press.
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J. C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., Cosset, F. L. & Purcell, R. H. (2003). In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: Evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (SUPPL. 2):14199-14204.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F. L. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197 (5):633-642.
- Battegay, M., Cooper, S., Althage, A., Banziger, J., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1991). Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J Virol Methods* 33 (1-2):191-198.
- Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology* 11 (1):34-46.
- Baumgarth, N., Choi, Y. S., Rothausler, K., Yang, Y. & Herzenberg, L. A. (2008). B cell lineage contributions to antiviral host responses. *Curr Top Microbiol Immunol* 319:41-61.
- Baumgarth, N., Herman, O. C., Jager, G. C., Brown, L. E., Herzenberg, L. A. & Chen, J. (2000). B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med* 192 (2):271-280.
- Baumgarth, N., Herman, O. C., Jager, G. C., Brown, L. & Herzenberg, L. A. (1999). Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5):2250-2255.
- Baumgarth, N. & Roederer, M. (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 243 (1-2):77-97.
- Baumgarth, N., Tung, J. W. & Herzenberg, L. A. (2005). Inherent specificities in natural antibodies: A key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Seminars in Immunopathology* 26 (4):347-362.
- Bekeredjian-Ding, I. & Jegu, G. (2009). Toll-like receptors--sentries in the B-cell response. *Immunology* 128 (3):311-323.
- Belperron, A. A., Dailey, C. M. & Bockenstedt, L. K. (2005). Infection-induced marginal zone B cell production of *Borrelia hermsii*-specific antibody is impaired in the absence of CD1d. *J Immunol* 174 (9):5681-5686.
- Belperron, A. A., Dailey, C. M., Booth, C. J. & Bockenstedt, L. K. (2007). Marginal zone B-cell depletion impairs murine host defense against *Borrelia burgdorferi* infection. *Infect Immun* 75 (7):3354-3360.
- Bendelac, A., Bonneville, M. & Kearney, J. F. (2001). Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 1 (3):177-186.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Bartosch, B., Cosset, F. L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernandez, A., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M. & Majano, P. L. (2009). The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* 83 (16):8012-8020.
- Bergthaler, A., Flatz, L., Verschoor, A., Hegazy, A. N., Holdener, M., Fink, K., Eschli, B., Merkler, D., Sommerstein, R., Horvath, E., Fernandez, M., Fitsche, A., Senn, B. M., Verbeek, J. S., Odermatt, B., Siegrist, C. A. & Pinschewer, D. D. (2009). Impaired Antibody Response Causes Persistence of Prototypic T Cell-Contained Virus. *Plos Biology* 7 (4):789-799.
- Berland, R. & Wortis, H. H. (2000). A model for autoantigen induction of natural antibody producing B-1a cells. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*.

- Bertolino, P, McCaughan, GW & Bowen, DG. (2008). Immunological Parameters Influencing Adaptive Immune Responses to the Hepatitis C Virus. *Hepatitis C Virus Disease*:39-70.
- Bevan, M. J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 4 (8):595-602.
- Bhat, N. M., Kantor, A. B., Bieber, M. M., Stall, A. M., Herzenberg, L. A. & Teng, N. N. (1992). The ontogeny and functional characteristics of human B-1 (CD5+ B) cells. *Int Immunol* 4 (2):243-252.
- Bigras, M. (2008). Rôle des Anticorps Naturels dans la Présentation Antigénique lors d'Infections Virales, Virologie et Immunologie, Université du Québec - Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada.
- Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J. R., Tarakhovsky, A. & Bondada, S. (1996). CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 274 (5294):1906-1909.
- Binder, C. J. (2010). Natural IgM antibodies against oxidation-specific epitopes. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1:S56-60.
- Binder, D., Fehr, J., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1997). Virus-induced transient bone marrow aplasia: major role of interferon-alpha/beta during acute infection with the noncytopathic lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* 185 (3):517-530.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B. & Pien, G. C. (2002). Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:7-27.
- Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A. & Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10 (1):29-37.
- Blackwell, T. K. & Alt, F. W. (1989). Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals. *Annu Rev Genet* 23:605-636.
- Blander, J. M. & Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440:808-812.
- Bocharov, G., Ludewig, B., Bertoletti, A., Klenerman, P., Junt, T., Krebs, P., Luzyanina, T., Fraser, C. & Anderson, R. M. (2004). Underwhelming the Immune Response: Effect of Slow Virus Growth on CD8⁺-T-Lymphocyte Responses. *Journal of Virology* 78 (5):2247-2254.
- Boes, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology* 37 (18):1141-1149.
- Boes, M., Esau, C., Fischer, M. B., Schmidt, T., Carroll, M. & Chen, J. (1998). Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol* 160 (10):4776-4787.
- Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B. C., Marshak-Rothstein, A. & Chen, J. (2000). Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (3):1184-1189.
- Bofill, M., Janossy, G., Janossa, M., Burford, G. D., Seymour, G. J., Wernet, P. & Kelemen, E. (1985). Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J Immunol* 134 (3):1531-1538.
- Boonstra, A., van der Laan, L. J., Vanwolleghem, T. & Janssen, H. L. (2009). Experimental models for hepatitis C viral infection. *Hepatology* 50 (5):1646-1655.
- Borrow, P. & Oldstone, M. B. (1992). Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus. *J Virol* 66 (12):7270-7281.
- Borrow, P. & Oldstone, M. B. (1997). Lymphocytic Choriomeningitis Virus. In *Viral Pathogenesis*, edited by N. Nathanson, Ahmed, A., Gonzalez-Scarano, F., Griffin, D. O., Holmes, K. L., Murphy, F. A. & Robinson, H. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Borrow, P., Tishon, A., Lee, S., Xu, J., Grewal, I. S., Oldstone, M. B. & Flavell, R. A. (1996). CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8⁺ CTL response. *J Exp Med* 183 (5):2129-2142.

- Borrow, P., Tough, D. F., Eto, D., Tishon, A., Grewal, I. S., Sprent, J., Flavell, R. A. & Oldstone, M. B. (1998). CD40 ligand-mediated interactions are involved in the generation of memory CD8(+) cytotoxic T lymphocytes (CTL) but are not required for the maintenance of CTL memory following virus infection. *J Virol* 72 (9):7440-7449.
- Bos, N. A., Kimura, H., Meeuwsen, C. G., De Visser, H., Hazenberg, M. P., Wostmann, B. S., Pleasants, J. R., Benner, R. & Marcus, D. M. (1989). Serum immunoglobulin levels and naturally occurring antibodies against carbohydrate antigens in germ-free BALB/c mice fed chemically defined ultrafiltered diet. *European Journal of Immunology* 19 (12):2335-2339.
- Bos, N. A., Meeuwsen, C. G., Wostmann, B. S., Pleasants, J. R. & Benner, R. (1988). The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. *Cell Immunol* 112 (2):371-380.
- Bouaziz, J. D., Yanaba, K. & Tedder, T. F. (2008). Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev* 224:201-214.
- Bowen, D. G., Shoukry, N. H., Grakoui, A., Fuller, M. J., Cawthon, A. G., Dong, C., Hasselschwert, D. L., Brasky, K. M., Freeman, G. J., Seth, N. P., Wucherpfennig, K. W., Houghton, M. & Walker, C. M. (2008). Variable patterns of programmed death-1 expression on fully functional memory T cells after spontaneous resolution of hepatitis C virus infection. *J Virol* 82 (10):5109-5114.
- Bowen, D. G. & Walker, C. M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436 (7053):946-952.
- Boyden, Stephen V. (1966). Natural Antibodies and the Immune Response. In *Advances in Immunology*, edited by F.J. Dixon, Jr. & Humphrey, J. H.: Academic Press.
- Briles, D. E., Nahm, M., Schroer, K., Davie, J., Baker, P., Kearney, J. & Barletta, R. (1981). Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae. *J Exp Med* 153 (3):694-705.
- Brundler, M. A., Aichele, P., Bachmann, M., Kitamura, D., Rajewsky, K. & Zinkernagel, R. M. (1996). Immunity to viruses in B cell-deficient mice: influence of antibodies on virus persistence and on T cell memory. *Eur J Immunol* 26 (9):2257-2262.
- Buchmeier, M. J., Bowen, M. D. & Peters, C. J. (2001). *Arenaviridae: The Viruses and Their Replication*. In *Fields' Virology*, edited by B. N. Fields, Knipe, D. M., Howley, P. M. & Griffin, D. E. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Buchmeier, M. J., de la Torre, J.C. & Peters, C. J. (2007). *Arenaviridae: The Viruses and Their Replication*. In *Fields' Virology*, edited by D. M. Knipe & Howley, P. M. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business.
- Buchmeier, M. J., Welsh, R. M., Dutko, F. J. & Oldstone, M. B. (1980). The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Adv Immunol* 30:275-331.
- Burastero, S. E., Casali, P., Wilder, R. L. & Notkins, A. L. (1988). Monoreactive high affinity and polyreactive low affinity rheumatoid factors are produced by CD5+ B cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 168 (6):1979-1992.
- Butz, E. A. & Bevan, M. J. (1998). Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 8 (2):167-175.
- Byrne, J. A. & Oldstone, M. B. (1984). Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J Virol* 51 (3):682-686.
- Cao, W., Henry, M. D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J. H., Ravkov, E. V., Nichol, S. T., Compans, R. W., Campbell, K. P. & Oldstone, M. B. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282 (5396):2079-2081.
- Carroll, M. C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology* 5 (10):981-986.

- Cascalho, M., Ma, A., Lee, S., Masat, L. & Wabl, M. (1996). A quasi-monoclonal mouse. *Science* 272 (5268):1649-1652.
- Cascalho, M., Wong, J. & Wabl, M. (1997). VH gene replacement in hyperselected B cells of the quasimonoclonal mouse. *J Immunol* 159 (12):5795-5801.
- Chan, C. W., Crafton, E., Fan, H. N., Flook, J., Yoshimura, K., Skarica, M., Brockstedt, D., Dubensky, T. W., Stins, M. F., Lanier, L. L., Pardoll, D. M. & Housseau, F. (2006). Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 12 (2):207-213.
- Chen, J., Trounstein, M., Alt, F. W., Young, F., Kurahara, C., Loring, J. F. & 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.
- Chen, J., Trounstein, M., Kurahara, C., Young, F., Kuo, C. C., Xu, Y., Loring, J. F., Alt, F. W. & Huszar, D. (1993). B cell development in mice that lack one or both immunoglobulin kappa light chain genes. *EMBO J* 12 (3):821-830.
- Chen, Y., Khanna, S., Goodyear, C. S., Park, Y. B., Raz, E., Thiel, S., GrÄnwall, C., Vas, J., Boyle, D. L., Corr, M., Kono, D. H. & Silverman, G. J. (2009). Regulation of dendritic cells and macrophages by an anti-apoptotic cell natural antibody that suppresses TLR responses and inhibits inflammatory arthritis. *Journal of Immunology* 183 (2):1346-1359.
- Choi, Y. S. & Baumgarth, N. (2008). Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *Journal of Experimental Medicine* 205 (13):3053-3064.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & 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.
- Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W., Jr. & Cyster, J. G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9 (1):54-62.
- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., Houghton, M., Parham, P. & Walker, C. M. (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10 (4):439-449.
- Cormier, E. G., Durso, R. J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W. C., Gardner, J. P. & Dragic, T. (2004). L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (O209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (39):14067-14072.
- Cousens, L. P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J. D., Ahmed, R. & Biron, C. A. (1999). Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J Exp Med* 189 (8):1315-1328.
- Coutelier, J. P., Johnston, S. J., El Idrissi, M. el- A. & Pfau, C. J. (1994). Involvement of CD4+ cells in lymphocytic choriomeningitis virus-induced autoimmune anaemia and hypergammaglobulinaemia. *J Autoimmun* 7 (5):589-599.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. & Avrameas, S. (1995). Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 7 (6):812-818.
- Cox, A. L., Page, K., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Lauer, G. M., Kim, A. Y., Rosen, H. R., Radziewicz, H., Grakoui, A., Fierer, D. S., Branch, A. D., Kaplan, D. E. & Chang, K. M. (2009). Rare Birds in North America: Acute Hepatitis C Cohorts. *Gastroenterology* 136 (1):26-31.
- Crawford, A. & Wherry, E. J. (2009). The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol* 21 (2):179-186.
- Cummings, K. L., Rosen, H. R. & Hahn, Y. S. (2009). Frequency of gC1qR(+)CD4(+) T cells increases during acute hepatitis C virus infection and remains elevated in patients with chronic infection. *Clinical Immunology* 132 (3):401-411.

- Dash, S, Hazari, S, Garry, RF & Regenstein, F. (2008). Mechanisms of Interferon Action and Resistance in Chronic Hepatitis C Virus Infection: Lessons Learned from Cell Culture Studies. *Hepatitis C Virus Disease*:16-38.
- Dauphinee, M., Tovar, Z. & Talal, N. (1988). B cells expressing CD5 are increased in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 31 (5):642-647.
- Day, C. L., Lauer, G. M., Robbins, G. K., McGovern, B., Wurcel, A. G., Gandhi, R. T., Chung, R. T. & Walker, B. D. (2002). Broad specificity of virus-specific CD4(+) T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* 76 (24):12584-12595.
- Deenen, G. J. & Kroese, F. G. (1992). Murine peritoneal Ly-1 B cells do not turn over rapidly. *Ann N Y Acad Sci* 651:70-71.
- den Haan, J. M., Lehar, S. M. & Bevan, M. J. (2000). CD8+ but not CD8- dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192:1685-1696.
- Dessain, S. K., Adekar, S. P. & Berry, J. D. (2008). Exploring the native human antibody repertoire to create antiviral therapeutics. *Curr Top Microbiol Immunol* 317:155-183.
- Dienstag, J. L. & McHutchison, J. G. (2006). American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 130 (1):231-264; quiz 214-237.
- Donze, H. H., Lue, C., Julian, B. A., Kutteh, W. H., Kantele, A. & Mestecky, J. (1997). Human peritoneal B-1 cells and the influence of continuous ambulatory peritoneal dialysis on peritoneal and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) composition and immunoglobulin levels. *Clin Exp Immunol* 109 (2):356-361.
- Dore, G. J., MacDonald, M., Law, M. G. & Kaldor, J. M. (2003). Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *Aust Fam Physician* 32 (10):796-798.
- Dorner, M., Horwitz, J. A., Robbins, J. B., Barry, W. T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C. T., Schoggins, J. W., Catanese, M. T., Burton, D. R., Law, M., Rice, C. M. & Ploss, A. (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474 (7350):208-211.
- Dorshkind, K. & Montecino-Rodriguez, E. (2007). Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol* 7 (3):213-219.
- Dowd, K. A., Netski, D. M., Wang, X., Cox, A. L. & Ray, S. C. (2009). Selection Pressure From Neutralizing Antibodies Drives Sequence Evolution During Acute Infection With Hepatitis C Virus. *Gastroenterology* 136 (7):2377-2386.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4 (1):11-22.
- Drouin, C., Lamarche, S., Bruneau, J., Soudeyns, H. & Shoukry, N. H. (2010). Cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus (HCV) alternate reading frame protein (ARFP) are undetectable during acute infection. *Journal of Clinical Virology* 47 (1):102-103.
- Du Pasquier, L. (2004). Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. *C R Biol* 327 (6):591-601.
- Durbeej, M., Henry, M. D., Ferletta, M., Campbell, K. P. & Ekblom, P. (1998). Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 46 (4):449-457.
- Durrbach, A., Baple, E., Preece, A. F., Charpentier, B. & Gustafsson, K. (2007). Virus recognition by specific natural antibodies and complement results in MHC I cross-presentation. *European Journal of Immunology* 37 (5):1254-1265.
- Eckels, D. D., Wang, H. R., Bian, T. H., Tabatabai, N. & Gill, J. C. (2000). Immunobiology of hepatitis C virus (HCV) infection: the role of CD4 T cells in HCV infection. *Immunological Reviews* 174:90-97.
- Ehrenstein, M. R., Cook, H. T. & Neuberger, M. S. (2000). Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies. *J Exp Med* 191 (7):1253-1258.
- Ehrenstein, M. R. & Notley, C. A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nature Reviews Immunology* 10 (11):778-786.

- Esplin, B. L., Welner, R. S., Zhang, Q., Borghesi, L. A. & Kincade, P. W. (2009). A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (14):5773-5778.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446 (7137):801-805.
- Fagarasan, S. & Honjo, T. (2004). Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. *Curr Opin Immunol* 16 (3):277-283.
- Fanning, L., Kenny-Walsh, E., Levis, J., Choudhury, K. R., Cannon, B., Sheehan, M., Whelton, M. & Shanahan, F. (2000). Natural fluctuations of hepatitis C viral load in a homogeneous patient population: a prospective study. *Hepatology* 31 (1):225-229.
- Feeney, A. J. (1990). Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences. *J Exp Med* 172 (5):1377-1390.
- Ferguson, A. R., Youd, M. E. & Corley, R. B. (2004). Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol* 16 (10):1411-1422.
- Ferrari, C., Valli, A., Galati, L., Penna, A., Scaccaglia, P., Giuberti, T., Schianchi, C., Missale, G., Marin, M. G. & Fiaccadori, F. (1994). T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology* 19 (2):286-295.
- Fitzmaurice, K. & Klenerman, P. (2008). Cellular immunity and acute hepatitis C infection. *Current Pharmaceutical Design* 14 (17):1666-1677.
- Flatz, L., Hegazy, A. N., Bergthaler, A., Verschoor, A., Claus, C., Fernandez, M., Gattinoni, L., Johnson, S., Kreppel, F., Kochanek, S., Broek, M., Radbruch, A., Levy, F., Lambert, P. H., Siegrist, C. A., Restifo, N. P., Lohning, M., Ochsenbein, A. F., Nabel, G. J. & Pinschewer, D. D. (2010). Development of replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8+ T cell immunity. *Nat Med* 16 (3):339-345.
- Forster, I. & Rajewsky, K. (1987). Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur J Immunol* 17 (4):521-528.
- Frebel, H., Richter, K. & Oxenius, A. (2010). How chronic viral infections impact on antigen-specific T-cell responses. *Eur J Immunol* 40 (3):654-663.
- Gale Jr, M. & Foy, E. M. (2005). Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436 (7053):939-945.
- Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A. C., 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.
- Galun, E., Burakova, T., Ketzinel, M., Lubin, I., Shezen, E., Kahana, Y., Eid, A., Ilan, Y., Rivkind, A., Pizov, G. & et al. (1995). Hepatitis C virus viremia in SCID-->BNX mouse chimera. *J Infect Dis* 172 (1):25-30.
- Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C. & Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol* 178 (12):7779-7786.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C. A., Santantonio, T. & Pape, G. R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117 (4):933-941.
- Ghosn, E. E., Yang, Y., Tung, J. & Herzenberg, L. A. (2008). CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (13):5195-5200.
- Gobet, R., Cerny, A., Ruedi, E., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1988). The role of antibodies in natural and acquired resistance of mice to vesicular stomatitis virus. *Exp Cell Biol* 56 (4):175-180.

- Golden-Mason, L., Burton, J. R., Jr., Castelblanco, N., Klarquist, J., Benlloch, S., Wang, C. & Rosen, H. R. (2006). Loss of IL-7 receptor alpha-chain (CD127) expression in acute HCV infection associated with viral persistence. *Hepatology* 44 (5):1098-1109.
- Golden-Mason, L., Palmer, B., Klarquist, J., Mengshol, J. A., Castelblanco, N. & Rosen, H. R. (2007). Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells associated with reversible immune dysfunction. *Journal of Virology* 81 (17):9249-9258.
- Grakoui, A., Shoukry, N. H., Woollard, D. J., Han, J. H., Hanson, H. L., Ghayeb, J., Murthy, K. K., Rice, C. M. & Walker, C. M. (2003). HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302 (5645):659-662.
- Griffin, D. O., Holodick, N. E. & Rothstein, T. L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70. *J Exp Med* 208 (1):67-80.
- Gu, H., Forster, I. & Rajewsky, K. (1990). Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *EMBO J* 9 (7):2133-2140.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667.
- Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19:65-91.
- Gururajan, M., Jacob, J. & Pulendran, B. (2007). Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. *PLoS One* 2 (9):e863.
- Ha, S. A., Tsuji, M., Suzuki, K., Meek, B., Yasuda, N., Kaisho, T. & Fagarasan, S. (2006). Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J Exp Med* 203 (11):2541-2550.
- Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. A. & Tedder, T. F. (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23 (1):7-18.
- Han, J. H., Akira, S., Calame, K., Beutler, B., Selsing, E. & Imanishi-Kari, T. (2007). Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors. *Immunity* 27 (1):64-75.
- Hangartner, Lars, Zinkernagel, Rolf M. & Hengartner, Hans. (2006). Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol* 6 (3):231-243.
- Hardy, R. R. (2006). B-1 B cell development. *J Immunol* 177 (5):2749-2754.
- Harty, J. T. & Badovinac, V. P. (2008). Shaping and reshaping CD8⁺ T-cell memory. *Nat Rev Immunol* 8 (2):107-119.
- Hastings, W. D., Gurdak, S. M., Tumang, J. R. & Rothstein, T. L. (2006). CD5⁺/Mac-1⁻ peritoneal B cells: a novel B cell subset that exhibits characteristics of B-1 cells. *Immunol Lett* 105 (1):90-96.
- Hastings, W. D., Tumang, J. R., Behrens, T. W. & Rothstein, T. L. (2006). Peritoneal B-2 cells comprise a distinct B-2 cell population with B-1b-like characteristics. *Eur J Immunol* 36 (5):1114-1123.
- Hauray, M., Sundblad, A., Grandien, A., Barreau, C., Coutinho, A. & Nobrega, A. (1997). The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol* 27 (6):1557-1563.
- Hayakawa, K., Asano, M., Shinton, S. A., Gui, M., Allman, D., Stewart, C. L., Silver, J. & Hardy, R. R. (1999). Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285 (5424):113-116.
- Hayakawa, K., Asano, M., Shinton, S. A., Gui, M., Wen, L. J., Dashoff, J. & Hardy, R. R. (2003). Positive selection of anti-thy-1 autoreactive B-1 cells and natural serum autoantibody production independent from bone marrow B cell development. *J Exp Med* 197 (1):87-99.

- Hayakawa, K. & Hardy, R. R. (2000). Development and function of B-1 cells. *Curr Opin Immunol* 12 (3):346-353.
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R. & Herzenberg, L. A. (1983). The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* 157 (1):202-218.
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Stall, A. M. & Herzenberg, L. A. (1986). Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur J Immunol* 16 (10):1313-1316.
- He, Y., Zhang, J., Donahue, C. & Falo, L. D. (2006). Skin-derived dendritic cells induce potent CD8+ T cell immunity in recombinant lentivector-mediated genetic immunization. *Immunity* 24:643-656.
- Herzenberg, L. A. (2000). B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev* 175:9-22.
- Hnatyszyn, H. J. (2005). Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther* 10 (1):1-11.
- Hoffmann, A., Kerr, S., Jellusova, J., Zhang, J. Q., Weisel, F., Wellmann, U., Winkler, T. H., Kneitz, B., Crocker, P. R. & Nitschke, L. (2007). Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nature Immunology* 8 (7):694-704.
- Homann, D. (2002). Immunocytotoxicity. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:43-65.
- Homann, D., Teyton, L. & Oldstone, M. B. (2001). Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat Med* 7 (8):913-919.
- Homann, D., Tishon, A., Berger, D. P., Weigle, W. O., von Herrath, M. G. & Oldstone, M. B. (1998). Evidence for an underlying CD4 helper and CD8 T-cell defect in B-cell-deficient mice: failure to clear persistent virus infection after adoptive immunotherapy with virus-specific memory cells from muMT/muMT mice. *J Virol* 72 (11):9208-9216.
- Hooijkaas, H., Benner, R., Pleasants, J. R. & Wostmann, B. S. (1984). Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. *Eur J Immunol* 14 (12):1127-1130.
- Hotchin, J. (1962). The biology of lymphocytic choriomeningitis infection: virus-induced immune disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 27:479-499.
- Hsu, M. C., Toellner, K. M., Vinuesa, C. G. & MacLennan, I. C. (2006). B cell clones that sustain long-term plasmablast growth in T-independent extrafollicular antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (15):5905-5910.
- Hunziker, L., Recher, M., Macpherson, A. J., Ciurea, A., Freigang, S., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (2003). Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol* 4 (4):343-349.
- Ikeda, A., Merchant, M., Lev, L., Longnecker, R. & Ikeda, M. (2004). Latent membrane protein 2A, a viral B cell receptor homologue, induces CD5+ B-1 cell development. *J Immunol* 172 (9):5329-5337.
- Ippolito, G. C., Schelonka, R. L., Zemlin, M., Ivanov, I., Kobayashi, R., Zemlin, C., Gartland, G. L., Nitschke, L., Pelkonen, J., Fujihashi, K., Rajewsky, K. & Schroeder, H. W., Jr. (2006). Forced usage of positively charged amino acids in immunoglobulin CDR-H3 impairs B cell development and antibody production. *J Exp Med* 203 (6):1567-1578.
- Ishii, S. & Koziel, M. J. (2008). Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clinical Immunology* 128 (2):133-147.
- Ivanov, I., Schelonka, R. L., Zhuang, Y., Gartland, G. L., Zemlin, M. & Schroeder, H. W., Jr. (2005). Development of the expressed Ig CDR-H3 repertoire is marked by focusing of constraints in length, amino acid use, and charge that are first established in early B cell progenitors. *J Immunol* 174 (12):7773-7780.
- Jakobovits, A., Amado, R. G., Yang, X., Roskos, L. & Schwab, G. (2007). From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* 25 (10):1134-1143.

- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1:1-13.
- Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Jayasekera, J. P., Moseman, E. A. & Carroll, M. C. (2007). Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *Journal of Virology* 81 (7):3487-3494.
- Joao, C., Ogle, B. M., Gay-Rabinstein, C., Platt, J. L. & Cascalho, M. (2004). B cell-dependent TCR diversification. *J Immunol* 172 (8):4709-4716.
- Johansson, D. X., Voisset, C., Tarr, A. W., Aung, M., Ball, J. K., Dubuisson, J. & Persson, M. A. (2007). Human combinatorial libraries yield rare antibodies that broadly neutralize hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (41):16269-16274.
- Jung, S. (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211-220.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Gottesman, K.S. & Foeller, C. (1992). *Sequences of Proteins of Immunological Interest*: Diane Publishing Co.
- Kaetzel, C. S. (2005). The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 206:83-99.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369 (6475):31-37.
- Kalia, V., Sarkar, S. & Ahmed, R. (2010). CD8 T-cell memory differentiation during acute and chronic viral infections. *Adv Exp Med Biol* 684:79-95.
- Kanayama, N., Cascalho, M. & Ohmori, H. (2005). Analysis of marginal zone B cell development in the mouse with limited B cell diversity: role of the antigen receptor signals in the recruitment of B cells to the marginal zone. *J Immunol* 174 (3):1438-1445.
- Kantor, A. B., Merrill, C. E., Herzenberg, L. A. & Hillson, J. L. (1997). An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol* 158 (3):1175-1186.
- Kaplan, D. E., Sugimoto, K., Newton, K., Valiga, M. E., Ikeda, F., Aytaman, A., Nunes, F. A., Lucey, M. R., Vance, B. A., Vonderheide, R. H., Reddy, K. R., McKeating, J. A. & Chang, K. (2007). Discordant Role of CD4 T-Cell Response Relative to Neutralizing Antibody and CD8 T-Cell Responses in Acute Hepatitis C. *Gastroenterology* 132 (2):654-666.
- Karre, K. (2002). NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55 (3):221-228.
- Kasaian, M. T., Leite-Morris, K. A. & Biron, C. A. (1991). The role of CD4+ cells in sustaining lymphocyte proliferation during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 146 (6):1955-1963.
- Kasprowicz, V., Schulze Zur Wiesch, J., Kuntzen, T., Nolan, B. E., Longworth, S., Berical, A., Blum, J., McMahon, C., Reyor, L. L., Elias, N., Kwok, W. W., McGovern, B. G., Freeman, G., Chung, R. T., Klenerman, P., Lewis-Ximenez, L., Walker, B. D., Allen, T. M., Kim, A. Y. & Lauer, G. M. (2008). High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *J Virol* 82 (6):3154-3160.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. & Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125 (6):1808-1817.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11 (5):373-384.
- Kearney, J. F. (2005). Innate-like B cells. *Springer Seminars in Immunopathology* 26 (4):377-383.
- Keck, Z. Y., Li, S. H., Xia, J., von Hahn, T., Balfe, P., McKeating, J. A., Witteveldt, J., Patel, A. H., Alter, H., Rice, C. M. & Fong, S. K. (2009). Mutations in hepatitis C virus E2 located outside the CD81

- binding sites lead to escape from broadly neutralizing antibodies but compromise virus infectivity. *J Virol* 83 (12):6149-6160.
- Keller, S. A., Bauer, M., Manolova, V., Muntwiler, S., Saudan, P. & Bachmann, M. F. (2010). Cutting edge: limited specialization of dendritic cell subsets for MHC class II-associated presentation of viral particles. *J Immunol* 184 (1):26-29.
- Keshavarzi, S., Rietz, C., Simoes, S., Shih, S., Platt, J. L., Wong, J., Wabl, M. & Cascalho, M. (2003). The possibility of B-cell-dependent T-cell development. *Scand J Immunol* 57 (5):446-452.
- Kikuno, K., Kang, D. W., Tahara, K., Torii, I., Kubagawa, H. M., Ho, K. J., Baudino, L., Nishizaki, N., Shibuya, A. & Kubagawa, H. (2007). Unusual biochemical features and follicular dendritic cell expression of human Fc α / μ receptor. *Eur J Immunol* 37 (12):3540-3550.
- Kim, P. S. & Ahmed, R. (2010). Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Current Opinion in Immunology* 22 (2):223-230.
- Kimmig, B. & Lehmann-Grube, F. (1979). The immune response of the mouse to lymphocytic choriomeningitis virus. I. Circulating antibodies. *J Gen Virol* 45 (3):703-710.
- Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R. & Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350 (6317):423-426.
- Klein-Schneegans, A. S., Kuntz, L., Fonteneau, P. & Loor, F. (1989). Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the *Ipr* (lymphoproliferation) locus. *J Autoimmun* 2 (6):869-875.
- Klenerman, P. & Hill, A. (2005). T cells and viral persistence: Lessons from diverse infections. *Nature Immunology* 6 (9):873-879.
- Klotman, M. E. & Chang, T. L. (2006). Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6 (6):447-456.
- Kopf, M., Ruedl, C., Schmitz, N., Gallimore, A., Lefrang, K., Ecabert, B., Odermatt, B. & Bachmann, M. F. (1999). OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. *Immunity* 11 (6):699-708.
- Kubagawa, H., Oka, S., Kubagawa, Y., Torii, I., Takayama, E., Kang, D. W., Gartland, G. L., Bertoli, L. F., Mori, H., Takatsu, H., Kitamura, T., Ohno, H. & Wang, J. Y. (2009). Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. *J Exp Med* 206 (12):2779-2793.
- Lafaille, J. J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y. & Tonegawa, S. (1989). Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59 (5):859-870.
- Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290 (5489):92-97.
- Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2002). Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2 (12):982-987.
- Larsson, M., Beignon, A. S. & Bhardwaj, N. (2004). DC-virus interplay: a double edged sword. *Semin Immunol* 16 (3):147-161.
- Lau, L. L., Jamieson, B. D., Somasundaram, T. & Ahmed, R. (1994). Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 369 (6482):648-652.
- Lauer, G. M., Barnes, E., Lucas, M., Timm, J., Ouchi, K., Kim, A. Y., Day, C. L., Robbins, G. K., Casson, D. R., Reiser, M., Dusheiko, G., Allen, T. M., Chung, R. T., Walker, B. D. & Klenerman, P. (2004). High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 127 (3):924-936.
- Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A. W., Stamatakis, Z., Gastaminza, P., Chisari, F. V., Jones, I. M., Fox, R. I., Ball, J. K., McKeating, J. A., Kneteman, N. M. & Burton, D. R. (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14 (1):25-27.

- Lechner, F., Wong, D. K. H., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P. & Walker, B. D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *Journal of Experimental Medicine* 191 (9):1499-1512.
- Lee, K. J. & de la Torre, J. C. (2002). Reverse genetics of arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 262:175-193.
- Leist, T. P., Cobbold, S. P., Waldmann, H., Aguet, M. & Zinkernagel, R. M. (1987). Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J Immunol* 138 (7):2278-2281.
- Lesinski, G. B. & Westerink, M. A. (2001). Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J Microbiol Methods* 47 (2):135-149.
- Lewis, M. J., Malik, T. H., Ehrenstein, M. R., Boyle, J. J., Botto, M. & Haskard, D. O. (2009). Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 120 (5):417-426.
- Liang, T. J., Rehermann, B., Seeff, L. B. & Hoofnagle, J. H. (2000). Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Annals of Internal Medicine* 132 (4):296-305.
- Lin, M. Y., Selin, L. K. & Welsh, R. M. (2000). Evolution of the CD8 T-cell repertoire during infections. *Microbes Infect* 2 (9):1025-1039.
- Lindenbach, BD, Thiel, HJ & Rice, CM. (2007). Flaviviruses: the viruses and their replication. *Fields' Virology. DM Knipe and PM Howley, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia:1102–1152.*
- Liu, B. S., Woltman, A. M., Janssen, H. L. A. & Boonstra, A. (2009). Modulation of dendritic cell function by persistent viruses. *Journal of Leukocyte Biology* 85 (2):205-214.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B. & Wang, T. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83 (4):2011-2014.
- Logvinoff, C., Major, M. E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S. M., Alter, H., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (27):10149-10154.
- Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23 (9):1117-1125.
- Lopes-Carvalho, T. & Kearney, J. F. (2004). Development and selection of marginal zone B cells. *Immunological Reviews* 197:192-205.
- Lopez-Macias, C., Kalinke, U., Cascalho, M., Wabl, M., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. & 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.
- Lozach, P. Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foug, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F. & Altmeyer, R. (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 278 (22):20358-20366.
- Lozach, P. Y., Nobile, C., Altmeyer, R. & Schwartz, O. (2004). DC-SIGN: A multi-task viral receptor. *DC-SIGN: Un récepteur viral   large spectre* 8 (2):113-124.
- Luster, A. D., Alon, R. & von Andrian, U. H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6 (12):1182-1190.
- MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C. & Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194:8-18.
- Macpherson, A. J., Lamarre, A., McCoy, K., Harriman, G. R., Odermatt, B., Dougan, G., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (2001). IgA production without mu or delta chain expression in developing B cells. *Nat Immunol* 2 (7):625-631.

- Maeda, N., Watanabe, M., Okamoto, S., Kanai, T., Yamada, T., Hata, J., Hozumi, N., Katsume, A., Nuriya, H., Sandhu, J., Ishii, H., Kohara, M. & Hibi, T. (2004). Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone. *Liver Int* 24 (3):259-267.
- Maheshwari, A., Ray, S. & Thuluvath, P. J. (2008). Acute hepatitis C. *Lancet* 372 (9635):321-332.
- Major, Marian. (2009). Prophylactic and Therapeutic Vaccination against Hepatitis C Virus (HCV): Developments and Future Perspectives. *Viruses* 1 (2):144-165.
- Malkiel, S., Kuhlow, C. J., Mena, P. & Benach, J. L. (2009). The loss and gain of marginal zone and peritoneal B cells is different in response to relapsing fever and Lyme disease *Borrelia*. *J Immunol* 182 (1):498-506.
- Martin, F. & Kearney, J. F. (2000). B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev* 175:70-79.
- Martin, F. & Kearney, J. F. (2000). Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* 12 (1):39-49.
- Martin, F. & Kearney, J. F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 13 (2):195-201.
- Martin, F. & Kearney, J. F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2 (5):323-335.
- Martin, F., Oliver, A. M. & Kearney, J. F. (2001). Marginal zone and B1B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14 (5):617-629.
- Masmoudi, H., Mota-Santos, T., Huetz, F., Coutinho, A. & Cazenave, P. A. (1990). All T15 Id-positive antibodies (but not the majority of VHT15+ antibodies) are produced by peritoneal CD5+ B lymphocytes. *Int Immunol* 2 (6):515-520.
- Matloubian, M., Concepcion, R. J. & Ahmed, R. (1994). CD4(+) T-CELLS ARE REQUIRED TO SUSTAIN CD8(+) CYTOTOXIC T-CELL RESPONSES DURING CHRONIC VIRAL-INFECTION. *Journal of Virology* 68 (12):8056-8063.
- Matter, M., Odermatt, B., Yagita, H., Nuoffer, J. M. & Ochsenbein, A. F. (2006). Elimination of chronic viral infection by blocking CD27 signaling. *Journal of Experimental Medicine* 203 (9):2145-2155.
- Matter, M. S. & Ochsenbein, A. F. (2008). Natural antibodies target virus-antibody complexes to organized lymphoid tissue. *Autoimmunity Reviews* 7 (6):480-486.
- McGuire, K. L. & Vitetta, E. S. (1981). kappa/lambda Shifts do not occur during maturation of murine B cells. *J Immunol* 127 (4):1670-1673.
- McIntyre, T. M., Holmes, K. L., Steinberg, A. D. & Kastner, D. L. (1991). CD5+ peritoneal B cells express high levels of membrane, but not secretory, C mu mRNA. *J Immunol* 146 (10):3639-3645.
- McNally, J. M., Zarozinski, C. C., Lin, M. Y., Brehm, M. A., Chen, H. D. & Welsh, R. M. (2001). Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses. *J Virol* 75 (13):5965-5976.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1 (2):135-145.
- Mercer, David F., Schiller, Daniel E., Elliott, John F., Douglas, Donna N., Hao, Chunhai, Rinfret, Aline, Addison, William R., Fischer, Karl P., Churchill, Thomas A., Lakey, Jonathan R. T., Tyrrell, David L. J. & Kneteman, Norman M. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7 (8):927-933.
- Meunier, I. (2007). Contribution du Répertoire des Lymphocytes B-1 dans l'Induction d'une Réponse Antivirale, Virologie et Immunologie, Université du Québec - Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Canada.
- Meunier, J. C., Engle, R. E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S. U., Cosset, F. L., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2005). Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (12):4560-4565.

- Meyer, B. J., de la Torre, J. C. & Southern, P. J. (2002). Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 262:139-157.
- Meylan, E., Tschopp, J. & Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442 (7098):39-44.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S. & Bhan, A. K. (2002). Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 16 (2):219-230.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P., Ghersa, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J. M., Sa-Cunha, A. & Maurel, P. (2007). The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46 (3):411-419.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H. & Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* 7 (3):293-301.
- Montoya, M., Edwards, M. J., Reid, D. M. & Borrow, P. (2005). Rapid activation of spleen dendritic cell subsets following lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice: analysis of the involvement of type 1 IFN. *J Immunol* 174 (4):1851-1861.
- Moon, J. J., Chu, H. H., Hataye, J., Pagan, A. J., Pepper, M., McLachlan, J. B., Zell, T. & Jenkins, M. K. (2009). Tracking epitope-specific T cells. *Nat Protoc* 4 (4):565-581.
- Moon, J. J., Chu, H. H., Pepper, M., McSorley, S. J., Jameson, S. C., Kedl, R. M. & Jenkins, M. K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27 (2):203-213.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5 (6):453-463.
- Morris, D. L. & Rothstein, T. L. (1993). Abnormal transcription factor induction through the surface immunoglobulin M receptor of B-1 lymphocytes. *J Exp Med* 177 (3):857-861.
- Moser, M. & Leo, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine* 28 Suppl 3:C2-13.
- Moskophidis, D., Battegay, M., Bruendler, M. A., Laine, E., Gresser, I. & Zinkernagel, R. M. (1994). Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon. *J Virol* 68 (3):1951-1955.
- Moskophidis, D., Cobbold, S. P., 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. & Lehmann-Grube, F. (1984). The immune response of the mouse to lymphocytic choriomeningitis virus. IV. Enumeration of antibody-producing cells in spleens during acute and persistent infection. *J Immunol* 133 (6):3366-3370.
- Mosley, J. W., Operskalski, E. A., Tobler, L. H., Buskell, Z. J., Andrews, W. W., Phelps, B., Dockter, J., Giachetti, C., Seeff, L. B. & Busch, M. P. (2008). The course of hepatitis C viraemia in transfusion recipients prior to availability of antiviral therapy. *J Viral Hepat* 15 (2):120-128.
- Muller, S., Hunziker, L., Enzler, S., Buhler-Jungo, M., Di Santo, J. P., Zinkernagel, R. M. & Mueller, C. (2002). Role of an intact splenic microarchitecture in early lymphocytic choriomeningitis virus production. *J Virol* 76 (5):2375-2383.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. & Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264 (5167):1918-1921.
- Murakami, M., Yoshioka, H., Shirai, T., Tsubata, T. & Honjo, T. (1995). Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells. *Int Immunol* 7 (5):877-882.

- Murali-Krishna, K., Altman, J. D., Suresh, M., Sourdive, D. J., Zajac, A. J., Miller, J. D., Slansky, J. & Ahmed, R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8 (2):177-187.
- Nemazee, D. (2000). Receptor editing in B cells. *Adv Immunol* 74:89-126.
- Netski, D. M., Mosbrugger, T., Depla, E., Maertens, G., Ray, S. C., Hamilton, R. G., Roundtree, S., Thomas, D. L., McKeating, J. & Cox, A. (2005). Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 41 (5):667-675.
- Neuberger, M. S. & Milstein, C. (1995). Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 7 (2):248-254.
- Nguyen, L. T., Bachmann, M. F. & Ohashi, P. S. (2002). Contribution of LCMV transgenic models to understanding T lymphocyte development, activation, tolerance, and autoimmunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:119-143.
- Noad, R. & Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol* 11 (9):438-444.
- Notley, C. A., Baker, N. & Ehrenstein, M. R. (2010). Secreted IgM enhances B cell receptor signaling and promotes splenic but impairs peritoneal B cell survival. *J Immunol* 184 (7):3386-3393.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198:249-266.
- O'Brien, A. D., Scher, I., Campbell, G. H., MacDermott, R. P. & Formal, S. B. (1979). Susceptibility of CBA/N mice to infection with *Salmonella typhimurium*: influence of the X-linked gene controlling B lymphocyte function. *J Immunol* 123 (2):720-724.
- O'Garra, A., Chang, R., Go, N., Hastings, R., Houghton, G. & Howard, M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 22 (3):711-717.
- O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L. & von Andrian, U. H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 7 (5):507-516.
- Obar, J. J., Khanna, K. M. & Lefrancois, L. (2008). Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28 (6):859-869.
- Ochsenbein, A. F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286 (5447):2156-2159.
- Ochsenbein, A. F., Pinschewer, D. D., Odermatt, B., Carroll, M. C., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1999). Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *J Exp Med* 190 (8):1165-1174.
- Ochsenbein, A. F., Pinschewer, D. D., Sierro, S., Horvath, E., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (2000). Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (24):13263-13268.
- Ochsenbein, A. F. & Zinkernagel, R. M. (2000). Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunology Today* 21 (12):624-630.
- Odermatt, B., Eppler, M., Leist, T. P., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (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, M. B. (2006). Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology* 344 (1):111-118.
- Orange, J. S. & Biron, C. A. (1996). An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol* 156 (3):1138-1142.
- Owsianka, A., Clayton, R. F., Loomis-Price, L. D., McKeating, J. A. & Patel, A. H. (2001). Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Gen Virol* 82 (Pt 8):1877-1883.

- Oxenius, A., Campbell, K. A., Maliszewski, C. R., Kishimoto, T., Kikutani, H., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. & Bachmann, M. F. (1996). CD40-CD40 ligand interactions are critical in T-B cooperation but not for other anti-viral CD4+ T cell functions. *J Exp Med* 183 (5):2209-2218.
- Papavasiliou, F., Casellas, R., Suh, H., Qin, X. F., Besmer, E., Pelanda, R., Nemazee, D., Rajewsky, K. & Nussenzweig, M. C. (1997). V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science* 278 (5336):298-301.
- Pape, K. A., Kearney, E. R., Khoruts, A., Mondino, A., Merica, R., Chen, Z. M., Ingulli, E., White, J., Johnson, J. G. & Jenkins, M. K. (1997). Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo. *Immunol Rev* 156:67-78.
- Pasare, C. & Medzhitov, R. (2005). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 560:11-18.
- Pearlman, B. L. (2004). Hepatitis C treatment update. *Am J Med* 117 (5):344-352.
- Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R. M., Nemazee, D. & Rajewsky, K. (1997). Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity* 7 (6):765-775.
- Peng, Y., Kowalewski, R., Kim, S. & Elkon, K. B. (2005). The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Mol Immunol* 42 (7):781-787.
- Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Bläse, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F. L., Patel, A. H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., Rispeter, K., Blum, H. E., Roggendorf, M. & Baumert, T. F. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (14):6025-6030.
- Pfizenmaier, K., Trostmann, H., Rollinghoff, M. & Wagner, H. (1975). Temporary presence of self-reactive cytotoxic T lymphocytes during murine lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 258 (5532):238-240.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282 (5390):938-941.
- Pillai, S., Cariappa, A. & Moran, S. T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23:161-196.
- Pinet, V., Malnati, M. S. & Long, E. O. (1994). Two processing pathways for the MHC class II-restricted presentation of exogenous influenza virus antigen. *J Immunol* 152 (10):4852-4860.
- Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1989). Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342 (6249):559-561.
- Pircher, H., Michalopoulos, E. E., Iwamoto, A., Ohashi, P. S., Baenziger, J., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. & Mak, T. W. (1987). Molecular analysis of the antigen receptor of virus-specific cytotoxic T cells and identification of a new V alpha family. *Eur J Immunol* 17 (12):1843-1846.
- Planz, O., Seiler, P., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1996). Specific cytotoxic T cells eliminate B cells producing virus-neutralizing antibodies [corrected]. *Nature* 382 (6593):726-729.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. & Rice, C. M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457 (7231):882-886.
- Poccia, F., Agrati, C., Martini, F., Capobianchi, M. R., Wallace, M. & Malkovsky, M. (2005). Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect* 7 (3):518-528.
- Pooley, J. L., Heath, W. R. & Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J. Immunol.* 166:5327-5330.

- Pozzi, L. A., Maciaszek, J. W. & Rock, K. L. (2005). Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J Immunol* 175 (4):2071-2081.
- Racine, R. & Winslow, G. M. (2009). IgM in microbial infections: Taken for granted? *Immunology Letters* 125 (2):79-85.
- Radziewicz, H., Ibegbu, C. C., Fernandez, M. L., Workowski, K. A., Obideen, K., Wehbi, M., Hanson, H. L., Steinberg, J. P., Masopust, D., Wherry, E. J., Altman, J. D., Rouse, B. T., Freeman, G. J., Ahmed, R. & Grakoui, A. (2007). Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *Journal of Virology* 81 (6):2545-2553.
- Radziewicz, H., Ibegbu, C. C., Hon, H. M., Osborn, M. K., Obideen, K., Wehbi, M., Freeman, G. J., Lennox, J. L., Workowski, K. A., Hanson, H. L. & Grakoui, A. (2008). Impaired Hepatitis C Virus (HCV)-Specific Effector CD8(+) T Cells Undergo Massive Apoptosis in the Peripheral Blood during Acute HCV Infection and in the Liver during the Chronic Phase of Infection. *Journal of Virology* 82 (20):9808-9822.
- Rahemtulla, A., Fung-Leung, W. P., Schilham, M. W., Kundig, T. M., Sambhara, S. R., Narendran, A., Arabian, A., Wakeham, A., Paige, C. J., Zinkernagel, R. M. & et al. (1991). Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353 (6340):180-184.
- Rahman, F., Heller, T., Sobao, Y., Mizukoshi, E., Nascimbeni, M., Alter, H., Herrine, S., Hoofnagle, J., Liang, T. J. & Rehermann, B. (2004). Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C. *Hepatology* 40 (1):87-97.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381 (6585):751-758.
- Rapaka, R. R., Ricks, D. M., Alcorn, J. F., Chen, K., Khader, S. A., Zheng, M., Plevy, S., Bengten, E. & Kolls, J. K. (2010). Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina*. *J Exp Med* 207 (13):2907-2919.
- Raue, H. P. & Slifka, M. K. (2009). CD8+ T cell immunodominance shifts during the early stages of acute LCMV infection independently from functional avidity maturation. *Virology* 390 (2):197-204.
- Razvi, E. S. & Welsh, R. M. (1995). Apoptosis in viral infections. *Adv Virus Res* 45:1-60.
- Recher, M., Lang, K. S., Hunziker, L., Freigang, S., Eschli, B., Harris, N. L., Navarini, A., Senn, B. M., Fink, K., Lotscher, M., Hangartner, L., Zellweger, R., Hersberger, M., Theodorides, A., Hangartner, H. & Zinkernagel, R. M. (2004). Deliberate removal of T cell help improves virus-neutralizing antibody production. *Nat Immunol* 5 (9):934-942.
- Rehermann, B. (2009). Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: A tale of coevolution and coexistence. *Journal of Clinical Investigation* 119 (7):1745-1754.
- Rolan, H. G., Xavier, M. N., Santos, R. L. & Tsois, R. M. (2009). Natural Antibody Contributes to Host Defense against an Attenuated *Brucella abortus* virB Mutant. *Infection and Immunity* 77 (7):3004-3013.
- Rosado, M. M., Aranburu, A., Capolunghi, F., Giorda, E., Cascioli, S., Cenci, F., Petrini, S., Miller, E., Leanderson, T., Bottazzo, G. F., Natali, P. G. & Carsetti, R. (2009). From the fetal liver to spleen and gut: The highway to natural antibody. *Mucosal Immunology* 2 (4):351-361.
- Rouse, B. T. & Sehrawat, S. (2010). Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat Rev Immunol* 10 (7):514-526.
- Rowe, W. P., Murphy, F. A., Bergold, G. H., Casals, J., Hotchin, J., Johnson, K. M., Lehmann-Grube, F., Mims, C. A., Traub, E. & Webb, P. A. (1970). Arenoviruses: proposed name for a newly defined virus group. *J Virol* 5 (5):651-652.

- Rubtsov, A. V., Swanson, C. L., Troy, S., Strauch, P., Pelanda, R. & Torres, R. M. (2008). TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses. *J Immunol* 180 (6):3882-3888.
- Sakamoto, N., Shibuya, K., Shimizu, Y., Yotsumoto, K., Miyabayashi, T., Sakano, S., Tsuji, T., Nakayama, E., Nakauchi, H. & Shibuya, A. (2001). A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues. *Eur J Immunol* 31 (5):1310-1316.
- Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W. N., Konieczny, B. T., Subramaniam, S. & Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* 205 (3):625-640.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21 (19):5017-5025.
- Schelonka, R. L., Tanner, J., Zhuang, Y., Gartland, G. L., Zemlin, M. & Schroeder, H. W., Jr. (2007). Categorical selection of the antibody repertoire in splenic B cells. *Eur J Immunol* 37 (4):1010-1021.
- Schelonka, R. L., Zemlin, M., Kobayashi, R., Ippolito, G. C., Zhuang, Y., Gartland, G. L., Szalai, A., Fujihashi, K., Rajewsky, K. & Schroeder, H. W., Jr. (2008). Preferential use of DH reading frame 2 alters B cell development and antigen-specific antibody production. *J Immunol* 181 (12):8409-8415.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. & Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393 (6684):480-483.
- Schulze zur Wiesch, J., Lauer, G. M., Day, C. L., Kim, A. Y., Ouchi, K., Duncan, J. E., Wurcel, A. G., Timm, J., Jones, A. M., Mothe, B., Allen, T. M., McGovern, B., Lewis-Ximenez, L., Sidney, J., Sette, A., Chung, R. T. & Walker, B. D. (2005). Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 175 (6):3603-3613.
- Seeff, L. B. (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36 (5 Suppl 1):S35-46.
- Selin, L. K., Lin, M. Y., Kraemer, K. A., Pardoll, D. M., Schneck, J. P., Varga, S. M., Santolucito, P. A., Pinto, A. K. & Welsh, R. M. (1999). Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses. *Immunity* 11 (6):733-742.
- Semmo, N., Krashias, G., Willberg, C. & Klenerman, P. (2007). Analysis of the relationship between cytokine secretion and proliferative capacity in hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 14 (7):492-502.
- Semmo, N., Lucas, M., Krashias, G., Lauer, G., Chapel, H. & Klenerman, P. (2006). Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy. *Blood* 107 (11):4570-4571.
- Sevilla, N., Kunz, S., Holz, A., Lewicki, H., Homann, D., Yamada, H., Campbell, K. P., de La Torre, J. C. & Oldstone, M. B. (2000). Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J Exp Med* 192 (9):1249-1260.
- Sevilla, N., Kunz, S., McGavern, D. & Oldstone, M. B. (2003). Infection of dendritic cells by lymphocytic choriomeningitis virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 276:125-144.
- Shaw, P. X., Goodyear, C. S., Chang, M. K., Witztum, J. L. & Silverman, G. J. (2003). The autoreactivity of anti-phosphorylcholine antibodies for atherosclerosis-associated neo-antigens and apoptotic cells. *J Immunol* 170 (12):6151-6157.
- Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroshima, T., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., Endo, Y., Fujita, T., Miyabayashi, T., Sakano, S., Tsuji, T., Nakayama, E., Phillips, J. H., Lanier, L. L. & Nakauchi, H. (2000). Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol* 1 (5):441-446.

- Shima, H., Takatsu, H., Fukuda, S., Ohmae, M., Hase, K., Kubagawa, H., Wang, J. Y. & Ohno, H. (2010). Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *Int Immunol* 22 (3):149-156.
- Shin, H. & Wherry, E. J. (2007). CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Current Opinion in Immunology* 19 (4):408-415.
- Shoukry, N. H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D. Y., Ghayeb, J., Reimann, K. A. & Walker, C. M. (2003). Memory CD8(+) T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine* 197 (12):1645-1655.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J. & Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42 (4):962-973.
- Slifka, M. K. (2002). Mechanisms of humoral immunity explored through studies of LCMV infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:67-81.
- Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K. & Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8 (3):363-372.
- Slifka, M. K., Matloubian, M. & Ahmed, R. (1995). Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol* 69 (3):1895-1902.
- Smelt, S. C., Borrow, P., Kunz, S., Cao, W., Tishon, A., Lewicki, H., Campbell, K. P. & Oldstone, M. B. (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, C. M. (2004). Cognate CD4+ T cell licensing of dendritic cells in CD8+ T cell immunity. *Nature Immunol.* 5:1143-1148.
- Smyk-Pearson, S., Tester, I. A., Lezotte, D., Sasaki, A. W., Lewinsohn, D. M. & Rosen, H. R. (2006). Differential antigenic hierarchy associated with spontaneous recovery from hepatitis C virus infection: Implications for vaccine design. *Journal of Infectious Diseases* 194 (4):454-463.
- Solvason, N. & Kearney, J. F. (1992). The human fetal omentum: a site of B cell generation. *J Exp Med* 175 (2):397-404.
- Stager, S., Alexander, J., Kirby, A. C., Botto, M., Van Rooijen, N., Smith, D. F., Brombacher, F. & Kaye, P. M. (2003). Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8(+) T-cell responses. *Nature Medicine* 9 (10):1287-1292.
- Stall, A. M., Adams, S., Herzenberg, L. A. & Kantor, A. B. (1992). Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Ann N Y Acad Sci* 651:33-43.
- Sun, J. C., Lopez-Verges, S., Kim, C. C., DeRisi, J. L. & Lanier, L. L. (2011). NK cells and immune "memory". *J Immunol* 186 (4):1891-1897.
- Sun, J. C., Williams, M. A. & Bevan, M. J. (2004). CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5 (9):927-933.
- Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S. & Fagarasan, S. (2010). Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity. *Immunol Rev* 237 (1):180-190.
- Tarr, A. W., Owsianka, A. M., Jayaraj, D., Brown, R. J., Hickling, T. P., Irving, W. L., Patel, A. H. & Ball, J. K. (2007). Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J Gen Virol* 88 (Pt 11):2991-3001.
- Taylor, L. D., Carmack, C. E., Huszar, D., Higgins, K. M., Mashayekh, R., Sequar, G., Schramm, S. R., Kuo, C. C., O'Donnell, S. L., Kay, R. M. & et al. (1994). Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *Int Immunol* 6 (4):579-591.

- Taylor, L. D., Carmack, C. E., Schramm, S. R., Mashayekh, R., Higgins, K. M., Kuo, C. C., Woodhouse, C., Kay, R. M. & Lonberg, N. (1992). A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins. *Nucleic Acids Res* 20 (23):6287-6295.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H. & Chisari, F. V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24):15661-15668.
- Thimme, R., Lohmann, V. & Weber, F. (2006). A target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Research* 69 (3):129-141.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C. & Chisari, F. V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine* 194 (10):1395-1406.
- Thomas, D. L., Astemborski, J., Vlahov, D., Strathdee, S. A., Ray, S. C., Nelson, K. E., Galai, N., Nolt, K. R., Laeyendecker, O. & Todd, J. A. (2000). Determinants of the quantity of hepatitis C virus RNA. *J Infect Dis* 181 (3):844-851.
- Timm, J., Lauer, G. M., Kavanagh, D. G., Sheridan, I., Kim, A. Y., Lucas, M., Pillay, T., Ouchi, K., Reyor, L. L., zur Wiesch, J. S., Gandhi, R. T., Chung, R. T., Bhardwaj, N., Klenerman, P., Walker, B. D. & Allen, T. M. (2004). CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *Journal of Experimental Medicine* 200 (12):1593-1604.
- Tishon, A., Lewicki, H., Rall, G., Von Herrath, M. & Oldstone, M. B. (1995). An essential role for type 1 interferon-gamma in terminating persistent viral infection. *Virology* 212 (1):244-250.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302 (5909):575-581.
- Traub, E. (1936). Persistence of Lymphocytic Choriomeningitis Virus in Immune Animals and Its Relation to Immunity. *J Exp Med* 63 (6):847-861.
- Traub, E. (1939). Epidemiology of Lymphocytic Choriomeningitis in a Mouse Stock Observed for Four Years. *J Exp Med* 69 (6):801-817.
- Tsai, S. L., Liaw, Y. F., Chen, M. H., Huang, C. Y. & Kuo, G. C. (1997). Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: Implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 25 (2):449-458.
- Tumang, J. R., Frances, R., Yeo, S. G. & Rothstein, T. L. (2005). Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. *J Immunol* 174 (6):3173-3177.
- Urbani, S., Amadei, B., Fiscaro, P., Tola, D., Orlandini, A., Sacchelli, L., Mori, C., Missale, G. & Ferrari, C. (2006). Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 44 (1):126-139.
- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G. & Ferrari, C. (2006). PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 80 (22):11398-11403.
- Urbani, S., Boni, C., Missale, G., Elia, G., Cavallo, C., Massari, M., Raimondo, G. & Ferrari, C. (2002). Virus-specific CD8(+) lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *Journal of Virology* 76 (24):12423-12434.
- Vale, A. M., Tanner, J. M., Schelonka, R. L., Zhuang, Y., Zemlin, M., Gartland, G. L. & Schroeder, H. W., Jr. (2010). The peritoneal cavity B-2 antibody repertoire appears to reflect many of the same selective pressures that shape the B-1a and B-1b repertoires. *J Immunol* 185 (10):6085-6095.
- Varga, S. M. & Welsh, R. M. (1998). Detection of a high frequency of virus-specific CD4+ T cells during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* 161 (7):3215-3218.
- Villadangos, Jose A. & Schnorrer, Petra. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7 (7):543-555.

- Virgin, H. W., Wherry, E. J. & Ahmed, R. (2009). Redefining Chronic Viral Infection. *Cell* 138 (1):30-50.
- Vollmers, H. P. & Brandlein, S. (2006). Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev* 58 (5-6):755-765.
- Vollmers, H. P. & Brandlein, S. (2009). Natural antibodies and cancer. *New Biotechnology* 25 (5):294-298.
- von Hahn, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehmann, B., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2007). Hepatitis C Virus Continuously Escapes From Neutralizing Antibody and T-Cell Responses During Chronic Infection In Vivo. *Gastroenterology* 132 (2):667-678.
- von Herrath, M. G., Yokoyama, M., Dockter, J., Oldstone, M. B. & Whitton, J. L. (1996). CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol* 70 (2):1072-1079.
- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M. & Mond, J. J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* 176:154-170.
- Walker, C. M. (2010). Adaptive immunity to the hepatitis C virus. *Adv Virus Res* 78:43-86.
- Wallick, S., Claflin, J. L. & Briles, D. E. (1983). Resistance to *Streptococcus pneumoniae* is induced by a phosphocholine-protein conjugate. *J Immunol* 130 (6):2871-2875.
- Walsh, C. M., Matloubian, M., Liu, C. C., Ueda, R., Kurahara, C. G., Christensen, J. L., Huang, M. T., Young, J. D., Ahmed, R. & Clark, W. R. (1994). Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (23):10854-10858.
- Watanabe, N., Ikuta, K., Fagarasan, S., Yazumi, S., Chiba, T. & Honjo, T. (2000). Migration and differentiation of autoreactive B-1 cells induced by activated gamma/delta T cells in antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *J Exp Med* 192 (11):1577-1586.
- Wells, S. M., Kantor, A. B. & Stall, A. M. (1994). CD43 (S7) expression identifies peripheral B cell subsets. *J Immunol* 153 (12):5503-5515.
- Welsh, R. M., Jr. & Zinkernagel, R. M. (1977). Heterospecific cytotoxic cell activity induced during the first three days of acute lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice. *Nature* 268 (5621):646-648.
- Wen, L., Brill-Dashoff, J., Shinton, S. A., Asano, M., Hardy, R. R. & Hayakawa, K. (2005). Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen. *Immunity* 23 (3):297-308.
- Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Van Der Most, R. & Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *Journal of Virology* 77 (8):4911-4927.
- Wherry, E. J., Ha, S. J., Kaech, S. M., Haining, W. N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J. N., Barber, D. L. & Ahmed, R. (2007). Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27 (4):670-684.
- Wilson, N. S. & Villadangos, J. A. (2005). Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv. Immunol.* 86:241-305.
- Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Sauter, B., Li, H. L., Steinman, R. M. & Choi, Y. (1997). TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 186 (12):2075-2080.
- Wu, G. Y., Konishi, M., Walton, C. M., Olive, D., Hayashi, K. & Wu, C. H. (2005). A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* 128 (5):1416-1423.
- Xu, J. L. & Davis, M. M. (2000). Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13 (1):37-45.

- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M. & Tedder, T. F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28 (5):639-650.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Matsushita, T., Tsubata, T. & Tedder, T. F. (2009). The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol* 182 (12):7459-7472.
- Yang, M., Sun, L., Wang, S., Ko, K. H., Xu, H., Zheng, B. J., Cao, X. & Lu, L. (2010). Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. *J Immunol* 184 (7):3321-3325.
- Yang, Y., Tung, J. W., Ghosn, E. E. B. & Herzenberg, L. A. (2007). Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (11):4542-4546.
- Yerly, D., Heckerman, D., Allen, T. M., Chisholm, J. V., Faircloth, K., Linde, C. H., Frahm, N., Timm, J., Pichler, W. J., Cerny, A. & Brander, C. (2008). Increased cytotoxic T-lymphocyte epitope variant cross-recognition and functional avidity are associated with hepatitis C virus clearance. *Journal of Virology* 82 (6):3147-3153.
- Yokoyama, W. M. (2005). Specific and non-specific natural killer cell responses to viral infection. *Adv Exp Med Biol* 560:57-61.
- Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J. D., Suresh, M., Altman, J. D. & Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *Journal of Experimental Medicine* 188 (12):2205-2213.
- Zeisel, M. B., Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Barth, H., Stoll-Keller, F., Doffo, M. & Baumert, T. F. (2007). Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology* 13 (36):4824-4830.
- Zhou, Z. H., Zhang, Y., Hu, Y. F., Wahl, L. M., Cisar, J. O. & Notkins, A. L. (2007). The Broad Antibacterial Activity of the Natural Antibody Repertoire Is Due to Polyreactive Antibodies. *Cell Host and Microbe* 1 (1):51-61.
- Zimmerman, C., Brduscha-Riem, K., Blaser, C., Zinkernagel, R. M. & Pircher, H. (1996). Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *J Exp Med* 183 (4):1367-1375.
- Zinkernagel, R. M. (2002). Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:1-5.
- Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 27:51-177.
- Zinkernagel, R. M., Ehl, S., Aichele, P., Oehen, S., Kundig, T. & Hengartner, H. (1997). Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev* 156:199-209.