

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

Rôle du complément, de concert avec les anticorps naturels, dans les étapes précoces d'infections virales

Par

MARIE-PIERRE LANGLOIS

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Simona Stäger
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Jacques Thibodeau
Département de microbiologie et
immunologie
Université de Montréal

Directeur de recherche

Alain Lamarre
INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

À travers le monde, plus de 500 millions de personnes sont affectées par des infections virales chroniques. Parmi celles-ci, on dénote celle causée par le virus de l'hépatite C (VHC). L'infection par le VHC se démarque des autres infections virales persistantes puisque 20 à 25 % des personnes infectées arrivent à éliminer le virus alors que, la majorité des patients vont développer une infection chronique. Les mécanismes expliquant ce phénomène ne sont pas encore bien connus. Cependant, plusieurs études ont permis de démontrer que l'interaction entre le système immunitaire inné et adaptatif était importante pour le développement d'une réponse immunitaire spécifique efficace.

Les anticorps naturels, que l'on retrouve dans la circulation sanguine d'individus sains, représentent des effecteurs importants du système immunitaire inné. Le rôle majeur attribué aux anticorps naturels est de reconnaître les pathogènes dans les étapes précoces d'une infection. Dans notre laboratoire, il a été démontré qu'un répertoire d'anticorps naturels plus diversifié permettait un recrutement plus efficace des particules virales à la rate et le développement d'un nombre plus élevé de lymphocytes T spécifiques au virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Bref, en formant des complexes avec les pathogènes, ces anticorps participent à l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Cependant, le rôle du complément dans ce processus est encore inconnu.

Des souris ayant des répertoires en anticorps naturels différents ont été décomplémentées et infectées par la suite avec LCMV ou VSV (virus de la stomatite vésiculaire). Les titres viraux obtenus à la rate étaient similaires chez les souris décomplémentées par rapport aux souris témoins. Chez les souris possédant un répertoire plus diversifié en anticorps naturels, aucune différence significative n'a été observée au niveau de la production d'interféron alpha (IFN- α), de la présentation antigénique et de l'induction de la réponse immunitaire cellulaire. Cependant, une légère diminution en anticorps neutralisants a été observée chez les souris décomplémentées. Chez les souris possédant un répertoire moins diversifié en anticorps naturels, une augmentation de la production d'IFN- α , de la présentation antigénique et de l'induction de la réponse immunitaire adaptative a été observée chez les souris décomplémentées. Nos résultats suggèrent donc des rôles opposés pour le complément en présence ou en absence d'anticorps naturels. Les mécanismes sous-jacents à ce phénomène pourraient contribuer à notre meilleure compréhension de l'élimination du VHC chez l'homme.



MARIE-PIERRE LANGLOIS



ALAIN LAMARRE

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Alain Lamarre de m'avoir non seulement accueilli dans son laboratoire de recherche, mais aussi pour son écoute, ses conseils et de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès et conférences qui furent très enrichissants tout au long de ma maîtrise.

Un autre énorme merci à Esther Tarrab pour ses nombreux conseils pour mon projet, les tétramères, ainsi que l'aide pour tous les équipements de laboratoire ! Un autre énorme merci à Pascal Lapierre pour ses NOMBREUX conseils, mais aussi sans qui le FACSFortessa et FlowJo n'auraient pas été aussi « user friendly » !

Merci aussi à tous les membres du laboratoire, Marie-Ève, Valérie, Matthieu, Pascal et Tania ainsi que les membres du laboratoire Talbot, Mathieu, Élodie, Dominique, Marc et Hélène d'avoir fait de mon séjour dans la métropole une expérience inoubliable ! ☺ Un merci plus particulier à Marie-Ève et Valérie pour m'avoir non seulement aidée dans mes grosses expériences, mais aussi pour toutes les discussions du matin/midi/soir et de m'avoir permis de potiner et de me mériter le surnom de FoxNews ! ☺ Un autre merci à Tania qui a dû me supporter en tant que stagiaire le temps d'un été et d'avoir pris le temps de bien me former.

Un autre énorme remerciement au programme Apprentis en Biosciences qui m'a permis d'être marraine de trois jeunes extraordinaires ! Merci aussi à ma stagiaire Audrey pour toute l'aide qu'elle m'a apportée au cours de l'été 2012 pour mettre fin à mes dernières expérimentations !

Un dernier merci à mon amoureux qui a dû faire de nombreux allez-retour entre Québec et Montréal les fins de semaine et à ma famille et mes amis pour m'avoir supporté tout au long de ma formation.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
INTRODUCTION.....	1
<i>Chapitre 1</i>	5
<i>Revue de littérature</i>	5
1.1 Immunité innée	6
1.1.1 Anticorps naturels	6
1.1.1.1 Caractéristiques.....	6
1.1.1.2 Origine	7
1.1.1.3 Rôles	8
1.1.2 Système du complément	11
1.1.2.1 Caractéristiques et origine	11
1.1.2.2 Voies d'activation	12
1.1.2.2.1 Voie classique	12
1.1.2.2.2 Voie alternative	12
1.1.2.2.3 Voie des lectines.....	13
1.1.2.2.4 Clivage du C3 et formation du complexe d'attaque membranaire (CAM).....	13
1.1.2.2.5 Voie indépendante du C3	14
1.1.2.2.6 Régulateurs et récepteurs du système du complément	14
1.1.2.3 Rôles	16
1.1.2.4 Mutations, déficiences génétiques et maladies associées.....	18

1.1.3	Interféron de type I (IFN-I)	19
1.1.3.1	Caractéristiques et origine	20
1.1.3.2	Rôles	20
1.2	Présentation antigénique	21
1.2.1	Présentation par le CMH classe I	23
1.2.2	Présentation par le CMH classe II	23
1.2.3	Présentation croisée	24
1.3	Immunité adaptative	26
1.3.1	Réponse humorale	26
1.3.1.1	Le système du complément dans la réponse humorale	29
1.3.2	Réponse cellulaire	30
1.3.2.1	Le système du complément dans la réponse cellulaire	32
1.4	Infections virales persistantes	34
1.4.1	Virus de l'hépatite C	34
1.4.1.1	Agent étiologique	35
1.4.1.2	Réponse immunitaire contre le VHC.....	37
1.4.1.3	Évasion du VHC au système immunitaire.....	39
1.4.1.4	Modèles d'étude pour le VHC	41
1.5	Outils utilisés	44
1.5.1	Modèles viraux murins	44
1.5.1.1	Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)	44
1.5.1.1.1	Agent étiologique.....	44
1.5.1.1.2	Réponse immunitaire contre LCMV.....	46
1.5.1.1.3	Le complément et les anticorps naturels dans la réponse contre LCMV	49
1.5.1.2	Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)	49
1.5.1.2.1	Agent étiologique	49
1.5.1.2.2	Réponse immunitaire contre VSV.....	51

1.5.1.2.3	Le complément et les anticorps naturels dans la réponse contre VSV	52
1.5.2	Souches de souris	53
1.5.2.1	C57Bl/6	53
1.5.2.2	Quasi monoclonale (QM)	54
1.5.2.3	HC1	54
1.5.2.4	J _H T (J _H ^{-/-})	55
1.5.2.5	P14.....	55
1.5.3	Facteur de venin de cobra (CVF)	56
1.6	Hypothèse de travail	56
1.7	Objectifs du projet de recherche	57
Chapitre 2	58
Matériel et méthodes	58
2.1	Lignées cellulaires	59
2.2	Manipulation des virus	60
2.2.1	Production virale	60
2.2.1.1	Production du LCMV sérotype WE.....	60
2.2.1.2	Production du VSV sérotype Indiana (IND)	60
2.2.2	Titrage viral.....	61
2.2.2.1	LCMV-WE.....	61
2.2.2.2	VSV-IND	62
2.2.3	Purification des virus LCMV-WE et VSV-IND	63
2.2.4	Décomplémentation des souris	63
2.2.5	Infection des souris	64
2.2.5.1	Par LCMV-WE	64
2.2.5.2	Par VSV-IND	64
2.3	Liaison des IgM naturels aux virus par ELISA	64
2.4	Détection de la molécule C3 du complément par ELISA.....	65
2.5	Analyse de la réponse immunitaire précoce.....	66

2.5.1	Dosage des virus à la rate par titrage.....	66
2.5.1.1	Titration de VSV-IND	66
2.5.1.2	Titration de LCMV-WE.....	66
2.5.2	Dosage par ELISA d'IFN- α	68
2.5.3	Présentation antigénique par les cellules dendritiques aux lymphocytes T spécifiques au LCMV	68
2.5.3.1	Niveau d'activation des cellules dendritiques par cytométrie en flux.....	69
2.5.3.2	Purification des DCs et LT CD8+	69
2.6	Analyse de la réponse immunitaire adaptative	71
2.6.1	Analyse de la réponse humorale.....	71
2.6.1.1	Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-VSV	71
2.6.1.2	Survie des souris.....	72
2.6.2	Analyse de la réponse cellulaire par cytométrie en flux	72
2.6.2.1	Quantification du niveau d'activation des cellules T.....	72
2.6.2.2	Quantification des cellules T activées spécifiques au virus.....	73
2.6.2.3	Quantification de la fonctionnalité des cellules T spécifiques activées <i>ex vivo</i>	73
2.6.2.3.1	Sécrétion de cytokines antivirales	73
2.6.2.3.2	Potentiel cytotoxique	74
2.7	Analyse statistique	74
Chapitre 3	75
Résultats	75
3.1	Caractérisation des outils utilisés	76
3.1.1	Liaison des IgM naturels des différentes souches de souris au LCMV et au VSV purifiés	76
3.1.2	Quantification du taux de C3 chez les différentes souris naïves.....	77
3.1.3	Cinétique de décomplémentation des souris	78
3.2	Impact du système du complément et d'un répertoire diversifié en anticorps naturels sur l'induction de la réponse immunitaire précoce.....	79
3.2.1	Recrutement du LCMV et du VSV à la rate.....	79
3.2.2	Quantification de l'IFN- α produit suite à l'infection	81

3.2.3 Présentation antigénique <i>ex vivo</i> des cellules dendritiques aux lymphocytes T CD8+.....	83
3.3 Impact du système du complément et d'un répertoire diversifié en anticorps naturels sur l'induction de la réponse humorale.....	88
3.3.1 Titres en anticorps neutralisants contre VSV.....	88
3.3.2 Survie des souris suite à l'infection par VSV.....	90
3.4 Impact du système du complément et d'un répertoire diversifié en anticorps naturels sur l'induction de la réponse cellulaire.....	91
3.4.1 Expression de marqueur d'activation à la surface des lymphocytes T CD8+ lors d'une infection par LCMV.....	91
3.4.2 Quantification des lymphocytes T CD8+ spécifiques au virus.....	93
3.4.3 Potentiel cytotoxique des lymphocytes T CD8+ <i>ex vivo</i>	95
3.4.4 Capacité des lymphocytes T CD8+ à sécréter des cytokines antivirales <i>ex vivo</i>	96
Chapitre 4.....	100
Discussion.....	100
4.1 Les souris C57Bl/6 et QM possèdent la plus grande diversité de répertoire en IgM naturels	101
4.2 Impact du système du complément et d'un répertoire diversifié en anticorps naturels sur l'induction de la réponse immunitaire précoce.....	102
4.2.1 L'absence du système du complément n'affecte pas le recrutement des différents virus à la rate.....	102
4.2.2 En présence d'un répertoire peu ou pas diversifié en anticorps naturels, l'absence de complément favorise la production d'IFN- α suite à l'infection par LCMV et VSV.....	103
4.2.3 En présence d'un répertoire peu ou pas diversifié en anticorps naturels, l'absence de complément favorise l'activation des cellules dendritiques splénique et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD8+ spécifiques.....	104
4.3 Rôles opposés pour le système du complément dans l'induction de la réponse humorale et cellulaire.....	106
4.3.1 L'absence du système du complément chez les souris C57Bl/6 et QM diminue leur capacité à produire des anticorps neutralisants contre VSV, mais protège les souris HC1 et J _H T contre l'infection par VSV.....	107
4.3.2 Rôles opposés pour le système du complément selon la diversité du répertoire en anticorps naturels pour l'activation, la spécificité ainsi que la fonctionnalité des LT CD8+ suite à l'infection par LCMV.....	108
Chapitre 5.....	111
Conclusion et Perspectives.....	111
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les récepteurs et les régulateurs du système du complément.....	16
Tableau 2: Résumé des résultats obtenus lors des différentes expériences en absence du système du complément.	99

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les rôles des anticorps naturels dans la réponse contre les pathogènes.	10
Figure 2. Les différentes voies d'activation menant aux multiples rôles du système du complément.....	15
Figure 3. Les différentes voies de présentation antigénique.	22
Figure 4. Classes de Lymphocytes B et réponse en anticorps associée.	28
Figure 5. Le rôle de la composante C3d du complément dans l'activation des cellules B.	30
Figure 6. L'organisation du génome et la structure de la particule virale du VHC.....	36
Figure 7. Structure de la particule virale du LCMV et image en microscopie électronique des virions.	45
Figure 8. Réponses immunitaires adaptatives contre une infection aiguë induite par le LCMV	47
Figure 9. Structure de la particule virale du VSV et image en microscopie électronique des virions.	50
Figure 10. Réponses immunitaires adaptatives contre une infection aiguë induite par le VSV.	52
Figure 11. Représentation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines des souris C57Bl/6.	53
Figure 12. Représentation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines des souris QM.....	54
Figure 13. Représentation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines des souris HC1.	55
Figure 14. Représentation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines des souris JHT.	55

Figure 15. Liaison des IgM naturels sérique aux différents virus.....	76
Figure 16. Mesure du taux de la molécule C3 chez les différentes souches de souris. ...	77
Figure 17. Cinétique de décomplémentation des souris par le facteur de venin de cobra (CVF).....	78
Figure 18. Cinétique du recrutement des différents virus à la rate.	80
Figure 19. Quantification de l'IFN- α produit suite à l'infection par LCMV-WE à différents temps post-infection.....	82
Figure 20. Quantification de l'IFN- α produit suite à l'infection par VSV-IND à différents temps post-infection.....	83
Figure 21. Activation des DCs suite à l'infection par LCMV-WE.	84
Figure 22. Présentation antigénique par les cellules dendritiques spléniques des souris infectées avec LCMV-WE aux lymphocytes T CD8 de souris P14.	87
Figure 23. Cinétique du développement en anticorps neutralisants contre VSV-IND.	89
Figure 24. Survie des souris suite à l'infection par VSV.	91
Figure 25. Activation générale des lymphocytes T CD8 par l'expression du marqueur d'activation du CD62L à leur surface suite à l'infection par LCMV-WE.....	93
Figure 26. Activation spécifique des lymphocytes T CD8 suite à l'infection par LCMV-WE.	94
Figure 27. Potentiel cytotoxique des lymphocytes T CD8 par le relâchement de granzyme B suite à l'infection par LCMV-WE.	96
Figure 28. Production de cytokines par les lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV-WE.	98
Figure 29. Résumé schématique des résultats obtenus lors de l'infection par LCMV...	112

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -DG : α -dystroglycan

AcNat : Anticorps naturels

ADN : Acide désoxyribonucléique

AOH : Angio-œdème héréditaire

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BSA : Albumine sérique bovine

BCR : récepteur des cellules B

CAM : Complexe d'attaque membranaire

CFSE : Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CTL : Lymphocytes T CD8+ cytotoxiques

D.O : Densité optique

DCs : Cellules dendritiques

DMEM : Dulbeccos Modified Eagles Medium

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

FDCs : Cellules dendritiques folliculaires

FVC : Facteur de venin de cobra

g : gramme

GM-CSF : Granulocytes-macrophage colony-stimulating factor

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HPN: Hémoglobinurie paroxystique nocturne

HRP : Horse Radish Peroxydase

i.p.: Intrapéritonéal

IFN : Interféron

IgM : Immunoglobuline M

IL: Interleukine

IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium

ITAMs: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

i.v.: Intraveineuse

kb: kilo bases

LED : Lupus érythémateux disséminé

LB : Lymphocyte B

LCMV : Virus de la chorioméningite lymphocytaire

LT : Lymphocyte T

MASPs : MBL-associated proteins

MBL : Mannose binding lectin

MEM : Earle's Modified Essentiel Medium

mg : Milligramme

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

Mock: non infectée

MOI : Multiplicité d'infection

nm : Nanomètre

NP : 4-hydroxy-3-nitrophényl

p/v : Poids/volume

p.i. : Post-infection

PBS: Phosphate Buffer Saline

pg : picogramme

OPD : Orthophénylènediamine

PBMC : Cellules mononucléaires du sang périphérique

QM : Quasi monoclonale

RE : Réticulum endoplasmique

RPM : rotations par minute

SHU : Syndrome hémolytique et urémique

SVF : Sérum de veau foetal

TAP : Transporteur associé avec la présentation antigénique

TCR : Récepteur des cellules T

TP : Température pièce

Uff : Unités formant des foyers

Ufp : Unités formant des plages

µg : Microgramme

µL : Microlitre

VA : Voie alternative

VC : Voie classique

VHC : Virus de l'hépatite C

VHS-I : Virus de l'herpès simplex I

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VL : Voie des lectines

VNO : Virus du Nil occidental

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

INTRODUCTION

Les infections virales persistantes sont un problème de santé publique majeure puisqu'elles affectent des millions de personnes à travers le monde. Parmi celles-ci, on dénote le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'hépatite C (VHC). Jusqu'à ce jour, il n'existe qu'un vaccin pour le VHB (Saade *et al.*, 2013) et on dénombre plusieurs millions de nouvelles infections par le VIH et le VHC chaque année. Cependant, le virus de l'hépatite C se démarque des autres puisque 20 à 25 % des personnes infectées arrivent à spontanément éliminer le virus (Tarr *et al.*, 2012). Il a déjà été démontré qu'une réponse immunitaire adaptative à large spectre était importante pour l'élimination du virus (P. Borrow, 1997a). Plus récemment, plusieurs études ont montré que l'interaction entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif était très importante pour le développement d'une réponse antivirale à large spectre efficace. En effet, plusieurs composantes du système immunitaire inné sont importantes lors de l'infection par le VHC, comme par exemple, les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les cellules NK, le système du complément et des lipoprotéines (Cervantes-Barragan *et al.*, 2012, Cheent *et al.*, 2011, Tarr *et al.*, 2012).

Comme le virus de l'hépatite C pénètre majoritairement par la voie sanguine, un des premiers effecteurs que le virus rencontre est les anticorps naturels. Ceux-ci sont retrouvés dans le sang d'individus naïfs et ont été démontrés comme important dans la formation de complexes immuns et pour le recrutement aux organes lymphoïdes secondaires notamment dans les infections par le virus de l'influenza et le virus de la stomatite vésiculaire (Baumgarth *et al.*, 2005, Hangartner *et al.*, 2006b). Malheureusement, il n'existe qu'une espèce animale susceptible à l'infection par le VHC, le chimpanzé (Lanford *et al.*, 2001). Puisque cette espèce est menacée et que son utilisation est très limitée, plusieurs équipes de recherche ont plutôt opté pour divers modèles d'infection chez la souris (von Herrath *et al.*, 2001). Le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), qui peut être contrôlé et éliminé ou bien persister chez l'hôte et les réponses immunitaires engendrées par cette infection qui

sont similaires à celles observées lors de l'infection par le virus de l'hépatite C, est considéré comme un modèle pertinent d'infections virales persistantes.

Au cours des dernières années, notre laboratoire s'est donc intéressé aux rôles des anticorps naturels dans l'infection par le LCMV (Charpentier, 2011, Meunier, 2007). Puisque la plupart des recherches sur les anticorps naturels impliquaient seulement des souris sauvages ou sans anticorps (Baumgarth, 2011a, Matter *et al.*, 2008) notre laboratoire s'est intéressé à l'impact d'un répertoire plus restreint en anticorps naturels sur le développement des réponses immunitaires adaptatives lors de l'infection par LCMV. Pour ce faire, en plus des souris sauvages C57Bl/6 et des souris sans anticorps $J_H T$, notre laboratoire a utilisé deux souris ayant des répertoires intermédiaires en anticorps naturels, les souris QM et les souris HC1. Les souris QM possèdent un segment VDJ déjà réarrangé qui permet de lier spécifiquement l'haptène nitrophényl (Cascalho *et al.*, 1996). Les résultats obtenus par le laboratoire indiquent qu'un répertoire plus diversifié en anticorps naturels lors de l'infection par LCMV permet un meilleur recrutement des particules virales à la rate, une meilleure présentation des antigènes viraux aux lymphocytes T spécifiques ainsi qu'une meilleure induction de la réponse adaptative humorale et cellulaire (Charpentier, 2011, Meunier, 2007).

Puisque les anticorps naturels sont majoritairement des IgM et que ceux-ci sont très efficaces pour activer la voie classique du système du complément (Yang *et al.*, 2013), nous proposons que le système du complément pourrait jouer un rôle similaire chez nos différentes souris lors de l'infection par LCMV, mais aussi par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) qui est un excellent modèle d'infection virale pour l'étude de la réponse immunitaire humorale (Meyer *et al.*, 2011). Le système du complément est un élément important du système immunitaire inné. En plus de pouvoir lyser directement les cellules infectées, les bactéries et les virions grâce au complexe d'attaque membranaire (CAM), il joue aussi un rôle dans l'inflammation par le relâchement d'anaphylatoxines et dans la phagocytose par l'opsonisation des pathogènes (Yang *et al.*, 2013). Les anticorps naturels peuvent lier rapidement les pathogènes et ils pourraient ainsi activer le système du complément qui à son tour pourrait provoquer

un milieu proinflammatoire favorisant le recrutement d'autres effecteurs du système immunitaire ainsi que la phagocytose des complexes immuns. Ceci permettrait ensuite de faciliter la présentation antigénique et ainsi l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Donc, nous avons émis comme hypothèse que le système du complément, de concert avec les anticorps naturels, est important dans le développement d'une réponse immunitaire antivirale.

Afin d'élucider le rôle du complément, la moitié de chacun des groupes de souris utilisées a reçu du facteur de venin de cobra (CVF) qui permet de décomplémenter les souris (Vogel *et al.*, 1984b) avant d'être infectées par LCMV-WE ou VSV-IND.

Dans un premier temps, le rôle du complément en présence de différents répertoires en anticorps naturels a été observé dans l'induction de la réponse immunitaire précoce puisque le système du complément est un acteur très important du système inné (Stoermer *et al.*, 2011). Le recrutement du LCMV-WE et VSV-IND a été analysé en présence ou en absence de complément chez nos différentes souris. Par la suite, l'induction de la production en IFN- α a été analysée suivi du niveau d'activation des cellules dendritiques ainsi que leur capacité à présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T spécifiques. Dans un deuxième temps, l'impact du rôle du complément en présence de différents répertoires en anticorps naturels a été observé pour le développement de la réponse immunitaire adaptative. Nous avons comparé l'impact de l'absence du système du complément chez nos souris dans le développement en anticorps neutralisants anti-VSV-IND ainsi que sur la protection des souris face au virus. Par la suite, nous avons évalué si l'absence de complément avait un impact sur l'induction de la réponse cellulaire lors de l'infection par LCMV-WE. Le niveau d'activation des lymphocytes T CD8⁺ a pu être déterminé grâce au marqueur d'activation CD62L et la spécificité des lymphocytes T CD8⁺ a pu être analysée par marquage à l'aide de tétramères. Finalement, la capacité de ces lymphocytes T CD8⁺ à produire des cytokines antivirales tel que le TNF- α et l'IFN- γ ainsi que le relâchement des granzyme B a été analysée par cytométrie en flux.

Les résultats obtenus suggèrent un rôle opposé du système du complément selon la diversité en anticorps naturels lors d'infections virales.

Chapitre 1
Revue de littérature

1.1 Immunité innée

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense après les barrières physiques contre les infections. Contrairement au système immunitaire adaptatif, le système immunitaire inné est dit non spécifique. Il permet d'identifier et d'éliminer les substances étrangères et de recruter des cellules immunitaires aux sites d'infection. Il sert aussi à l'activation du système immunitaire adaptatif par la présentation antigénique qui sera discutée aux points 1.2 et 1.3. Le système immunitaire inné est donc très important pour favoriser l'élimination des pathogènes. On y retrouve des facteurs solubles, comme le système du complément et les anticorps naturels, ainsi que différentes composantes cellulaires comme les granulocytes, les macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques.

1.1.1 Anticorps naturels

1.1.1.1 Caractéristiques

Les anticorps naturels (AcNat) sont présents dans le sérum d'individus sains. C'est-à-dire, qu'il a été possible de retrouver des anticorps qui étaient capables de reconnaître le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) chez des personnes considérées séronégatives (Avrameas, 1991, Hartman *et al.*, 1989). Ils sont donc différents des anticorps générés en réponse à des stimuli antigéniques définis puisqu'ils reconnaissent plutôt des motifs conservés comme les sucres, acides nucléiques et phospholipides qui sont partagés par plusieurs pathogènes (Hardy *et al.*, 1994a, Vas *et al.*, 2013). Cette caractéristique peut s'avérer très importante pour la reconnaissance de particules virales dans les étapes précoces d'une infection. On peut comparer les anticorps naturels comme des équivalents solubles des récepteurs de type toll (TLR). Les anticorps naturels sont majoritairement des immunoglobulines M (IgM), mais l'on retrouve quelques IgG3 et IgA (Hamilton *et al.*, 1994). Les IgM circulants sont plus souvent sous forme pentamérique ce qui augmente l'avidité pour la liaison à un

antigène. Dans un individu sain, on dénombre environ de 1 à 2 mg/mL d'IgM naturels circulants (Kaveri *et al.*, 2012).

1.1.1.2 Origine

Les anticorps naturels ont d'abord émergé chez les agnathes bien avant qu'un système immunitaire adaptatif ne soit développé et plusieurs personnes croient que les anticorps naturels sont apparus dans le but de constituer une défense contre les pathogènes (Baumgarth *et al.*, 2005, Marchalonis *et al.*, 2006). Chez la souris, les lymphocytes B-1 qui expriment le CD5 sont considérés comme étant les cellules principales sécrétrices d'anticorps naturels (Hayakawa *et al.*, 1983). Chez les humains, leur identification a été controversée puisque le CD5 est un marqueur d'activation chez les cellules B. Une récente publication a identifié les cellules B-1 humaines comme étant CD20+CD27+CD43+CD70- (Griffin *et al.*, 2011). On retrouve ces cellules majoritairement dans les cavités pleurales et péritonéales après qu'ils aient migré de la moelle osseuse (Ansel *et al.*, 2002, Fagarasan *et al.*, 2000). Cependant, ce sont les B-1 contenus dans la rate et la moelle osseuse qui sécrètent la plupart des IgM naturels que l'on retrouve dans la circulation sanguine (McIntyre *et al.*, 1991, Tumang *et al.*, 2005). Contrairement aux lymphocytes B2 (aussi appelé B folliculaires), que l'on retrouve dans l'immunité adaptative, les lymphocytes B-1 ont la capacité de s'auto renouveler (Duber *et al.*, 2009, Holodick *et al.*, 2009). Bien que les fonctions des lymphocytes B-1 soient de plus en plus définies, l'origine et le développement de ces cellules restent encore à déterminer. Présentement, deux hypothèses existent, celle qui propose que les cellules B-1 et B-2 aient des précurseurs différents (hypothèse de la lignée) et celle qui propose que les cellules B-1 et B-2 partagent le même précurseur et qu'une lignée cellulaire soit favorisée dépendamment des signaux reçus lors du développement et de la sélection (hypothèse de la différenciation induite) (Berland *et al.*, 2002, Dorshkind *et al.*, 2007). Le débat subsiste encore puisque plusieurs études défendent les deux hypothèses. Par exemple, une étude a montré que les B-1 et B-2 partagent un ancêtre commun, le B-1

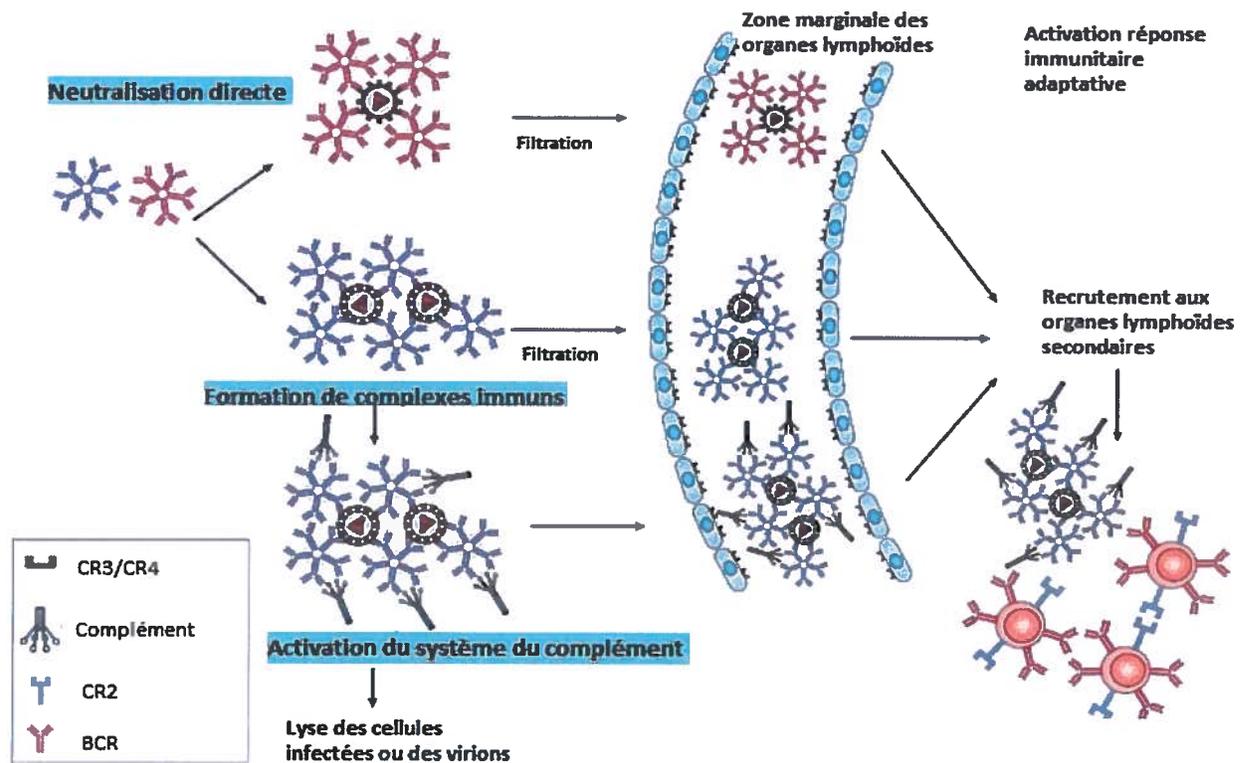
specific progenitor cells (B1P) tandis qu'une autre étude a démontré qu'en absence du TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), la population de lymphocytes B-1a était dépletées ce qui démontrerait un rôle important dans la signalisation par ce récepteur pour le développement et/ou la survie des B-1 (Esplin *et al.*, 2009, Kobayashi *et al.*, 2009, Montecino-Rodriguez *et al.*, 2006). Ce débat a amené une troisième hypothèse (l'hypothèse des deux voies), qui suggère que les deux premières hypothèses ne sont pas exclusives, mais qu'elles sont combinées ensemble pour assurer le développement et le maintien des B-1 avant et après le stage embryonnaire (Baumgarth, 2011b).

1.1.1.3 Rôles

Les anticorps naturels peuvent avoir plusieurs rôles. Premièrement, les AcNat jouent un rôle dans l'homéostasie (Vas *et al.*, 2013). Notamment, ils permettent l'élimination des déchets toxiques en liant les résidus oxydatifs entraînant l'activation des macrophages et prévenant ainsi ces structures de provoquer un milieu proinflammatoire (Boes, 2000). Il a aussi été démontré chez la souris qu'une absence d'IgM affectait l'élimination des cellules apoptotiques puisque les IgM lient les groupes phosphorylcholine sur les cellules apoptotiques (Quartier *et al.*, 2005). De plus, les anticorps naturels permettent l'élimination des protéines mal formées. En effet, des AcNat capables de reconnaître la β -amyloïde et de l'hydrolysée ont été isolés chez un patient atteint de la macroglobulinémie de Waldenström (Taguchi *et al.*, 2008). Ces AcNat anti- β -amyloïde ont aussi été injectés à des patients souffrant d'Alzheimer léger et ceux-ci ont vu une amélioration dans leur score mental (Neff *et al.*, 2008). Deuxièmement les AcNat jouent aussi un rôle dans la surveillance contre les cellules tumorales. Les cellules tumorales échappent au système immunitaire en changeant l'expression de certaines protéines et dans leur glycolysation. Cependant, ces cellules vont parfois exprimer des antigènes glucidiques avec des motifs répétés qui vont être reconnus par les AcNat (Schwartz-Albiez *et al.*, 2008, Vollmers *et al.*, 2007). Par exemple, un IgM monoclonal, le SAM-6, isolé d'une patient atteint du cancer de l'estomac, est capable de reconnaître un motif glucidique que l'on retrouve sur les cellules malignes,

mais pas sur les cellules saines. Il a été démontré que SAM-6 induisait, *in vitro*, l'apoptose de ces cellules (Brandlein *et al.*, 2007, Rauschert *et al.*, 2008). Troisièmement, les anticorps naturels sont un élément très important dans la réponse contre les pathogènes (figure 1). Les AcNat peuvent neutraliser directement les pathogènes. Il a été démontré que des AcNat pouvaient lier directement une région conservée de la gp120 du VIH et catalyser son clivage concédant ainsi une certaine résistance naturelle contre le VIH (Planque *et al.*, 2007, Townsley-Fuchs *et al.*, 1996). Ils peuvent aussi neutraliser directement le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) diminuant ainsi la dissémination du virus au cerveau des souris (Gobet *et al.*, 1988). Les anticorps naturels peuvent aussi former des complexes immuns qui peuvent ou non activer le système du complément menant à la lyse directe des virions et des cellules infectées. La formation de ces complexes permet de recruter plus facilement les particules infectieuses aux organes lymphoïdes secondaires, notamment la rate. Par exemple, il a été démontré que les AcNat étaient importants lors d'une infection par VSV chez la souris pour le recrutement à la rate. En effet, la présence d'AcNat lors de l'infection permet de réduire les titres viraux dans le foie, les reins et le cerveau, tandis que les titres viraux à la rate sont augmentés. Cependant, ce phénomène n'est pas dépendant d'un système du complément complet, puisque qu'il n'y a pas de différence entre les titres viraux des souris décomplémentées avec le facteur de venin de cobra (CVF) comparativement aux contrôles (Ochsenbein *et al.*, 1999a). Toutefois, lors d'une infection par le virus de l'influenza, le système du complément est important pour un meilleur recrutement des particules virales à la rate. En effet, la présence d'IgM naturels et du système du complément est requise pour permettre l'agrégation des particules virales et la phagocytose par les cellules présentatrices professionnelles (Oldstone, 1975). Le recrutement des particules infectieuses aux organes lymphoïdes secondaires comme la rate permet à son tour une meilleure présentation antigénique et induction de la réponse immunitaire adaptative. Lors d'une infection par le virus de l'influenza, la réponse humorale est grandement améliorée en présence d'anticorps naturels (Baumgarth *et al.*, 2000). Aussi, lors d'une infection par VSV, les titres viraux à la rate

chez des souris possédant des AcNat sont identiques en présence ou en absence de complément, mais la réponse humorale induite est diminuée en absence de complément indiquant l'importance de la présence du complément et des AcNat dans l'induction de la réponse adaptative anti-VSV (Ochsenbein *et al.*, 1999a, Ochsenbein *et al.*, 1999b). L'induction de la réponse immunitaire adaptative sera discutée plus en détail à la section 1.3 de ce chapitre.



Adaptée de Hangartner *et al.*, 2006
Nature Reviews | Immunology

Figure 1. Les rôles des anticorps naturels dans la réponse contre les pathogènes.

La liaison des anticorps naturels aux particules virales, par exemple, peut mener à la neutralisation directe de ces particules ou à la formation de complexes immuns (avec ou sans l'activation du complément) permettant le recrutement aux organes lymphoïdes secondaire, contribuant ainsi à l'induction de la réponse immunitaire adaptative.

1.1.2 Système du complément

Comme il a été mentionné plus tôt, les anticorps naturels sont majoritairement des IgM et il a été démontré que les complexes immuns formés avec des molécules d'IgM étaient très efficaces pour activer la voie classique du complément. En effet, une molécule d'IgM peut activer le complément et lyser un globule rouge, tandis qu'il en faudra 1000 molécules d'IgG pour observer le même effet (Cooper *et al.*, 1985). Cependant, le rôle du complément dans la fonction immunomodulatoire des anticorps naturels n'est pas encore très bien connu.

1.1.2.1 Caractéristiques et origine

Le système du complément a été découvert à la fin du 19^e siècle par trois microbiologistes, Paul Ehrlich, Jules Bordet et George Nuttall, lorsqu'ils ont observé une fonction bactéricide du sang sur *Bacillus anthracis* et que cette fonction était perdue lorsque le sang était chauffé à 56°C ou gardé à température pièce. Ils ont appelé cet effet « alexine ». Ce n'est qu'en 1899 que Paul Ehrlich renomma l'alexine en système du complément puisque ce système complétait les anticorps (Bordet, 1895, Bordet, 1898, Ehrlich, 1899, Nuttall, 1888). Le système du complément compte plus de 30 protéines solubles et membranaires comptant pour environ 15% (3 g/L) de la fraction globulaire du plasma (Walport, 2001a). Les composantes du complément sont produites principalement par le foie. De récentes études ont permis d'observer que certaines cellules extra hépatiques étaient aussi capables de synthétiser des protéines du complément. C'est le cas pour les cellules épithéliales, les cellules endothéliales (reins, poumons, intestins), les fibroblastes et les macrophages (Laufer *et al.*, 2001, Walport, 2001b). Le système du complément représente une composante très ancienne dans la défense de l'hôte puisque de hauts degrés d'homologie dans la structure et la fonction ont été observés à travers les vertébrés (Dunkelberger *et al.*, 2010, Jensen *et al.*, 1981). Le système du complément n'existe pas seulement chez les vertébrés puisque des études fonctionnelles et génomiques sur des molécules du complément ont permis de découvrir des analogues de ces molécules, par exemple, chez des tuniciers et même

chez une anémone de mer, une protéine fonctionnelle C3 a été identifiée (Azumi *et al.*, 2003, Zhu *et al.*, 2005).

1.1.2.2 Voies d'activation

Le système du complément comprend 3 voies principales d'activation, la voie classique, la voie alternative et la voie des lectines qui convergent toutes vers le clivage de la molécule C3 et la formation du complexe d'attaque membranaire et des différents rôles du système du complément (figure 2).

1.1.2.2.1 Voie classique

Dans les années 1920, la voie classique (VC) est la première voie à être découverte grâce à la détection des molécules C1, C2, C3 et C4. Chaque molécule du complément a été assignée avec un numéro selon l'ordre qu'elles aient été découvertes, donc les numéros ne représentent pas leur séquence d'activation dans la cascade. Les numéros ont été conservés selon leur ordre de découverte pour éviter la confusion (Walport, 2001a, Zhu *et al.*, 2005). La voie classique du complément est activée lorsque des complexes immuns formés d'IgM ou d'IgG lié à un pathogène ou tout autre antigène étranger ou du non-soi. Le complexe C1, un complexe multimérique composé du C1q, C1s et C1r, lie la portion Fc des IgG ou IgM du complexe immun. Le C1s et C1r sont activés lorsque le C1q se lie à la portion Fc des immunoglobulines et le C1s clive le C4 et le C2 pour former la convertase C3 de la VC, la C4bC2a (Ricklin *et al.*, 2010).

1.1.2.2.2 Voie alternative

La molécule C3 est constamment hydrolysée à un bas niveau pour former le C3b, permettant la reconnaissance de pathogènes comme des bactéries ou des virus. La voie alternative du complément (VA) est activée lorsqu'il y a liaison de la molécule C3b sur des glucides, des lipides et des protéines étrangères ou du non-soi sur une surface (Qu *et al.*, 2009). Le facteur B est recruté au niveau du C3b lié au pathogène suivi du facteur D qui va venir cliver le facteur B pour former la convertase C3 de la VA, la C3bBb. La

convertase C3bBb est stabilisée grâce à la properdine qui est sécrétée par les neutrophiles, mais aussi par les macrophages et cellules T. La properdine stabilise la convertase en se liant au C3b ce qui prévient son clivage par les facteurs H et I qui servent à dissocier la convertase et à arrêter l'activation de la cascade. Des études récentes suggèrent que la properdine peut aussi lier directement les cellules apoptotiques et nécrotiques et initier la cascade du complément (Kemper *et al.*, 2010).

1.1.2.2.3 Voie des lectines

La voie des lectines (VL) est activée lorsqu'il y a liaison du mannose binding lectin (MBL) ou de la Ficoline aux groupements glucidiques sur la surface des pathogènes incluant les levures, les bactéries, les parasites et les virus. Le MBL et la Ficoline forment des complexes avec les MBL-associated proteins (MASPs). On dénombre quatre MASPs : 1,2,3 et une MASP2 tronquée, la MAP19 (Sorensen *et al.*, 2005). La liaison au pathogène induit un changement conformationnel ce qui permet l'auto activation de MASP2. MASP2 clive la molécule C4 pour former le C4a et C4b. Le C4b s'attache à la surface du pathogène permettant l'attachement de la molécule C2 qui sera aussi clivée par MASP2 pour former le C2a et C2b. Le C4b et le C2a forment la convertase C3 de la VL, C4bC2a (Girija *et al.*, 2007). Les rôles exacts des autres MASPs sont encore inconnus, mais nous savons que MASP1 peut cliver le C2, mais pas le C4 (Wallis, 2007).

1.1.2.2.4 Clivage du C3 et formation du complexe d'attaque membranaire (CAM)

Les convertases C3 de la voie classique et des lectines, la C4bC2a, et celle de la voie alternative, la C3bBb, mènent toutes au clivage de la molécule C3 relâchant du C3a et C3b. Le C3b joue un rôle dans la phagocytose tandis que le C3a est une anaphylatoxine qui joue un rôle dans la réponse inflammatoire (voir section 1.1.2.3 de ce chapitre). Le C3b en association avec les convertases C3, forme les convertases C5 : C3bBbC3b et C4bC2aC3b. Les convertases C5 clive la molécule C5 pour former le C5a et C5b. Le complexe d'attaque membranaire (CAM) est initié lorsque le C6, le C7 se lient au C5b pour former le complexe C5bC6C7. Par la suite, le C8 et plusieurs C9 se lient à ce

complexe formant ainsi le CAM. Le CAM forme un pore dans la membrane cellulaire menant à la lyse cellulaire (Ricklin *et al.*, 2010).

1.1.2.2.5 Voie indépendante du C3

En plus des trois voies vues précédemment, des protéases relâchées par les neutrophiles et macrophages comme la kallikréine, la plasmine et la Xlla, peuvent générer des produits d'activation du complément comme le C5a (Huber-Lang *et al.*, 2006, Huber-Lang *et al.*, 2002). Aussi, la thrombine, un membre faisant partie du processus de coagulation, peut générer localement du C5a chez des souris déficientes en C3 qui sont incapables de produire une convertase C5 fonctionnelle (Huber-Lang *et al.*, 2006).

1.1.2.2.6 Régulateurs et récepteurs du système du complément

Des régulateurs solubles et membranaires du complément aident à contrôler le système du complément lors de son activation, à ajuster sa sévérité et sa propagation lors d'attaques. Quant à eux, les récepteurs du complément permettent de jouer plusieurs rôles dans la réponse immunitaire en induisant différents signaux. Les régulateurs et récepteurs ainsi que leurs fonctions sont décrites dans le **tableau 1**.

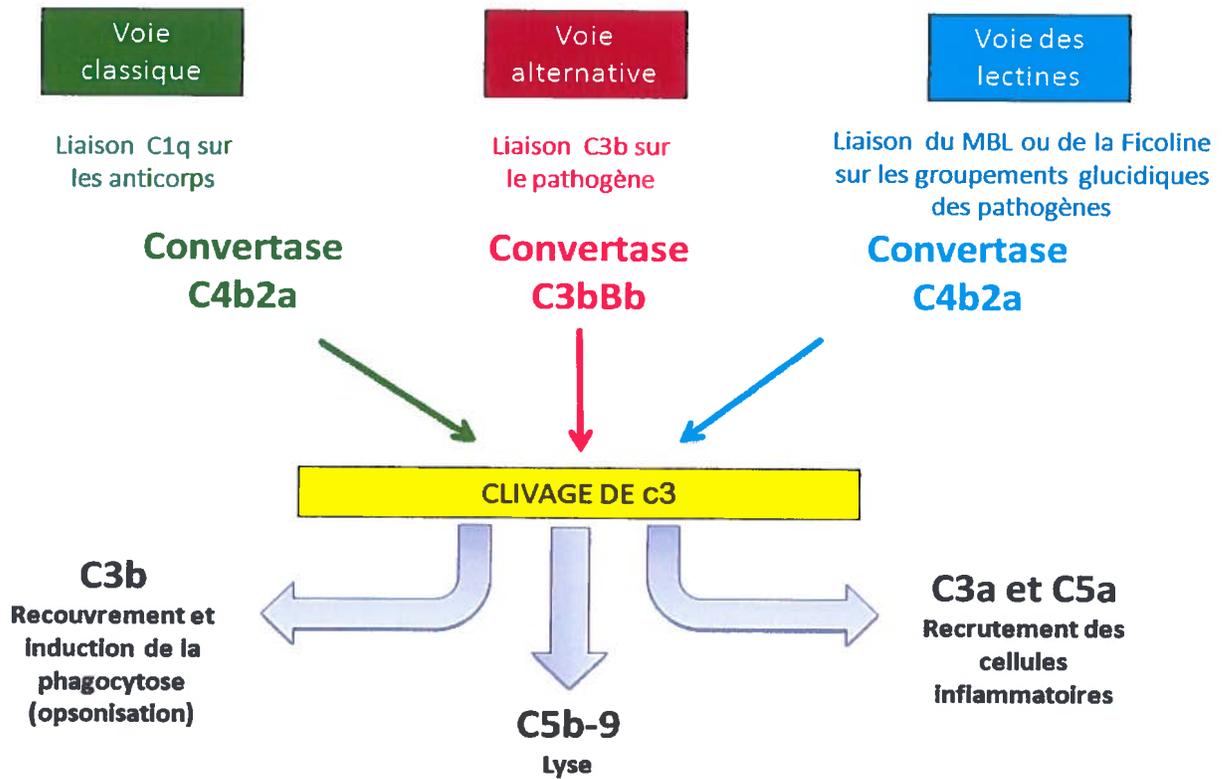


Figure 2. Les différentes voies d'activation menant aux multiples rôles du système du complément. Les trois voies principales d'activation du complément vont être activées selon la liaison de certaines molécules et vont mener vers un seul et unique but, celui du clivage de la molécule C3. Le clivage du C3 va permettre d'initier les différents rôles du système du complément soient la phagocytose, la lyse et l'induction d'un milieu pro inflammatoire.

Tableau 1: Les récepteurs et les régulateurs du système du complément

Noms	Autres noms	Fonctions
<u>Récepteurs</u>		
CR1	CD35 ; C3b/C4b-récepteur	Lie C3b/iC3b ; induit la phagocytose
CR2	CD21 ; C3d-récepteur	Lie iC3b/C3dg/C3d ; réduit le seuil d'activation des cellules B
CR3	CD11b/CD18 ; Mac-1	Lie iC3b ; induit la phagocytose
CR4	CD11c/CD18 ; p150/95	Lie iC3b ; induit la phagocytose
C3aR		Lie C3a ; déclencheurs de signaux pro-inflammatoires
C5aR	CD88	Lie C5a ; déclencheurs de signaux pro-inflammatoires
C5L2	GPR77	Lie C5a ; fonctions non connues
CR1g	Z93Ig ; VSIG4	Lie iC3b/C3c ; induit la phagocytose
<u>Régulateurs</u>		
C1-INH	SERPIN1	Inhibe C1r/s et MASPs
sMAP	MAP19	Lie MBL et concurrence avec MASPs
MAP-1	MAP44	Lie MBL/ficoline ; inhibe la déposition du C4
C4BP		Accélère la dégradation de la VL/VC convertase ; cofacteur avec le facteur I
Facteur H	CFH	Reconnaît surface du soi ; accélère dégradation des convertases ; cofacteur avec le facteur I
Facteur I	CFI	Dégrade C3b et C4b
FHL-1	Reconectine, CFHL-1	Accélère dégradation des convertases ; cofacteur avec le facteur I
MCP	CD46	Cofacteur avec le facteur I
DAF	CD55	Accélère dégradation des convertases
CFHR-1	FHR-1	Reconnaît surface du soi et C5 ; inhibe le clivage du C5 et la formation du CAM
CD59	Protectine	Lie C8 et C9 ; prévient l'assemblage du CAM
Vitronectine	S-protein ; S40	Lie C5b-C9 ; prévient l'assemblage du CAM
Clusterine	Apolipoprotein ; SP-40	Lie C7-C9 ; prévient l'assemblage du CAM
Carbopeptidase-N		Dégrade C3a et C5a

Adapté de Ricklin et al 2010

1.1.2.3 Rôles

Le rôle le mieux connu du complément est celui lui permettant de lyser les cellules et les différents pathogènes via son complexe d'attaque membranaire. Par exemple, les personnes déficientes en molécules C5 à C9 sont beaucoup plus susceptibles aux infections par *Neisseria Meningitidis* (Sarma et al., 2011). Cependant,

plusieurs pathogènes réussissent à contourner la lyse en employant plusieurs stratégies. On dénote les bactéries Gram positif qui possède une architecture cellulaire résistante à la lyse, ou certains virus comme le VIH et le virus de l'hépatite C (VHC) qui utilisent des récepteurs du complément pour faciliter leur entrée dans la cellule ou pour diminuer la réponse immunitaire adaptative (Bajtay *et al.*, 2004, Eisen-Vandervelde *et al.*, 2004, Lambris *et al.*, 2008). D'autres virus, comme le virus de l'herpès simplex I (VHS-I), le cytomegalovirus, le virus du Nil occidental (VNO) vont moduler l'expression, intégrer ou imiter des régulateurs du complément, pour éviter la lyse par le complément (Blue *et al.*, 2004, Chung *et al.*, 2006, Nomura *et al.*, 2002). Heureusement, le système du complément n'a pas que la lyse comme fonction. Il peut aussi sécréter des anaphylatoxines (C3a et C5a). Ces anaphylatoxines peuvent exercer des effets pléiotropiques lorsqu'elles se lient à leur récepteur spécifique, C3aR pour C3a et C5aR et C5L2 pour C5a. Le C5L2 a été découvert en 2000, mais malgré qu'il partage une homologie avec le C5aR, son rôle biologique n'est pas encore très clair (Ohno *et al.*, 2000). Les anaphylatoxines agissent comme des chimioattractants puissants qui guident les neutrophiles, les monocytes et les macrophages vers les sites d'infection ou d'inflammation. Ils sont aussi des vasodilatateurs puisqu'ils induisent la contraction des muscles lisses. Ils provoquent aussi la libération d'histamine par les mastocytes et la consommation du O₂ par les neutrophiles (Klos *et al.*, 2009). Le système du complément peut aussi promouvoir la phagocytose grâce à l'interaction des opsonines, C3b (et ses produits de clivage, iC3b, C3c, C3d) et C4b, avec les récepteurs du complément (van Lookeren Campagne *et al.*, 2007). La déposition de ces opsonines sur la surface des bactéries, virus, ou cellules infectées lors de l'activation du système du complément va permettre la liaison à leurs récepteurs (CR1, CR2, CR3, CR4 et CR1g) sur les macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques pour induire la phagocytose (Helmy *et al.*, 2006, Krych-Goldberg *et al.*, 2001). Ce phénomène est aussi utile lors de l'élimination de cellules apoptotiques (Gaip *et al.*, 2003). En plus de ses rôles dans l'immunité innée, le système du complément a aussi un rôle à jouer dans l'immunité adaptative. En effet, le

complément est essentiel dans la réponse humorale et cellulaire (Yang *et al.*, 2013). Ces aspects seront traités plus en détail à la **section 1.3** de ce chapitre.

1.1.2.4 Mutations, déficiences génétiques et maladies associées

Plusieurs maladies sont associées à des mutations ou des déficiences au niveau du système du complément. Notamment, on dénote le syndrome hémolytique et urémique (SHU), l'angio-œdème héréditaire (AOH), l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), le lupus érythémateux disséminé (LED) et plusieurs infections bactériennes. Premièrement, le SHU peut être causé par la bactérie *Escherichia coli*, mais aussi par une mutation au niveau du facteur H qui lierait moins efficacement le C3b sur les cellules endothéliales causant une augmentation des dommages au système vasculaire par la déposition de fibrines. Ceci pourrait mener à une insuffisance rénale aiguë. Il a aussi été démontré que cette maladie pouvait être causée par des mutations au niveau du facteur I, facteur B et MCP (Botto *et al.*, 2009, Pettigrew *et al.*, 2009). Deuxièmement, le AOH est une maladie génétique rare causée par une déficience au niveau du C1-INH. Le C1-INH n'inhibe pas uniquement le C1r/s et MASP2, mais aussi la kallikréine que l'on retrouve dans le processus d'inflammation. La kallikréine clive le kininogène en bradykinine et en kallidine. La déficience en C1-INH provoque donc un dérèglement dans la production de bradykinine, menant à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Donc, les personnes atteintes de AOH ont des épisodes récurrents de gonflements situés principalement au niveau du visage, des muqueuses et des organes internes (Cugno *et al.*, 2009). Troisièmement, la HPN est une cause rare d'anémie. Elle est causée par une mutation dans le gène PIG-A qui est responsable de l'ancrage membranaire de plusieurs protéines de membrane des cellules sanguines, notamment le CD59 et DAF. CD59 et DAF ont pour rôle l'inhibition de l'assemblage du complexe d'attaque membranaire du complément. Bref, les personnes atteintes de HPN ont d'intenses lyses médiées par le complément de leurs globules rouges causant une anémie hémolytique (Liebman *et al.*, 2003). Quatrièmement, le LED est une maladie systémique auto-immune chronique du tissu conjonctif. Le LED peut être causé par des

facteurs exogènes comme l'exposition au soleil ou une récente infection par le virus de l'Epstein-Barr, mais il peut aussi être causé par des facteurs endogènes comme une déficience en molécules de la voie classique du complément, le C1, C2 et C4. Le LED est associé plus fortement avec une déficience en C1q qu'en C2 ou C4. Mondialement, seulement 2 adultes n'étant pas atteints du lupus érythémateux disséminé et ayant une déficience en C1q ont été reportés (Vassallo *et al.*, 2007). L'absence de ces protéines du complément provoquerait une défectuosité dans l'élimination des complexes immuns ayant pour conséquence une accumulation de ces complexes dans les organes, principalement les reins et les parois artérielles. Il y aurait aussi une accumulation anormale des cellules apoptotiques incluant les cellules B et T, menant à une auto-immunité (Botto *et al.*, 2009, Pettigrew *et al.*, 2009). Finalement, des déficiences au niveau des molécules du système du complément rendent les personnes affectées beaucoup plus susceptibles aux infections bactériennes. Par exemple, une déficience en properdine peut mener à la mort lors d'une infection par *Neisseria meningitidis*. Des déficiences au niveau des molécules formant le complexe d'attaque membranaire (C5-C9) sont aussi répertoriées et sont associées aussi à une plus grande susceptibilité aux infections par *Neisseria meningitidis*. Cependant, le taux de mortalité est moins élevé chez ces personnes que celles ayant une déficience en properdine (Fijen *et al.*, 1999). Une déficience en MBL augmente les risques d'infections des voies respiratoires ainsi que les risques de maladies cardiovasculaires (Eisen, 2010, Madsen *et al.*, 1998). Bref, un système du complément complet est important pour assurer un bon fonctionnement de notre système immunitaire.

1.1.3 Interféron de type I (IFN-I)

Les interférons de type I font aussi partie du système immunitaire inné. Tout comme les anticorps naturels et le système du complément, ils jouent un rôle dans les étapes précoces d'infections et font un lien important entre le système immunitaire inné et adaptatif.

1.1.3.1 Caractéristiques et origine

Les interférons de type I ont été découverts en 1957 par Isaacs et Lindenmann comme étant des molécules solubles capable d'inhiber la réplication virale dans des cultures cellulaires (Isaacs *et al.*, 1957a, Isaacs *et al.*, 1957b, Lindenmann *et al.*, 1957). Les interférons de type I comprennent les IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ et IFN- ω . Les sous-types IFN- α et IFN- β sont les plus importants. La famille des IFN- α est un groupe multigénique de polypeptides homologues codés par plus de 13 gènes chez les humains. L'IFN- β , quant à lui, est codé par un seul gène (Pestka *et al.*, 2004). Les IFN-I ont tous le même récepteur soit le IFNaR qui est composé de 2 sous-unités (IFNaR1 et IFNaR2) et l'on retrouve ce récepteur sur la plupart des cellules (de Weerd *et al.*, 2007). Ces deux sous-types sont produits par la plupart des cellules du corps lors d'infections et possèdent de très grandes propriétés antivirales. Cependant, certaines cellules ont démontré la capacité de sécréter des très grandes quantités d'IFN- α/β . Ces cellules dites naturelles productrices d'interférons sont les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Fitzgerald-Bocarsly, 2002). Puisque ces cellules n'ont pas besoin d'infection virale pour produire de l'IFN- α/β , du virus inactivé, de l'acide ribonucléique (ARN) ou de l'acide désoxyribonucléique (ADN) de bactérie étant suffisants, elles sont donc de bonnes sentinelles du système immunitaire inné lors d'infections virales (Krug *et al.*, 2001, Sato *et al.*, 2000).

1.1.3.2 Rôles

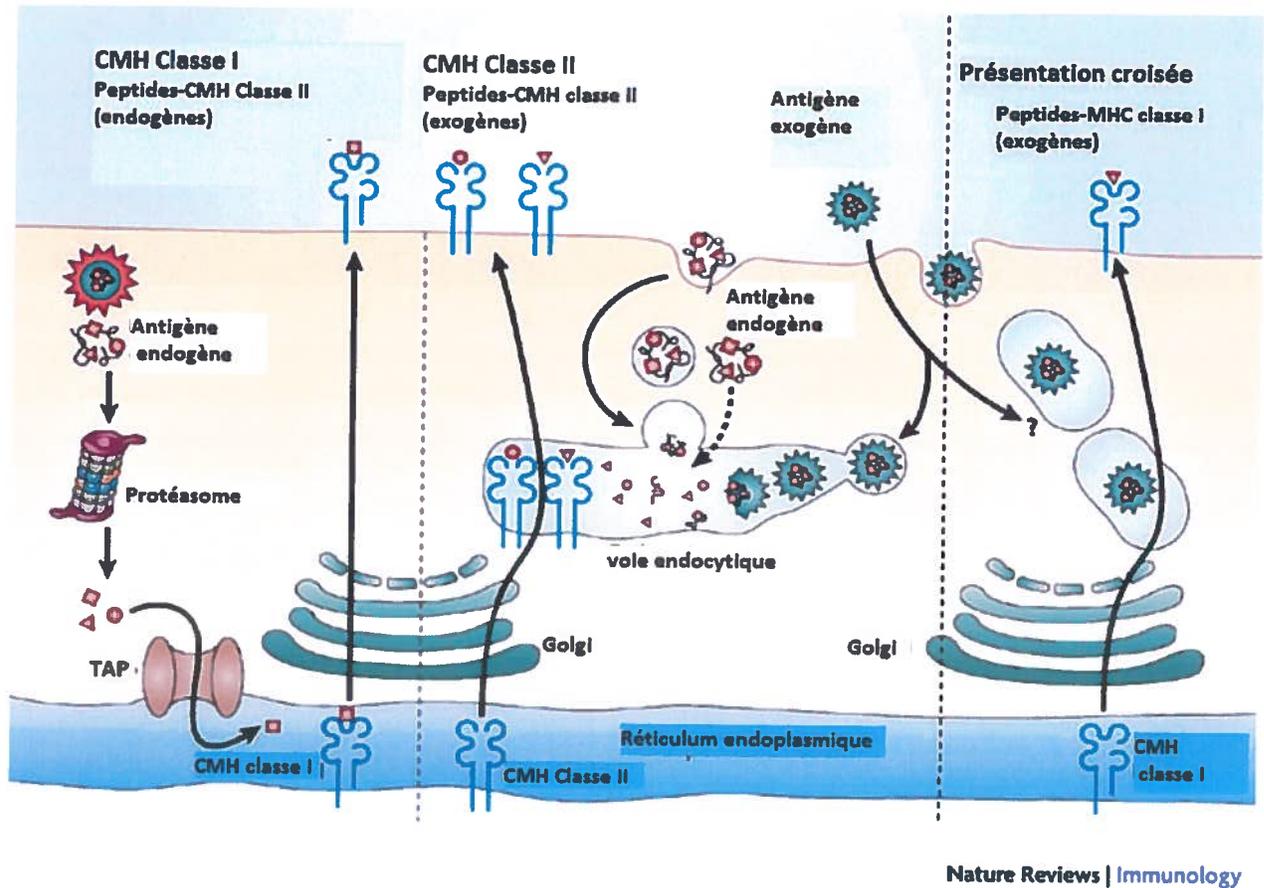
L'utilisation d'IFN-I comme traitement est très répandue. En effet, des injections systémiques d'IFN-I sont approuvées dans le traitement de plusieurs maladies comme la sclérose en plaques, les hémopathies malignes et les hépatites virales chroniques puisque l'IFN-I a un effet direct sur les virus ou les cellules malignes. Cependant, il a aussi été montré que les IFN-I avaient un rôle à jouer sur la régulation de certaines cellules du système immunitaire. Ils peuvent agir directement sur ces cellules, par la signalisation via IFNaR ou indirectement par la sécrétion de chimiokines ou de cytokines. Par exemple, les IFN-I sont capables de réguler les fonctions des cellules NK en

augmentant la capacité de celles-ci à tuer leurs cellules cibles et à sécréter de l'IFN- γ (Lee *et al.*, 2000). Les interférons de type I peuvent aussi jouer un rôle dans la réponse en anticorps primaire en stimulant toutes les sous-classes d'immunoglobuline G et induisant aussi une réponse mémoire contre l'antigène. Ceci serait dû à un effet direct de l'IFN- α sur les cellules B (Fink *et al.*, 2006). Cependant, le principal rôle de l'IFN-I est celui qu'il exerce sur les cellules dendritiques (DCs) puisque les DCs sont les seules cellules qui sont capables d'activer les cellules T naïves via la présentation antigénique. L'IFN-I affecte la différenciation, la maturation ainsi que la migration des cellules dendritiques. En effet, des monocytes humains mis en présence de granulocytes-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et de l'IFN- α/β se différencient plus vite en DCs que lorsqu'ils sont mis en culture avec du GM-CSF et de l'IL-4. Ils sont aussi plus aptes à induire une réponse en anticorps primaire ainsi qu'une réponse en cellules T CD8+ lorsqu'ils sont incubés avec un antigène et injectés dans des souris SCID (Lapenta *et al.*, 2003, Santodonato *et al.*, 2003). Des traitements *in vitro* avec des cellules dendritiques immatures ont aussi démontré une augmentation de l'expression de surface des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), CMH-II, CD40, CD80, CD86 et CD83 associé avec une meilleure capacité d'activation des réponses en cellules T CD8+ (Gallucci *et al.*, 1999, Montoya *et al.*, 2002).

1.2 Présentation antigénique

Les lymphocytes B utilisent les anticorps liés à leur membrane pour reconnaître une variété d'antigènes comme les polysaccharides, les lipides et petits produits chimiques. Ces antigènes peuvent être exprimés à la surface de microbes (capsule ou enveloppe) ou ils peuvent être sous forme soluble (toxines). Pour les lymphocytes T, les antigènes sont présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui sont principalement les cellules dendritiques, mais aussi les macrophages et les cellules B. Les protéines extracellulaires qui sont internalisées par les CPA sont apprêtées dans des vésicules et présentées par les CMH de classe II aux lymphocytes T CD4+, tandis que les protéines dans le cytosol de n'importe quelles cellules nucléées sont apprêtées dans le

cytoplasme et présentées par les CMH de classe I aux lymphocytes T CD8+. Des protéines extracellulaires peuvent aussi être présentées par des CMH de classe I aux lymphocytes T CD8+ par la présentation antigénique croisée (figure 3).



Nature Reviews | Immunology

Figure 3. Les différentes voies de présentation antigénique.

Les CMH de classe I présentent des peptides venant de protéines endogènes dégradées principalement dans le cytosol. Quant à eux, les CMH de classe II présentent des peptides dont les protéines exogènes ont été dégradées dans des endosomes. Ces protéines proviennent principalement de l'environnement extracellulaire, mais aussi de composantes endogènes, comme les protéines membranaires, des composantes de la voie endocytique et des protéines cytosoliques qui accèdent aux endosomes grâce à l'autophagie. Les cellules dendritiques CD8+ ont la capacité unique de pouvoir amener au CMH de classe I des antigènes exogènes, mais ce mécanisme n'est pas encore très bien compris. Adaptée de Villadangos *et al.*, 2007

1.2.1 Présentation par le CMH classe I

Les protéines antigéniques présentées par cette voie sont des protéines intracellulaires. Par exemple, elles peuvent être produites dans le cytoplasme ou provenir de virus se répliquant dans la cellule infectée. Toutes ces protéines, ainsi que les protéines mal formées de la cellule hôte, sont ciblées pour être détruites par des protéasomes cytosoliques et nucléaires. Les peptides obtenus sont transportés vers le réticulum endoplasmique (RE) par un transporteur associé avec la présentation antigénique (TAP) pour rejoindre le CMH de classe I. TAP lie les peptides dans le cytoplasme et les fait traverser la membrane du RE jusqu'à l'intérieur ce qui est l'inverse de la direction normale lors de la production de protéine. Les molécules de CMH de classe I nouvellement synthétisées, assemblées d'une chaîne lourde polymorphique α et d'une chaîne légère β_2 -microglobuline, sont attachées faiblement à la protéine TAP. Lorsque des peptides entrent dans le RE, ils sont capturés par le CMH de classe I. Si le peptide est composé de 8 à 9 acides aminés et qu'il s'insère parfaitement dans le CMH de classe I, le complexe CMH classe I-peptide est maintenant stabilisé et peut être transporté à la surface de la cellule. Les CMH de classe I qui ne trouvent pas de peptides dans le RE deviennent instables et sont retournés au cytosol pour être dégradés (Neefjes *et al.*, 2011).

1.2.2 Présentation par le CMH classe II

Les cellules présentatrices d'antigènes internalisent les pathogènes par plusieurs mécanismes. Elles peuvent internaliser lorsqu'il y a liaison de l'un de leurs récepteurs directement sur le pathogène, par leur récepteur se liant à la portion Fc des immunoglobulines, par un récepteur du complément (opsonisation) ou par une combinaison de plusieurs de ces récepteurs. Après internalisation par les CPA, les protéines sont amenées dans des vésicules intracellulaires très acides, les endosomes, qui peuvent fusionner avec les lysosomes. Dans ces vésicules, les protéines sont clivées par des enzymes protéolytiques pour former plusieurs peptides de différentes longueurs.

Les CPA produisent constamment des molécules de CMH de classe II dans le RE. Elles sont composées de chaînes α et β transmembranaire qui sont associées à une chaîne invariable I_i qui contient une séquence , CLIP, qui lie fermement la niche peptidique du CMH de classe II. Ce complexe migre vers la surface cellulaire dans une vésicule exocytique qui va fusionner avec une vésicule endosomale contenant les peptides intracellulaires. Cette vésicule contient aussi une protéine appelée DM, qui a pour fonction de déloger CLIP du CMH de classe II. Ainsi, la niche peptidique du CMH de classe II est disponible pour recevoir un peptide. Si le CMH de classe II est capable de lier un des peptides générés, le complexe devient stable et migre vers la surface cellulaire. Si le CMH de classe II ne lie aucun peptide, il devient instable et est dégradé par des protéases contenues dans l'endosome (Neefjes *et al.*, 2011).

1.2.3 Présentation croisée

Il existe aussi une troisième voie de présentation antigénique, la présentation croisée, dont les CMH de classe I présentent des antigènes exogènes. Cette voie est très utile, par exemple, lorsque les CPA ne sont pas directement infectées et qu'elles ont besoin d'obtenir des antigènes des agents infectieux pour les présenter sur les CMH de classe I. Deux grand types de voies intracellulaires possibles de présentation croisée ont été décrites et elles sont référées comme étant la voie cytosolique et la voie vacuolaire. La présentation croisée par la voie cytosolique est sensible aux inhibiteurs du protéasome , ce qui suggère que les protéines internalisées se dirigent vers le cytosol où elles seront dégradées par le protéasome (Kovacsovics-Bankowski *et al.*, 1995). Les peptides générés par le protéasome peuvent donc aller rejoindre la voie « classique » de présentation par le CMH de classe I qui comprend le transport du peptide par TAP et le chargement du peptide sur une molécule de CMH de classe I nouvellement formée. Cependant, il n'y a aucune preuve directe que le peptide est chargé sur le CMH de classe I dans le RE. Le recrutement de TAP et du CMH de classe I aux phagosomes et aux endosomes suggère que le chargement du peptide pourrait se produire aussi dans les compartiments d'endocytose (Burgdorf *et al.*, 2008, Guermonprez *et al.*, 2003, Houde *et*

al., 2003). Par conséquent, la voie cytosolique de la présentation croisée est considérée comme la voie dans laquelle la transformation de l'antigène se produit dans le cytosol, quel que soit l'emplacement du chargement peptidique. Contrairement à la voie cytosolique, la voie vacuolaire est résistante aux inhibiteurs du protéasome et généralement indépendante de TAP, mais est sensible aux inhibiteurs de la protéolyse lysosomale (Shen *et al.*, 2004). Ceci suggère le traitement et le chargement de l'antigène se produisent tous les deux dans les compartiments d'endocytose dans cette voie. Ajoutant à la confusion, il a été démontré récemment que la voie cytosolique peut également être indépendante de TAP, ce qui impliquerait peut-être un autre transporteur de peptide non identifié jusqu'à présent (Merzougui *et al.*, 2011). Un autre modèle de présentation croisée celui de la voie endosomale dépendante des TAP a aussi été suggéré. Le TAP est recruté vers l'endosome précoce par le signal TLR4/MyD88. Les antigènes endocytés sortent de l'endosome et vont être protéolysés par le protéasome et les peptides peuvent être retranslocalisés via les TAP et ainsi être chargés sur les CMH I et être les complexes nouvellement formés vont pouvoir être exportés vers la membranes plasmiques (Bevan, 2006).

Initialement, les DCs CD8⁺ avaient été démontrées comme étant les cellules dendritiques les plus aptes à induire la présentation croisée que les DCs CD8⁻, bien que les deux soient aussi aptes à présenter un antigène (Kamphorst *et al.*, 2010). Cependant, plusieurs études ont permis de mettre en évidence que d'autres types de DCs pouvaient aussi induire la présentation croisée. C'est le cas des CD103⁺ DCs que l'on retrouve dans les poumons et la peau, ainsi que les DCs que l'on retrouve dans des modèles d'inflammation (Bedoui *et al.*, 2009, Desch *et al.*, 2011, Segura *et al.*, 2009). Chez l'humain, la présentation croisée serait assurée par les cellules de Langerhans, les CD1a⁺ DCs et les BDCA3⁺ DCs qui ont récemment été proposées comme étant les homologues des CD8⁺ DCs des souris (Bachem *et al.*, 2010, Segura *et al.*, 2012). La capacité de ces DCs à faire de la présentation croisée est seulement possible lorsque les cellules dendritiques sont dans les dernières étapes de leur développement (Sathe *et al.*, 2011).

Puisque l'IFN de type I est exprimé très rapidement en réponse à une infection et qu'il est important dans la maturation des DCs, l'IFN- α/β pourrait être un acteur important dans l'induction de la présentation croisée. En effet, une étude dans laquelle la réponse en lymphocytes T (LT) CD8+ contre OVA a été étudiée dans le contexte d'une infection virale. L'administration de la protéine OVA, qui ne peut pas stimuler de réponse LT CD8+ sans la présentation croisée, lors d'une infection par le virus de chorioméningite lymphocytaire (LCMV) a montré une induction efficace d'une réponse spécifique LT CD8+ à OVA. De plus, aucune présentation croisée n'a été observée chez les souris immunisées avec OVA dans le cas d'une infection avec le virus de la vaccine, qui est un très faible inducteur d'IFN-I comparativement à LCMV, ou lors de l'infection de souris déficiente en IFN-I avec LCMV. Bref, la présentation antigénique croisée dans le contexte de LCMV, par exemple, a lieu par un mécanisme dépendant de l'IFN- α/β (Le Bon *et al.*, 2003). En plus de son rôle important lors d'infections, la présentation croisée pourrait être exploitée pour la vaccination, notamment pour des vaccins où l'injection de virus atténués vivants peut amener des risques significatifs ainsi que pour les vaccins contre le cancer.

1.3 Immunité adaptative

1.3.1 Réponse humorale

L'immunité humorale est médiée par les anticorps et elle est la branche de l'immunité adaptative qui a pour fonctions de neutraliser et d'éliminer les pathogènes extracellulaires et les toxines. Les anticorps sont produits par les lymphocytes B (LB) qui lorsqu'ils reconnaissent un antigène, peuvent s'activer et se différencier en cellules sécrétant des anticorps, les plasmocytes. Les lymphocytes B expriment deux classes d'anticorps liés à la membrane, IgM et IgD, qui agissent comme récepteurs pour les antigènes. L'activation des lymphocytes B résulte en la prolifération des LB spécifiques à l'antigène, appelé expansion clonale, ainsi que leur différenciation en plasmocytes. Durant leur différenciation, certaines cellules B commencent à produire des anticorps de différents isotopes (classes), phénomène appelé commutation isotypique, qui ont

différentes fonctions et qui servent à combattre différents pathogènes. Ensuite, une exposition répétée à un antigène mène à la production d'anticorps ayant une plus grande affinité pour l'antigène. Ce processus s'appelle la maturation d'affinité et permet de produire des anticorps ayant une meilleure capacité à lier et neutraliser les pathogènes (Abbas, 2009).

Les réponses en anticorps sont classées en deux groupes soient la réponse T-dépendante et la réponse T-indépendante selon si l'aide des cellules T est requise. Les LB reconnaissent et sont activés par plusieurs éléments comme les protéines, les polysaccharides et les lipides. Les antigènes protéiques sont pris en charge par les CPA et sont reconnus par les lymphocytes T auxiliaires qui jouent un rôle important dans la commutation isotypique et la maturation d'affinité. Les polysaccharides, les lipides et autres composantes non protéique stimulent la production en anticorps sans l'aide des LT auxiliaires, donc la réponse en anticorps contre ces éléments est appelée T-indépendante. Les anticorps produits lors de cette réponse montrent peu de commutation isotypique et de maturation d'affinité. Différentes classes de cellules B répondent préférentiellement aux antigènes protéiques ou non-protéiques (**figure 4**). Parmi ceux-ci, on retrouve les lymphocytes B folliculaires et les lymphocytes B de la zone marginale. Les LB folliculaires résident dans les follicules des organes lymphoïdes et ils sont en majorité responsables de la réponse T-dépendante. Les LB de la zone marginale sont localisés dans la zone marginale de la pulpe blanche de la rate et sont les acteurs principaux de la réponse T-indépendante.

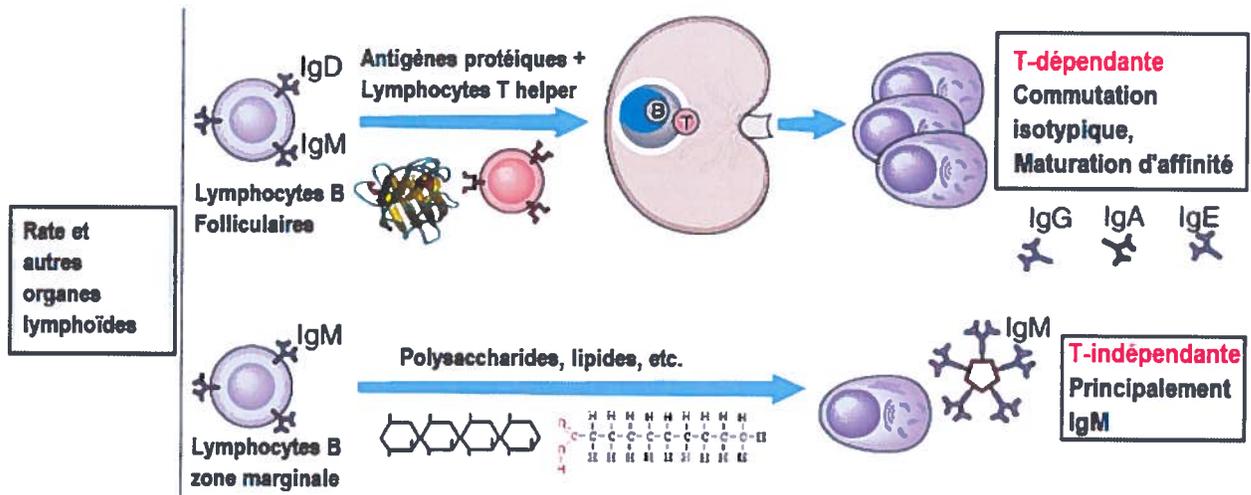


Figure 4. Classes de Lymphocytes B et réponse en anticorps associée.

Les lymphocytes B folliculaires sont responsables de la réponse T-dépendante aux antigènes protéiques tandis que, les lymphocytes B de la zone marginale sont responsables de la réponse T-dépendante contre les polysaccharides et les lipides. Cependant, dans certains cas, les lymphocytes B folliculaires peuvent induire une réponse T-indépendante et les lymphocytes B de la zone marginale permettent l'induction d'une réponse T-dépendante. Adaptée de Abbas et Lichtman (Abbas, 2009)

L'activation des lymphocytes B a lieu lorsque deux ou plusieurs antigènes forment un agrégat ou bien lorsqu'un antigène présente des épitopes répétés et qu'ensuite, ils se lient aux molécules d'Ig à la membrane des cellules B. Les polysaccharides et les lipides contiennent plusieurs épitopes identiques et sont donc aussi capable de lier plusieurs Ig en même temps sur les cellules B. Ces récepteurs (IgM et IgD) permettent de lier les antigènes, mais ne sont pas capable de transduire le signal d'activation. Donc, ils sont liés de façon non covalente à deux autres protéines, appelées $Ig\alpha$ et $Ig\beta$, ce qui forme le récepteur des cellules B (BCR). Le domaine cytoplasmique de $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ contient des ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) que l'on retrouve dans plusieurs autres voies de signalisation. Lorsque deux ou plusieurs récepteurs des cellules B sont regroupés, les tyrosines des ITAMs sont phosphorylées par les kinases associées avec le complexe du BCR. Ces tyrosines deviennent des sites d'ancrage pour des protéines adaptatrices qui vont permettre le recrutement d'autres molécules de signalisation pour ainsi activer les facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (Abbas, 2009, Keven Murphy, 2011).

1.3.1.1 Le système du complément dans la réponse humorale

En plus de son rôle dans l'immunité innée, le système du complément est aussi très important dans la régulation de l'immunité adaptative. Il y a déjà environ 40 ans, il a été observé par le Dr Pepys que si l'on enlevait la composante C3 du complément dans le sérum d'animaux expérimentaux ceux-ci avaient une diminution de la réponse en anticorps contre les antigènes T dépendant (Pepys, 1972). Jusqu'à ce jour, plusieurs recherches ont été faites dans le but de comprendre ce qui liait le système du complément avec la réponse humorale. Il est maintenant clair que le rôle principal du complément dans la réponse humorale est l'interaction entre le récepteur du complément CR2 (ou CD21), que l'on retrouve sur les cellules B ainsi que sur les cellules dendritiques folliculaires (FDCs) tant chez les humains que chez la souris, et les antigènes liés par la molécule C3d (Carroll *et al.*, 2012). Sur les cellules B, le CD21 forme un complexe avec la protéine de signalisation CD19 et le CD81 (figure 5). L'engagement du CD21-CD19-CD81 avec le récepteur Ig des cellules B abaisse le seuil d'activation des cellules B et fournit aussi un important signal de survie (Carroll, 2004). Un autre mécanisme par lequel le complément améliore l'immunité adaptative est par la localisation de l'antigène aux FDCs dans les follicules lymphoïdes (Fang *et al.*, 1998). Les FDCs sécrètent des chimiokines chimioattractantes pour les lymphocytes B et sont importantes pour l'organisation des centres germinatifs (Cyster *et al.*, 2000). Les FDCs expriment fortement le CD21 et CD35 ce qui permet la rétention des complexes immuns liés par des molécules de C3 dans les compartiments lymphoïdes (Barrington *et al.*, 2002). Il a été observé que les cellules B naïves étaient des transporteurs majeurs de complexes immuns recouverts de complément jusqu'aux follicules et que l'absorption et le transfert des complexes immuns aux FDCs étaient dépendants du CR2 et du C3d (Carroll *et al.*, 2012).

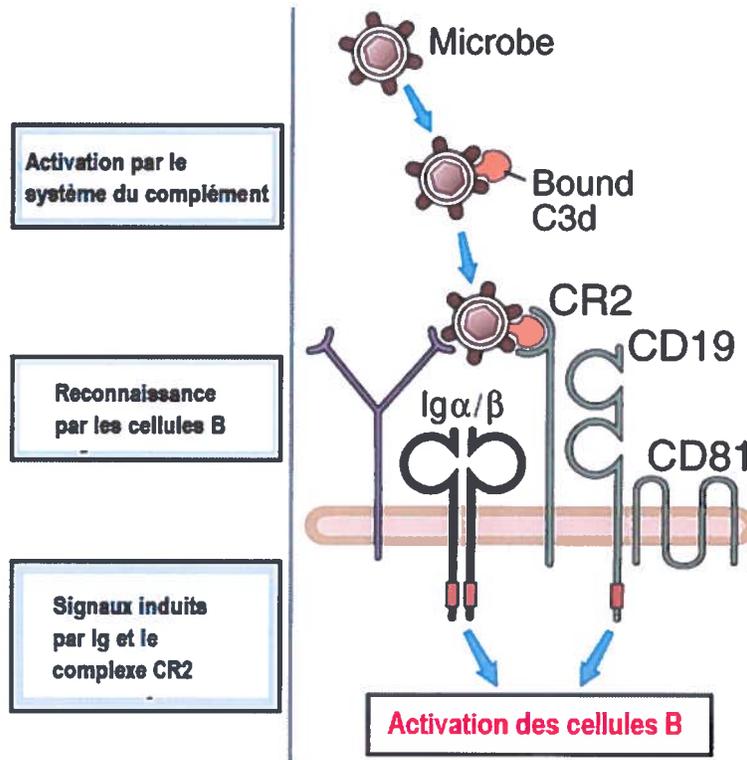


Figure 5. Le rôle de la composante C3d du complément dans l'activation des cellules B.

L'activation du système du complément par des pathogènes mène à la liaison du complément, plus particulièrement le C3d aux pathogènes. Les lymphocytes B reconnaissent simultanément l'antigène par leur récepteur Ig et le C3d lié par le CR2 (CD21). Le CR2 est attaché à un complexe de protéines, CD19 et CD81, qui sont aussi impliqués dans les signaux d'activation induits dans les cellules B. Adaptée de Abbas et Lichtman (Abbas, 2009)

1.3.2 Réponse cellulaire

L'immunité cellulaire est la branche de l'immunité adaptative qui a pour rôle de combattre principalement les infections par des pathogènes intracellulaires, mais aussi les vers, les bactéries et protozoaires extracellulaires. Les pathogènes peuvent être ingérés par des phagocytes dans le cadre du mécanisme de défense de l'immunité innée. D'autres, pathogènes, comme les virus, peuvent lier les récepteurs à la surface de plusieurs cellules et sont capables de les infecter ainsi que de s'y répliquer. La réponse cellulaire est prise en charge par les lymphocytes T et on retrouve deux types de LT, soit les LT CD4+ qui vont activer les phagocytes pour éliminer les pathogènes résidants dans les vésicules de ces phagocytes et les LT CD8+ cytotoxiques (CTLs) qui vont tuer, entre

autre, toutes cellules contenant des pathogènes ou des protéines du pathogène dans leur cytoplasme mais aussi des bactéries (Abbas, 2009, Keven Murphy, 2011).

L'initiation de la réponse cellulaire requiert plusieurs récepteurs sur les cellules T qui reconnaissent leur ligand sur les cellules présentatrices d'antigènes. Le récepteur des cellules T (TCR) reconnaît les complexes CMH-peptides sur les CPA, les corécepteurs CD4 et CD8 reconnaissent les molécules du CMH, les molécules d'adhésion (LFA-1, VLA-4) renforcent la liaison entre les cellules T et les CPA et des récepteurs de costimulation (comme, entre autre, le CD28 (signal positif) et le CTLA-4 (signal négatif)) qui reconnaissent les seconds signaux provenant des CPA.

En réponse à l'antigène et aux molécules de costimulation, les lymphocytes T, particulièrement les LT CD4+, sécrètent rapidement différentes cytokines. La première cytokine produite par les LT CD4+ est l'interleukine 2 (IL-2) après seulement 1 à 2 heures suivant l'activation. La principale action de l'IL-2 à ce stade est de stimuler la prolifération et la survie des cellules T. Dans la première et deuxième journée suivant l'activation, les lymphocytes T commencent à proliférer résultant en une expansion des clones spécifiques à l'antigène. Par exemple, avant infection, on retrouve environ $1/10^5$ à 10^6 LT CD8+ spécifiques à l'antigène tandis qu'environ 1 semaine après l'infection, 10 à 20% des LT sont spécifiques à l'antigène. La prolifération des LT CD4+ est moins importante que celles des LT CD8, environ 1000 fois moins, puisqu'ils ne possèdent pas les mêmes fonctions (Abbas, 2009).

La différenciation des cellules effectrices apparaît normalement environ 3 à 4 jours avec l'exposition au pathogène. Les LT CD4+ vont se différencier en cellules effectrices qui vont produire des cytokines et exprimer des molécules de surfaces pour activer les phagocytes et les lymphocytes B. On retrouve trois principaux sous-types de LT CD4+ soit les T_H1 , les T_H2 et les T_H17 , mais il en existe plusieurs autres comme les Treg, les TFh et les Th9. Les T_H1 vont stimuler la phagocytose ainsi que la destruction des pathogènes par la réponse cellulaire. La cytokine produite la plus importante est l'IFN- γ , mais on retrouve aussi du TNF- α et de l'IL-2. L'IFN- γ est un important activateur de macrophages

et stimule la production d'anticorps favorisant la phagocytose des pathogènes ainsi que l'activation du complément. L'IFN- γ stimule aussi l'expression des CMH II sur les cellules dendritiques et les macrophages, servant ainsi à amplifier la réponse T. Quant à eux, les T_H2 servent majoritairement à créer un environnement proinflammatoire induit principalement par les éosinophiles ainsi qu'à limiter les conséquences dommageables de l'activation des macrophages. Ils vont produire de l'IL-4 qui stimule la production d'IgE, de l'IL-5 qui active les éosinophiles, mais aussi de l'IL-13 et de l'IL-10 qui peuvent servir à inhiber l'action microbicide des macrophages. Finalement, les T_H17 sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22 et sont les principaux médiateurs d'inflammation dans plusieurs réactions immunologiques. Ce sous-type a d'ailleurs été découvert dans des modèles animaux de sclérose en plaques, maladie inflammatoire de l'intestin et arthrite rhumatoïde. Les T_H17 pourraient aussi être impliqués dans la défense contre les infections bactériennes et fongiques (Abbas, 2009).

Les LT CD8+ vont se différencier en CTLs qui sont capables de tuer les cellules infectées exprimant l'antigène. La reconnaissance de l'antigène par les CTLs mène à l'activation de signaux de transductions, et ainsi à la création de la synapse immunologique, qui vont permettre l'exocytose du contenu retrouvé dans les vésicules des CTLs vers les cellules cibles. Trois types de protéines contenus dans ces vésicules sont importantes pour tuer les cellules cibles ; les granzymes, les perforines et les granulysines. Les granzymes sont des enzymes qui vont cliver et donc activer les caspases qui sont présentes dans le cytoplasme des cellules cibles induisant ainsi l'apoptose. Les perforines, quant à elles, sont nécessaires pour l'entrée des granzymes dans le cytoplasme. Les granulysines vont aussi permettre de créer des trous dans les parois membranaires des cellules cibles et d'induire l'apoptose. Les CTLs sont aussi capables de produire de l'IFN- γ et du TNF- α comme les LT CD4+ ainsi que des chimiokines.

1.3.2.1 Le système du complément dans la réponse cellulaire

En plus de son rôle dans l'immunité innée et l'immunité humorale, le système du complément est aussi un acteur important dans l'immunité cellulaire. Comme il a été

mentionné plus tôt, les cellules présentatrices d'antigènes expriment plusieurs récepteurs du complément à leur surface. Lors de la liaison du complément sur les CPA, celui-ci est capable de moduler la fonction de ces cellules. En effet, il a été observé qu'en absence de C1q ou C3 l'absorption de l'antigène par les CPA était diminuée résultant en une diminution de l'activation des CPA ainsi que l'activation des cellules T (Castellano *et al.*, 2004, Kerekes *et al.*, 2001, Walport, 2001b). De plus, le relâchement d'anaphylatoxines comme C3a et C5a au site d'infection active leur récepteur sur les CPA ce qui fait en sorte que la production en IL-12 peut être modulée. L'induction de la production d'IL-12 favorise une réponse T_H1 tandis que la suppression de la production d'IL-12 favorise une réponse T_H2. L'induction ou la suppression de la production d'IL-12 lors de l'activation des récepteurs des anaphylatoxines C3aR et C5aR sur les CPA vont être favorisées selon le modèle de maladie et la voie d'injection de l'antigène utilisés (Drouin *et al.*, 2001, Kawamoto *et al.*, 2004). Contrairement aux CPA, les lymphocytes T expriment beaucoup moins de récepteurs du complément à leur surface. Cependant, les LT sont capables de lier les complexes immuns enveloppés de C1q ce qui entraînerait l'activation des LT et la production d'IFN- γ et de TNF- α (A. Chen *et al.*, 1994). Le C5aR est aussi exprimé sur la plupart des cellules T et est chimioattractant pour C5a et favoriserait ainsi la migration et le recrutement des cellules du système immunitaire (Nataf *et al.*, 1999, Tsuji *et al.*, 2000).

En raison de son rôle important dans la réponse cellulaire, il n'est pas étonnant que le système du complément a été étudié dans les rejets de greffe. Le principal obstacle à la réussite de la transplantation est le rejet de la greffe, un processus qui est principalement mené par la réponse T (Sacks *et al.*, 2003). Il a été observé que chez les souris qui étaient déficientes en C3 ou en C4 ou chez les souris ayant reçues des inhibiteurs de complément, que la survie était prolongée pour des allogreffes de peau et surtout des greffes vascularisées. Ceci était relié à une réduction des lésions causées par l'ischémie-reperfusion ainsi qu'une diminution de l'inflammation et du recrutement de cellules effectrices (Sacks *et al.*, 2003).

Bref, le système du complément n'est pas qu'un acteur de la réponse immunitaire innée. Il est aussi très important dans la réponse adaptative, tant pour la réponse humorale que pour la réponse cellulaire. Il s'avère être un joueur important dans la défense contre les pathogènes, notamment dans la réponse antivirale.

1.4 Infections virales persistantes

Chaque année, plusieurs millions de personnes seront infectées par des virus. Il est possible, pour certains virus, de prévenir une infection virale à l'aide d'un vaccin. Lorsqu'il n'existe pas de vaccin contre un virus, le système immunitaire de l'hôte reste la meilleure défense face à l'infection virale. Il existe trois issues possibles suite à une infection virale. L'infection peut être soit éliminée complètement de l'hôte (aigüe) ou subsister chez l'hôte (persistante). La troisième issue est la mort de l'hôte. Bien que plusieurs vaccins ont été développés, il existe très peu de vaccins pour prévenir des infections virales persistantes.

Parmi les infections virales persistantes, on dénote le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'hépatite C (VHC). Nous allons nous intéresser davantage au virus de l'hépatite C qui, selon l'organisation mondiale de la santé, infecte plus de 170 millions de personnes à travers le monde. On dénote environ 3-4 millions de nouvelles infections par année et aucun vaccin n'est disponible jusqu'à présent.

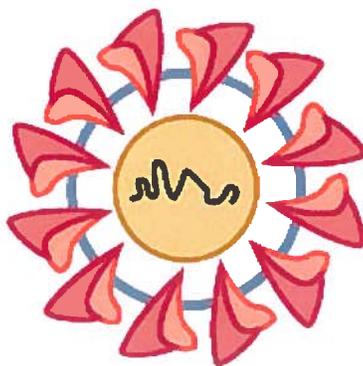
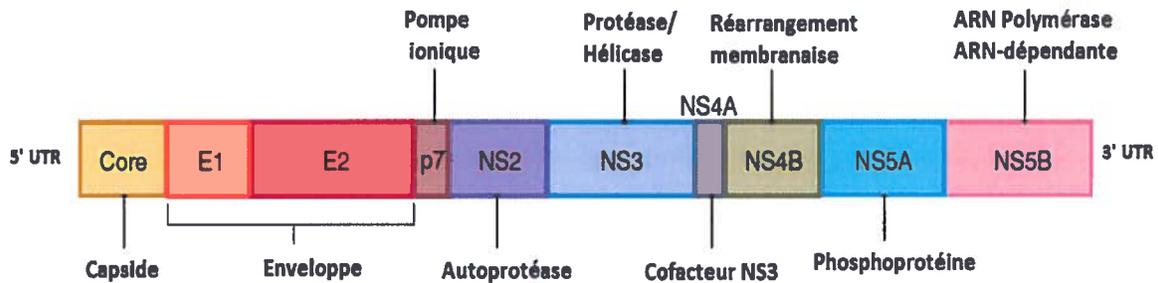
1.4.1 Virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C se démarque des autres virus persistants, puisque 20-25 % des personnes infectées vont réussir à éliminer complètement le virus, tandis que les autres vont être infectées de façon persistante. Ces patients sont à risques élevés de développer des dommages sérieux au foie, comme une cirrhose, une stéatose ainsi qu'un carcinome hépatocellulaire (Lauer *et al.*, 2001). La progression de la maladie est

propre à chaque individu, mais prend normalement des décennies donc, la plupart du temps, les personnes infectées ne sont pas au courant de leur maladie. Le VHC est maintenant la première cause de transplantation du foie en Amérique du Nord et en Europe (R. S. Brown, 2005). L'infection est transmise principalement par la voie parentérale. Bien que la transmission par des transfusions de sang contaminé est très rare dans les pays développés, l'épidémie continue de se propager parmi ceux qui se partagent des aiguilles et des drogues (Shepard *et al.*, 2005).

1.4.1.1 Agent étiologique

Le virus de l'hépatite C est un virus à ARN simple brin enveloppé qui appartient au genre *Hepacivirus* et à la famille des *Flaviviridae*. Son génome a une taille d'environ 9600 bases et code pour une polyprotéine qui est clivée par des protéases cellulaires et virales en 10 différentes protéines (Poenisch *et al.*, 2010) (figure 6). Les protéines structurales core, E1 et E2 se trouvent dans la région amino-terminale de la polyprotéine et sont les constituants des particules virales infectieuses. La protéine hydrophobe p7 ainsi que la protéine non structurale NS2 sont requises pour l'assemblage du virion, mais ne font pas partie des particules sécrétées. La protéine NS3 forme un complexe stable avec la protéine NS4A pour cliver la polyprotéine pour donner les dernières protéines. NS4B induit l'altération des réseaux membranaires qui sont probablement le lieu de la réplication de l'ARN viral. NS5A est une phosphoprotéine qui est requise pour la réplication et l'assemblage et NS5B est l'ARN polymérase ARN-dépendante (Thimme *et al.*, 2012).



Virion

Figure 6. L'organisation du génome et la structure de la particule virale du VHC.

L'ARN du VIHc code pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés. La polyprotéine est clivée pendant et après la traduction par les protéases de l'hôte et virales pour donner 10 protéines, core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. Les protéines core, E1 et E2 font la particule virale et sont appelées protéines structurales, tandis que les autres protéines sont dites non structurales et sont requises pour la réplication du virus. Adaptée de (Dustin *et al.*, 2007)

Les principales cellules ciblées par le VHC sont les hépatocytes. Certaines études ont démontré qu'il était possible de détecter de l'ARN viral dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) (Zignego *et al.*, 2007). Cependant, une étude *in vitro* a permis de démontrer que les cellules du sang étaient non susceptibles à l'infection par le VHC et à la réplication virale (Marukian *et al.*, 2008). Ceci est supporté par les recherches qui ont permis de trouver quatre molécules de surface, CD81, SCARB1, CLDN1 et OCLN, qui participent dans l'entrée du VHC et qui sont hautement exprimées chez les cellules du foie, mais non exprimées pour certaines, chez les cellules du sang (Zeisel *et al.*, 2011). Par contre, d'autres études *in vitro* auraient démontré de la réplication virale dans des cellules neuroépithéliales montrant que le VHC n'est peut-être pas seulement hépatotrope (Fletcher *et al.*, 2010).

La production de particules virales chez les patients infectés est estimée à environ 10^{12} particules par jour et la demi-vie du VHC dans le sérum est d'environ 3 heures (Layden *et al.*, 2000). Aussi, l'ARN polymérase ARN-dépendante fait beaucoup d'erreurs de lecture. Donc, le haut taux de particules virales produites, ainsi que les erreurs accumulées par la polymérase permettent une évolution rapide du virus, ce qui outrepassa la sélection par le système immunitaire et les antiviraux. De plus, il existe 6 génotypes majeurs du VHC et ils diffèrent selon la situation géographique et les thérapies antivirales ne sont pas adaptées pour tous ces génotypes. Le virus de l'hépatite C n'étant pas cytolytique, la destruction des cellules infectées est causée principalement par le système immunitaire de l'hôte plutôt que par le virus lui-même (Chisari, 2005).

1.4.1.2 Réponse immunitaire contre le VHC

Un système immunitaire innée efficace ainsi qu'une bonne réponse adaptative sont essentiels pour contrôler le VHC. En effet, l'élimination du VHC durant l'infection aiguë corrèle avec une induction précoce de la réponse immunitaire innée et une réponse à large spectre de la réponse immunitaire adaptative. Cependant, chez les personnes infectées de façon persistante, ces réponses ont échoué et ont été insuffisantes pour éliminer complètement le virus.

L'IFN de type I a été démontré comme étant efficace contre le virus de l'hépatite C dans des cultures cellulaires (Diegelmann *et al.*, 2010). L'IFN- α/β induit l'expression de plus de 300 gènes dont les produits ont des fonctions antivirales, antiprolifération et immunomodulatoires (Randall *et al.*, 2008). Nous savons que les hépatocytes répondent bien à l'IFN-I produit, mais un débat subsiste sur la provenance de cet IFN. Certains croient que l'IFN-I provient des hépatocytes infectés, tandis que d'autres pensent que ce sont d'autres cellules, comme les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui infiltrent le foie (Bigger *et al.*, 2001). Cependant, *in vivo*, la réponse en interférons de type I n'est pas suffisante dans la majorité des cas pour éliminer complètement le virus. Les cellules NK sont aussi importantes dans la réponse innée contre le virus de l'hépatite C (Cheent

et al., 2011). L'expression du récepteur d'activation des NK, NKG2D, est augmentée lors d'une infection par le VHC. Ceci est accompagné par une augmentation de la production de l'IFN- γ et de la cytotoxicité (Amadei *et al.*, 2010). Toutefois, il n'est pas encore clair si la capacité des cellules NK à produire des cytokines antivirales est affectée chez les patients infectés de façon persistante. Deux groupes ont reporté un défaut dans la production d'IFN- γ , tandis que deux autres groupes en sont venus à une conclusion opposée (Ahlenstiel *et al.*, 2010, Amadei *et al.*, 2010, Golden-Mason *et al.*, 2008, Oliviero *et al.*, 2009). Un autre élément important du système immunitaire inné face à l'infection par le VHC est le système du complément. En effet, une étude a permis de démontrer que les protéines E1 et E2 étaient des ligands potentiels pour le MBL. Le MBL a été démontré comme étant capable de neutraliser l'entrée de pseudoparticules du VHC dans des cellules Huh-7 et ce, pour plusieurs génotypes. La liaison du MBL aux particules virales E1 et E2 active le système du complément via la MASP2 ce qui mène à l'inhibition de l'entrée du virus (K. S. Brown *et al.*, 2010).

Les anticorps neutralisants sont importants dans la protection contre plusieurs virus. Toutefois, dans le cas du VHC, les anticorps neutralisants ne sont pas ceux qui permettent de réduire la charge virale durant la phase aiguë d'infection, mais c'est plutôt la réponse cellulaire qui assure ce rôle. Plusieurs études ont montré que l'élimination du VHC était associée avec une forte et soutenue réponse en lymphocytes T CD4+ et T CD8+ ciblant plusieurs épitopes chez les différentes protéines virales du VHC. Premièrement, comme il a été démontré par plusieurs équipes, on dénote une forte réponse périphérique et intra hépatique en T CD8+ spécifiques au virus ciblant plusieurs épitopes ce qui corrèle avec l'apparition de dommages au foie ainsi que l'élimination du virus (Cox *et al.*, 2005a, Lechner *et al.*, 2000, Thimme *et al.*, 2001, Thimme *et al.*, 2002). Deuxièmement, on retrouve une forte association entre des allèles de HLA de classe I et la résolution spontanée de l'infection. Grâce à une cohorte irlandaise de femmes accidentellement infectées avec le génotype 1b du VHC il y a plus de 20 ans, il a été possible de montrer l'importance de certains allèles de HLA de classe I dans l'élimination du virus. Les allèles de HLA de classe I A3, B7 et Cw*10 ont été associés avec la clairance

du virus, tandis que la B8 a été associée avec la persistance (McKiernan *et al.*, 2004). Troisièmement, il a été démontré, *in vivo*, que la réponse en LT CD8+ permettait de contrôler l'infection par le VHC. Après avoir dépleté les T CD8+ chez des chimpanzés, l'infection par le VHC a persisté chez ces animaux jusqu'à ce que la réponse en LT CD8+ reviennent et que les LT CD8+ spécifiques au virus apparaissent (Shoukry *et al.*, 2004, Shoukry *et al.*, 2003). Ensemble, ces résultats montrent que les LT CD8+ sont très importants pour contrôler le VHC. Par contre, en plus des LT CD8+, les LT CD4+ spécifiques au virus sont aussi très importants dans le contrôle du virus de l'hépatite C. En effet, plusieurs études ont permis de démontrer qu'une forte et soutenue réponse en T CD4+ spécifiques au virus était aussi importante pour l'élimination du VHC (Day *et al.*, 2002, Gerlach *et al.*, 1999, Schulze zur Wiesch *et al.*, 2005). Comme pour les HLA de classe I, certains allèles des HLA de classe II ont aussi été démontrés comme étant importants dans le contrôle du VHC. C'est le cas pour DRB1*1101, DQB1*0301, DRB1*01, DRB1*0401 et DRB1*15 (Hong *et al.*, 2005, McKiernan *et al.*, 2004). La déplétion des LT CD4+ chez les chimpanzés infectés avec le VHC a aussi mené à une persistance du virus chez ces animaux (Grakoui *et al.*, 2003).

1.4.1.3 Évasion du VHC au système immunitaire

Malgré une réponse anti-VHC menant à une élimination du virus par le système immunitaire, le VHC peut aussi réussir à échapper par plusieurs mécanismes à cette réponse et persister chez l'hôte. Premièrement, le VHC a été démontré comme étant capable d'interférer avec la réponse antivirale. En effet, la protéase NS3/4A du virus clive, *in vitro*, deux molécules importantes dans la voie de signalisation IRF3 ce qui fait en sorte que les cellules ne sont plus capables de produire efficacement de l'IFN de type I (Foy *et al.*, 2003, K. Li *et al.*, 2005). De plus, cet effet a aussi été démontré chez l'humain (Bellecave *et al.*, 2010). Deuxièmement, il existe quelques études indiquant que le VHC pourrait interférer avec l'action des cellules NK. Une étude suggère que la NS5A du virus amènerait les monocytes à produire des grandes quantités d'IL-10 et beaucoup moins d'IL-12 ce qui aurait pour conséquence de réguler à la baisse

l'expression d'un récepteur d'activation des NK, le NKG2D (Sene *et al.*, 2010). D'autres études proposent que le VHC inhibe les cellules NK par la liaison du CD81 à la surface des NK avec la protéine virale E2 ce qui aurait pour effet de diminuer la cytotoxicité et la production d'IFN- γ par les cellules NK. Cependant, ce phénomène n'a été observé qu'en présence de hautes concentrations de E2 ou de virions immobilisés sur une plaque de culture cellulaire, mais pas par une exposition directe des cellules NK aux particules infectieuses du VHC ce qui laisse à se demander si ce phénomène pourrait être observé *in vivo* (Crotta *et al.*, 2010, Farag *et al.*, 2011). Troisièmement, comme il a été mentionné plus tôt, les composantes du système du complément sont synthétisées principalement au foie, et nous savons que le virus de l'hépatite C infecte cet organe. Il a été observé que le sérum patients chroniquement infectés avec le VHC contenait des niveaux plus bas de C3 comparé aux individus sains. Autrement dit, il a été démontré que la protéine NS5A du VHC réussissait à inhiber la production de C3 que l'on retrouve dans toutes les voies principales d'activation du système du complément, ce qui a pour effet de compromettre une partie du système immunitaire inné (Mazumdar *et al.*, 2012). Quatrièmement, le VHC réussit aussi à échapper à la réponse humorale, notamment par l'interaction du VHC avec SCARB1 lors de l'entrée du virus qui permettrait une protection contre les anticorps neutralisants (Logvinoff *et al.*, 2004). Il est aussi intéressant de savoir que plusieurs études ont permis de mettre en évidence que le VHC échapperait aux anticorps neutralisants par le transfert direct du virus entre cellules (Brimacombe *et al.*, 2011, Timpe *et al.*, 2008, Witteveldt *et al.*, 2009). Cinquièmement, dû au taux élevé de réplication virale et de virions produit par jour ainsi que les erreurs commises par l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus, il existe plusieurs variants du virus qui circulent dans les patients. Il a d'ailleurs été démontré que ces virus pouvaient échapper aux réponses en LT CD8+ chez les patients qui ont développé une infection chronique, mais ce phénomène n'était pas observé chez les patients qui ont éliminé l'infection (Cox *et al.*, 2005b, Cox *et al.*, 2005c, Tester *et al.*, 2005). Sixièmement, il a été observé par plusieurs groupes de recherche que lorsque les fonctions des LT CD8+ étaient affectées, par exemple par leur incapacité à produire des cytokines antivirales et

à proliférer en réponse à un antigène, il y avait une forte chance que le virus établisse une persistance chez l'hôte. Chez les patients infectés chroniquement avec le VHC, il a été observé que les LT CD8+ spécifiques au VHC exprimaient fortement PD-1 et faiblement CD127 ce qui a pour conséquence d'inhiber les fonctions et d'épuiser ces lymphocytes. De plus, les LT CD8+ spécifiques exprimant fortement PD-1 sont plus enclins à l'apoptose. Cependant, leurs fonctions pouvaient être rétablies lorsque l'on bloque PD-1 à l'aide d'anticorps (Bensch *et al.*, 2007, Golden-Mason *et al.*, 2007, Radziejewicz *et al.*, 2008). D'autres études ont aussi démontré qu'une réponse en LT CD4+ était importante pour soutenir la réponse en LT CD8+ cytotoxique lors d'infection chronique chez la souris (Matloubian *et al.*, 1994). Cependant, dans le cas d'infection persistante avec VHC, les réponses en LT CD4+ sont faibles ou même absentes et fonctionnellement déficientes dues, par exemple, à une faible sécrétion d'IL-2 (Semmo *et al.*, 2005). Finalement, de plus en plus d'études suggèrent que les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont un rôle significatif dans la suppression des réponses T spécifiques au virus. Par exemple, dans les patients infectés chroniquement, les LT CD4+CD25+ ont été retrouvés à une fréquence plus élevée que chez les patients qui ont éliminé le VHC ou chez les individus sains (Boettler *et al.*, 2012, Cabrera *et al.*, 2004, Sugimoto *et al.*, 2003). Ces Treg vont supprimer la prolifération ainsi que la sécrétion de cytokines antivirales des LT CD8+ *in vitro*. *In vivo*, ces Treg auraient pour fonction de limiter l'immunopathologie au foie en bloquant directement les LT CD8+ spécifique au VHC (Franceschini *et al.*, 2009).

1.4.1.4 Modèles d'étude pour le VHC

Dans le passé, les recherches sur le virus de l'hépatite C ont été plus difficiles dû au manque d'un système de culture cellulaire approprié. Les méthodes conventionnelles de culture cellulaire ont toutes échoué pour obtenir une production et infection efficace du VHC. Cependant, plus récemment, de nouvelles méthodes ont été développées ce qui permet désormais une étude plus facile du VHC. Wakita et ses collègues ont réussi à développer un réplikon de pleine longueur du génotype 2a du VHC,

le JFH-1, qui a été isolé d'un patient Japonais souffrant d'une hépatite fulminante. Ce VHC se réplique adéquatement et produit des particules virales (VHCcc) dans les cellules Huh-7 (Wakita *et al.*, 2005). D'autres études ont permis de mener au développement d'une lignée cellulaire dérivée des Huh-7, les Huh-7.5.1. Cette nouvelle lignée permet d'augmenter les titres viraux à 10^4 - 10^5 unités infectieuses par millilitre dans du surnageant de culture et ces cellules sont hautement permissives à l'infection par JFH-1 (Zhong *et al.*, 2005). Les particules infectieuses de JFH-1 sont un outil idéal pour étudier le cycle viral du VHC incluant l'attachement, l'entrée, le mouvement à l'intérieur de la cellule ainsi que la réplication. Les particules virales peuvent être neutralisées avec un anti-CD81 et des anticorps monoclonaux contre les glycoprotéines virales E1 et E2 (Cai *et al.*, 2005). La réplication des VHCcc peut aussi être inhibée par l'IFN- α et d'autres antiviraux spécifiques au virus de l'hépatite C ce qui indique que le système de culture de particules infectieuses de JFH-1 est un outil puissant pour étudier d'autres antiviraux ainsi que le développement de vaccins. Cependant, il y a quelques limitations à l'utilisation de ce système. Par exemple, les particules infectieuses ont été isolées d'un patient ayant une hépatite fulminante ce qui est plutôt rare et les particules du VHC sont d'un génotype de type 2 qui n'est pas le génotype dominant à travers le monde. Des pseudoparticules du VHC (VHCpp) ont aussi été produites pour étudier les étapes précoces du cycle viral. Les VHCpp ont été produites par transfection de trois vecteurs dans des cellules 293T. Elles peuvent être aussi neutralisées par des anticorps monoclonaux dirigés contre les glycoprotéines virales E1 et E2 et servent aussi à identifier des inhibiteurs de l'entrée virale (Cai *et al.*, 2005, Hsu *et al.*, 2003).

Les humains et les chimpanzés sont les deux seules espèces naturellement permissives au virus de l'hépatite C. Les études dans les chimpanzés sont utiles puisqu'elles permettent d'analyser tous les animaux qui sont exposés, contrairement aux humains, dont les résultats peuvent être biaisés puisque les études portent majoritairement sur les individus qui présentent des signes cliniques et ne comportent pas ceux qui sont asymptomatiques, qui ne développent pas d'anticorps ou qui ne présentent plus d'anticorps après rémissions. De plus, l'ADN des chimpanzés a 98-99 % de similarité

avec celui des humains, donc il est possible d'utiliser les mêmes réactifs et tests que pour les humains. Les études chez les chimpanzés ont contribué à une meilleure compréhension du VHC, notamment pour évaluer l'infectiosité de clones moléculaires du VHC et de confirmer la pertinence de certains éléments génétiques dans la compréhension du cycle de vie du virus. Cependant, l'évolution clinique de l'hépatite est moindre que celle observée chez les humains et la réponse humorale est plus faible. De plus, des considérations éthiques ainsi que des hauts coûts et une faible accessibilité aux chimpanzés font en sorte que les chercheurs se tournent vers des modèles animaux plus abordables, comme les rongeurs, pour poursuivre leur recherche sur le VHC (Rehermann *et al.*, 2005). La musaraigne a été utilisée il y a une dizaine d'années comme modèle d'infection par le VHC. Bien qu'elle pouvait être infectée par le VHC, après une immunosuppression sévère, la persistance virale ne pouvait être établie dans ce modèle (Xie *et al.*, 1998). La diversité génétique ainsi que la rapidité de reproduction des souris ont rendu attrayante leur utilisation. Par contre, les cellules murines étant résistantes à l'entrée du VHC, plusieurs modèles de souris de laboratoire ont dû être développés pour rendre les souris susceptibles à l'infection. On dénote, par exemple, un modèle de souris transgénique exprimant différents gènes viraux dans le foie, un modèle d'immunosuppression combinée à une greffe hétérotopique de foie humain ainsi qu'une souris transgénique (uPAC) dont des hépatocytes humains ont été transplantés (Galun *et al.*, 1995, Mercer *et al.*, 2001, Moriya *et al.*, 1998). Bien que ces modèles permettent la réplication virale, la virémie n'est que de courte durée et ils ne permettent pas l'étude du système immunitaire adaptatif. Récemment, un nouveau modèle murin immunocompétent a été développé. Puisque le VHC entre dans les hépatocytes grâce à l'action combinée d'au moins quatre molécules de l'hôte (CD81, SCARB1, CLDN1 et OCLN), une souris exprimant ces 4 protéines humaines a été développée (Dorner *et al.*, 2011). Toutefois, bien que ce modèle est susceptible à l'infection par différent génotype du VHC, nous ne savons pas si les réponses immunitaires engendrées sont comparables à celles de l'humain. D'ailleurs, c'est pour cette raison que plusieurs chercheurs utilisent le virus de la chorioméningite

lymphocytaire (LCMV) comme modèle d'infection persistante, ayant pour hôte naturel la souris, pour l'étude des réponses immunitaires.

1.5 Outils utilisés

1.5.1 Modèles viraux murins

1.5.1.1 Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)

Le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) a été isolé en 1933 à St-Louis par Charles Armstrong lorsqu'il étudiait une épidémie d'encéphalite (Muckenfuss, 1934). Bien que ce fût Armstrong qui a été crédité pour la découverte de ce virus, d'autres chercheurs ont aussi étudié ce virus dans les années 30 et son interaction avec le système immunitaire (Rivers *et al.*, 1936, Traub, 1936a, Traub, 1936b). Les études faites avec le LCMV ont grandement contribué à l'avancement de notre compréhension de l'immunologie et a mené à la découverte de concepts essentiels comme, par exemple, la restriction par les CMH, l'épuisement des lymphocytes T et le dysfonctionnement des LT cytotoxiques lors d'infections persistantes (Zinkernagel, 2002).

1.5.1.1.1 Agent étiologique

Le LCMV est un virus enveloppé faisant partie de la famille des *Arenaviridae* que l'on peut séparer en deux groupes, le nouveau et vieux monde (New World et Old World), le LCMV faisant parti du deuxième groupe. Il possède un génome d'ARN simple brin bisegmenté ambisens. Le LCMV est un virus non cytolitique pléomorphe ayant une apparence de grains de sable dû à l'incorporation de ribosomes dans le virion et il mesure environ de 300 à 400 nm en diamètre (Lehmann-Grube, 1970, Neuman *et al.*, 2005).

Son génome comprend deux segments, le segment short S d'environ 3,4 kb et le segment long L d'environ 7,2 kb codant pour des séquences ne s'entrecoupant pas. Le segment S code pour les protéines structurales du virus, la nucléoprotéine NP et le

précurseur des glycoprotéines GP-C. La GP-C sera ensuite clivé pour donner la GP-1 et la GP-2. Quant à lui, le segment L code pour l'ARN polymérase ARN-dépendante L et pour une protéine à doigt de zinc Z qui est nécessaire pour le bourgeonnement du virus (figure 7) (Beyer *et al.*, 2003, M. J. Buchmeier *et al.*, 1979, Perez *et al.*, 2003, Salvato *et al.*, 1989).

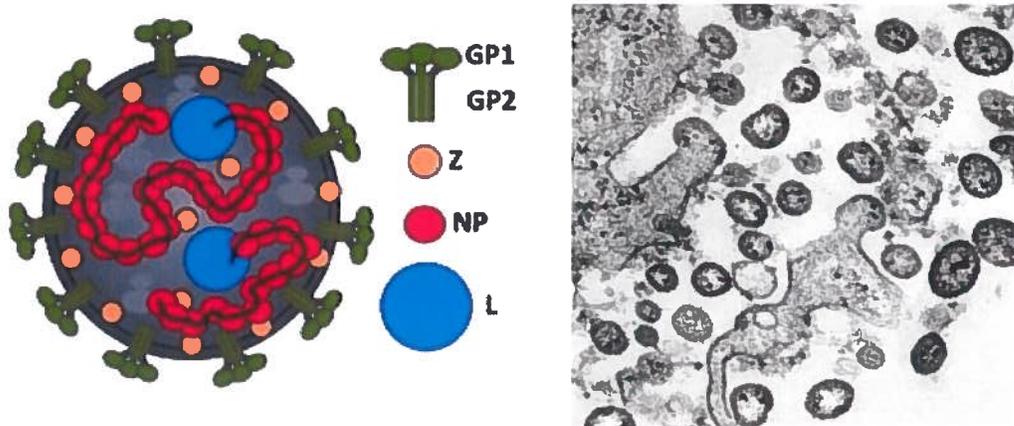


Figure 7. Structure de la particule virale du LCMV et image en microscopie électronique des virions.

À gauche, schéma de la structure du LCMV. Le segment S code pour les protéines structurales GP1, GP2 et NP tandis que le segment L code pour l'ARN polymérase ARN-dépendante L et une protéine régulatrice Z. À droite, représentation du LCMV dans des cultures de cellules Vero. Adaptée de Murphy (F. A. Murphy *et al.*, 1969)

Le LCMV a pour hôte naturel *Mus musculus* (souris), mais il peut infecter une très vaste gamme d'hôtes comme, par exemple, les hamsters, les furets, les chats, les chiens, les rats, les chimpanzés, les chevaux, les vaches et même les humains (Lehmann-Grube, 1972, Skinner *et al.*, 1979). Ceci pourrait être dû au fait que l'entrée du virus se fait via la liaison de la protéine GP-1 à la protéine de surface α -dystroglycan (α -DG) qui est exprimée dans plusieurs tissus chez plusieurs hôtes (Durbeej *et al.*, 1998, Kunz, 2009). L'infection par LCMV chez l'humain est souvent asymptomatique chez des individus immunocompétents. Les symptômes les plus communs sont la fièvre, les maux de tête, les douleurs musculaires et des nausées. Le LCMV peut aussi dans de rares cas causer des encéphalites aseptiques rarement mortelles. L'infection par le LCMV chez les humains est souvent causée par la cohabitation avec des souris infectées ou de matériaux contaminés dans les laboratoires (M. J. Buchmeier, de la Torre, J.C. & Peters,

C. J., 2007). Les souris peuvent être infectées par LCMV par différentes voies, incluant la voie intracérébrale, intrapéritonéale, intradermale, sous-cutanée, intraveineuse, intranasale et intragastrique (Hotchin *et al.*, 1963). Le LCMV peut être « naturellement transmis soit de façon horizontale ou verticale. La transmission horizontale a lieu via l'exposition d'aérosols provenant de salive ou d'urine de souris infectées ou de morsures. Cependant, ce type de transmission engendre rarement la persistance chez la souris adulte. L'autre voie de transmission, la voie verticale, implique une transmission *in utero* au début de la gestation et presque toutes les cellules peuvent être infectées dans les deux premières semaines et engendrent habituellement la persistance virale (Traub, 1936a, Traub, 1936b, Traub, 1939).

Plusieurs différentes souches de LCMV sont utilisées dans les recherches en laboratoire. Parmi celles-ci on dénote, notamment, la souche Armstrong (ARM) (Armstrong, 1934), clone 13 (Cl13) (Ahmed *et al.*, 1984) et WE (Rivers *et al.*, 1936). Les souches ARM et WE sont connues pour induire des infections aiguës, tandis que la souche Cl13 induit des infections persistantes. La souche LCMV-WE sera utilisée comme modèle d'infection chez la souris puisque lorsqu'elle est administrée par voie intraveineuse, elle est hépatotrope tout comme le virus de l'hépatite C chez l'humain (P. Oldstone Borrow, M.B., 1997b). De plus, elle engendre une infection de type aiguë. Ceci nous permettra d'observer si les anticorps naturels et le système du complément ont un rôle important à jouer dans l'élimination de ce virus, ce qui pourrait, par la suite, peut-être expliquer pourquoi certaines personnes peuvent éliminer efficacement le VHC.

1.5.1.1.2 Réponse immunitaire contre LCMV

Suite à l'infection aiguë avec LCMV, le virus se réplique rapidement dans plusieurs tissus comme les reins, le foie, la rate et les ganglions lymphatiques. Les titres viraux sont à leur sommet environ 3-4 jours suivant l'infection et au jour 5 il y a une baisse des titres viraux et l'infection est presque totalement résolue au jour 8 suivant l'infection (figure 8). C'est aux alentours du jour 5 que les LT CD8+ cytotoxiques spécifiques au virus (CTLs) apparaissent. Les CTLs sont à leur plus haut niveau vers les

jours 8-9 post infection et diminuent rapidement pendant les 5 à 10 jours suivants. Des anticorps spécifiques au LCMV sont aussi détectables dans le sérum 4 jours suivant l'infection et atteignent un plateau entre 10 et 20 jours pour ensuite maintenir ce niveau indéfiniment, mais les anticorps neutralisants ne se développent qu'après 50 à 80 jours suivant l'infection (Asano *et al.*, 1995, Hangartner *et al.*, 2006b). Bien que l'infection par LCMV induit une réponse humorale et cellulaire, il a bien été démontré dans le passé que c'est la réponse cellulaire qui assure l'élimination du virus (Ahmed *et al.*, 1987, Byrne *et al.*, 1984, Schulz *et al.*, 1989). En effet, il a été démontré que les CTLs étaient les cellules responsables en majorité de l'élimination du virus puisque des souris CD8 -/- n'étaient pas capables d'éliminer un LCMV qui cause normalement une infection aiguë (Ahmed *et al.*, 1984, Lehmann-Grube *et al.*, 1993). De plus, ce phénomène est dépendant de la perforine et de l'IFN- γ (Kagi *et al.*, 1994, Moskophidis *et al.*, 1994, Walsh *et al.*, 1994).

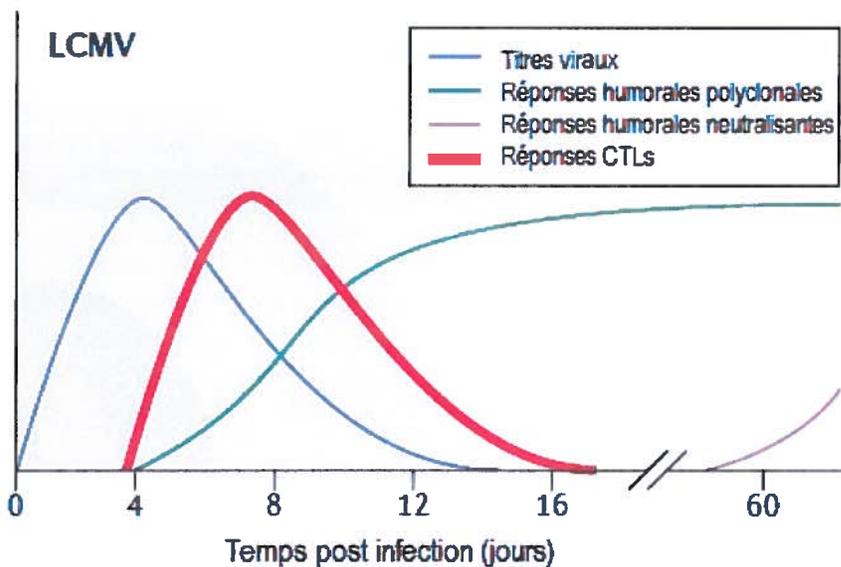


Figure 8. Réponses immunitaires adaptatives contre une infection aiguë induite par le LCMV

L'infection des souris adultes avec le LCMV induit une réponse CTL qui permet de contrôler le virus, et ce en dessous des limites de détection expérimentale. Les anticorps neutralisants ne jouent normalement pas de rôle dans ce type d'infection puisqu'ils sont développés seulement après 50 à 80 jours suivant l'infection. Cependant, si la réponse en CTL s'avère diminuée ou faible, des anticorps neutralisants peuvent être détectés plus tôt, soit vers les jours 25-30 post-infection. Adaptée de (Hangartner *et al.*, 2006b)

1.5.1.1.3 Le complément et les anticorps naturels dans la réponse contre LCMV

Les anticorps naturels et le système du complément jouent un rôle important dans la réponse précoce contre LCMV. Il y a quelques années, des études ont démontré que les anticorps naturels étaient capables de lier LCMV et qu'ils activaient par la suite le système du complément via la voie classique qui pouvait inactiver le virus ou mener à la lyse par le complément (R. M. Welsh, 1977, R. M. Welsh, Jr. *et al.*, 1976). De plus, lors d'infection par LCMV, les anticorps naturels lient la GP et permettent de ralentir la dissémination du virus vers les organes (Hangartner *et al.*, 2006a). Aussi, dans le laboratoire, il a été démontré qu'un répertoire plus diversifié en anticorps naturels lors d'une infection par LCMV permettait un meilleur recrutement à la rate des particules virales, une meilleure présentation antigénique par les cellules dendritiques ainsi qu'une meilleure réponse antivirale cellulaire (Charpentier, 2011). Le complément est aussi important dans la réponse contre le LCMV, puisqu'en son absence on remarque une baisse dans l'induction des LT CD8+ spécifiques au virus ainsi que des titres viraux détectables au jour 6 post infection comparativement aux contrôles qui ont déjà éliminé le virus (Hangartner *et al.*, 2006a, Suresh *et al.*, 2003).

1.5.1.2 Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)

Le modèle d'infection des souris avec le virus de la chorioméningite lymphocytaire ne permet pas de bien étudier la réponse en anticorps neutralisants puisque ceux-ci se développent que 50 à 80 jours suivant l'infection (**figure 8**). Ainsi, pour voir l'influence des anticorps naturels et du système du complément sur la réponse en anticorps neutralisants, le modèle d'infection des souris avec le virus de stomatite vésiculaire (VSV) a été utilisé pour ce projet.

1.5.1.2.1 Agent étiologique

Le VSV est un virus cytolytique enveloppé ayant une forme de balle de fusil et faisant partie de la famille des *Rhabdoviridae* du genre *Vesiculovirus*. Il existe plusieurs

Vesiculovirus dans la nature et ils sont connus pour infecter tant les vertébrés, que les invertébrés et même certaines plantes. Deux souches du VSV partageant environ 50% d'homologie au niveau de leur séquence en acides aminés de la glycoprotéine G, soit le VSV-Indiana (VSV-IND) et le VSV-New Jersey (VSV-NJ). Le VSV-IND est la première souche à avoir été isolée en 1925 et c'est cette souche qui fut utilisée pour ce projet. Le VSV possède un génome d'ARN simple brin à polarité négative de 11 kb qui est recouvert de la nucléoprotéine virale. Il code pour 5 protéines distinctes dont la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de la matrice (M), la glycoprotéine d'enveloppe (G) et l'ARN polymérase ARN-dépendante (L) (figure 9) (Janelle *et al.*, 2013, Lichty *et al.*, 2004).

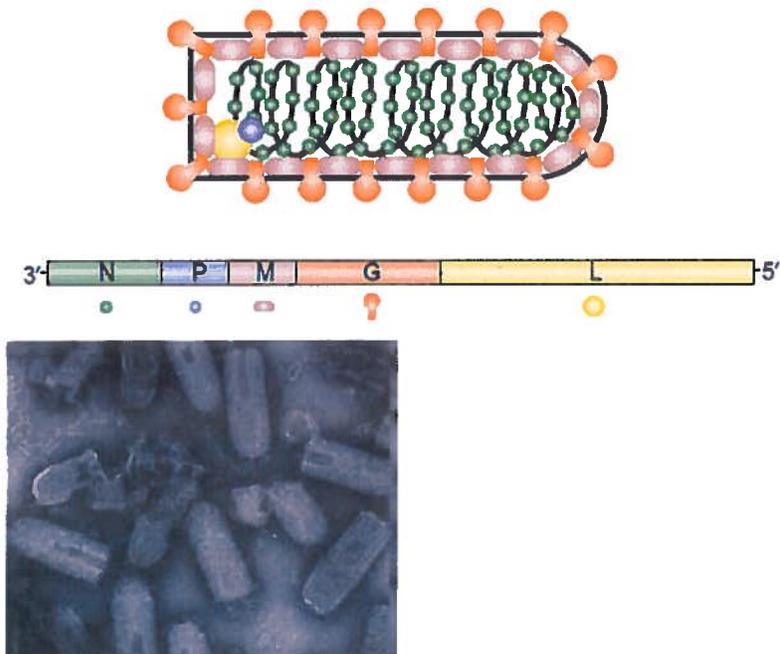


Figure 9. Structure de la particule virale du VSV et image en microscopie électronique des virions.

En haut, schéma de la structure du VSV. Les cinq protéines virales : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de la matrice (M), la glycoprotéine d'enveloppe (G) et l'ARN polymérase ARN-dépendante (L) . En bas, représentation du VSV en microscopie électronique. Adaptée de Lichty (*et al.*, 2004) et Ivanov (*Ivanov et al.*, 2011)

Le VSV infecte principalement le bétail, les rongeurs, les porcs, les chevaux, mais il peut aussi infecter les humains. Si le VSV peut infecter tant d'espèces, c'est parce que sa glycoprotéine se lie à la phosphatidylsérine qui est une composante de la membrane

cellulaire que l'on retrouve chez plusieurs d'hôtes (Lichty *et al.*, 2004). Le VSV provoque une infection aigüe et, chez le bétail les porcs et les chevaux, la maladie associée est caractérisée par des ulcérations de la cavité buccale et des pattes (Flanagan *et al.*, 2001). Cependant, l'infection par VSV chez les humains est rare. Les rares cas d'infection surviennent lorsque les individus sont exposés avec des stocks infectieux ou lors de recherches en laboratoire. La plupart des infections par VSV chez les humains sont asymptomatiques, quoique quelques cas présentant avec des symptômes typiques de la grippe aient été reportés (Roberts *et al.*, 1999).

1.5.1.2.2 Réponse immunitaire contre VSV

Le VSV cause une infection aigüe et asymptomatique chez la souris immunocompétente. L'infection est rapidement contrôlée par une réponse forte et rapide en IgM neutralisants qui atteignent leur pic au moment où la virémie disparaît et que la réponse en IgG neutralisants commence (**figure 10**). De l'IFN de type I est aussi induit rapidement après l'infection. Une réponse en CTLs est aussi induite, mais elle n'est pas nécessaire à l'élimination du virus. Le VSV est neurotrope et si l'infection n'est pas contrôlée par le système immunitaire 5 à 8 jours suivant l'infection, le virus migre au système nerveux central et peut causer des convulsions et la paralysie des membres arrières et finalement causer la mort de ces souris (Hangartner *et al.*, 2006b).

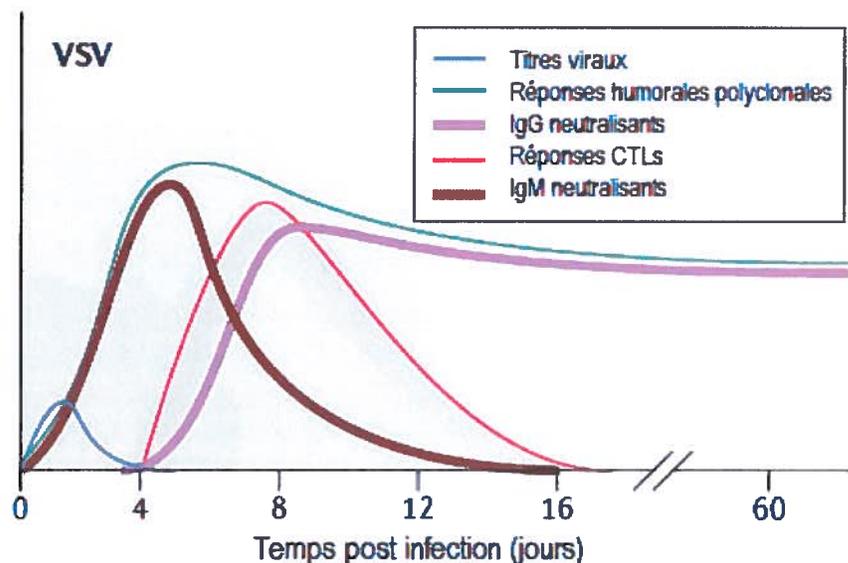


Figure 10. Réponses immunitaires adaptatives contre une infection aiguë induite par le VSV.

Le VSV se réplique faiblement dans les souris, excepté dans les cellules neuronales, et est rapidement contrôlé par une forte réponse T-indépendante en IgM neutralisants qui évolue en une réponse en IgG neutralisants 4 à 6 jours suivant l'infection. Bien qu'une réponse en CTLs soit induite suite à l'infection par VSV, elle n'est pas nécessaire à l'élimination du virus. Adaptée de (Hangartner *et al.*, 2006b)

1.5.1.2.3 Le complément et les anticorps naturels dans la réponse contre VSV

Les anticorps naturels et le système du complément jouent aussi un rôle important dans la réponse précoce contre VSV. Il y a quelques années, des études ont démontré que des IgM naturels purifiés étaient capables de lier VSV et former un complexe pouvant être lié par le C1 (Beebe *et al.*, 1981). Par la suite, ceci permettait d'activer la voie classique du système du complément (Ochsenbein *et al.*, 1999b, Ochsenbein *et al.*, 2000). De plus, on retrouve des anticorps naturels capables de neutraliser VSV dans le sérum de souris naïves à des titres allant de 1:8 à 1:32 (Hangartner *et al.*, 2003, Martinez *et al.*, 2004). Aussi, dans le laboratoire, il a été démontré qu'un répertoire plus diversifié en anticorps naturels lors d'une infection par VSV permettait un meilleur recrutement à la rate des particules virales, une meilleure

réponse en anticorps neutralisants ainsi qu'une meilleure chance de survie des souris suite à l'infection (Cote, 2006). Le complément est aussi important dans la réponse contre le VSV, puisqu'en son absence on remarque une baisse en anticorps neutralisants ainsi qu'une plus grande dissémination du virus vers les organes vitaux et un taux de mortalité plus élevé chez les souris n'ayant pas de complément comparativement aux contrôles (Ochsenbein *et al.*, 1999b).

1.5.2 Souches de souris

Pour cette étude, plusieurs souches de souris ont été utilisées. Ces souris possèdent toutes un répertoire différent en anticorps naturels allant d'un répertoire complet, à des répertoires intermédiaires jusqu'à une absence totale de répertoire en anticorps. Ainsi, elles pourront permettre d'étudier l'importance d'un répertoire diversifié en anticorps naturels avec l'action du système du complément lors d'infections virales.

1.5.2.1 C57Bl/6

Les souris C57Bl/6 ont été commandées chez la compagnie Charles River (Saint-Constant, QC, Canada). Ces souris ne possèdent aucune modification génétique et elles ont été utilisées comme groupe témoin, avec le répertoire le plus diversifié en anticorps naturels. Afin de limiter les divergences entre les différents groupes expérimentaux, les autres souches de souris ont été obtenues à partir du fond génétique des souris C57Bl/6.

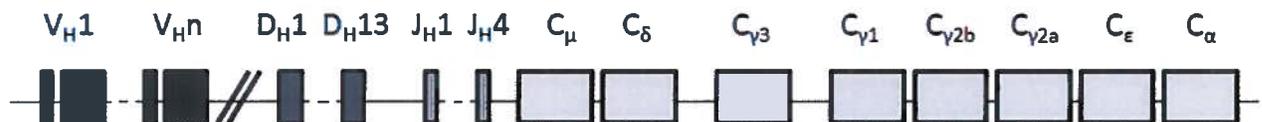


Figure 11. Représentation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines des souris C57Bl/6.

1.5.2.2 Quasi monoclonale (QM)

Les souris quasi-monoclonale (QM) ont été générées dans le laboratoire du Dr Wabl dans les années 1990 (Cascalho *et al.*, 1996). Cette souris hémizygote possède un segment $V_H D J_H$ réarrangé, appelé 17.2.25, qui a été inséré par mutagenèse dirigée dans la chaîne lourde des immunoglobulines. Pour s'assurer que seulement cet allèle soit réarrangé, l'autre allèle a été éliminée par la délétion du segment J_H . De plus, cette souris ne possède que des chaînes légères λ puisque l'allèle permettant de produire des chaînes légères κ est non fonctionnel chez cette souris. Cette combinaison fait en sorte qu'il y a production d'anticorps spécifique à l'haptène 4-hydroxy-3-nitrophényl, couramment appelé NP donc, cette souris possède un répertoire primaire d'anticorps monospécifiques. Cependant, il a été remarqué qu'environ 20% des anticorps produits pouvaient reconnaître d'autres épitopes (Cascalho *et al.*, 1996). Cette souris a permis de démontrer que cette diversité de répertoire pouvait être suffisante pour avoir une réponse humorale protectrice, mais retardée par rapport au contrôle, face à certains virus (Lopez-Macias *et al.*, 1999).

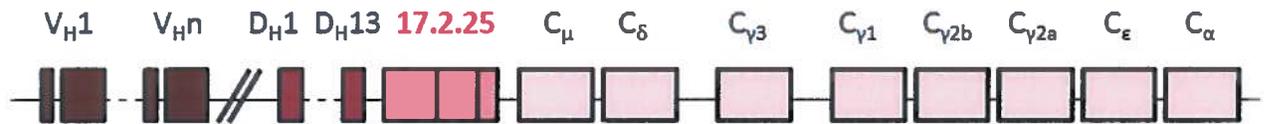


Figure 12. Représentation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines des souris QM.

1.5.2.3 HC1

Les souris HC1 nous ont été fournies par le laboratoire du Dr Mark M. Davis. Ces souris ont été créées par l'insertion ciblée dans le génome murin d'un minilocus humain, V_{H5-51} , codant pour une seule région variable de la chaîne lourde (Taylor *et al.*, 1994, Taylor *et al.*, 1992). Cette souris possède 10 segments D_H et 6 segments J_H en plus des régions constantes C_μ et $C_{\gamma 1}$. Afin de réarranger seulement le minilocus humain, les souris HC1 ont été croisées avec des souris ayant une délétion au niveau des segments J_H de la chaîne lourde murine (J. Chen *et al.*, 1993b). Elles ont aussi été croisées avec des

souris ne pouvant pas réarranger leurs chaînes légères κ . Ces souris possèdent donc un répertoire très limité.

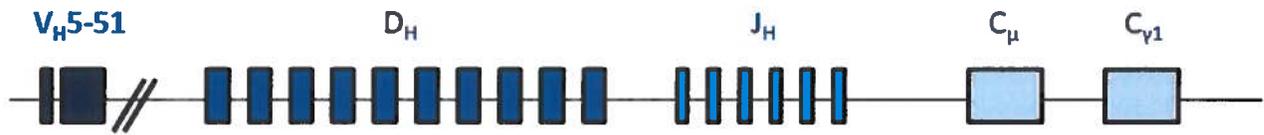


Figure 13. Représentation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines des souris HC1.

1.5.2.4 $J_H T$ ($J_H^{-/-}$)

La souris $J_H T$ a été produite par la délétion ciblée des segments J_H de la chaîne lourde dans des cellules souches embryonnaires. Ces cellules souches ont ensuite été injectées dans des blastocystes de souris C57Bl/6 et la reproduction a été poursuivie sur ce fond génétique (J. Chen *et al.*, 1993a). Puisque la souris $J_H T$ ne possède pas de segment J_H et que ceux-ci sont nécessaires pour le réarrangement génique des immunoglobulines, cette souris ne possède aucun lymphocyte B et ne peut donc pas générer des anticorps. De plus, ce manque a pour conséquence d'affecter l'architecture splénique (Mebius *et al.*, 2004).

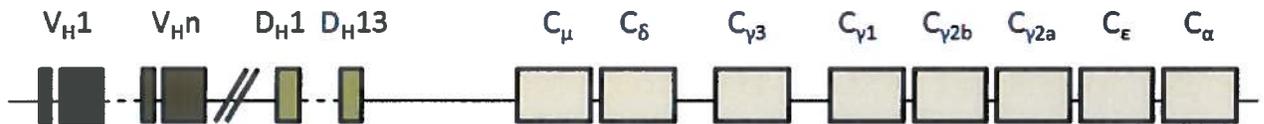


Figure 14. Représentation génomique de la chaîne lourde des immunoglobulines des souris JHT.

1.5.2.5 P14

Les souris P14 possèdent un transgène codant pour un TCR CD8 qui reconnaît spécifiquement le peptide gp33 du LCMV. Par conséquent, presque la totalité (70 à 90 %) des lymphocytes T CD8 chez ces souris sont spécifiques au virus (Pircher *et al.*, 1987).

1.5.3 Facteur de venin de cobra (CVF)

Afin de voir l'importance du complément et des anticorps naturels lors d'infections virales, les différentes souches de souris seront décomplémentées grâce au facteur de venin de cobra (CVF). Le facteur de venin de cobra est une protéine non toxique du venin de cobra qui agit comme un hyper activateur du système du complément. Le CVF est une protéine homologue au C3b que l'on retrouve dans la voie alternative du complément. Le C3b fait partie d'un complexe servant au clivage du C3 que l'on retrouve dans les trois voies d'activation du complément. Cependant, le CVF, qui va prendre la place du C3b, est résistant au facteur H et I (dissociation de la convertase et clivage de C3b) qui servent à réguler et arrêter l'activation du système du complément. Donc, cette résistance va entraîner l'hyperactivation du complément en consommant la totalité des molécules C3 dans le sérum, inactivant ainsi les 3 voies d'activation du complément (Vogel *et al.*, 2010, Vogel *et al.*, 1984a, Vogel *et al.*, 1984b).

1.6 Hypothèse de travail

Les anticorps naturels peuvent lier rapidement les pathogènes et permettent leur recrutement aux organes lymphoïdes secondaires. Ils sont aussi des très bons activateurs du système du complément qui peut mener à la lyse de cellules infectées ou des particules infectieuses elles-mêmes et aussi augmenter davantage le recrutement vers les organes lymphoïdes secondaires. De plus, l'activation du système du complément provoque l'établissement d'un milieu proinflammatoire et ceci pourrait favoriser le recrutement d'autres effecteurs du système immunitaire ainsi que la phagocytose des complexes immuns. Ceci faciliterait ensuite la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices et de surcroît l'activation de la réponse immunitaire adaptative. En plus de son rôle dans les étapes précoces d'infections, le complément est aussi très important dans la régulation de la réponse humorale ainsi que la réponse cellulaire. Donc, nous proposons que le complément, de concert avec les

anticorps naturels, est important dans le développement d'une réponse immunitaire antivirale efficace.

1.7 Objectifs du projet de recherche

Le projet comportait deux objectifs principaux afin de déterminer l'importance du système du complément chez différentes souches de souris ayant un répertoire en anticorps naturels varié lors d'infections virales.

Le premier objectif était d'observer le rôle du complément chez les différentes souris dans les étapes précoces d'infections virales par LCMV et VSV, notamment par le recrutement des particules virales à la rate, la production en IFN- α ainsi que la présentation de l'antigène par les CPA aux lymphocytes T CD8+.

Le deuxième objectif était d'évaluer le rôle du système du complément dans l'induction de la réponse immunitaire adaptative par la production en anticorps neutralisants contre VSV-IND et le taux de survie de ces souris lors de l'infection par VSV-IND et par l'activation, la spécificité et la fonctionnalité des lymphocytes T CD8+ lors de l'infection par LCMV-WE.

Chapitre 2
Matériel et méthodes

2.1 Lignées cellulaires

La lignée L929 (American Type Culture Collection (ATCC) : CCL-1) est dérivée du tissu conjonctif sous-cutané de souris C3H/An. Ces cellules ont été cultivées à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ dans du milieu MEM (*Earle's Modified Essential Medium*) (Hyclone (Thermo Fisher Scientific), Ottawa, Ontario, Canada) dans lequel a été ajouté 5% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (PAA Lab Inc, Etobicoke, Ontario, Canada) décomplémenté par une incubation de 30 minutes à 56°C. La lignée cellulaire MC57G (ATCC : CRL-2295) est un fibrosarcome de souris C57Bl/6. Cette lignée a été cultivée dans les mêmes conditions que la lignée L929. La lignée cellulaire Vero provient de reins de singe vert africain (ATCC : CCL-81). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (High glucose) (*Dulbeccos Modified Eagles Medium, High Glucose*) (Hyclone) dans lequel a été ajouté 10% (v/v) de SFV. Elles ont aussi été cultivées à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂.

Les cellules VL4, KL-25 et Vi10 sont des hybridomes qui ont été fournis par le laboratoire du Dr Rolf M. Zinkernagel (Institut of Experimental Immunology, Zurich, Suisse). Les hybridomes de souris KL-25 et de rat VL4 produisent des anticorps spécifiques à la glycoprotéine et à la nucléoprotéine de LCMV respectivement. L'hybridome murin Vi10, quant à lui, produit un anticorps spécifique au VSV. Tous les hybridomes ont été maintenus dans du milieu IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (Hyclone) supplémenté de 10% de SFV et de β-Mercaptétanol (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) et cultivé à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂.

2.2 Manipulation des virus

2.2.1 Production virale

2.2.1.1 Production du LCMV sérotype WE

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

Des cellules L929 ont été cultivées jusqu'à ce qu'elles soient à une confluence de 80%. Par la suite, elles ont été infectées avec LCMV-WE à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 dans 5 mL de milieu MEM 2% (v/v) SFV et laissées à température pièce (TP) pendant une heure sur une plaque agitatrice. Ensuite, 5 mL de milieu MEM 2% (v/v) SFV ont été ajoutés aux flacons et ceux-ci ont été placés à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ pendant 48 heures. Les surnageants ont été récoltés et centrifugés à 2000 rotations par minutes (rpm) (Sorvall Legend RT, Mandel, Guelph, Ontario, Canada). Les surnageants ont été collectés, aliquotés et congelés à -80°C. Les flacons contenant les cellules ont été remis à 37°C avec 10 mL de MEM 2% (v/v) SFV frais pour encore 24 heures. Les surnageants ont été récoltés et ont suivis le même processus que ceux obtenus 48 heures post-infection (p.i.) Le titre viral a été déterminé à l'aide d'un test de foyers infectieux décrit à la section 2.2.1 de ce chapitre.

2.2.1.2 Production du VSV sérotype Indiana (IND)

Le virus VSV-IND nous a été fourni par le laboratoire du Dr Rolf M. Zinkernagel.

Des cellules Vero ont été cultivées jusqu'à ce qu'elles soient à une confluence de 50%. Par la suite, elles ont été infectées avec VSV-IND à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 dans 5 mL de milieu DMEM 2% (v/v) SFV et laissées à température pièce (TP) pendant une heure sur une plaque agitatrice. Ensuite, 5 mL de milieu DMEM 2% (v/v) SFV ont été ajoutés aux flacons et ceux-ci ont été placés à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ pendant 24 heures. Finalement, les surnageants ont été récoltés et centrifugés à 2000 rotations par minutes (rpm) (Sorvall Legend RT, Mandel, Guelph, Ontario,

Canada). Les surnageants ont été collectés, aliquotés et congelés à -80°C. Le titre viral a été déterminé à l'aide d'un test de lyse de plages décrit à la section 2.2.2 de ce chapitre.

2.2.2 Titrage viral

2.2.2.1 LCMV-WE

Le titrage des particules infectieuses de LCMV-WE a été déterminé par un test de foyers infectieux sur des cellules MC57G. L'échantillon à titrer a été dilué à plusieurs concentrations directement dans des plateaux 24 puits (Corning, New York, USA) contenant du MEM 5% SVF pour obtenir un volume final de 200 µL (microlitre). Ensuite, 200 µL d'une suspension cellulaire de MC57G à 8×10^5 cellules par mL ont été ajoutés à chacun des puits. Les plateaux ont été placés à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ pendant 4 à 6 heures. Par la suite, 300 µL d'une solution de MEM/Méthycellulose¹, ont été ajoutés à chacun des puits et les plateaux ont été incubés à nouveau à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ pour 48 heures. Toutes les prochaines étapes ont été effectuées à TP. Les plateaux ont été vidés par inversion dans un bac de décontamination et ils ont été lavés 3 fois avec du milieu HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Invitrogen). Ensuite, les cellules ont été fixées avec 250 µL d'une solution de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 25% (v/v) Formaldéhyde 37 % (Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) durant 20 à 30 minutes. Les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS entre chacune des étapes suivantes. Afin de perméabiliser les cellules, 250 µL d'une solution TritonX-100 0.5% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) dilué dans du HBSS rouge phénol (Invitrogen) ont été ajoutés pour 20 minutes. Les sites de liaisons non spécifiques sont bloqués pendant 1 heure avec 200 µL de PBS 10% SVF. Le virus est détecté grâce à l'ajout de 3 anticorps consécutivement et d'un temps d'incubation de 90 minutes pour chacun d'entre eux. Le premier anticorps ajouté est l'hybridome VL4 (détection de la nucléoprotéine de LCMV) par ajout de 200 µL par puits. Le second anticorps est un anticorps de chèvre anti-rat couplé à l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxydase, Jackson Immunoresearch, West Grove,

¹ MEM/Méthycellulose : 1% (p/v) (poids/volume) de Méthycellulose (Fluka, Buchs, Suisse), 10% (v/v) de MEM-Earle 10X (Invitrogen), 5% (v/v) de SVF, 1% 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 de l'eau distillée stérile.

PA, USA) dilué 1 :160 dans du HBSS rouge phénol ajouté à 200 µL par puits. Le troisième et dernier anticorps est un anticorps d'âne anti chèvre couplé à la HRP (Jackson Immunoresearch) dilué 1 :300 dans du HBSS rouge phénol et ajouté aussi à 200 µL par puits. Les foyers infectieux sont révélés par l'ajout de 300 µL par puits du substrat OPD² pendant 30 minutes. Le substrat est retiré et les plateaux sont lavés 3 fois avec de l'eau distillée. Les titres viraux sont exprimés en unités formant des foyers par mL (uff/mL). La formule suivante a servi au calcul des titres viraux : nombre de foyers/(volume d'infection (mL) x dilution de l'échantillon).

2.2.2.2 VSV-IND

Le titrage des particules infectieuses de VSV-IND a été déterminé par un test de lyse sur des cellules Vero. Une suspension de cellules Vero a $3,2 \times 10^5$ cellules/mL dans du DMEM 10% SVF a été faite et 500 µL de cette solution a été déposée dans les puits de plateaux 24 puits (Corning) et les plateaux ont été incubés à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ pour 24 heures. Ensuite, le milieu de culture des cellules a été aspiré et l'échantillon a été dilué à plusieurs concentrations directement dans des plateaux 24 puits (Corning) contenant du DMEM 10% SVF pour obtenir un volume final de 200 µL. Par la suite, les plateaux ont été incubés pendant 1 heure à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂. Après l'incubation, 300 µL de la solution MEM/Méthylcellulose ont été ajoutés aux puits et les plateaux ont été incubés à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ pour un autre 24 heures. La solution de MEM/Méthylcellulose a été retirée des puits et environ 300 µL de fixateur/Colorant³ ont été ajoutés pour 1 heure afin de colorer et fixer les cellules. Les plateaux ont été rincés à l'eau distillée et les plages de lyses ont pu être dénombrées. Les titres viraux sont exprimés en unités formant des plages (ufp/mL)

² Substrat OPD : 0,04% (p/v) d'ortho-phénylènediamine (OPD, Sigma-Aldrich), St-Louis, MO, USA), 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 de l'eau distillée

³ Fixateur/Colorant : 50% (v/v) EtOH 96%, 0,5% (p/v) crystal violet (Fisher), 0,8% (p/v) NaCl (Sigma-Aldrich), 45% (v/v), 5% formaldéhyde 37% (Sigma-Aldrich) dilués dans de l'eau distillée

La formule suivante a servi au calcul des titres viraux : nombre de foyers/(volume d'infection (mL) x dilution de l'échantillon).

2.2.3 Purification des virus LCMV-WE et VSV-IND

Les surnageants des cellules infectées sont récoltés et afin d'éliminer les débris cellulaires, ceux-ci sont centrifugés à 9500 rotations par minute (rpm) pendant 20 minutes à 4°C (rotor JA-10 appareil J2-21M, Beckman, Palo Alto, CA, USA). Les surnageants sont, par la suite, amenés à 0,5M de NaCl (Sigma-Aldrich) et 10% (p/v) de PEG 8000 (Sigma-Aldrich) et incubés à 4°C pour 2 à 3 heures avec une agitation douce. Les surnageants sont centrifugés à nouveau à 9500 rpm (rotor JA-10) pendant 30 minutes à 4°C. Les culots contenant les particules virales précipitées sont conservés et mis en suspension dans 2 mL de tampon TNE⁴. Les suspensions contenant les virus sont ensuite ajoutés sur un gradient discontinu de 50 et 10% (p/v) d'Histodenz (Sigma-Aldrich) dans des tubes Ultraclear (Beckman) pour rotor SW41 (Beckman). Les tubes sont ultracentrifugés (Optima L-100K, Beckman) sans frein à 30 000 rpm pendant 3 heures à 4°C. Les particules virales se retrouvent à l'interphase et sont récupérées à l'aide d'une longue pipette pasteur. Les fractions récoltées sont dialysées trois fois contre le tampon TNE à 4°C. Les fractions sont ensuite récoltées et aliquotées et conservées à -80°C.

2.2.4 Décomplémentation des souris

Vingt-quatre heures avant infection, la moitié des souris de chacun des différents groupes (C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT) ont reçu 20 microgrammes (µg) de FVC (Quidel, San Diego, CA, USA) par voie intra-péritonéale (i.p.) dans 200 µL de PBS stérile.

⁴ Tampon TNE : 150 millimolaire (mM) de NaCl (Sigma-Aldrich), 10 mM de Tris-HCl (Fisher) et 1 mM d'EDTA dilués dans de l'eau distillée

2.2.5 Infection des souris

2.2.5.1 Par LCMV-WE

Pour l'analyse de la réponse immunitaire précoce (**section 5**), toutes les souris (C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT) ont été infectées avec une haute dose de LCMV-WE, soit 2×10^6 ufp par voie intraveineuse (i.v.) dans 200 μ L de MEM stérile.

Pour l'analyse de la réponse immunitaire adaptative cellulaire (**section 6.2**), toutes les souris (C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT) ont été infectées avec une faible dose de LCMV-WE, soit 200 ufp i.v. dans 200 μ L de MEM stérile.

2.2.5.2 Par VSV-IND

Pour l'analyse de la réponse immunitaire précoce (**section 5**), toutes les souris (C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT) ont été infectées avec une haute dose de VSV-IND, soit 2×10^8 ufp i.v. dans 200 μ L de MEM stérile.

Pour l'analyse de la réponse immunitaire adaptative humorale (**section 6.1**), les souris C57Bl/6, QM et HC1 ont été infectées avec 1×10^6 ufp de VSV-IND et les souris J_HT ont été infectées avec 1×10^3 ufp de VSV-IND i.v. dans 200 μ L de MEM stérile.

2.3 Liaison des IgM naturels aux virus par ELISA

Le sérum des différentes souris naïves (C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT) a été récolté et utilisé pour ce test. Cinquante μ L d'une solution de virus purifié (LCMV-WE ou VSV-IND) à 2 μ g/mL dans du tampon carbonate⁵ ont été ajoutés dans les puits de plateaux ELISA 96 puits (Corning) et incubés toute la nuit à 4°C. Les plaques sont lavées avec du PBS et afin de bloquer les sites non spécifiques, 150 μ L de PBS/1% d'albumine sérique bovine (BSA, Fisher) ont été ajoutés pour une heure à TP. Les plateaux sont rincés 3 fois avec du PBS/Tween20 0,05% (Bio-rad) et une fois avec du PBS entre chacune des étapes suivantes et les dilutions sont toutes faites dans le tampon PBS/BSA 1%. Cinquante μ L

⁵ Tampon carbonate : 87,49 mM Na₂CO₃, 12,83 mM NaHCO₃ dilués dans de l'eau distillée

des dilutions en séries des différents sérums de souris ont été ajoutés aux puits et les plaques ont été incubées pour une autre heure à TP. Les hybridomes KL25 (LCMV) et Vi10 (VSV) ont été ajoutés comme contrôles positifs. Une autre incubation d'une heure à TP a suivi avec un anticorps de chèvre anti-IgM de souris couplé à la HRP (Jackson ImmunoResearch) dilué 1 :5000 par ajout de 50 µL par puits. Finalement, 100 µl du substrat OPD ont été ajoutés pour 15 minutes et la réaction a été arrêtée par l'ajout de 50 µl par puits de HCl 1M (Sigma-Aldrich). Les résultats ont été obtenus par spectrophotométrie (Bio-Rad) à une longueur d'ondes de 490 nanomètres (nm).

2.4 Détection de la molécule C3 du complément par ELISA

Le sérum des différentes souris naïves (C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT) a été récolté et utilisé pour ce test. Cinquante µL d'une solution d'IgM de souris purifiées à 5 µg/mL dans du tampon carbonate ont été ajoutés dans les puits de plateaux ELISA 96 puits (Corning) et incubés toute la nuit à 4°C. Les plaques sont lavées avec du PBS et afin de bloquer les sites non spécifiques, 150 µl de PBS/1% d'albumine sérique bovine (BSA, Fisher) ont été ajoutés pour une heure à TP. Les plateaux sont rincés 3 fois avec du PBS/Tween20 0,05% (Bio-rad) et une fois avec du PBS entre chacune des étapes suivantes et les dilutions sont toutes faites dans le tampon PBS/BSA 1%. Sept µL des différents sérums de souris ont été ajoutés aux puits et les plaques ont été incubé pour 2 minutes à 37°C 5 % CO₂. Une autre incubation d'une heure à TP a suivi avec un anticorps de chèvre anti-C3 de souris couplé à la Biotine (Jackson ImmunoResearch) dilué 1 :5000 par ajout de 40 µL par puits. Ensuite, encore une autre incubation d'une heure à TP a suivi avec de la STREP-HRP (Jackson ImmunoResearch) dilué 1 :30 000 par ajout de 40 µL par puits. Finalement, 40 µl du substrat OPD ont été ajoutés pour 15 minutes et la réaction a été arrêtée par l'ajout de 40 µl par puits de HCl 1M (Sigma-Aldrich). Les résultats ont été obtenus par spectrophotométrie (Bio-Rad) à une longueur d'ondes de 490 nanomètres (nm).

2.5 Analyse de la réponse immunitaire précoce

2.5.1 Dosage des virus à la rate par titrage

2.5.1.1 Titrage de VSV-IND

Le titrage des rates des différentes souris infectées à haute dose par VSV-IND a été déterminé par un test de lyse sur des cellules Vero. Une suspension de cellules Vero a $3,2 \times 10^5$ cellules/mL dans du DMEM 10% SVF a été faite et 500 μ L de cette solution a été déposée dans les puits de plateaux 24 puits (Corning) et les plateaux ont été incubés à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ pour 24 heures. Ensuite, le milieu de culture des cellules a été aspiré et les suspensions d'homogénats de rates ont été dilués à plusieurs concentrations directement dans des plateaux 24 puits (Corning) contenant du DMEM 10% SVF pour obtenir un volume final de 240 μ L. Par la suite, les plateaux ont été incubés pendant 1 heure à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂. Après l'incubation, 300 μ L de la solution MEM/Méthylcellulose ont été ajoutés aux puits et les plateaux ont été incubés à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ pour un autre 24 heures. La solution de MEM/Méthylcellulose a été retirée des puits et environ 300 μ L de fixateur/colorant ont été ajoutés pour 1 heure afin de colorer et fixer les cellules. Les plateaux ont été rincés à l'eau distillée et les plages de lyses ont pu être dénombrées. Les titres viraux sont exprimés en unités formant des plages (ufp/mL). La formule suivante a servi au calcul des titres viraux : (nombre de foyers x volume de l'homogénat (mL))/(volume d'infection (mL) x poids de l'organe (g) x dilution de l'échantillon).

2.5.1.2 Titrage de LCMV-WE

Le titrage des rates de souris infectées à haute dose par LCMV-WE a été déterminé par un test de foyers infectieux sur des cellules MC57G. Les suspensions d'homogénats de rates ont été diluées à plusieurs concentrations directement dans des plateaux 24 puits (Corning) contenant du MEM 5% SVF pour obtenir un volume final de 240 μ L (microlitre). Ensuite, 200 μ L d'une suspension cellulaire de MC57G à 8×10^5 cellules par mL ont été ajoutés à chacun des puits. Les plateaux ont été placés à 37°C

avec une atmosphère de 5% CO₂ pendant 4 à 6 heures. Par la suite, 300 µL d'une solution de MEM/Méthycellulose⁶. ont été ajouté à chacun des puits et les plateaux ont été incubés à nouveau à 37°C avec une atmosphère de 5% CO₂ pour 48 heures. Toutes les prochaines étapes ont été effectuées à TP. Les plateaux ont été vidés par inversion dans un bac de décontamination et ils ont été lavés 3 fois avec du milieu HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Invitrogen). Ensuite, les cellules ont été fixées avec 250 µL d'une solution de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 25% (v/v) Formaldéhyde 37 % (Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) durant 20 à 30 minutes. Les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS entre chacune des étapes suivantes. Afin de perméabiliser les cellules, 250 µL d'une solution TritonX-100 0.5% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) dilué dans du HBSS rouge phénol (Invitrogen) ont été ajouté pour 20 minutes. Les sites de liaisons non spécifiques sont bloqués pendant 1 heure avec 200 µL de PBS 10% SVF. Le virus est détecté grâce à l'ajout de 3 anticorps consécutivement et d'un temps d'incubation de 90 minutes pour chacun d'entre eux. Le premier anticorps ajouté est l'hybridome VL4 (détection de la nucléoprotéine de LCMV) par ajout de 200 µL par puits. Le second anticorps est un anticorps de chèvre anti-rat couplé à l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxydase, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) dilué 1 :160 dans du HBSS rouge phénol ajouté à 200 µL par puits. Le troisième et dernier anticorps est un anticorps d'âne anti chèvre couplé à la HRP (Jackson ImmunoResearch) dilué 1 :300 dans du HBSS rouge phénol et ajouté aussi à 200 µL par puits. Les foyers infectieux sont révélés par l'ajout de 300 µL par puits du substrat OPD pendant 30 minutes. Le substrat est retiré et les plateaux sont lavés 3 fois avec de l'eau distillée. Les titres viraux sont exprimés en unités formant des foyers par mL (uff/mL). La formule suivante a servi au calcul des titres viraux : (nombre de foyers x volume de l'homogénat (mL))/(volume d'infection (mL) x poids de l'organe (g) x dilution de l'échantillon).

⁶ MEM/Méthycellulose : 1% (p/v) (poids/volume) de Méthycellulose (Fluka, Buchs, Suisse), 10% (v/v) de MEM-Earle 10X (Invitrogen), 5% (v/v) de SVF, 1% 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 de l'eau distillée stérile

2.5.2 Dosage par ELISA d'IFN- α

Le sérum des différentes souris (C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT) décomplémentées ou non et infectées à haute dose par LCMV-WE ou VSV-IND a été récolté à différents temps post-infection (2, 8, 24 et 48 heures pour LCMV-WE et 1, 2, 4 et 7 heures pour VSV). Les sérums ont été utilisés pour doser par test ELISA l'IFN- α selon le kit *VeriKineTM Mouse Interferon Alpha ELISA Kit Product #42120* (PBL Interferon, New Jersey, USA). En résumé, 100 μ L des échantillons sont ajoutés aux puits et 50 μ L de la solution d'anticorps sont ajoutés au même moment. Le plateau est incubé pendant 1 heure à TP sur un plateau agitateur (450 rpm). Le plateau est ensuite laissé à 4°C pour 20 à 24 heures. La plaque est lavée 4 fois avec la solution de lavage et 100 μ L de la solution HRP sont ajoutés aux puits et le plateau est incubé pour 2 heures à TP. La plaque est de nouveau lavée 4 fois avec la solution de lavage et 100 μ L de la solution de substrat TMB sont ajoutés aux puits et le plateau est incubé à TP à l'abri de la lumière pour 15 minutes. La réaction est ensuite arrêtée par l'ajout de 100 μ L de la solution d'arrêt et le plateau est lu dans un délai de 5 minutes à 450 nm.

2.5.3 Présentation antigénique par les cellules dendritiques aux lymphocytes T spécifiques au LCMV

La moitié des souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT ont d'abord été décomplémentées 24 heures avant d'être infectées à haute dose avec LCMV. Vingt-quatre heures post-infection, les souris sont sacrifiées et les rates ont été récoltées. Des souris témoins négatifs (Mock) ont reçu par voie intraveineuse un volume de milieu de culture (MEM sans sérum) équivalent au volume de virus injecté aux souris infectées. Les rates des souris sont récoltées dans des tubes de 15 mL (Corning) contenant 5 mL de collagénase D (Roche, Laval, Canada) à une concentration de 160 U/mL dilués dans du PBS contenant du Ca²⁺ (Invitrogen). Le contenu des tubes est versé dans des pétris stériles (Fisher) et les rates sont broyées à l'aide d'un piston de seringue 3 mL (BD, Franklin Lake, NJ, USA) et les pétris sont incubés à 37°C et 5 % de CO₂ pendant une heure. Les

morceaux de rate sont transférés dans des tamis cellulaire 100 µm et écrasés à l'aide du piston d'une seringue de 3 mL. Les suspensions cellulaires sont ensuite transférées dans des tubes de 15 mL et lavées 2 fois avec 10 mL de PBS 2 % SFV avec 1 mM EDTA (centrifugation de 5 minutes à 1300 rpm). Les culots cellulaires sont remis en suspension dans 1 mL de PBS 2 % SFV avec 1 mM EDTA.

2.5.3.1 Niveau d'activation des cellules dendritiques par cytométrie en flux

Cent µL des différentes suspensions cellulaires sont déposés dans des tubes à cytométrie et lavés avec du tampon de cytométrie⁷ (centrifugation 5 minutes à 1500 rpm). Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 100 µL de tampon de cytométrie pour être marquées avec une combinaison des anticorps rat anti-souris suivants : CD86-PE, CD11c-FITC et 7-AAD (eBioscience, San Diego, USA) pour une période de 20 minutes à 4°C. Après un lavage des cellules avec du tampon de cytométrie, les cellules sont remises en suspensions dans 250 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 (FACSFortessa).

2.5.3.2 Purification des DCs et LT CD8+

Les cellules dendritiques spléniques des différentes souris infectées ont été purifiées par billes magnétiques grâce à la trousse de sélection positive de STEMCELL EASYSEP USING « THE BIG EASY » SILVER EASYSEP MAGNET (#18001 ET #18758). En bref, 50 µL d'une solution de CD11c-PE sont ajoutés à chaque tube contenant 1 mL des suspensions cellulaires de rate et incubées 15 minutes à TP. Ensuite, 100 µL d'une solution de cocktail de sélection PE sont ajoutés aux tubes et incubés 15 minutes à TP. Par la suite, 50 µL d'une solution contenant des nanoparticules magnétiques sont ajoutés aux tubes et incubés 15 minutes à TP. Le volume de la suspension cellulaire est amené à 5 mL à l'aide de PBS 2 % SVF 1mM EDTA et les tubes sont placés dans les aimants pour 5 minutes. Le contenu des tubes est vidé dans des bacs de déchets et 5 mL

⁷ Tampon de cytométrie : 1 % (p/v) d'albumine sérique bovine (BSA et 0,1 % (p/v) de NaN₃(USB) dilués dans du PBS

de PBS 2 % SVF 1 mM EDTA est ajouté aux tubes et replacé dans l'aimant pour 5 minutes. Ces étapes sont répétées 3 fois. Les cellules sont ensuite comptées et les cellules sont mises à une concentration de 5×10^5 cellules/mL dans du RPMI 5% SVF, P/S, 1% L-Glutamine 100X et 10 μ M de β -ME. Cent μ L des solutions contenant les cellules dendritiques purifiées sont ajoutés dans les puits d'un plateau 96 puits à fond rond et 50 μ L d'une solution de LPS (Sigma) à 6 μ g/mL est ajouté à chaque puits contenant des cellules dendritiques. Les plateaux sont par la suite incubée pendant 16 heures à 37°C 5 % CO₂

Le matin suivant la purification des cellules dendritiques, les rates de souris naïves P14 sont récoltées et broyées dans un tamis cellulaire 100 μ m à d'un piston de seringue 3 mL dans un pétri stérile (BD) et remises en suspension dans 1 mL de PBS 2 % SVF 1 mM EDTA. Les lymphocytes T CD8 ont été purifiés grâce à la trousse de sélection négative de STEMCELL EASYSEP USING « THE BIG EASY » SILVER EASYSEP MAGNET (#18001 ET #19753). En résumé, 50 μ L d'un cocktail d'enrichissement sont ajoutés aux tubes et ceux-ci sont incubés pendant 15 minutes à 4°C. Ensuite, 100 μ L de la solution de cocktail de sélection sont ajoutés et incubés pendant 15 minutes à 4°C. Par la suite, 100 μ L de nanoparticules magnétiques sont ajoutés et incubés 5 minutes à 4°C. Les suspensions cellulaires sont amenées à 5 mL avec du PBS 2% SVF 1 mM EDTA et placés dans les aimants pour 5 minutes. Le contenu est vider dans un autre tube et suspendu à nouveau dans 1 mL de PBS 5 %. Dans un autre tube, le CFSE est dilué à une concentration de 10 μ M. Ajouter 1 mL de la solution de CFSE 10 μ M au 1 mL de suspension de LT CD8+ et incuber pendant 10 minutes dans un bain-marie à 37°C en vortexant toutes les minutes. Arrêter la réaction en ajoutant 1 mL de RPMI 5 % SVF, P/S, 1% L-Glutamine 100X et 10 μ M de β -ME et faire 3 lavages (centrifugation 1500 rpm pendant 5 minutes). Suspendre les cellules à une concentration de 1×10^6 cellules/ml et ajouter 100 μ L aux puits contenant les cellules dendritiques purifiées. Incuber les plaques pendant 3 jours à 37°C 5 % CO₂. Récolter les cellules, faire un lavage avec du tampon de cytométrie (centrifugation 5 minutes à 1500 rpm). Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 100 μ L de tampon de cytométrie pour être marquées avec un anticorps rat anti-

souris CD8-PECy7 (eBioscience) pour une période de 20 minutes à 4°C. Après un lavage des cellules avec du tampon de cytométrie, les cellules sont remises en suspensions dans 250 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 (FACSFortessa).

2.6 Analyse de la réponse immunitaire adaptative

2.6.1 Analyse de la réponse humorale

2.6.1.1 Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-VSV

Les souris C57Bl/6, QM et HC1 ayant reçu ou non du CVF ont été infectées avec 1×10^6 UFP de VSV-IND. Au jours 4, 8, 12 et 20 des prélèvements sanguins par la veine de la saphène des souris ont été effectués pour récolter le sang. Les sérums ont été entreposés à -20°C jusqu'à l'expérimentation.

Cent µL d'une suspension de cellules Vero a une concentration de 1×10^8 cellules/mL dans du DMEM 10 % SVF ont été déposés dans des plaques 96 puits à fond plat (Corning) et incubées 24 heures à 37°C 5 % CO₂. Les sérums des souris infectées ont été dilués dans du DMEM 10 % SVF et afin de tester aussi leur capacité neutralisante en absence d'IgM, les sérums ont aussi été mis en présence de β-Mercaptoéthanol 0,1 M (Bio-Rad) pendant 1 heure à TP. Des dilutions successives de 2 ont été faites dans un plateau 96 puits à fond rond dans du DMEM 10 % SVF. Ensuite, les dilutions de sérums ont été mises en présence dans une proportion 1:1 de 100 µL de 5×10^4 UFP de VSV-IND pendant 1h30 à 37°C, 5 % CO₂. Par la suite, les mélanges dilutions sérums-virus ont été transférés dans les plaques contenant les cellules Vero et laissé incubés 1 heure à 37°C, 5 % CO₂. Suivant cette incubation, 200 µL de méthycellulose/MEM ont été ajoutés dans les puits et les plateaux ont été incubés de nouveau à 37°C, 5 % CO₂ pour 24 heures. Après avoir enlevé le contenu liquide des puits, les cellules ont été fixées et colorées avec la solution fixateur/colorant pour 1 heure et rincées à l'eau. Les plages de lyses ont été dénombrées afin de déterminer le titre neutralisant des anticorps réduisant de 50 % la quantité de plages dénombrées dans le témoin négatif (virus uniquement).

2.6.1.2 Survie des souris

Les souris C57Bl/6, QM et HC1 ayant reçues ou non du CVF ont été infectées avec 1×10^6 UFP de VSV-IND. Quant à elles, les souris J_HT ayant reçues ou non du CVF ont été infectées avec 1×10^3 UFP de VSV-IND puisqu'elles ne possèdent pas de lymphocytes B. Les souris ont été observées chaque jour suivant l'infection jusqu'au jour 30 p.i. pour les signes cliniques suivants : paralysie des membres arrières, convulsions et morbidité. Lorsqu'elles présentaient ces signes, elles étaient sacrifiées par inhalation de CO₂.

2.6.2 Analyse de la réponse cellulaire par cytométrie en flux

La moitié des souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT ont d'abord été décomplémentées 24 heures avant d'être infectées à faible dose avec LCMV. Elles ont été sacrifiées 8 jours p.i. par inhalation au CO₂ et les rates ont été récoltées dans 5 mL de milieu MEM 5 % SFV. Par la suite, les rates ont été broyées à travers un tamis cellulaire 100 µm à l'aide d'un piston de seringue de 3 mL (BD) dans un pétri stérile (Fisher). Les suspensions cellulaires sont transférées dans un tube et un comptage cellulaire est effectué afin d'obtenir une concentration de 1×10^7 cellules/mL.

2.6.2.1 Quantification du niveau d'activation des cellules T

Cent µL des suspensions cellulaires a une concentration de 1×10^7 cellules/mL sont transférés dans des tubes de cytométrie et lavés avec du tampon de cytométrie (5 minutes à 1500 rpm). Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 100 µL de tampon de cytométrie pour être marquées avec la combinaison d'anticorps rat anti-souris suivante : CD62L-APC, CD8-PECy7 et 7-AAD pour 20 minutes à 4°C. Après un lavage des cellules avec du tampon de cytométrie, les cellules sont remises en suspensions dans 250 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 (FACSFortessa).

2.6.2.2 Quantification des cellules T activées spécifiques au virus

Cent μL de la suspension cellulaire a une concentration de 1×10^7 cellules/mL ont été déposés dans des tubes de cytométrie et lavés avec du tampon de cytométrie (5 minutes à 1500 rpm). Les cellules sont d'abord incubées 30 minutes à 37°C avec les tétramères gp₃₃₋₄₁, gp₂₇₆₋₂₈₆ ou np₃₉₆₋₄₀₅ couplés au PE. Sans laver les cellules, les anticorps rat anti-souris CD62L-APC, CD8-FITC et du 7-AAD sont ajoutés aux tubes et incubés durant 20 minutes à 4°C . Après un lavage des cellules avec du tampon de cytométrie, les cellules sont remises en suspensions dans 250 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 (FACSFortessa).

2.6.2.3 Quantification de la fonctionnalité des cellules T spécifiques activées *ex vivo*

2.6.2.3.1 Sécrétion de cytokines antivirales

Cent μL de la suspension cellulaire a une concentration de 1×10^7 cellules/mL sont déposés dans des puits d'une plaque 96 puits à fond rond dans un volume de 100 μL . Les cellules ont été diluées dans du RPMI 5 % SVF avec 100 U/mL d'IL-2 recombinante de souris (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) et de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Brefeldine A (Sigma) avec ajout ou non de peptide gp₃₃₋₄₁ (Sigma) et la plaque a été mise à 37°C , 5 % CO_2 pour 5 heures. Les cellules sont marquées à l'aide d'anticorps rat anti-souris CD8-FITC et de 7-AAD pendant 20 minutes à 4°C . Après un lavage avec du tampon de cytométrie (5 minutes à 1500 rpm), les cellules sont fixées durant 20 minutes à TP avec 100 μL de tampon de fixation IC (eBioscience). Par la suite, deux lavages sont faits avec 200 μL de tampon de perméabilisation 1X (eBioscience) et les cytokines sont détectées dans le cytoplasme avec les anticorps rat anti-souris TNF α -APC et IFN γ -PE (eBioscience) durant 20 minutes à TP. Un dernier lavage avec le tampon de perméabilisation est effectué et les cellules sont remises en suspensions dans 250 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 (FACSFortessa).

2.6.2.3.2 Potentiel cytotoxique

Cent μL de la suspension cellulaire a une concentration de 1×10^7 cellules/mL sont déposés dans des puits d'une plaque 96 puits à fond rond dans un volume de 100 μL . Les cellules ont été diluées dans du RPMI 10 % SVF avec de la Monensin A 2X (Sigma) et d'anticorps rat anti-souris CD107a-FITC avec ajout ou non de peptide gp33-41 (Sigma) et la plaque a été mise à 37°C, 5 % CO_2 pour 5 heures. Les cellules sont marquées à l'aide d'anticorps rat anti-souris CD8-PECy7 et de 7-AAD pendant 20 minutes à 4°C. Après un lavage avec du tampon de cytométrie (5 minutes à 1500 rpm), les cellules sont fixées durant 20 minutes à TP avec 100 μL de tampon de fixation IC (eBioscience). Par la suite, deux lavages sont faits avec 200 μL de tampon de perméabilisation 1X (eBioscience) et les granzymes sont détectées dans le cytoplasme avec l'anticorps rat anti-souris GranzymeB-eFluor450 (eBioscience) durant 20 minutes à TP. Un dernier lavage avec le tampon de perméabilisation est effectué et les cellules sont remises en suspensions dans 250 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 (FACSFortessa).

2.7 Analyse statistique

Le test d'analyse de la variance suivi du test de comparaisons multiples Bonferroni a été utilisé pour les différents groupes expérimentaux. Les barres d'erreur représentent l'erreur moyenne standard. Les résultats sont considérés significatifs à partir de $P < 0,05$.

Chapitre 3

Résultats

3.1 Caractérisation des outils utilisés

L'objectif de cette section était de caractériser les différents outils utilisés lors des expériences. Nous avons d'abord comparé la capacité des IgM naturels des différentes souris naïves à lier les deux virus modèles. Par la suite, afin de s'assurer que nos différentes souris ne possèdent aucune différence au niveau de leur système du complément, nous avons vérifié les niveaux de C3 dans le sérum de ces souris avant infection. Finalement, pour garantir que les souris ont bien été décomplémentées, nous avons fait la cinétique de décomplémentation pour déterminer la durée de la décomplémentation.

3.1.1 Liaison des IgM naturels des différentes souches de souris au LCMV et au VSV purifiés

Afin d'évaluer la capacité des IgM naturels à lier les virus, nous avons fait un test ELISA avec le sérum des différentes souris naïves et contre des virions de LCMV ou VSV purifiés (figure 15).

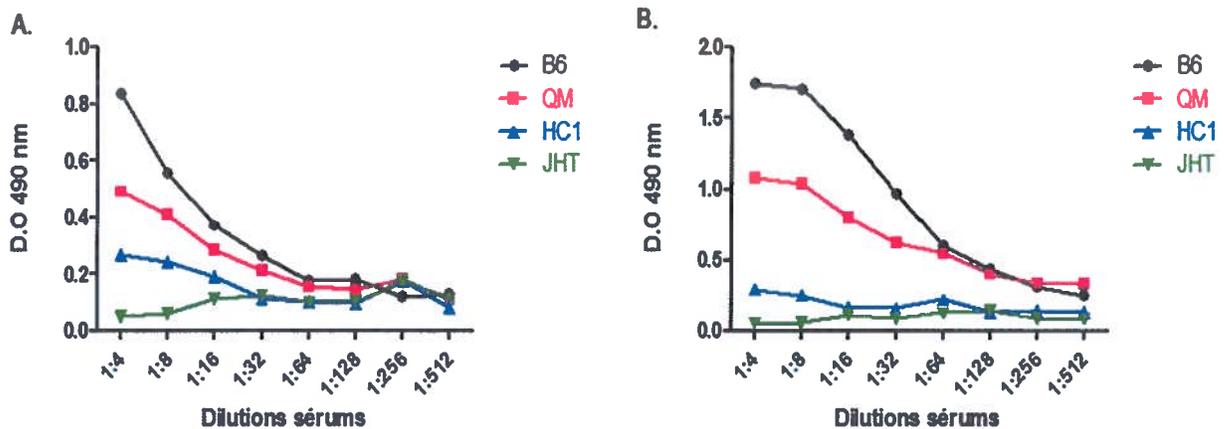


Figure 15. Liaison des IgM naturels sérique aux différents virus.

Les sérums des souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont été prélevés et la capacité de leurs IgM naturels à différentes concentrations à lier (A) LCMV-WE purifié ou (B) VSV-IND purifié a été testée par test ELISA direct. Représentatif de trois expériences. D.O : densité optique

Deux groupes ressortent de ces expériences tant pour la liaison au LCMV qu'au VSV. Le premier groupe, ceux qui ont une plus grande diversité de répertoire en IgM naturels, les souris C57BL/6 (B6) et les souris QM, et ceux ayant peu ou pas de diversité de répertoire les souris HC1 et J_HT. Les souris ayant une plus grande diversité dans leur répertoire en anticorps sont plus aptes à lier les différents virus, tandis que les souris ayant peu ou pas de diversité sont incapables de lier efficacement les virus.

3.1.2 Quantification du taux de C3 chez les différentes souris naïves

Aussi, afin de s'assurer qu'il n'y a aucune différence au niveau du système du complément des différentes souris, nous avons testé par ELISA le taux de C3 dans le sérum des souris naïves (figure 16).

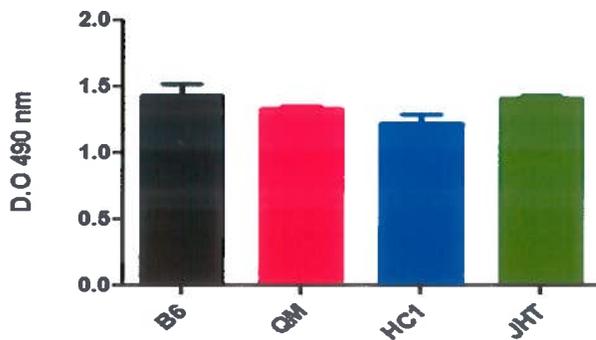


Figure 16. Mesure du taux de la molécule C3 chez les différentes souches de souris.

Les sérums des souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont été prélevés et le taux de molécule C3 du système du complément a été testé par test ELISA direct. Représentatif de trois expériences. D.O : densité optique

Les différentes souris présentent toutes des niveaux similaires en molécules C3 que l'on retrouve dans toutes les voies principales d'activation. D'autres molécules du complément ont aussi été testées soient le C4 que l'on retrouve dans la voie des lectines et classique et le C1q que l'on retrouve dans la voie classique (non montrés). Encore une fois, aucune différence au niveau de ces molécules dans le sérum des souris naïves n'a été constatée.

3.1.3 Cinétique de décomplémentation des souris

Finalement, pour mieux interpréter les résultats et s'assurer d'une bonne décomplémentation des souris à l'aide du facteur de venin de cobra, une cinétique de décomplémentation a été faite à l'aide d'un test ELISA (figure 17). Ceci nous a permis de savoir si la décomplémentation permettait d'avoir une absence du complément pendant plus qu'une journée.

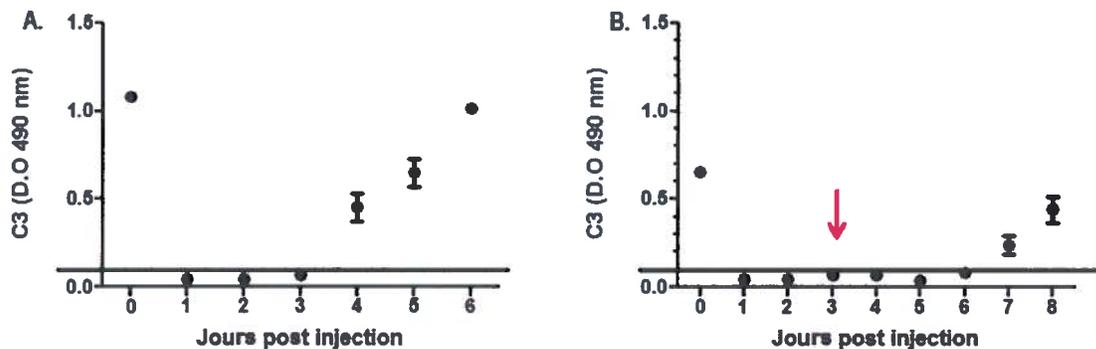


Figure 17. Cinétique de décomplémentation des souris par le facteur de venin de cobra (CVF).

Les souris C57Bl/6 ont été injectées avec une dose de 20 μ g de CVF intrapéritonéale. Aux différents temps post infection le sérum des souris ont été récoltés et le taux de la molécule C3 a été détecté par test ELISA direct. Une seule dose de CVF au jour 0 (A) permet de décomplémenter les souris jusqu'à 3 jours post injection (effet précoce) tandis qu'une deuxième dose de 20 μ g de CVF administrée au jour 3 post premièrement injection (B) permet une décomplémentation jusqu'à 6 jours (effet prolongé). Représentatif de trois expériences. D.O : densité optique.

Une première dose de CVF permet de décomplémenter les souris jusqu'à 3 jours post injection. La molécule C3 réapparaît à partir de 4 jours post injection et revient à des niveaux de base au jour 6 post injection. Ce type de décomplémentation a permis de voir l'importance du complément dans les étapes précoces d'infection. Une deuxième dose de CVF administrée au jour 3 post première injection permet d'avoir une absence de complément jusqu'à 6 jours. Cette approche permet d'analyser l'importance du complément pour une période prolongée lors d'une infection. Le niveau de C3 revient à des niveaux basaux vers le jour 8 post première injection. La différence remarquée pour les deux expériences au JO est dû à une exposition moins prolongée du substrat OPD

avec la HRP avant l'arrêt de la réaction avec la solution de HCL pour l'expérience de la décomplémentation prolongée.

3.2 Impact du système du complément et d'un répertoire diversifié en anticorps naturels sur l'induction de la réponse immunitaire précoce

Le système du complément est un élément essentiel du système immunitaire inné. De plus, comme il a été mentionné dans le chapitre 1, le système du complément peut être activé très efficacement par les IgM. C'est donc dans cette optique que nous avons déterminé si l'absence du complément chez des souris ayant un répertoire en anticorps naturels différents avait un impact sur l'induction de la réponse immunitaire précoce lors d'infections virales. Pour ce faire, nous avons vérifié si l'absence de complément affectait le recrutement des particules virales, la production d'IFN- α ainsi que la présentation antigénique chez les différentes souches de souris.

3.2.1 Recrutement du LCMV et du VSV à la rate

Comme il a été mentionné plus tôt, le recrutement des particules virales à la rate par le système immunitaire inné est important pour que le virus puisse être présenté au système immunitaire adaptatif. On ne remarque aucune différence significative dans les titres viraux retrouvés à la rate chez les souris qui ont été décomplémentées (CVF) ou non (**figure 18**).

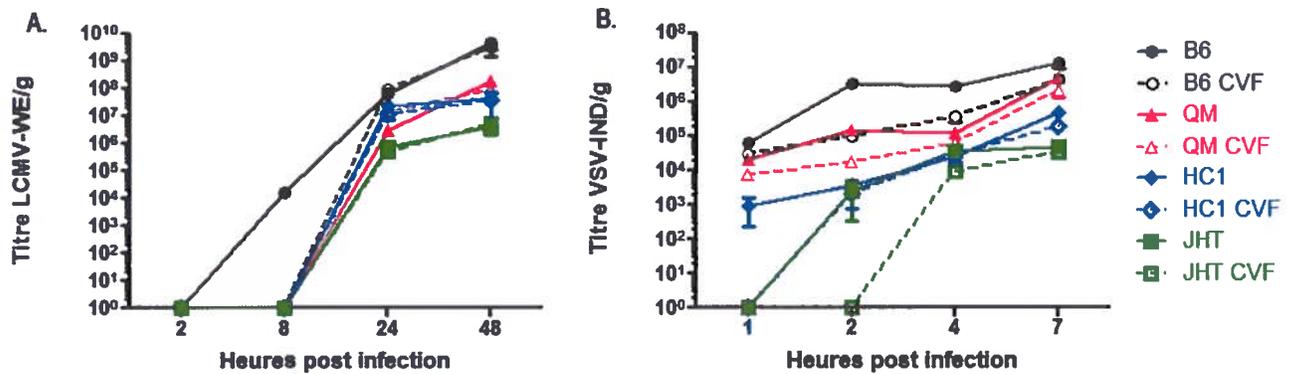


Figure 18. Cinétique du recrutement des différents virus à la rate.

Les souris C57BL/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF (lignes pointillées) ou non (lignes pleines) 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 2×10^6 ufp de (A) LCMV-WE ou 2×10^8 ufp de (B) VSV-IND. Les rates des différentes souris ont été récoltées à différents temps post infection et un test (A) de foyers infectieux ou (B) plage de lyse a été effectué. Représentatif de 3 à 4 expériences. g : gramme.

En effet, que ce soit pour une infection par LCMV ou VSV, le système du complément ne semble pas jouer un rôle pour le recrutement des particules virales à la rate. Cependant, puisque le recrutement des particules de VSV est très rapide, on peut voir que dans les premières heures suivant l'infection, l'absence de complément semble ralentir (différences non significatives) le recrutement du VSV vers la rate. Par contre, seulement 7 heures après l'infection par VSV, les titres viraux à la rate sont similaires entre les souris décomplémentées ou non. Toutefois, la diversité du répertoire en anticorps est importante dans le recrutement de particules virales vers la rate comme il a été déjà démontré au laboratoire. Effectivement, on observe que les souris C57BL/6 sont les plus aptes à amener tant les particules de LCMV que de VSV à la rate suivi des souris QM, des souris HC1 et J_HT. Ceci concorde avec les résultats obtenus lors du test de la liaison des IgM naturels aux différents virus (figure 15). Les souris C57BL/6 et QM sont plus efficaces pour lier les virus et permettent leur recrutement à la rate alors que les souris HC1 et J_HT ne lient que faiblement ou pas les virus. De plus, en absence de complément, les virus n'ont pas plus tendance à se disséminer vers d'autres organes vitaux. Les titres viraux retrouvés dans les reins, le foie et le sang restent similaires entre les souris ayant reçu du CVF ou non (résultats non présentés). Bref, le système du complément n'influence pas le recrutement des virus vers la rate et ne permet pas une meilleure protection face à la dissémination des virus vers d'autres organes.

3.2.2 Quantification de l'IFN- α produit suite à l'infection

Puisque le recrutement des virus vers la rate n'est pas différent chez les souris décomplémentées, nous avons vérifié si la réponse immunitaire précoce était activée à des niveaux différents. La production d'IFN de type I comme l'IFN- α est un bon indicateur de l'activation immunitaire précoce. Les sérums des différentes souris ont été récoltés aux mêmes temps post infections que lors du recrutement à la rate. Ici, on observe une différence dans la production d'IFN- α selon le groupe de souris infectées (**figures 19 et 20**). Par exemple, pour les souris ayant une plus grande diversité de répertoire (C57BL/6 et QM), la production en interférons n'est pas affectée en absence de complément. Cependant, chez les souris ayant peu ou pas d'anticorps (HC1 et J_HT), l'absence du complément favorise une meilleure production d'IFN- α à des niveaux similaires à ceux des souris B6 et QM. Ce phénomène n'est pas propre à un seul virus puisqu'il est observé tant lors d'une infection avec LCMV qu'avec VSV (**figures 19 et 20**).

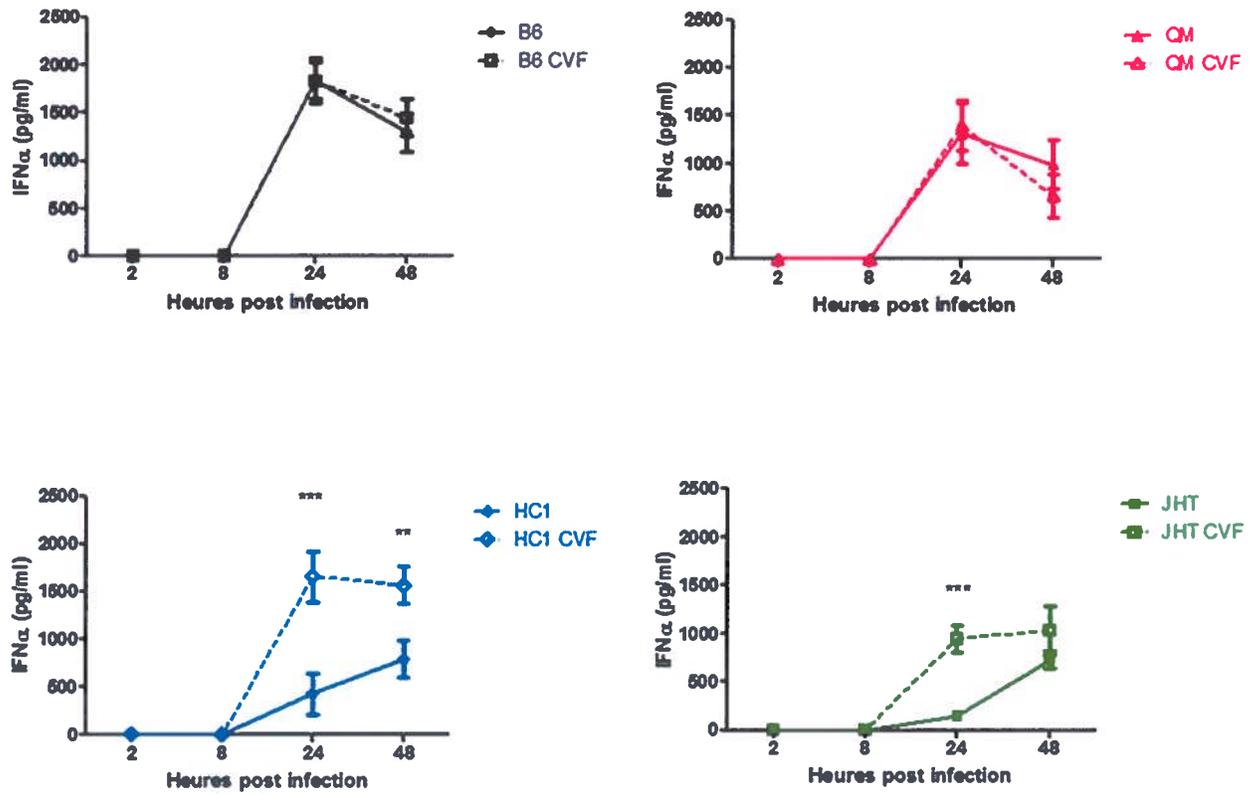


Figure 19. Quantification de l'IFN- α produit suite à l'infection par LCMV-WE à différents temps post-infection.

Les souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF (lignes pointillées) ou non (lignes pleines) 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 2×10^6 uff de LCMV-WE. Les sérums des différentes souris ont été récoltés à différents temps post infection et un test ELISA sandwich a été effectué pour quantifier l'IFN- α produit. Représentatif de 3 à 4 expériences. pg : picogramme.

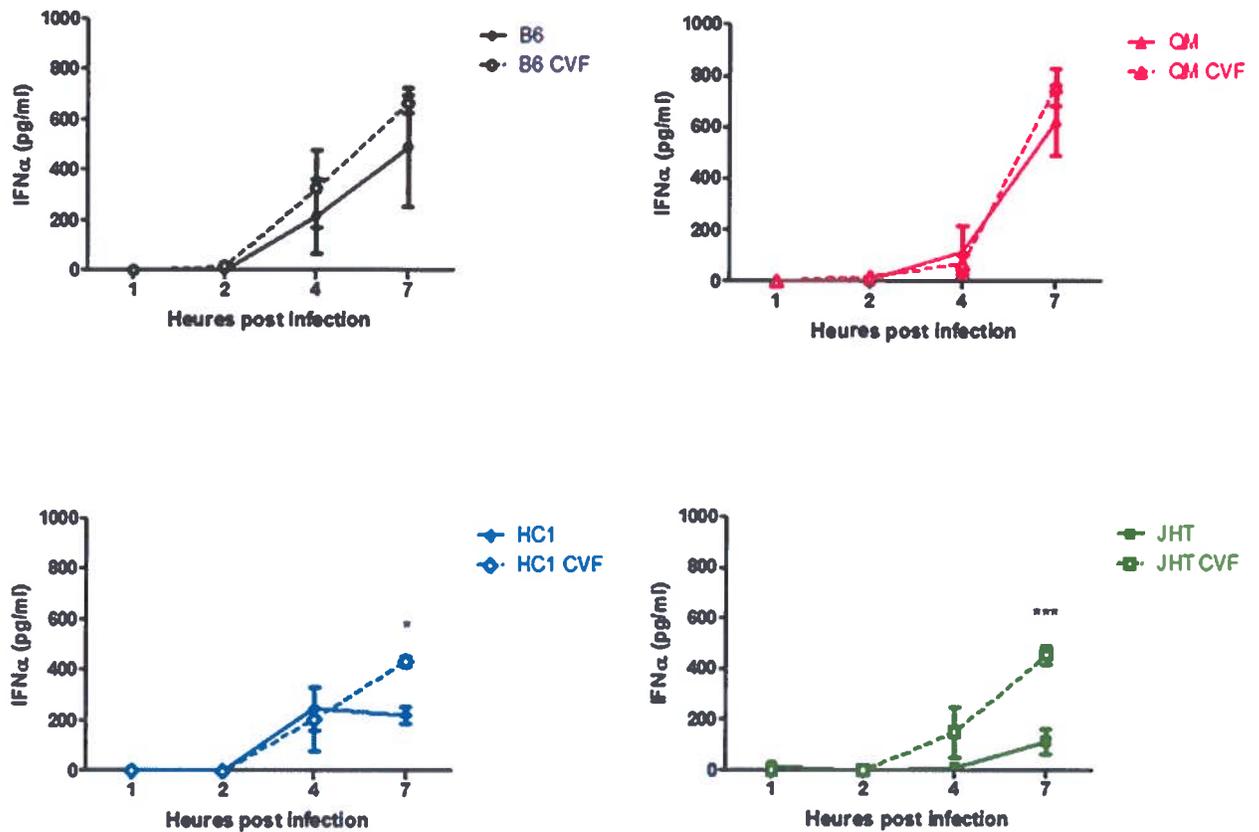


Figure 20. Quantification de l'IFN- α produit suite à l'infection par VSV-IND à différents temps post-infection.

Les souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF (lignes pointillées) ou non (lignes pleines) 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 2×10^8 ufp de VSV-IND. Les sérums des différentes souris ont été récoltés à différents temps post infection et un test ELISA sandwich a été effectué pour quantifier l'IFN- α produit. Représentatif de 3 expériences. pg : picogramme.

3.2.3 Présentation antigénique *ex vivo* des cellules dendritiques aux lymphocytes T CD8+

L'IFN alpha est connu pour activer plusieurs cellules du système immunitaire dont les cellules dendritiques qui sont d'excellentes cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules dendritiques sont donc importantes dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Nous avons donc voulu voir si la production d'IFN- α avait un impact, premièrement, sur l'activation des cellules dendritiques. L'activation des cellules dendritiques a pu être observée grâce à l'expression du marqueur d'activation CD86 à

leur surface. Dans cette expérience, on remarque aussi une différence au niveau de l'expression du marqueur CD86 chez les DCs lors de la décomplémentation seulement chez deux souches (**figure 21**).

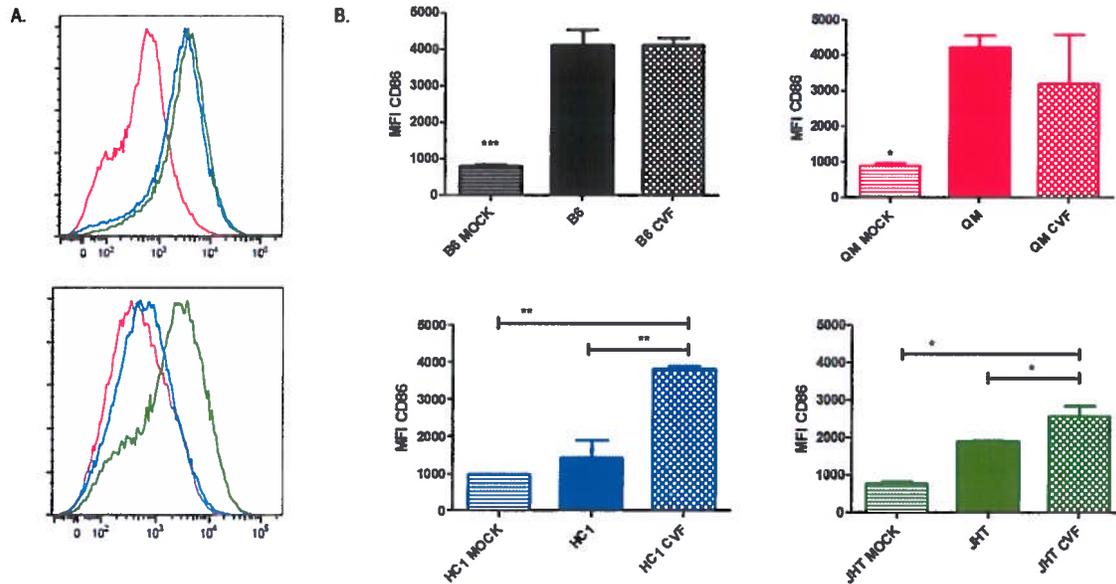


Figure 21. Activation des DCs suite à l'infection par LCMV-WE.

Les souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF ou non 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 2×10^6 uff de LCMV-WE. Les rates des différentes souris ont été récoltées 24h post infection et l'activation des DCs a été observée. **A.** Analyse de l'activation des DCs grâce à l'expression du marqueur d'activation CD86 par cytométrie en flux des souris C57Bl/6/QM (haut) et HC1/J_HT (bas). Les DCs ont été sélectionnés avec un anti-CD11c et ensuite avec un anti-CD86 pour mesurer leur activation. Rouge : souris non-infectées (mock), Bleu : souris avec complément, Vert : souris ayant reçues du CVF. **B.** Histogrammes représentatif de l'intensité de fluorescence (MFI) du CD86 obtenu pour chacune des souris. Représentatif de 3 expériences. DCs : cellules dendritiques; MFI : Mean Fluorescence Intensity. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Les cellules dendritiques des souris C57Bl/6 et QM infectées avec LCMV montrent une augmentation de l'expression du CD86 par rapport aux souris non infectées (mock), mais aucune différence avec celles ayant reçu une dose de CVF. Chez les cellules dendritiques des souris HC1 et J_HT, ayant peu ou pas de diversité dans leur répertoire d'anticorps, on observe qu'une faible activation des DCs suivant l'infection. Cependant, lorsque les souris sont décomplémentées avant l'infection, les DCs de ces souris présentent une augmentation significative du marqueur CD86 à des niveaux rejoignant

ceux des souris C57BL/6 et QM. Ceci corrèle aussi avec les résultats obtenus pour la production d'IFN- α à 24 heures post infection avec LCMV. En effet, la meilleure production d'interférons chez ces souris semble favoriser l'activation des cellules dendritiques.

Deuxièmement, nous avons voulu déterminer si les DCs activées étaient aussi capables de présenter l'antigène aux cellules T CD8+. Pour ce faire, les rates des différentes souris infectées à haute dose par LCMV ont été récoltées 24h p.i. et les DCs ont été purifiées à l'aide de billes magnétiques. Les DCs ont par la suite été incubées 16h avec du LPS. Le lendemain, des rates de souris P14, qui possèdent des lymphocytes T CD8+ spécifiques au LCMV, ont été récoltées. Les LT CD8+ ont été isolées aussi à l'aide de billes magnétiques. Les cellules ont par la suite été marquées au CFSE qui nous permettait de quantifier leur prolifération. Les LT CD8+ ont ensuite été mis en coculture avec les DCs pour 3 jours, permettant ainsi la présentation de l'antigène viral par les DCs aux LT CD8+. Une diminution de l'intensité du CFSE corrèle avec la division cellulaire. Après 3 jours, les LT CD8+ ont été marqués avec un anti-CD8 et la prolifération a été mesurée à l'aide de la cytométrie en flux. Comme pour l'expression du marqueur d'activation CD86 chez les cellules dendritiques, on remarque que la prolifération des LT CD8+ spécifiques est plus importante chez les souris C57BL/6 et QM que chez les souris HC1 et J_HT et que la décomplémentation n'a d'effet que chez les deux dernières souris (figure 22).

Les souris C57BL/6 sont celles qui permettent d'avoir la plus grande prolifération des LT CD8+ spécifiques au LCMV par rapport aux souris mock (naïves, non infectées). Les souris QM réussissent à induire un peu de prolifération tandis que chez les souris HC1 et J_HT on ne dénote aucune prolifération. Cependant, lorsque les souris HC1 et J_HT sont décomplémentées avec le CVF, elles sont capables d'induire une prolifération significative des LT CD8+ spécifiques au LCMV.

En résumé, chez toutes les souches de souris, l'absence de complément n'affecte pas le recrutement du LCMV ou du VSV à la rate. Chez les souris possédant un répertoire en anticorps naturels diversifié, la production en IFN- α , l'activation des DCs et l'induction

de la prolifération des LT CD8+ spécifiques suite à l'infection ne sont pas affectés en absence du système du complément. Toutefois, on n'observe pas le même phénomène chez les souris ne possédant pas ou peu d'anticorps. En absence de complément, la production en IFN- α est augmentée de façon significative et on observe une meilleure activation des cellules dendritiques qui permettent à leur tour d'augmenter la capacité de ces souris à présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T CD8+.

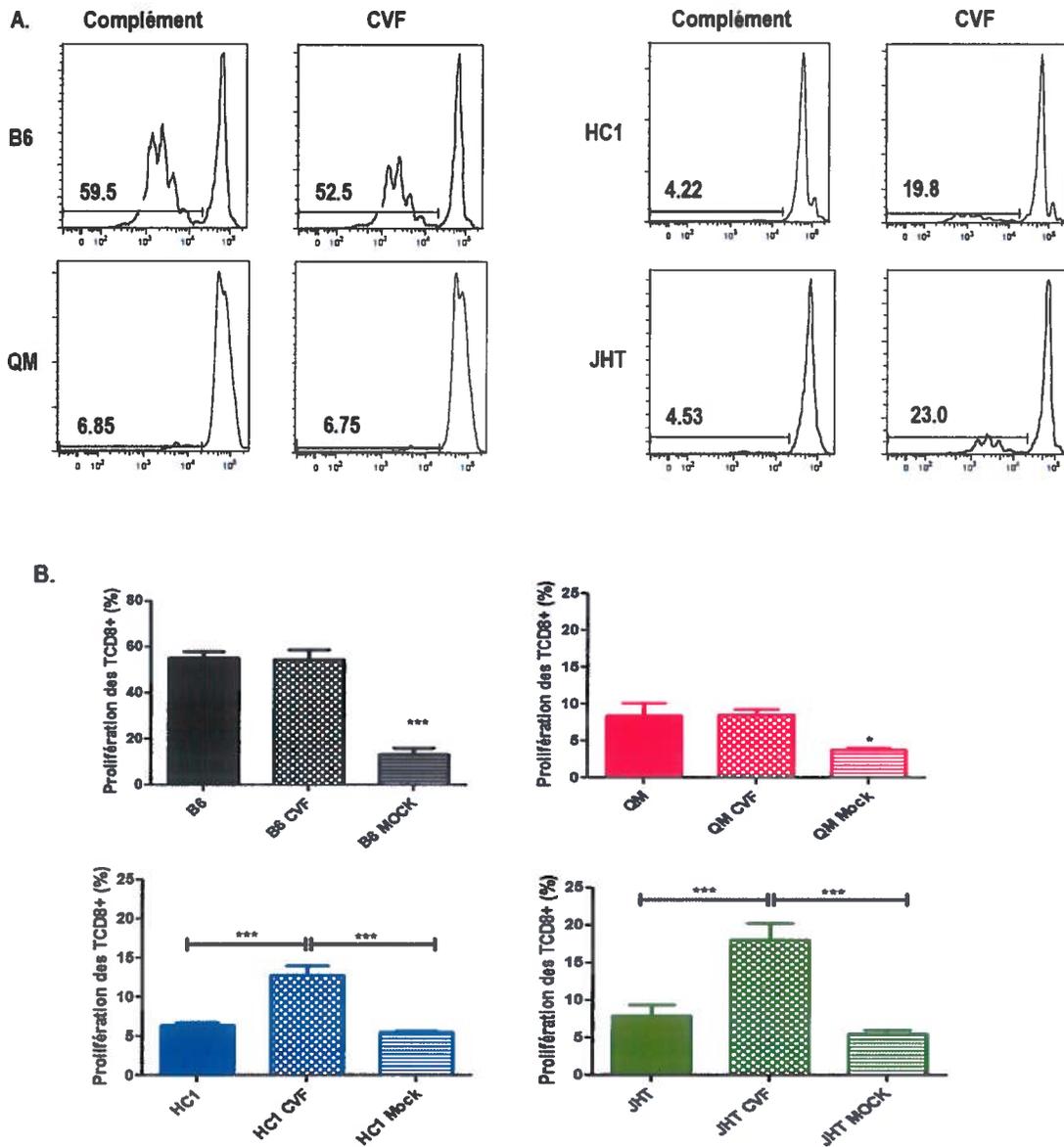


Figure 22. Présentation antigénique par les cellules dendritiques spléniques des souris infectées avec LCMV-WE aux lymphocytes T CD8 de souris P14.

Présentation antigénique par les cellules dendritiques spléniques des souris infectées avec LCMV-WE aux lymphocytes T CD8 de souris P14.

Les souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF ou non 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 2×10^6 uff de LCMV-WE. Les rates des différentes souris ont été récoltées 24h post infection et les DCs ont été isolées à l'aide de billes magnétiques et mises en coculture avec des lymphocytes T CD8 isolés de la rate de souris P14 à l'aide aussi de billes magnétiques. Afin d'analyser la prolifération des lymphocytes T CD8 spécifiques au virus, ceux-ci ont été marqués avec le CFSE A. Analyse représentative de la prolifération des lymphocytes T CD8+ grâce à l'expression du CFSE par cytométrie en flux des souris C57Bl/6/QM (haut) et HC1/J_HT (bas) en présence (gauche) ou en absence (droite) du système du complément. B. Histogrammes représentatifs du pourcentage de prolifération par la diminution de l'expression du CFSE obtenu pour chacune des souris. Représentatif de 3 expériences. DCs : cellules dendritiques; CFSE : Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester . *, P<0.05; ***, P<0.001.

3.3 Impact du système du complément et d'un répertoire diversifié en anticorps naturels sur l'induction de la réponse humorale

Par la suite, nous avons investigué l'impact des observation que nous avons faites concernant la réponse précoce sur l'induction de la réponse immunitaire adaptative. Premièrement, nous avons analysé la réponse humorale. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle viral VSV puisque celui-ci permet l'induction d'une bonne réponse immunitaire humorale neutralisante.

3.3.1 Titres en anticorps neutralisants contre VSV

Tout d'abord, nous avons regardé les titres en anticorps neutralisants dirigés contre VSV chez les différentes souris en présence ou en absence du système du complément. L'absence de complément chez les souris C57BL/6 affecte faiblement l'apparition des Ig totales neutralisantes dès les premiers jours suivant l'infection par VSV et on remarque une diminution de leur nombre au jour 30 p.i. La présence de complément favorise la production tardive des IgG neutralisantes puisqu'on retrouve une diminution de leur quantité chez les souris ayant reçu du CVF au jour 30 p.i (figure 23). Les souris QM, produisent moins d'anticorps neutralisants que les souris C57BL/6, mais l'absence de complément ne semble pas avoir un impact sur la production d'Ig totales neutralisantes. Par contre, pour la production d'IgG neutralisantes, on dénote un léger ralentissement dans la production de ces molécules en absence de complément. Pour les souris HC1, elles ne font pas de commutation isotypique, donc leurs immunoglobulines sont majoritairement des IgM. Cependant, contrairement aux deux autres souris, ces souris, lorsqu'elles sont décomplémentées, produisent légèrement plus d'Ig neutralisantes que leurs témoins. Les souris J_HT, comme il a été mentionné plus tôt, ne possèdent pas d'anticorps et donc, ne peuvent pas produire une réponse humorale contre le VSV.

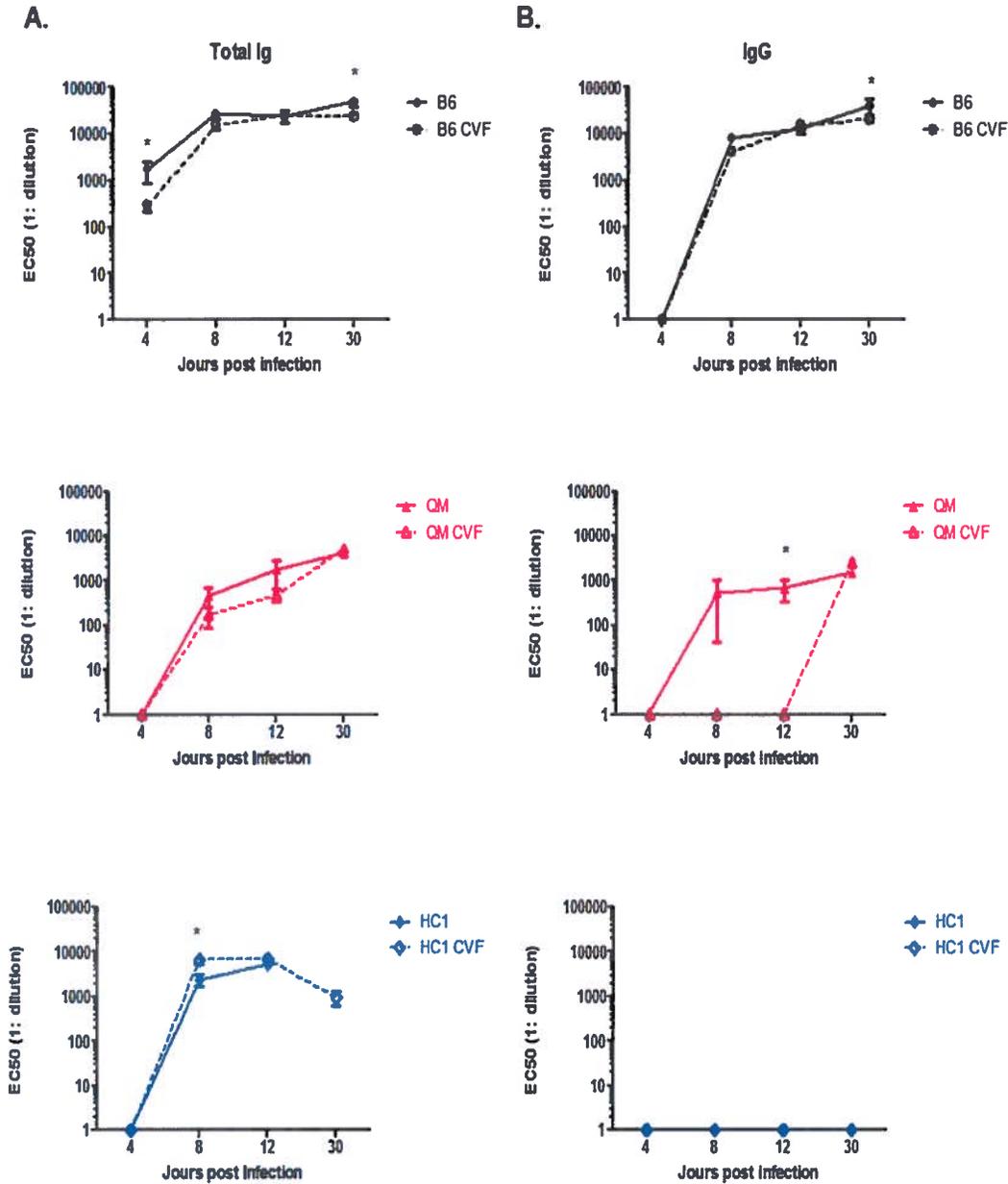


Figure 23. Cinétique du développement en anticorps neutralisants contre VSV-IND.

Les souris C57Bl/6, QM et HC1 naïves ont reçu du CVF (ligne pointillée) ou non (ligne pleine) 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 1×10^6 ufp de VSV-IND. Les sérums des différentes souris ont été récoltés à différents temps post infection et les anticorps neutralisants anti-VSV ont été titrés par un test de neutralisation **A**. Analyse des anticorps neutralisants anti-VSV de tous les isotypes. **B**. Analyse des IgG neutralisants anti-VSV uniquement. Représentatif de 3 expériences. Ig : Immunoglobuline; IgG : Immunoglobuline G. *, $P < 0.05$

3.3.2 Survie des souris suite à l'infection par VSV

La réponse humorale est très importante dans le contrôle de l'infection par VSV. Si le virus n'est pas bien maîtrisé, il peut migrer jusqu'au système nerveux central. Dans ce cas, les souris présentent dans un premier temps des signes de paralysie des membres arrières et dans un deuxième temps des signes de convulsions et finalement les souris meurent de l'infection. Nous avons donc voulu savoir si l'absence de complément chez nos différentes souris avait un impact sur la survie des souris suite à l'infection par VSV. Chez les souris C57Bl/6 et QM, l'absence ou la présence de complément n'affecte pas la survie des souris. Cependant, pour les souris HC1 et J_HT, on remarque un tout autre phénomène. Les souris HC1 et J_HT qui normalement ne survivent pas à une infection à haute dose, réussissent à contrôler et éliminer le virus lorsqu'elles ont reçues du CVF (figure 24).

En résumé, l'absence de complément n'affecte pas la survie des souris C57Bl/6 et QM malgré une diminution et un ralentissement dans l'apparition des anticorps neutralisants. Pour les souris HC1 et J_HT, le peu de diversité dans leur répertoire ou le manque d'anticorps les empêche d'avoir une bonne réponse humorale contre le virus. Cependant, en absence du système du complément, la réponse en anticorps neutralisants chez les souris HC1 est légèrement augmentée. De plus, chez les souris HC1 et J_HT décomplémentées, l'absence de complément favorise la survie de ces souris face à l'infection par VSV ce qui pourrait être dû à la plus grande quantité d'IFN- α .

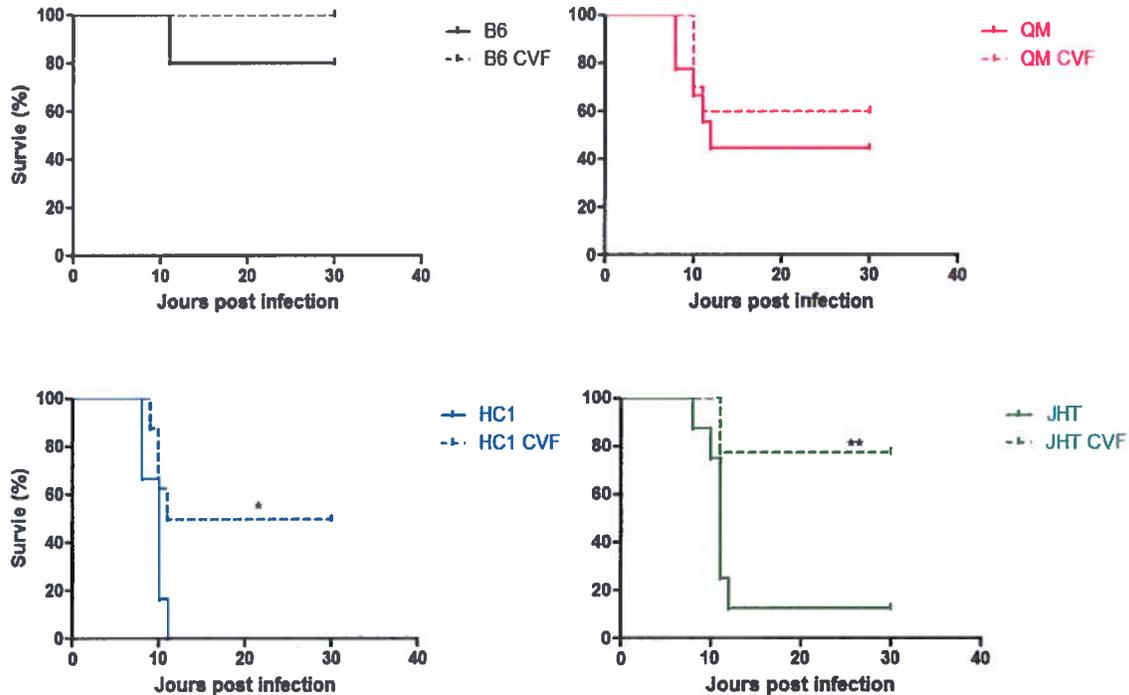


Figure 24. Survie des souris suite à l'infection par VSV.

Les souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF (ligne pointillée) ou non (ligne pleine) 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 1×10^6 ufp de VSV-IND (C57Bl/6, QM et HC1) ou 1×10^3 ufp de VSV-IND (J_HT). Les souris ont été observées quotidiennement pour les points limites. Lorsque les souris présentaient des signes de paralysie des membres arrière ou des convulsions, elles étaient sacrifiées. Représentatif de 3 expériences. *, $P < 0.05$ *, **, $P < 0.01$.

3.4 Impact du système du complément et d'un répertoire diversifié en anticorps naturels sur l'induction de la réponse cellulaire

Nous avons, par la suite, analysé l'impact de la réponse précoce induite sur la réponse cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé cette fois-ci le modèle viral LCMV puisque celui-ci est contrôlé majoritairement par cette réponse.

3.4.1 Expression de marqueur d'activation à la surface des lymphocytes T CD8+ lors d'une infection par LCMV

Tout d'abord, nous avons voulu déterminer si l'activation générale des LT CD8+ était affectée en absence de complément. Pour ce faire, les souris ont été infectées à faible dose avec LCMV 24h après avoir été décomplémentées ou non. Au jour 8, les rates des différentes souris ont été récoltées et des marquages pour la cytométrie en flux ont été

effectués. Pour cette expérience, nous avons marqué les LT CD8+ à l'aide d'un anticorps anti-CD8 et leur niveau d'activation a pu être déterminé grâce à un anticorps anti-CD62L. Le CD62L est une molécule d'adhésion cellulaire retrouvée sur les lymphocytes qui leur permet d'entrer dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate. Les lymphocytes perdent l'expression du CD62L, lorsqu'ils sont activés et qu'ils peuvent alors quitter les organes lymphoïdes secondaires. Donc, afin de quantifier l'activation des lymphocytes T CD8 lors d'une infection par LCMV en présence ou en absence de complément, les LT ont été sélectionnés par l'expression CD8+CD62L-. De plus, dans cette expérience, des groupes de souris ont reçu deux doses de CVF (2xCVF) pour nous permettre de voir l'impact d'une plus longue absence de complément sur l'induction de la réponse immunitaire adaptative. On observe que pour l'activation générale des LT CD8+ chez les souris C57Bl/6 et QM, l'absence précoce de complément ne joue aucun rôle. Cependant, l'absence de complément sur une période prolongée semble diminuer le niveau d'activation générale des lymphocytes T CD8+ des souris C57Bl/6 (figure 25). Le phénomène ne se répète pas pour les souris ne possédant peu ou pas de répertoire en anticorps naturels. En effet, les souris HC1 et J_HT, lorsqu'elles reçoivent une dose de CVF, donc une décomplémentation dans les étapes précoces d'infection, ont un plus grand nombre de LT CD8+ activés que leur contrôle. Par contre, lorsqu'elles reçoivent deux doses de CVF, cette augmentation tend à diminuer. Ces mêmes résultats ont aussi été observés en ce qui concerne le pourcentage de LT CD8+CD62L- (résultats non montrés).

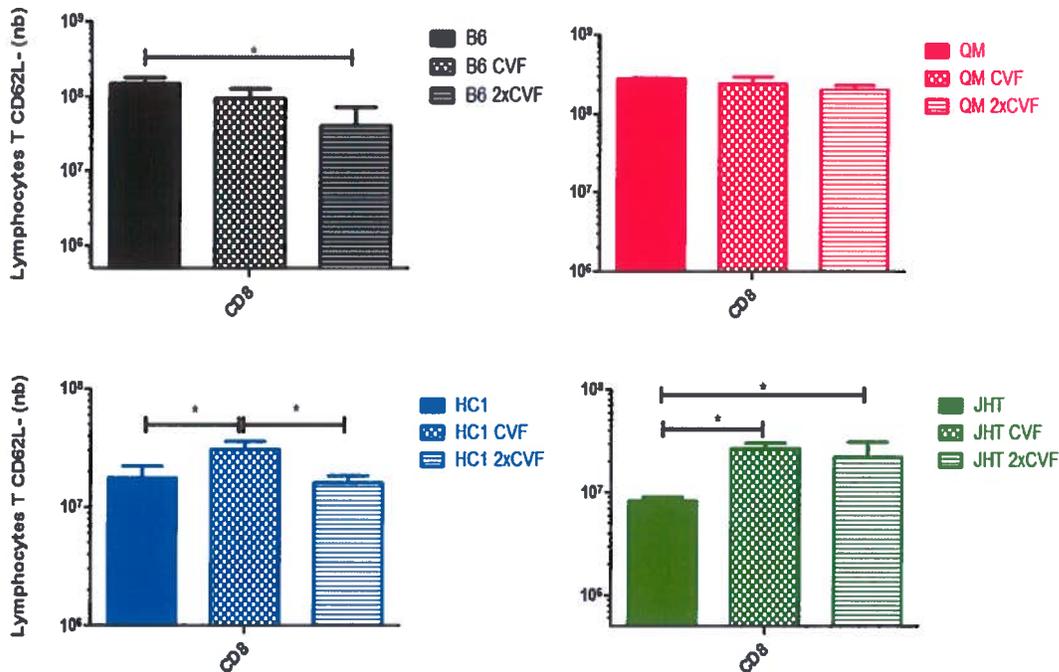


Figure 25. Activation générale des lymphocytes T CD8 par l'expression du marqueur d'activation du CD62L à leur surface suite à l'infection par LCMV-WE.

Les souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF ou non 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 200 uff de LCMV-WE. Les rates des différentes souris ont été récoltées 8 jours post infection et le niveau d'expression du CD62L à la surface des lymphocytes T CD8 a été analysé par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en nombre total de lymphocytes T CD8+ CD62L-. Représentatif de 4 expériences. *, P<0.05.

3.4.2 Quantification des lymphocytes T CD8+ spécifiques au virus

Le nombre de cellules activées spécifiques au LCMV a par la suite été quantifié. La spécificité a pu être obtenue à l'aide de tétramères. Cette méthode a permis de détecter directement les cellules T CD8+ spécifiques par marquage de leur TCR avec un complexe de 4 unités de CMH classe I préalablement chargés par l'épitope d'intérêt. La spécificité des LT CD8+ a été testée pour 3 différents épitopes du LCMV, soit deux de la glycoprotéines (gp33-41 et gp276-286) et un de la nucléoprotéine (np396-405). On observe un résultat similaire à celui obtenu pour l'activation générale (**figure 26**). Les souris C57Bl/6 ont une diminution de leur nombre de LT spécifique au virus lorsque les souris sont décomplémentées de façon prolongée. Cette différence est observable pour l'épitope gp33-41, mais on remarque une tendance similaire pour les autres épitopes.

On remarque un phénomène similaire aussi pour les souris QM. Chez les souris n'ayant pas ou peu d'anticorps naturels, on observe un résultat semblable à celui obtenu aussi pour l'activation générale des LT CD8+. C'est-à-dire que chez ces souris, celles qui ont reçu une dose de CVF ont un plus grand nombre de LT spécifiques que leurs témoins. Cependant, lorsqu'une deuxième dose de CVF est administrée, le nombre de LT spécifiques tend à diminuer à nouveau comme il a été observé chez l'activation générale. Ces mêmes résultats ont aussi été observés en ce qui concerne le pourcentage de LT CD8+CD62L-Tétramère+(résultats non montrés).

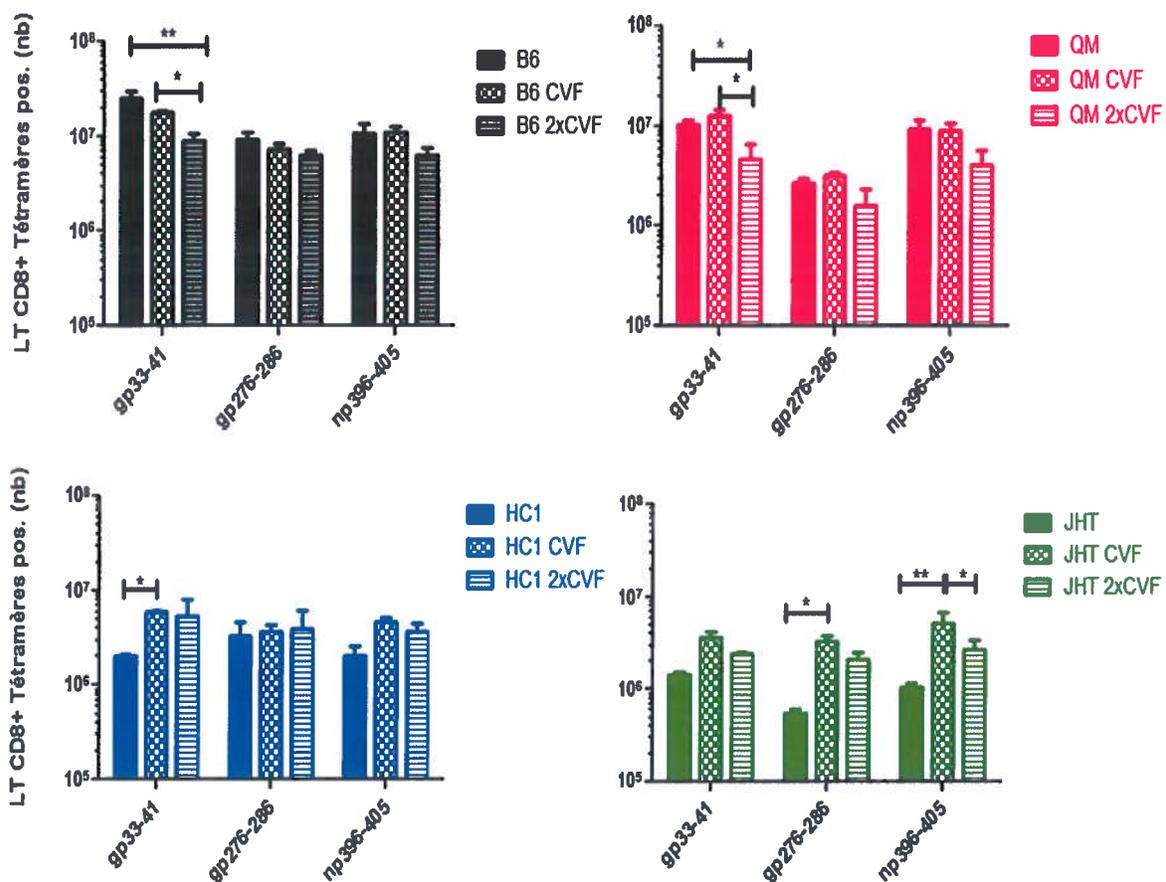


Figure 26. Activation spécifique des lymphocytes T CD8 suite à l'infection par LCMV-WE.

Les souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF ou non 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 200 uff de LCMV-WE. Les rates des différentes souris ont été récoltées 8 jours post infection et les lymphocytes T CD8 spécifiques pour trois tétramères ont été analysés par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en nombre total de lymphocytes T CD8+ CD62L- tétramères+. Représentatif de 4 expériences. *, P<0.05; **, P<0.01.

3.4.3 Potentiel cytotoxique des lymphocytes T CD8+ *ex vivo*

La fonctionnalité des LT CD8+ spécifiques au LCMV a par la suite été analysée. Pour ce faire, nous avons premièrement analysé le potentiel cytotoxique des LT CD8+ en quantifiant le relâchement de granzyme B qui permet d'induire l'apoptose des cellules cibles. Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD8, anti-CD62L, anti-CD107a (vésicules contenant les granzymes) et anti granzyme-B. Encore une fois, on retrouve la même tendance que pour les résultats obtenus précédemment pour la réponse cellulaire. L'absence prolongée de complément affecte le potentiel cytotoxique des souris ayant un répertoire diversifié en anticorps, tandis qu'une absence au début de l'infection seulement favorise le relâchement de granzyme B chez les souris ayant un répertoire peu ou pas diversifiés (**figure 27**). Ces mêmes résultats ont aussi été observé en ce qui concerne le pourcentage de LT CD8+CD62L-CD106a+GranzymeB+ (résultats non montrés).

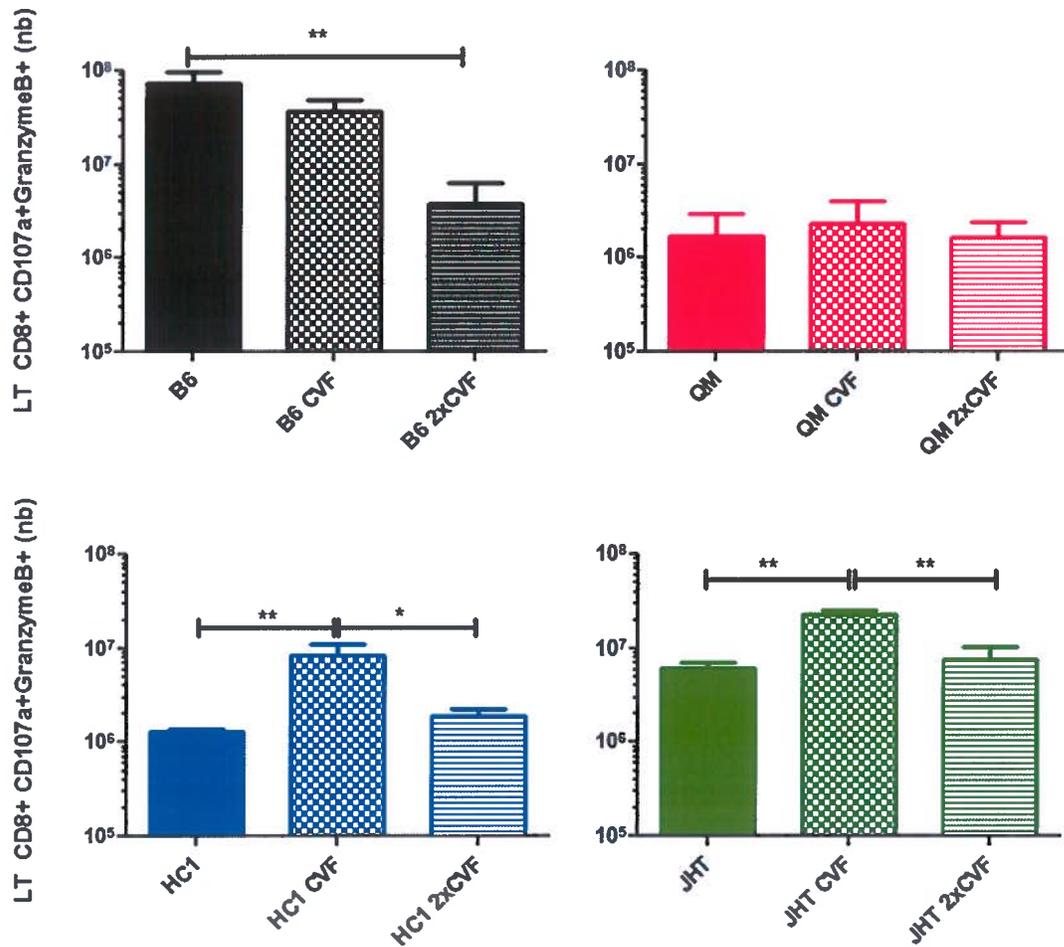


Figure 27. Potentiel cytotoxique des lymphocytes T CD8 par le relâchement de granzyme B suite à l'infection par LCMV-WE.

Les souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF ou non 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 200 uff de LCMV-WE. Les rates des différentes souris ont été récoltées 8 jours post infection et les lymphocytes T CD8 étant capables de sécréter des granzymes ont été analysé par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en nombre total de lymphocytes T CD8+ CD107a+ Granzyme B+. Représentatif de 4 expériences. *, P<0.05; **, P<0.01.

3.4.4 Capacité des lymphocytes T CD8+ à sécréter des cytokines antivirales *ex vivo*

Une autre méthode a été utilisée afin de vérifier la fonctionnalité des LT CD8+. Elle consiste à déterminer la capacité de ces lymphocytes à sécréter des cytokines effectrices comme L'IFN- γ et le TNF α . Ces deux cytokines sont très importantes dans des infections virales, par exemple dans l'inhibition de la réplication virale. Les cellules

ont été traitées afin de pouvoir faire un marquage intracellulaire et elles ont été marquées avec des anticorps anti-CD8, anti-IFN- γ et anti-TNF α . Les résultats obtenus pour la sécrétion de cytokines antivirales abondent aussi dans le même sens que les résultats obtenus pour le potentiel cytotoxique. En effet, les souris C56Bl/6 et QM qui possèdent une plus grande diversité dans leur répertoire en anticorps, possèdent plus de LT CD8+ aptes à sécréter de l'IFN- γ et du TNF α , et même les deux cytokines simultanément, en présence de complément. L'effet est encore plus probant lorsque les souris ont reçu deux doses de CVF (**figure 28**). Au contraire, chez les souris HC1 et J_HT, une absence du système du complément dans les premiers jours suivants l'infection favorise la production de LT CD8+ sécrétant de l'IFN- γ et du TNF- α ainsi que la production de LT CD8+ plurifonctionnels qui peuvent sécréter les deux cytokines.

Bref, le système du complément semble jouer des rôles opposés aussi dans la réponse cellulaire. En présence d'une plus grande diversité de répertoire en anticorps naturels, le système du complément est important pour obtenir une bonne réponse cellulaire. Par contre lorsque celui-ci est absent plus tôt dans l'infection, la réponse cellulaire est que peu ou pas affectée. Cependant, en présence d'un répertoire en anticorps naturels plus restreint, le système du complément semble nuire à l'induction de la réponse cellulaire. Cet effet est maximal seulement si le complément est absent dans les étapes précoces d'infection puisque la réponse cellulaire diminue à nouveau si les souris sont décomplémentées de façon prolongée.

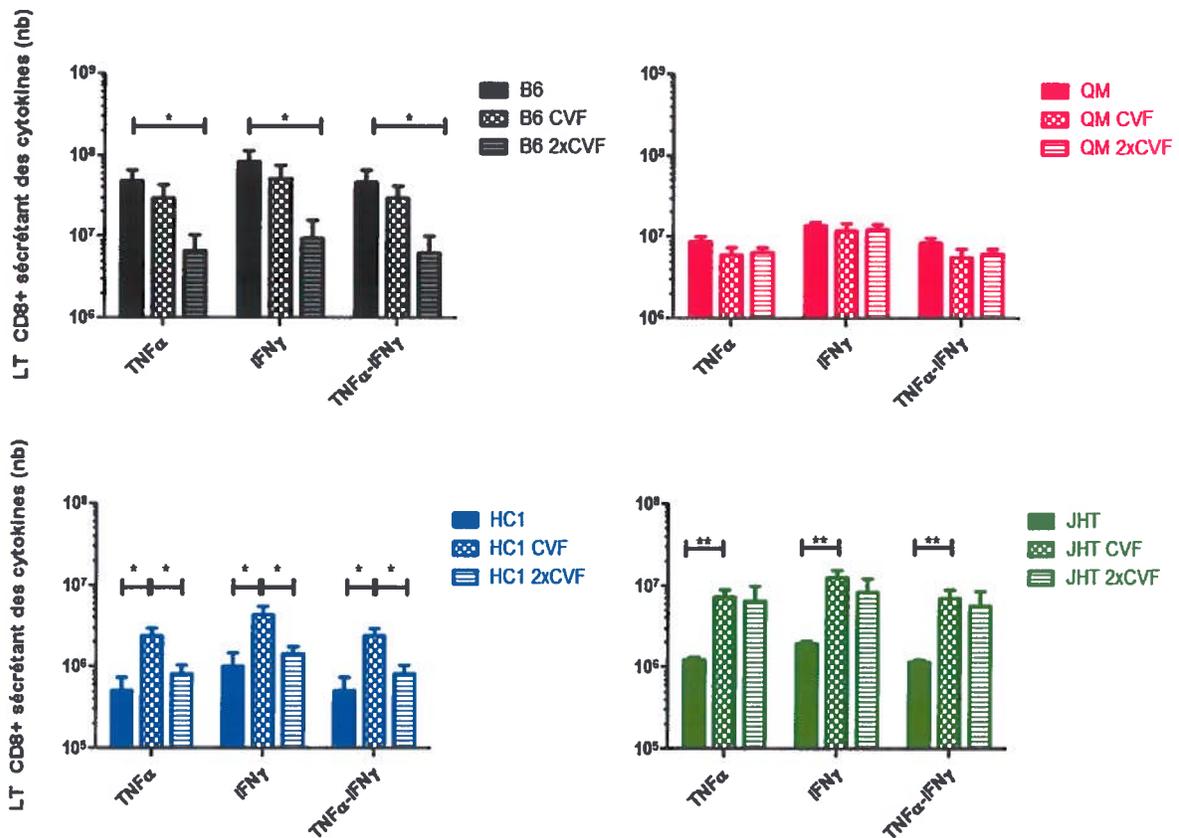


Figure 28. Production de cytokines par les lymphocytes T CD8 spécifiques au LCMV-WE.

Les souris C57Bl/6, QM, HC1 et J_HT naïves ont reçu du CVF ou non 24h avant l'infection par voie intraveineuse de 200 uff de LCMV-WE. Les rates des différentes souris ont été récoltées 8 jours post infection et les lymphocytes T CD8 étant capables de sécréter des cytokines antivirales ont été analysé par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en nombre total de lymphocytes T CD8+ TNFα+ IFNγ-, CD8+ TNFα- IFNγ+ et CD8+ TNFα+ IFNγ+ . Représentatif de 4 expériences. *, P<0.05; **, P<0.01.

Afin de mieux représenter les résultats obtenus, le **tableau 2** présente un bref résumé des résultats pour toutes les souches de souris lorsqu'elles sont décomplémentées et infectées.

Tableau 2: Résumé des résultats obtenus lors des différentes expériences en absence du système du complément.

Lors d'une décomplémentation	B6/QM	HC1/JHT
Diversité du répertoire AcNat	+++/>++	+/-
Recrutement virus à la rate	Aucune différence	Aucune différence
Production IFN α	Aucune différence	<u>Augmentation</u>
Présentation antigénique	Aucune différence	<u>Augmentation</u>
Anticorps neutralisants	<u>Diminution</u> <u>Ralentissement</u>	<u>Augmentation</u>
Survie	Aucune différence	<u>Augmentation</u>
Activation/Spécificité/ Fonctionnalité cellulaire	Aucune différence (précoce) <u>Diminution (prolongé)</u>	<u>Augmentation</u>

Chapitre 4

Discussion

4.1 Les souris C57Bl/6 et QM possèdent la plus grande diversité de répertoire en IgM naturels

Plusieurs études ont permis de démontrer que les anticorps naturels, majoritairement d'isotype IgM, sont capables de lier des motifs répétés comme les sucres, les acides nucléiques et phospholipides qui sont partagés par plusieurs pathogènes (Hardy *et al.*, 1994b). Les anticorps naturels sont, en outre, impliqués dans l'homéostasie (Boes, 2000), la surveillance des cellules tumorales (Schwartz-Albiez *et al.*, 2008) ainsi que dans la réponse contre les pathogènes dont le VIH, le VSV et le virus de l'Influenza (Baumgarth *et al.*, 2000, Ochsenbein *et al.*, 1999a, Planque *et al.*, 2007). Les anticorps naturels sont aussi très importants dans l'activation de la voie classique du complément. En effet, il faut une molécule d'IgM pour activer le complément et lyser un globule rouge, tandis qu'il faudra 1000 molécules d'IgG pour obtenir le même résultat (Cooper *et al.*, 1985).

Afin de déterminer si la diversité en IgM a un impact sur le fonctionnement du système du complément, nous avons utilisé quatre souris ayant un répertoire en lymphocytes B différents. Tout d'abord, nous avons évalué la capacité des IgM de nos différentes souris à lier par test ELISA des virions purifiés de LCMV-WE et VSV-IND. Nous avons obtenu un lien direct entre les dilutions de sérums et la diminution de la densité optique pour toutes les souches de souris ayant des LB fonctionnels autant pour l'expérience avec LCMV-WE que celles avec le VSV (**figure 15**). Pour les deux virus, deux groupes se distinguent. Celui des souris C57Bl/6 et QM, qui possède la plus grande diversité de répertoire en IgM naturels et celui des HC1 et J_HT qui ont peu ou pas de diversité dans leur répertoire. Ces résultats concordent avec ceux obtenus pour les souris C57Bl/6 et J_HT dans le laboratoire du Dr Zinkernagel (Ochsenbein *et al.*, 1999a) et ceux obtenus antérieurement pour les quatre souches de souris dans notre laboratoire (Charpentier, 2011).

4.2 Impact du système du complément et d'un répertoire diversifié en anticorps naturels sur l'induction de la réponse immunitaire précoce

Les anticorps naturels et le système du complément sont deux acteurs importants du système immunitaire inné. Puisque les anticorps naturels sont majoritairement des IgM et que ceux-ci sont très efficaces pour activer la voie classique du système du complément, nous avons voulu déterminer si la présence ou l'absence du système du complément avait un impact sur l'induction d'une réponse immunitaire lors d'infections virales chez des souris ayant des répertoires différents d'anticorps naturels.

4.2.1 L'absence du système du complément n'affecte pas le recrutement des différents virus à la rate

Les complexes immuns formés d'anticorps et de particules virales peuvent activer le système du complément ce qui peut permettre la lyse de virions ou de cellules infectées. Le système du complément peut aussi favoriser le recrutement des complexes immuns aux organes lymphoïdes secondaires notamment par l'attachement du complément aux récepteurs CR2 retrouvés sur les parois (Hangartner *et al.*, 2006b). Un meilleur recrutement des complexes immuns aux organes lymphoïdes secondaires favorise l'activation de la réponse immunitaire adaptative dans l'espoir d'éliminer complètement le virus. Ce phénomène a été observé il y a plusieurs années pour le virus de l'Influenza. En présence de complément les complexes immuns formés d'anticorps naturels et du virus de l'influenza sont mieux recrutés vers la rate, ce qui permet une meilleure induction de la réponse humorale contre le virus (Oldstone, 1975). Plus récemment, on a observé le même effet pour *Listeria monocytogenes*. Chez des souris $C3^{-/-}$, le recrutement des particules bactériennes vers la rate est diminué ce qui entraîne à son tour une diminution en cellules T spécifiques contre la bactérie (Verschoor *et al.*, 2011). Bien qu'il a été démontré que la présence d'anticorps naturels, ainsi qu'une diversité dans ce répertoire étaient importantes pour le recrutement du LCMV et du VSV à la rate, les résultats obtenus démontrent que le système du complément ne semble pas jouer un rôle dans ce processus (**figure 18**) (Meunier, 2007, Ochsenschein *et al.*, 1999a). Dans le cas de l'infection par LCMV, la diversité du répertoire

en anticorps naturels est importante pour permettre un meilleur recrutement du virus vers à la rate, mais aucune différence n'est observée chez les souris ayant reçues du CVF par rapport à leur témoins. Cependant, on observe que pour l'infection par VSV, l'absence de complément semble ralentir le recrutement des particules virales dans les premières heures suivant l'infection, mais déjà après 7 heures, on ne dénote plus aucune différence entre le nombre de particules virales recrutées à la rate chez les souris ayant du complément ou celles ayant reçues du CVF. Ces résultats ont aussi été observés par le Dr Ochsenbein chez des souris ayant reçu ou non du CVF avant l'infection par VSV (Ochsenbein *et al.*, 1999b). Le même phénomène a aussi été observé chez des souris MBL^{-/-} ayant été infectées par le virus de l'herpès simplex 2 puisqu'aucune différence n'a été obtenue au niveau des titres viraux à la rate, mais il a été remarqué que l'absence de complément favorisait la dissémination du virus vers le foie (Gadjeva *et al.*, 2004). Bien que le système du complément ne joue pas nécessairement un rôle pour le recrutement des particules virales aux organes lymphoïdes secondaires, il a été démontré qu'il pouvait être important pour éliminer des pathogènes de la circulation sanguine. En effet, il a été observé chez des patients chroniquement infectés par le VHC qu'il y avait un plus grand nombre de complexes immuns dans leur sang. Ces patients posséderaient des taux plus bas de récepteurs du complément 1 sur leurs érythrocytes (E-CR1) (Miyaike *et al.*, 2002). Le E-CR1 est important dans le recrutement des complexes immuns vers le foie empêchant ainsi la déposition des complexes immuns sur des tissus plus vulnérables (Birmingham, 1995).

4.2.2 En présence d'un répertoire peu ou pas diversifié en anticorps naturels, l'absence de complément favorise la production d'IFN- α suite à l'infection par LCMV et VSV

Puisque le recrutement à la rate n'était pas dépendant du système du complément, nous nous sommes demandé si celui-ci jouait un rôle à un niveau différent de la réponse immunitaire innée. Les interférons de type I sont de forts indicateurs de l'activation du système inné. En effet, l'IFN- α est un acteur très important notamment dans la réponse antivirale contre VSV et LCMV (Fink *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2012). De

plus, il a déjà été démontré que chez les souris ayant une architecture splénique anormale, la réponse en interférons de type I était réduite (Louten *et al.*, 2006). Ce phénomène a aussi pu être observé chez nos souris transgéniques par rapport aux témoins autant pour l'infection par LCMV que VSV (figures 19 et 20). Cependant, lorsque l'on administre du CVF aux souris HC1 et J_HT, celles-ci produisent des niveaux plus élevés d'IFN- α . Ce phénomène n'est pas propre à une infection en particulier puisqu'on le retrouve tant dans l'infection avec LCMV qu'avec VSV. L'induction plus élevée d'IFN- α chez ces souris n'est pas dû à l'administration de CVF puisque les souris non infectées ayant reçues ce traitement ne produisent pas d'IFN- α . Cependant, il a été remarqué chez les patients atteints du lupus érythémateux disséminé une plus grande production d'IFN- α et celle-ci serait reliée à une déficience au niveau de la molécule C1q du système du complément (Lood *et al.*, 2009). En effet, l'absence de C1q favoriserait l'accumulation de complexes immuns et de déchets apoptotiques ce qui entraînerait une augmentation dans la production d'IFN- α . Il a aussi été observé que l'ajout d'IgG permettait d'inhiber cette surproduction d'interféron ce qui pourrait expliquer pourquoi on observe aucune différence chez les souris C57Bl/6 et QM puisque la diversité de leur répertoire naturel permettrait de « contrôler » ce phénomène (Lood *et al.*, 2009).

4.2.3 En présence d'un répertoire peu ou pas diversifié en anticorps naturels, l'absence de complément favorise l'activation des cellules dendritiques splénique et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD8+ spécifiques

Comme il a été mentionné plus tôt, l'IFN- α est capable de réguler les cellules dendritiques. Nous avons donc voulu déterminer si les effets observés au niveau de la production d'IFN- α chez nos souris décomplémentées se transposaient, dans un premier temps, aussi sur l'activation des cellules dendritiques. Nous avons donc analysé le niveau d'expression du marqueur CD86 chez les DCs des différents groupes de souris. Premièrement, nous avons observé que la diversité du répertoire en anticorps naturels était importante pour l'activation des DCs suite à l'infection par LCMV (figure 21). On remarque que les cellules dendritiques des souris C57Bl/6 et QM sont plus activées que les DCs des souris HC1 et J_HT. Cependant, l'activation des DCs est augmentée lorsque les

souris HC1 et J_HT sont traitées avec le CVF avant l'infection par LCMV contrairement aux souris C57Bl/6 et QM ce qui concorde avec les résultats obtenus précédemment pour la production en IFN- α (figure 19). Ces résultats peuvent paraître surprenants à prime abord puisque les cellules dendritiques possèdent plusieurs récepteurs du complément favorisant la phagocytose des pathogènes opsonisés et ainsi la présentation des antigènes au système immunitaire adaptatif. C'est le cas observé lors d'une infection par le VIH, puisque lorsque le virus est opsonisé par des molécules du complément, celui-ci est mieux présenté aux CTLs (Banki *et al.*, 2010). Nous avons donc voulu vérifier, en deuxième lieu, s'il y avait une différence chez nos groupes de souris dans la présentation antigénique. Pour ce faire, nous avons purifié les DCs des différentes souris infectées avec LCMV et les avons mis en coculture avec des lymphocytes T CD8⁺ purifiés de souris P14 qui possèdent des LT CD8⁺ spécifiques au LCMV. On remarque que les résultats sont similaires à ceux obtenus pour la production en IFN- α et l'activation des cellules dendritiques suite à l'infection par LCMV (figure 22). Les souris C57Bl/6 demeurent celles qui ont le plus grand pourcentage de prolifération, suivi des souris QM et finalement les souris HC1 et J_HT, ce qui concorde aussi avec les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire (Charpentier, 2011). Encore une fois, lorsque du CVF est administré à ces différents groupes de souris afin de les décomplémenter, on ne remarque aucune différence significative chez les souris C57Bl/6 et QM, mais une augmentation de la prolifération des LT CD8⁺ par les DCs des souris HC1 et J_HT qui ne proliféraient pas ou peu en absence de CVF. Nous concluons donc que ces souris produisent plus d'IFN- α suite à l'infection, ce qui activerait davantage leurs cellules dendritiques, favorisant la présentation par celles-ci des antigènes viraux aux LT CD8⁺.

Il a déjà été observé que des complexes immuns formés d'IgM et de complément favorisaient la localisation dans la zone marginale de la rate suivi d'une déposition sur les cellules dendritiques folliculaires favorisant ainsi l'activation de la réponse immunitaire adaptative (Ferguson *et al.*, 2004, Link *et al.*, 2012). Le dépôt de ces complexes sur les FDCs serait aussi impliqué dans la formation des centres germinatifs (Tarlinton, 1998). Les récepteurs du complément CR1 et CR2 seraient aussi importants

pour la localisation des antigènes aux FDCs puisqu'on observe aucune colocalisation chez des souris CR1^{-/-} ou CR2^{-/-}. Pour les complexes immuns ne contenant pas de complément, ils seraient davantage retenus dans la zone marginale et pris en charge par les macrophages de la zone marginale, tandis que ceux formés uniquement de compléments et de pathogènes, se retrouvent tout de même dans la zone marginale et déposée sur les FDCs, mais en plus petite proportion réduisant ainsi la formation des centres germinatifs (Ferguson *et al.*, 2004). Puisque les souris HC1 et J_HT possèdent une architecture splénique affectée par rapport à celle des souris C57Bl/6 et QM, il se pourrait que la localisation des complexes immuns dans la rate soit différente entre ces différents groupes de souris. L'absence de complément pourrait ainsi permettre à ces souris de relocaliser leur complexes immuns de façon à bien stimuler la réponse immunitaire adaptative.

Une autre hypothèse pourrait expliquer le phénomène observé. En présence de globules rouges de moutons, le système du complément compris dans le sérum des souris HC1 et J_HT a un potentiel de lyse beaucoup plus élevé (30 à 60%) que le système du complément des souris C57Bl/6 et QM (environ 10%) (résultats non montrés). Ceci pourrait être dû au fait que les souris HC1 et J_HT possèdent une diversité de répertoire en anticorps naturels beaucoup plus restreinte que les deux autres souris, ce qui permettrait à leur système du complément de « compenser » le manque d'anticorps, puisque, par définition, le système du complément sert à « compléter » les anticorps. Il a déjà été observé que le LCMV pouvait être lysé par le système du complément donc, les particules virales pourraient être lysées plus facilement par le système du complément de ces souris, ce qui diminuerait la présence d'antigènes viraux à être présentés (R. M. Welsh, Jr. *et al.*, 1976).

4.3 Rôles opposés pour le système du complément dans l'induction de la réponse humorale et cellulaire

Puisque l'absence de complément a un impact sur la réponse immunitaire innée chez certains groupes de souris, nous avons voulu déterminer si la réponse immunitaire

adaptative était aussi affectée. Afin d'analyser l'effet d'une décomplémentation sur la réponse humorale, le modèle viral du VSV a été utilisé alors que pour la réponse cellulaire, le modèle viral utilisé a plutôt été le LCMV.

4.3.1 L'absence du système du complément chez les souris C57Bl/6 et QM diminue leur capacité à produire des anticorps neutralisants contre VSV, mais protège les souris HC1 et J_HT contre l'infection par VSV

Il a déjà été démontré qu'un répertoire diversifié en anticorps naturels était important pour obtenir de bons titres en anticorps neutralisants contre VSV (Cote, 2006, Lopez-Macias *et al.*, 1999). Les souris C57Bl/6 ont des hauts titres en anticorps neutralisants, tandis que les souris QM et HC1 ont un ralentissement dans l'apparition de leur anticorps neutralisants contre VSV, tant pour le nombre d'Ig total que pour les IgG neutralisants. Quant à elles, les souris J_HT ne peuvent pas produire d'anticorps. En absence de complément, les titres neutralisants contre VSV diminuent faiblement chez les souris C57Bl/6 et QM (**figure 23**). Ceci n'est pas surprenant puisque le système du complément est impliqué dans l'activation de la réponse humorale par l'interaction des pathogènes enveloppés de C3d et du CR2 retrouvés dans le complexe du BCR (Carroll *et al.*, 2012). Cependant, d'autres études ont démontré une diminution dix fois plus grande en anticorps neutralisants contre VSV chez des souris C3^{-/-} que ceux obtenus lors de ce projet (Ochsenbein *et al.*, 1999b). Par contre, les souris C3^{-/-} ont une morphologie anormale ainsi que des nombres diminués en centres germinatifs et ont une réponse humorale affectée pour un bon nombre de pathogènes dû à l'importance du complément dans la régulation des cellules B (Carroll *et al.*, 2012, Fischer *et al.*, 1996, Nakayama *et al.*, 2009, Wessels *et al.*, 1995). Ceci pourrait expliquer les différences entre les résultats obtenus. De plus, lors de notre étude, les souris ont été décomplémentées seulement avant l'infection par VSV et aucune dose supplémentaire n'a été administrée. L'effet prolongé d'une décomplémentation aurait probablement eu un impact plus important sur la production en anticorps neutralisants contre VSV. Aussi, dans cette étude d'Ochsenbein, une haute dose de VSV cause la mortalité de toutes ou la majorité des souris C3^{-/-}, tandis que nous n'avons pas observé de mortalité dans ce

groupe de souris (**figure 24**) (Ochsenbein *et al.*, 1999b). Encore une fois, les $C3^{-/-}$ ont un système immunitaire affecté et ne résistent pas facilement à des infections virales. Par contre, une décomplémentation prolongée de nos souris aurait possiblement augmenté le taux de mortalité chez celles-ci. Bref, l'absence de complément chez les souris C57Bl/6 et QM diminue la production en anticorps neutralisants totaux et en IgG neutralisants contre VSV, mais aucune différence n'est observée pour le taux de mortalité signifiant que le virus est tout de même bien contrôlé par la réponse immunitaire puisqu'aucun virus n'est retrouvé au cerveau (résultat non montré). Le système du complément est donc aussi important dans les étapes précoces d'infection par VSV pour obtenir une bonne réponse en anticorps neutralisants.

Par contre, ce phénomène n'est pas observé chez les souris HC1 et J_HT. Le virus de la stomatite vésiculaire est un virus qui est très bien contrôlé par la réponse en interféron de type I (Janelle *et al.*, 2013, Lichty *et al.*, 2004). L'IFN de type I produit permettrait un meilleur contrôle du virus chez les souris HC1 et J_HT et un taux de mortalité beaucoup plus faible que les souris contrôles (**figure 24**). Bref, l'absence de complément chez ces souris favorise la production en IFN- α , l'activation des cellules dendritiques et la présentation antigénique, mais aussi la réponse en anticorps neutralisants contre VSV pour les souris HC1 et protège même les souris lors de cette infection.

4.3.2 Rôles opposés pour le système du complément selon la diversité du répertoire en anticorps naturels pour l'activation, la spécificité ainsi que la fonctionnalité des LT CD8+ suite à l'infection par LCMV

Il a été démontré dans notre laboratoire qu'un répertoire diversifié en anticorps naturel était important pour une réponse cellulaire efficace lors d'une infection par LCMV (Charpentier, 2011). Nous avons donc voulu déterminer l'importance du complément sur la réponse cellulaire lors d'une infection par LCMV chez des souris ayant des répertoires diversifiés en anticorps naturel. Plusieurs études ont permis de démontrer que la composante C3 du complément était importante lors d'infections virales. En effet, lors d'une infection par le virus de l'influenza chez des souris $C3^{-/-}$, la migration des cellules immunitaires vers les poumons est moins efficace, la réponse cellulaire est

diminuée et le virus est ainsi moins bien contrôlé par le système immunitaire (Kopf *et al.*, 2002). Le C3 est aussi requis pour l'obtention d'une réponse optimale en LT CD8+ spécifiques au LCMV (Suresh *et al.*, 2003). Chez des souris ayant des répertoires en anticorps naturels diversifiés (C57Bl/6 et QM), on observe qu'une simple décomplémentation dans les 3 premiers jours d'infection par LCMV n'influence pas l'activation des LT CD8+ (**figure 25**). La spécificité de ces lymphocytes n'est pas affectée non plus (**figure 26**). Puisque qu'on n'observe aucune différence dans l'activation et la spécificité, nous nous sommes demandé si l'absence de complément affectait plutôt la fonctionnalité de ces cellules, notamment par le relâchement de cytokines antivirales comme le TNF- α et l'IFN- γ et/ou par le relâchement de granzyme B. Encore une fois, une simple dose de CVF administrée 1 jour avant l'infection par LCMV n'influence pas la fonctionnalité des lymphocytes T. Effectivement, la capacité de ces cellules à sécréter de l'IFN- γ ou du TNF- α ou par la sécrétion de ces deux cytokines simultanément et le relâchement de granzyme B ne sont pas diminués en absence du système du complément chez les souris C57Bl/6 et QM (**figures 27 et 28**). Cependant, lorsqu'une deuxième dose de CVF est administrée pour assurer une décomplémentation sur 6 jours, on remarque que l'activation, la spécificité ainsi que la fonctionnalité des LT CD8+ sont diminuées (**Figures 25 à 28**). Ceci corrèle davantage avec les résultats obtenus par des études antérieures (Kopf *et al.*, 2002, Suresh *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que l'absence du système du complément dans les étapes précoces d'infections virales n'influence pas la réponse immunitaire cellulaire. Cependant, celui-ci aurait possiblement un impact dans les étapes plus tardives d'infections virales, suggérant un rôle dans la régulation des cellules T.

Par contre, pour les souris ayant un répertoire peu ou pas diversifié (HC1 et J_HT), nous obtenons des résultats très différents. En effet, contrairement aux souris C57Bl/6 et QM, lorsque l'on administre une simple dose aux souris HC1 et J_HT, l'activation des LT CD8+ est augmentée significativement (**figure 25**). On observe aussi le même phénomène pour la spécificité de ces cellules ainsi que leur capacité à sécréter des cytokines antivirales et le relâchement de granzyme B (**figures 26 à 28**). Ces résultats corrèlent avec ceux

obtenus pour l'induction de la réponse immunitaire précoce, notamment par la production d'IFN- α , l'activation des cellules dendritiques et la présentation des antigènes viraux aux lymphocytes T CD8+. Chez ces souris, le système du complément semble interférer avec la réponse précoce. Cependant, lorsqu'une seconde dose de CVF est administrée à ces souris, ce phénomène est renversé. Effectivement, une décomplémentation sur une plus longue période tend à diminuer l'activation, la spécificité ainsi que la fonctionnalité des LT CD8+ (figures 25 à 28).

Bref, en présence d'un répertoire peu ou pas diversifié, le système du complément semble interférer avec la réponse immunitaire précoce, mais il semble important dans la régulation de la réponse cellulaire. Les mêmes résultats sont aussi observés chez les LT CD4+ (résultats non montrés). Certaines études proposent qu'une absence de complément sur une longue période diminue la réponse T_H1 et favorise la réponse T_H2 et T_H17, ce qui pourrait expliquer le phénomène observé lors d'une décomplémentation prolongée chez nos souris (Kemper *et al.*, 2007, Peng *et al.*, 2008, Sacks, 2010).

Chapitre 5
Conclusion et Perspectives

Le système du complément peut être activé par trois principales voies, soit la voie alternative, la voie classique et la voie des lectines. Puisque ce sont les IgM qui sont les meilleurs activateurs de la voie classique du complément, nous nous sommes penchés sur le rôle du système du complément dans le contexte de différents répertoires en IgM naturels lors d'infections virales. Les résultats obtenus lors de ce projet suggèrent des rôles opposés pour le système du complément dépendamment de la diversité du répertoire en anticorps naturels. Un résumé schématique des résultats obtenus est présenté à la figure 29.

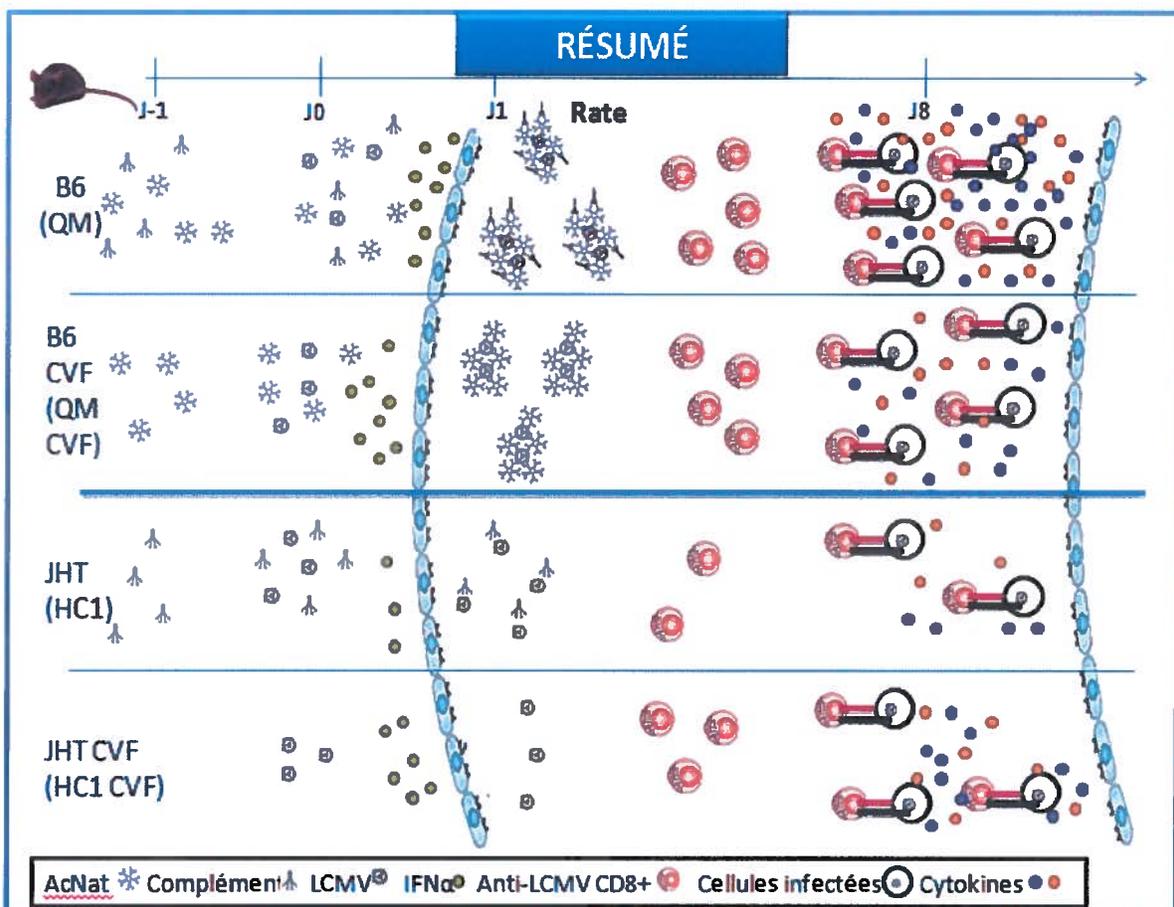


Figure 29. Résumé schématique des résultats obtenus lors de l'infection par LCMV.

Les différentes souris sont séparées en deux groupes, le groupe C57Bl/6 et QM, et le groupe HC1 et J_HT. Lors de l'infection par LCMV, l'absence de complément n'affecte pas le recrutement des particules de LCMV vers la rate. Cependant, les souris HC1 CVF et J_HT CVF produisent plus d'IFN-α que leur contrôle ce qui entraîne une meilleure activation de leurs cellules dendritiques menant à une meilleure présentation antigénique. Ceci permet donc d'augmenter la réponse cellulaire, notamment par l'augmentation de l'activation des LT CD8+, une meilleure spécificité de leur LT CD8+ ainsi qu'une meilleure capacité de ces cellules à sécréter des cytokines antivirales. Pour les souris C57Bl/6 et QM, seulement une décomplémentation prolongée aura pour effet de diminuer la réponse cellulaire anti-LCMV.

Mis en commun, nos résultats suggèrent que le système du complément peut interférer avec la réponse immunitaire innée en présence de peu ou pas d'anticorps naturels, tandis que son absence n'est pas remarquée en présence d'un plus grand répertoire d'anticorps naturels. Cependant, le système du complément semble jouer un rôle de régulation sur les lymphocytes T, puisqu'une décomplémentation prolongée diminue la réponse cellulaire chez les deux groupes de souris. Afin d'évaluer si le système du complément régule directement la réponse cellulaire ou que cette diminution est dû à l'addition d'une décomplémentation précoce et prolongée, des expérimentations avec une décomplémentation uniquement 3 jours suivant l'infection serait nécessaire.

Les résultats obtenus pour les souris HC1 CVF et J_HT CVF demeurent très étonnants. Ces souris dépourvues d'anticorps et de système du complément, réussissent à obtenir une meilleure réponse immunitaire, tant lors de l'infection par LCMV que VSV, comparativement à leur témoin. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce phénomène. Premièrement, il a déjà été démontré lors d'une infection par LCMV que les souris ayant des architectures spléniques anormales, ne parvenaient pas à produire les mêmes niveaux d'IFN- α que les souris ayant des architectures spléniques normales (Louten *et al.*, 2006). Puisque les souris HC1 CVF et J_HT CVF réussissent à produire des niveaux plus élevés d'IFN- α qui atteignent même des niveaux semblables à ceux des souris C57Bl/6 et QM, on pourrait croire que le virus est reconnu différemment dans cette situation. Le recrutement à la rate n'étant pas affecté, le transport des antigènes viraux à travers la rate pourrait être différent chez les souris HC1 CVF et J_HT CVF. En effet, il a déjà été démontré que certains antigènes, en absence de complément, tendaient à rester dans la zone marginale et étaient pris en charge par les macrophages de la zone marginale (Ferguson *et al.*, 2004). Il serait donc important de regarder le transport des antigènes viraux chez ces souris. Deuxièmement, les souris HC1 et J_HT décomplémentées possèdent des cellules dendritiques beaucoup plus activées. Le virus de la chorioméningite lymphocytaire est reconnu pour infecter plusieurs cellules, dont

les cellules dendritiques (Sevilla *et al.*, 2003). Dans le cas de ces souris, il serait important de vérifier si les cellules dendritiques des souris HC1 CVF et J_HT sont moins infectées que celles des souris HC1 et J_HT, ce qui pourrait expliquer la meilleure activation de celles-ci ainsi que l'augmentation de la production d'IFN- α et l'augmentation de la réponse cellulaire (Cervantes-Barragan *et al.*, 2012, Lang *et al.*, 2012). Troisièmement, de récentes études ont permis d'observer que le système du complément jouait un rôle de régulation négative sur les cellules NK (K.; Peng Li, Q.; Wang, N.; Li, Z.; Sacks, S.; Zhou, W. , 2012). En effet, la liaison du iC3b du système du complément avec le récepteur CR3, que l'on retrouve sur les cellules NK, régule négativement leurs fonctions effectrices. Chez des souris CD11b^{-/-} qui ne possèdent pas le récepteur CR3, les NK sont plus activées et ont une meilleure capacité à sécréter de l'IFN γ . Il a aussi été observé que chez les patients infectés chroniquement par le VHC, les récepteurs d'inhibition CD94/NKG2A étaient augmentés sur les cellules NK (Takehara *et al.*, 2005). Il serait donc important de vérifier les taux d'activation des cellules NK chez les souris HC1 et J_HT ayant reçues ou non du CVF. Quatrièmement, la microstructure de la rate des différentes souches de souris pourrait être différente dû aux différentes modifications génétiques effectuées chez ces souris. D'ailleurs il a déjà été démontré que les souris ayant une structure splénique anormale avait plus de difficulté à produire de l'interféron alpha lors d'une infection virale (Louten *et al.*, 2006). Les souris C3^{-/-} ont aussi une architecture splénique anormale puisque la molécule C3 est importante dans l'activation des cellules B (Fischer *et al.*, 1996). Aussi, il a été observé que les souris QM avaient plus de 50% de leur cellules B qui possédaient le même phénotype que les cellules B de la zone marginale. Puisque tout ceci pourrait influencer les résultats, il serait donc important d'investiguer plus loin l'architecture splénique des différents groupes de souris.

Finalement, il serait intéressant de reprendre ces expériences avec le LCMV-Cl13 puisque celui-ci permet d'établir la chronicité chez la souris et ainsi voir si les mêmes phénomènes sont observés chez ce modèle d'infection. Ces expériences pourraient

permettre de mieux comprendre les mécanismes immunitaires impliqués dans la persistance de certains virus, notamment pour le virus de l'hépatite C chez l'humain.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abbas AKL, A. H. (Édit) (2009) *Basic immunology Functions and Disorders of the Immune System*. Saunders, Philadelphia, Third Edition Éd.
- Ahlenstiel G, Titerence RH, Koh C, Edlich B, Feld JJ, Rotman Y, Ghany MG, Hoofnagle JH, Liang TJ, Heller T & Rehermann B (2010) Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. *Gastroenterology* 138(1):325-335 e321-322.
- Ahmed R, Jamieson BD & Porter DD (1987) Immune therapy of a persistent and disseminated viral infection. *J Virol* 61(12):3920-3929.
- Ahmed R, Salmi A, Butler LD, Chiller JM & Oldstone MB (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.
- Amadei B, Urbani S, Cazaly A, Fisicaro P, Zerbini A, Ahmed P, Missale G, Ferrari C & Khakoo SI (2010) Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 138(4):1536-1545.
- Ansel KM, Harris RB & Cyster JG (2002) CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 16(1):67-76.
- Armstrong CL, 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.
- Asano MS & Ahmed R (1995) Immune conflicts in lymphocytic choriomeningitis virus. *Springer Semin Immunopathol* 17(2-3):247-259.
- Avrameas S (1991) Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 12(5):154-159.
- Azumi K, De Santis R, De Tomaso A, Rigoutsos I, Yoshizaki F, Pinto MR, Marino R, Shida K, Ikeda M, Arai M, Inoue Y, Shimizu T, Satoh N, Rokhsar DS, Du Pasquier L, Kasahara M, Satake M & Nonaka M (2003) Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". *Immunogenetics* 55(8):570-581.
- Bachem A, Guttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, Salama A, Movassaghi K, Opitz C, Mages HW, Henn V, Kloetzel PM, Gurka S & Kroczeck RA (2010) Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* 207(6):1273-1281.
- Bajtay Z, Speth C, Erdei A & Dierich MP (2004) Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). *J Immunol* 173(8):4775-4778.
- Banki Z, Posch W, Ejaz A, Oberhauser V, Willey S, Gassner C, Stoiber H, Dittmer U, Dierich MP, Hasenkrug KJ & Wilflingseder D (2010) Complement as an

endogenous adjuvant for dendritic cell-mediated induction of retrovirus-specific CTLs. *PLoS Pathog* 6(4):e1000891.

- Barrington RA, Pozdnyakova O, Zafari MR, Benjamin CD & Carroll MC (2002) B lymphocyte memory: role of stromal cell complement and FcγRIIB receptors. *J Exp Med* 196(9):1189-1199.
- Baumgarth N (2011a) The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature reviews. Immunology* 11(1):34-46.
- Baumgarth N (2011b) The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 11(1):34-46.
- Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA & 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, Tung JW & Herzenberg LA (2005) Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 26(4):347-362.
- Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone FR, Brooks AG & Heath WR (2009) Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10(5):488-495.
- Beebe DP & Cooper NR (1981) Neutralization of vesicular stomatitis virus (VSV) by human complement requires a natural IgM antibody present in human serum. *J Immunol* 126(4):1562-1568.
- Bellecave P, Sarasin-Filipowicz M, Donze O, Kennel A, Gouttenoire J, Meylan E, Terracciano L, Tschopp J, Sarrazin C, Berg T, Moradpour D & Heim MH (2010) Cleavage of mitochondrial antiviral signaling protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. *Hepatology* 51(4):1127-1136.
- Bensch B, Spangenberg HC, Kersting N, Neumann-Haefelin C, Panther E, von Weizsacker F, Blum HE, Pircher H & Thimme R (2007) Analysis of CD127 and KLRG1 expression on hepatitis C virus-specific CD8+ T cells reveals the existence of different memory T-cell subsets in the peripheral blood and liver. *J Virol* 81(2):945-953.
- Berland R & Wortis HH (2002) Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 20:253-300.
- Bevan MJ (2006) Cross-priming. *Nature immunology* 7(4):363-365.
- Beyer WR, Popplau D, Garten W, von Laer D & Lenz O (2003) Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77(5):2866-2872.
- Bigger CB, Brasky KM & Lanford RE (2001) DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 75(15):7059-7066.

- Birmingham DJ (1995) Erythrocyte complement receptors. *Crit Rev Immunol* 15(2):133-154.
- Blue CE, Spiller OB & Blackburn DJ (2004) The relevance of complement to virus biology. *Virology* 319(2):176-184.
- Boes M (2000) Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 37(18):1141-1149.
- Boettler T, Moeckel F, Cheng Y, Heeg M, Salek-Ardakani S, Crotty S, Croft M & von Herrath MG (2012) OX40 facilitates control of a persistent virus infection. *PLoS Pathog* 8(9):e1002913.
- Bordet J (1895) Les leukocytes et les proprietes actives du serum chez les vaccins. *Ann. Inst. Pasteur.* 9:462-506.
- Bordet J (1898) Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le serum d'animaux injectes de sang defibine. *Ann. Inst. Pasteur.* 12:688.
- Borrow P (1997a) Mechanisms of viral clearance and persistence. *J Viral Hepat* 4 Suppl 2:16-24.
- Borrow PO, M.B. (1997b) *Lymphocytic Choriomeningitis Virus*. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA
- Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Wurzner R & Tedesco F (2009) Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol* 46(14):2774-2783.
- Brandlein S, Rauschert N, Rasche L, Dreykluft A, Hensel F, Conzelmann E, Muller-Hermelink HK & Vollmers HP (2007) The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein. *Mol Cancer Ther* 6(1):326-333.
- Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, Timpe JM, Krieger SE, Baumert TF, Tellinghuisen TL, Wong-Staal F, Balfe P & McKeating JA (2011) Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 85(1):596-605.
- Brown KS, Keogh MJ, Owsianka AM, Adair R, Patel AH, Arnold JN, Ball JK, Sim RB, Tarr AW & Hickling TP (2010) Specific interaction of hepatitis C virus glycoproteins with mannan binding lectin inhibits virus entry. *Protein Cell* 1(7):664-674.
- Brown RS (2005) Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 436(7053):973-978.
- Buchmeier MJ, de la Torre, J.C. & Peters, C. J. (2007) Arenaviridae: The viruses and their replication. in *Fields' Virology*, Édit Virology F (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA).
- Buchmeier MJ & Oldstone MB (1979) Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: evidence for a cell-associated precursor of the virion glycopeptides. *Virology* 99(1):111-120.

- Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, Tampe R & Kurts C (2008) Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* 9(5):558-566.
- Byrne JA & Oldstone MB (1984) Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J Virol* 51(3):682-686.
- Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C & Nelson DR (2004) An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40(5):1062-1071.
- Cai Z, Zhang C, Chang KS, Jiang J, Ahn BC, Wakita T, Liang TJ & Luo G (2005) Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J Virol* 79(22):13963-13973.
- Carroll MC (2004) The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 5(10):981-986.
- Carroll MC & Isenman DE (2012) Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* 37(2):199-207.
- Cascalho M, Ma A, Lee S, Masat L & Wabl M (1996) A quasi-monoclonal mouse. *Science* 272(5268):1649-1652.
- Castellano G, Woltman AM, Nauta AJ, Roos A, Trouw LA, Seelen MA, Schena FP, Daha MR & van Kooten C (2004) Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro. *Blood* 103(10):3813-3820.
- Cervantes-Barragan L, Lewis KL, Firner S, Thiel V, Hugues S, Reith W, Ludewig B & Reizis B (2012) Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(8):3012-3017.
- Charpentier T (2011) *Impact du répertoire des lymphocytes B sur le développement de réponses immunitaires cellulaires antivirales*. Maîtrise (UQ-INRS-Institut Armand-Frappier, Laval). 145 p
- Cheent K & Khakoo SI (2011) Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* 60(2):268-278.
- Chen A, Gaddipati S, Hong Y, Volkman DJ, Peerschke EI & Ghebrehiwet B (1994) Human T cells express specific binding sites for C1q. Role in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 153(4):1430-1440.
- Chen J, Trounstein M, Alt FW, Young F, Kurahara C, Loring JF & Huszar D (1993a) 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 CC, Xu Y, Loring JF, Alt FW & Huszar D (1993b) B cell development in mice that lack one or both immunoglobulin kappa light chain genes. *EMBO J* 12(3):821-830.
- Chisari FV (2005) Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 436(7053):930-932.

- Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, Atkinson JP & Diamond MS (2006) West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50):19111-19116.
- Cooper NR & Nemerow GR (1985) Complement effector mechanisms in health and disease. *J Invest Dermatol* 85(1 Suppl):39s-46s.
- Cote M-H (2006) *Contribution du répertoire primaire des lymphocytes B et des mécanismes de maturation de l'affinité dans l'induction d'une réponse antivirale protectrice*. Maîtrise (UQ-INRS-Institut Armand-Frappier, Laval). 114 p(Consulté le 14 Sept 2006)
- Cox AL, Mosbruger T, Lauer GM, Pardoll D, Thomas DL & Ray SC (2005a) Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* 42(1):104-112.
- Cox AL, Mosbruger T, Mao Q, Liu Z, Wang XH, Yang HC, Sidney J, Sette A, Pardoll D, Thomas DL & Ray SC (2005b) Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 201(11):1741-1752.
- Cox AL, Netski DM, Mosbruger T, Sherman SG, Strathdee S, Ompad D, Vlahov D, Chien D, Shyamala V, Ray SC & Thomas DL (2005c) Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 40(7):951-958.
- Crotta S, Brazzoli M, Piccioli D, Valiante NM & Wack A (2010) Hepatitis C virions subvert natural killer cell activation to generate a cytokine environment permissive for infection. *J Hepatol* 52(2):183-190.
- Cugno M, Zanichelli A, Foiemi F, Caccia S & Cicardi M (2009) C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress. *Trends Mol Med* 15(2):69-78.
- Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL, Luther SA & Ngo VN (2000) Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 176:181-193.
- Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT & Walker BD (2002) Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 76(24):12584-12595.
- de Weerd NA, Samarajiwa SA & Hertzog PJ (2007) Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* 282(28):20053-20057.
- Desch AN, Randolph GJ, Murphy K, Gautier EL, Kedl RM, Lahoud MH, Caminschi I, Shortman K, Henson PM & Jakubzick CV (2011) CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *J Exp Med* 208(9):1789-1797.
- Diegelmann J, Beigel F, Zitzmann K, Kaul A, Goke B, Auernhammer CJ, Bartenschlager R, Diepolder HM & Brand S (2010) Comparative analysis of the lambda-

- interferons IL-28A and IL-29 regarding their transcriptome and their antiviral properties against hepatitis C virus. *PLoS One* 5(12):e15200.
- Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT, Schoggins JW, Catanese MT, Burton DR, Law M, Rice CM & 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.
- Drouin SM, Corry DB, Kildsgaard J & Wetsel RA (2001) Cutting edge: the absence of C3 demonstrates a role for complement in Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. *J Immunol* 167(8):4141-4145.
- Duber S, Hafner M, Krey M, Lienenklaus S, Roy B, Hobeika E, Reth M, Buch T, Waisman A, Kretschmer K & Weiss S (2009) Induction of B-cell development in adult mice reveals the ability of bone marrow to produce B-1a cells. *Blood* 114(24):4960-4967.
- Dunkelberger JR & Song WC (2010) Role and mechanism of action of complement in regulating T cell immunity. *Mol Immunol* 47(13):2176-2186.
- Durbeej M, Henry MD, Ferletta M, Campbell KP & Ekblom P (1998) Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 46(4):449-457.
- Dustin LB & Rice CM (2007) Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 25:71-99.
- Ehrlich P (1899) Zur Theorie der Lysenwirkung. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 36:6.
- Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao ZQ, Cale EM, Hahn CS & Hahn YS (2004) Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem* 279(42):43479-43486.
- Eisen DP (2010) Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection. *J Innate Immun* 2(2):114-122.
- Esplin BL, Welner RS, Zhang Q, Borghesi LA & Kincade PW (2009) A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(14):5773-5778.
- Fagarasan S, Shinkura R, Kamata T, Nogaki F, Ikuta K & Honjo T (2000) Mechanism of B1 cell differentiation and migration in GALT. *Curr Top Microbiol Immunol* 252:221-229.
- Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM & Molina H (1998) Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol* 160(11):5273-5279.
- Farag MM, Weigand K, Encke J & Momburg F (2011) Activation of natural killer cells by hepatitis C virus particles in vitro. *Clin Exp Immunol* 165(3):352-362.

- Ferguson AR, Youd ME & Corley RB (2004) Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol* 16(10):1411-1422.
- Fijen CA, van den Bogaard R, Schipper M, Mannens M, Schlesinger M, Nordin FG, Dankert J, Daha MR, Sjöholm AG, Truedsson L & Kuijper EJ (1999) Properdin deficiency: molecular basis and disease association. *Mol Immunol* 36(13-14):863-867.
- Fink K, Lang KS, Manjarrez-Orduno N, Junt T, Senn BM, Holdener M, Akira S, Zinkernagel RM & Hengartner H (2006) Early type I interferon-mediated signals on B cells specifically enhance antiviral humoral responses. *Eur J Immunol* 36(8):2094-2105.
- Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J, Finco O, Han S, Kelsoe G, Howard RG, Rothstein TL, Kremmer E, Rosen FS & Carroll MC (1996) Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J Immunol* 157(2):549-556.
- Fitzgerald-Bocarsly P (2002) Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. *Biotechniques* Suppl:16-20, 22, 24-19.
- Flanagan EB, Zamparo JM, Ball LA, Rodriguez LL & Wertz GW (2001) Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *J Virol* 75(13):6107-6114.
- Fletcher NF, Yang JP, Farquhar MJ, Hu K, Davis C, He Q, Dowd K, Ray SC, Krieger SE, Neyts J, Baumert TF, Balfe P, McKeating JA & Wong-Staal F (2010) Hepatitis C virus infection of neuroepithelioma cell lines. *Gastroenterology* 139(4):1365-1374.
- Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM & Gale M, Jr. (2003) Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300(5622):1145-1148.
- Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M, Morrone S, Labbadia G, Cerino A, Mondelli MU & Barnaba V (2009) PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 119(3):551-564.
- Gadjeva M, Paludan SR, Thiel S, Slavov V, Ruseva M, Eriksson K, Lowhagen GB, Shi L, Takahashi K, Ezekowitz A & Jensenius JC (2004) Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection. *Clin Exp Immunol* 138(2):304-311.
- Gaipl US, Brunner J, Beyer TD, Voll RE, Kalden JR & Herrmann M (2003) Disposal of dying cells: a balancing act between infection and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 48(1):6-11.
- Gallucci S, Lolkema M & Matzinger P (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5(11):1249-1255.

- 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.
- Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T & Pape GR (1999) Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117(4):933-941.
- Girija UV, Dodds AW, Roscher S, Reid KB & Wallis R (2007) Localization and characterization of the mannose-binding lectin (MBL)-associated-serine protease-2 binding site in rat ficolin-A: equivalent binding sites within the collagenous domains of MBLs and ficolins. *J Immunol* 179(1):455-462.
- Gobet R, Cerny A, Ruedi E, Hengartner H & Zinkernagel RM (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, Madrigal-Estebas L, McGrath E, Conroy MJ, Ryan EJ, Hegarty JE, O'Farrelly C & Doherty DG (2008) Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 57(8):1121-1128.
- Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N & Rosen HR (2007) Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 81(17):9249-9258.
- Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM & Walker CM (2003) HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302(5645):659-662.
- Griffin DO, Holodick NE & Rothstein TL (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.
- Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P & Amigorena S (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425(6956):397-402.
- Hamilton AM & Kearney JF (1994) Effects of IgM allotype suppression on serum IgM levels, B-1 and B-2 cells, and antibody responses in allotype heterozygous F1 mice. *Dev Immunol* 4(1):27-41.
- Hangartner L, Senn BM, Ledermann B, Kalinke U, Seiler P, Bucher E, Zellweger RM, Fink K, Odermatt B, Burki K, Zinkernagel RM & Hengartner H (2003) Antiviral immune responses in gene-targeted mice expressing the immunoglobulin heavy chain of virus-neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22):12883-12888.
- Hangartner L, Zellweger RM, Giobbi M, Weber J, Eschli B, McCoy KD, Harris N, Recher M, Zinkernagel RM & Hengartner H (2006a) Nonneutralizing antibodies

- binding to the surface glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus reduce early virus spread. *J Exp Med* 203(8):2033-2042.
- Hangartner L, Zinkernagel RM & Hengartner H (2006b) Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol* 6(3):231-243.
- Hardy RR, Carmack CE, Li YS & Hayakawa K (1994a) Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5⁺ B cells. *Immunol Rev* 137:91-118.
- Hardy RR & Hayakawa K (1994b) CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* 55:297-339.
- Hartman AB, Mallett CP, Srinivasappa J, Prabhakar BS, Notkins AL & Smith-Gill SJ (1989) Organ reactive autoantibodies from non-immunized adult BALB/c mice are polyreactive and express non-biased VH gene usage. *Mol Immunol* 26(4):359-370.
- Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR & Herzenberg LA (1983) The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* 157(1):202-218.
- Helmy KY, Katschke KJ, Jr., Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, Scales SJ, Ghilardi N & van Lookeren Campagne M (2006) CR1: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124(5):915-927.
- Holodick NE, Repetny K, Zhong X & Rothstein TL (2009) Adult BM generates CD5⁺ B1 cells containing abundant N-region additions. *Eur J Immunol* 39(9):2383-2394.
- Hong X, Yu RB, Sun NX, Wang B, Xu YC & Wu GL (2005) Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 11(46):7302-7307.
- Hotchin J & Benson L (1963) The Pathogenesis of Lymphocytic Choriomeningitis in Mice: The Effects of Different Inoculation Routes and the Footpad Response. *J Immunol* 91:460-468.
- Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D & Desjardins M (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425(6956):402-406.
- Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM & McKeating JA (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12):7271-7276.
- Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA & Ward PA (2006) Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12(6):682-687.
- Huber-Lang M, Younkin EM, Sarma JV, Riedemann N, McGuire SR, Lu KT, Kunkel R, Younger JG, Zetoune FS & Ward PA (2002) Generation of C5a by phagocytic cells. *Am J Pathol* 161(5):1849-1859.

- Isaacs A & Lindenmann J (1957a) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927):258-267.
- Isaacs A, Lindenmann J & Valentine RC (1957b) Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927):268-273.
- Ivanov I, Yabukarski F, Ruigrok RW & Jamin M (2011) Structural insights into the rhabdovirus transcription/replication complex. *Virus Res* 162(1-2):126-137.
- Janelle V, Poliquin L & Lamarre A (2013) [Vesicular stomatitis virus in the fight against cancer]. *Med Sci (Paris)* 29(2):175-182.
- Jensen JA, Festa E, Smith DS & Cayer M (1981) The complement system of the nurse shark: hemolytic and comparative characteristics. *Science* 214(4520):566-569.
- Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM & Hengartner H (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369(6475):31-37.
- Kamphorst AO, Guermontprez P, Dudziak D & Nussenzweig MC (2010) Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J Immunol* 185(6):3426-3435.
- Kaveri SV, Silverman GJ & Bayry J (2012) Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol* 188(3):939-945.
- Kawamoto S, Yalcindag A, Laouini D, Brodeur S, Bryce P, Lu B, Humbles AA, Oettgen H, Gerard C & Geha RS (2004) The anaphylatoxin C3a downregulates the Th2 response to epicutaneously introduced antigen. *J Clin Invest* 114(3):399-407.
- Kemper C & Atkinson JP (2007) T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 7(1):9-18.
- Kemper C, Atkinson JP & Hourcade DE (2010) Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol* 28:131-155.
- Kerekes K, Cooper PD, Prechl J, Jozsi M, Bajtay Z & Erdei A (2001) Adjuvant effect of gamma-inulin is mediated by C3 fragments deposited on antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 69(1):69-74.
- Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES & Kohl J (2009) The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 46(14):2753-2766.
- Kobayashi T, Kim TS, Jacob A, Walsh MC, Kadono Y, Fuentes-Panana E, Yoshioka T, Yoshimura A, Yamamoto M, Kaisho T, Akira S, Monroe JG & Choi Y (2009) TRAF6 is required for generation of the B-1a B cell compartment as well as T cell-dependent and -independent humoral immune responses. *PLoS One* 4(3):e4736.
- Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M & Bachmann MF (2002) Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat Med* 8(4):373-378.

- Kovacsovics-Bankowski M & Rock KL (1995) A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267(5195):243-246.
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM & Hartmann G (2001) Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31(7):2154-2163.
- Krych-Goldberg M & Atkinson JP (2001) Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev* 180:112-122.
- Kunz S (2009) Receptor binding and cell entry of Old World arenaviruses reveal novel aspects of virus-host interaction. *Virology* 387(2):245-249.
- Lambris JD, Ricklin D & Geisbrecht BV (2008) Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 6(2):132-142.
- Lanford RE, Bigger C, Bassett S & Klimpel G (2001) The chimpanzee model of hepatitis C virus infections. *ILAR J* 42(2):117-126.
- Lang PA, Shaabani N, Borkens S, Honke N, Scheu S, Booth S, Brenner D, Meryk A, Barthuber C, Recher M, Mak TW, Ohashi PS, Haussinger D, Griffiths GM, Thrasher AJ, Bouma G & Lang KS (2012) Reduced type I interferon production by dendritic cells and weakened antiviral immunity in patients with Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency. *J Allergy Clin Immunol*.
- Lapenta C, Santini SM, Logozzi M, Spada M, Andreotti M, Di Pucchio T, Parlato S & Belardelli F (2003) Potent immune response against HIV-1 and protection from virus challenge in hu-PBL-SCID mice immunized with inactivated virus-pulsed dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha. *J Exp Med* 198(2):361-367.
- Lauer GM & Walker BD (2001) Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 345(1):41-52.
- Laufer J, Katz Y & Passwell JH (2001) Extrahepatic synthesis of complement proteins in inflammation. *Mol Immunol* 38(2-3):221-229.
- Layden TJ, Mika B & Wiley TE (2000) Hepatitis C kinetics: mathematical modeling of viral response to therapy. *Semin Liver Dis* 20(2):173-183.
- Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P & Tough DF (2003) Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 4(10):1009-1015.
- Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR & Klenerman P (2000) CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol* 30(9):2479-2487.
- Lee CK, Rao DT, Gertner R, Gimeno R, Frey AB & Levy DE (2000) Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol* 165(7):3571-3577.

- Lehmann-Grube F (1970) [Pathogenesis of virus diseases]. *Monatsschr Kinderheilkd* 118(6):349-355.
- Lehmann-Grube F (1972) Persistent infection of the mouse with the virus of lymphocytic choriomeningitis. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 6:8-21.
- Lehmann-Grube F, Lohler J, Utermohlen O & Gegin C (1993) Antiviral immune responses of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice lacking CD8+ T lymphocytes because of disruption of the beta 2-microglobulin gene. *J Virol* 67(1):332-339.
- Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Jr. & Lemon SM (2005) Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8):2992-2997.
- Li KP, Q.; Wang, N.; Li, Z.; Sacks, S.; Zhou, W. (2012) Negative regulation of NK cell function through engagement of CR3 with its complement ligand. *Immunobiology* 217(11):1189-1190.
- Lichty BD, Power AT, Stojdl DF & Bell JC (2004) Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med* 10(5):210-216.
- Liebman HA & Feinstein DI (2003) Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is associated with markedly elevated plasma levels of leukocyte-derived tissue factor. *Thromb Res* 111(4-5):235-238.
- Lindenmann J, Burke DC & Isaacs A (1957) Studies on the production, mode of action and properties of interferon. *Br J Exp Pathol* 38(5):551-562.
- Link A, Zabel F, Schnetzler Y, Titz A, Brombacher F & Bachmann MF (2012) Innate immunity mediates follicular transport of particulate but not soluble protein antigen. *Journal of immunology* 188(8):3724-3733.
- Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM & McKeating JA (2004) Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(27):10149-10154.
- Lood C, Gullstrand B, Truedsson L, Olin AI, Alm GV, Ronnblom L, Sturfelt G, Eloranta ML & Bengtsson AA (2009) C1q inhibits immune complex-induced interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis Rheum* 60(10):3081-3090.
- Lopez-Macias C, Kalinke U, Cascalho M, Wabl M, Hengartner H, Zinkernagel RM & Lamarre A (1999) Secondary rearrangements and hypermutation generate sufficient B cell diversity to mount protective antiviral immunoglobulin responses. *J Exp Med* 189(11):1791-1798.
- Louten J, van Rooijen N & Biron CA (2006) Type 1 IFN deficiency in the absence of normal splenic architecture during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 177(5):3266-3272.

- Madsen HO, Videm V, Svejgaard A, Svennevig JL & Garred P (1998) Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. *Lancet* 352(9132):959-960.
- Marchalonis JJ, Adelman MK, Schluter SF & Ramsland PA (2006) The antibody repertoire in evolution: chance, selection, and continuity. *Dev Comp Immunol* 30(1-2):223-247.
- Martinez I, Barrera JC, Rodriguez LL & Wertz GW (2004) Recombinant vesicular stomatitis (Indiana) virus expressing New Jersey and Indiana glycoproteins induces neutralizing antibodies to each serotype in swine, a natural host. *Vaccine* 22(29-30):4035-4043.
- Marukian S, Jones CT, Andrus L, Evans MJ, Ritola KD, Charles ED, Rice CM & Dustin LB (2008) Cell culture-produced hepatitis C virus does not infect peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology* 48(6):1843-1850.
- Matloubian M, Concepcion RJ & Ahmed R (1994) CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 68(12):8056-8063.
- Matter MS & Ochsenbein AF (2008) Natural antibodies target virus-antibody complexes to organized lymphoid tissue. *Autoimmun Rev* 7(6):480-486.
- Mazumdar B, Kim H, Meyer K, Bose SK, Di Bisceglie AM, Ray RB & Ray R (2012) Hepatitis C virus proteins inhibit C3 complement production. *J Virol* 86(4):2221-2228.
- McIntyre TM, Holmes KL, Steinberg AD & Kastner DL (1991) CD5+ peritoneal B cells express high levels of membrane, but not secretory, C mu mRNA. *J Immunol* 146(10):3639-3645.
- McKiernan SM, Hagan R, Curry M, McDonald GS, Kelly A, Nolan N, Walsh A, Hegarty J, Lawlor E & Kelleher D (2004) Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 40(1):108-114.
- Mebius RE, Nolte MA & Kraal G (2004) Development and function of the splenic marginal zone. *Crit Rev Immunol* 24(6):449-464.
- Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL & Kneteman NM (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7(8):927-933.
- Merzougui N, Kratzer R, Saveanu L & van Endert P (2011) A proteasome-dependent, TAP-independent pathway for cross-presentation of phagocytosed antigen. *EMBO Rep* 12(12):1257-1264.
- Meunier I (2007) *Contribution du répertoire des lymphocytes B-1 dans l'induction d'une réponse antivirale*. Master (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval). 153 p
- Meyer K, Banerjee A, Frey SE, Belshe RB & Ray R (2011) A weak neutralizing antibody response to hepatitis C virus envelope glycoprotein enhances virus infection. *PLoS One* 6(8):e23699.

- Miyaike J, Iwasaki Y, Takahashi A, Shimomura H, Taniguchi H, Koide N, Matsuura K, Ogura T, Tobe K & Tsuji T (2002) Regulation of circulating immune complexes by complement receptor type 1 on erythrocytes in chronic viral liver diseases. *Gut* 51(4):591-596.
- 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, Schiavoni G, Mattei F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P & Tough DF (2002) Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 99(9):3263-3271.
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T & Koike K (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4(9):1065-1067.
- Moskophidis D, Battegay M, Bruendler MA, Laine E, Gresser I & Zinkernagel RM (1994) Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon. *J Virol* 68(3):1951-1955.
- Muckenfuss RS (1934) Clinical Observations and Laboratory Investigations on the 1933 Epidemic of Encephalitis in St. Louis. *Bull N Y Acad Med* 10(7):444-453.
- Murphy FA, Webb PA, Johnson KM & Whitfield SG (1969) Morphological comparison of Machupo with lymphocytic choriomeningitis virus: basis for a new taxonomic group. *J Virol* 4(4):535-541.
- Murphy K (2011) Janeway's Immunobiology. 8th edition:888.
- Nakayama Y, Kim SI, Kim EH, Lambris JD, Sandor M & Suresh M (2009) C3 promotes expansion of CD8+ and CD4+ T cells in a *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 183(5):2921-2931.
- Nataf S, Davoust N, Ames RS & Barnum SR (1999) Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J Immunol* 162(7):4018-4023.
- Neefjes J, Jongasma ML, Paul P & Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11(12):823-836.
- Neff F, Wei X, Nolker C, Bacher M, Du Y & Dodel R (2008) Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders. *Autoimmun Rev* 7(6):501-507.
- Neuman BW, Adair BD, Burns JW, Milligan RA, Buchmeier MJ & Yeager M (2005) Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *J Virol* 79(6):3822-3830.
- Nomura M, Kurita-Taniguchi M, Kondo K, Inoue N, Matsumoto M, Yamanishi K, Okabe M & Seya T (2002) Mechanism of host cell protection from complement in murine cytomegalovirus (CMV) infection: identification of a CMV-responsive element in the CD46 promoter region. *Eur J Immunol* 32(10):2954-2964.

- Nuttall G (1888) Experimente über die bacterienfeindliche Einflüsse des tierischen Körpers. *Z Hyg Infektionskr* 4:353.
- Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H & Zinkernagel RM (1999a) Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286(5447):2156-2159.
- Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Odermatt B, Carroll MC, Hengartner H & Zinkernagel RM (1999b) Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *J Exp Med* 190(8):1165-1174.
- Ochsenbein AF & Zinkernagel RM (2000) Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 21(12):624-630.
- Ohno M, Hirata T, Enomoto M, Araki T, Ishimaru H & Takahashi TA (2000) A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol* 37(8):407-412.
- Oldstone MB (1975) Virus neutralization and virus-induced immune complex disease. Virus-antibody union resulting in immunoprotection or immunologic injury--two sides of the same coin. *Prog Med Virol* 19:84-119.
- Oliviero B, Varchetta S, Paudice E, Michelone G, Zaramella M, Mavilio D, De Filippi F, Bruno S & Mondelli MU (2009) Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 137(3):1151-1160, 1160 e1151-1157.
- Peng Q, Li K, Anderson K, Farrar CA, Lu B, Smith RA, Sacks SH & Zhou W (2008) Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction. *Blood* 111(4):2452-2461.
- Pepys MB (1972) Role of complement in induction of the allergic response. *Nat New Biol* 237(74):157-159.
- Perez M & de la Torre JC (2003) Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 77(2):1184-1194.
- Pestka S, Krause CD & Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202:8-32.
- Pettigrew HD, Teuber SS & Gershwin ME (2009) Clinical significance of complement deficiencies. *Ann N Y Acad Sci* 1173:108-123.
- Pircher H, Michalopoulos EE, Iwamoto A, Ohashi PS, Baenziger J, Hengartner H, Zinkernagel RM & Mak TW (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.
- Planque S, Mitsuda Y, Taguchi H, Salas M, Morris MK, Nishiyama Y, Kyle R, Okhuysen P, Escobar M, Hunter R, Sheppard HW, Hanson C & Paul S (2007) Characterization of gp120 hydrolysis by IgA antibodies from humans without HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(12):1541-1554.

- Poenisch M & Bartenschlager R (2010) New insights into structure and replication of the hepatitis C virus and clinical implications. *Semin Liver Dis* 30(4):333-347.
- Qu H, Ricklin D & Lambris JD (2009) Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. *Mol Immunol* 47(2-3):185-195.
- Quartier P, Potter PK, Ehrenstein MR, Walport MJ & Botto M (2005) Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur J Immunol* 35(1):252-260.
- Radziewicz H, Ibegbu CC, Hon H, Osborn MK, Obideen K, Wehbi M, Freeman GJ, Lennox JL, Workowski KA, Hanson HL & 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. *J Virol* 82(20):9808-9822.
- Randall RE & Goodbourn S (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89(Pt 1):1-47.
- Rauschert N, Brandlein S, Holzinger E, Hensel F, Muller-Hermelink HK & Vollmers HP (2008) A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab Invest* 88(4):375-386.
- Rehermann B & Nascimbeni M (2005) Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5(3):215-229.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K & Lambris JD (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11(9):785-797.
- Rivers TM & Scott TF (1936) Meningitis in Man Caused by a Filterable Virus : ii. Identification of the Etiological Agent. *J Exp Med* 63(3):415-432.
- Roberts A, Buonocore L, Price R, Forman J & Rose JK (1999) Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* 73(5):3723-3732.
- Saade F, Honda-Okubo Y, Trec S & Petrovsky N (2013) A novel hepatitis B vaccine containing Advax, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, induces robust humoral and cellular immunity with minimal reactogenicity in preclinical testing. *Vaccine* 31(15):1999-2007.
- Sacks SH (2010) Complement fragments C3a and C5a: the salt and pepper of the immune response. *European journal of immunology* 40(3):668-670.
- Sacks SH, Chowdhury P & Zhou W (2003) Role of the complement system in rejection. *Curr Opin Immunol* 15(5):487-492.
- Salvato M, Shimomaye E & Oldstone MB (1989) The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. *Virology* 169(2):377-384.
- Santodonato L, D'Agostino G, Nisini R, Mariotti S, Monque DM, Spada M, Lattanzi L, Perrone MP, Andreotti M, Belardelli F & Ferrantini M (2003) Monocyte-derived

dendritic cells generated after a short-term culture with IFN-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate a potent Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cell response. *J Immunol* 170(10):5195-5202.

- Sarma JV & Ward PA (2011) The complement system. *Cell Tissue Res* 343(1):227-235.
- Sathe P, Pooley J, Vremec D, Mintern J, Jin JO, Wu L, Kwak JY, Villadangos JA & Shortman K (2011) The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *J Immunol* 186(9):5184-5192.
- Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N & Taniguchi T (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13(4):539-548.
- Schulz M, Aichele P, Vollenweider M, Bobe FW, Cardinaux F, Hengartner H & Zinkernagel RM (1989) Major histocompatibility complex--dependent T cell epitopes of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein and their protective capacity against viral disease. *Eur J Immunol* 19(9):1657-1667.
- Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, Wurcel AG, Timm J, Jones AM, Mothe B, Allen TM, McGovern B, Lewis-Ximenez L, Sidney J, Sette A, Chung RT & Walker BD (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.
- Schwartz-Albiez R, Laban S, Eichmuller S & Kirschfink M (2008) Cytotoxic natural antibodies against human tumours: an option for anti-cancer immunotherapy? *Autoimmun Rev* 7(6):491-495.
- Segura E, Albiston AL, Wicks IP, Chai SY & Villadangos JA (2009) Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(48):20377-20381.
- Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, Sastre-Garau X, Soumelis V & Amigorena S (2012) Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 209(4):653-660.
- Semmo N, Barnes E, Taylor C, Kurtz J, Harcourt G, Smith N & Klenerman P (2005) T-cell responses and previous exposure to hepatitis C virus in indeterminate blood donors. *Lancet* 365(9456):327-329.
- Sene D, Levasseur F, Abel M, Lambert M, Camous X, Hernandez C, Pene V, Rosenberg AR, Jouvin-Marche E, Marche PN, Cacoub P & Caillat-Zucman S (2010) Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. *PLoS Pathog* 6(11):e1001184.
- Sevilla N, Kunz S, McGavern D & Oldstone MB (2003) Infection of dendritic cells by lymphocytic choriomeningitis virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 276:125-144.

- Shen L, Sigal LJ, Boes M & Rock KL (2004) Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21(2):155-165.
- Shepard CW, Finelli L & Alter MJ (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5(9):558-567.
- Shoukry NH, Cawthon AG & Walker CM (2004) Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 58:391-424.
- Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA & Walker CM (2003) Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 197(12):1645-1655.
- Skinner HH & Knight EH (1979) Epidermal tissue as a primary site of replication of lymphocytic choriomeningitis virus in small experimental hosts. *J Hyg (Lond)* 82(1):21-30.
- Sorensen R, Thiel S & Jensenius JC (2005) Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol* 27(3):299-319.
- Stoermer KA & Morrison TE (2011) Complement and viral pathogenesis. *Virology* 411(2):362-373.
- Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ & Chang KM (2003) Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 38(6):1437-1448.
- Suresh M, Molina H, Salvato MS, Mastellos D, Lambris JD & Sandor M (2003) Complement component 3 is required for optimal expansion of CD8 T cells during a systemic viral infection. *J Immunol* 170(2):788-794.
- Taguchi H, Planque S, Nishiyama Y, Symersky J, Boivin S, Szabo P, Friedland RP, Ramsland PA, Edmundson AB, Weksler ME & Paul S (2008) Autoantibody-catalyzed hydrolysis of amyloid beta peptide. *J Biol Chem* 283(8):4714-4722.
- Takehara T & Hayashi N (2005) Natural killer cells in hepatitis C virus infection: from innate immunity to adaptive immunity. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 3(10 Suppl 2):S78-81.
- Tarlinton D (1998) Germinal centers: form and function. *Current opinion in immunology* 10(3):245-251.
- Tarr AW, Urbanowicz RA & Ball JK (2012) The role of humoral innate immunity in hepatitis C virus infection. *Viruses* 4(1):1-27.
- Taylor LD, Carmack CE, Huszar D, Higgins KM, Mashayekh R, Sequer G, Schramm SR, Kuo CC, O'Donnell SL, Kay RM & 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 LD, Carmack CE, Schramm SR, Mashayekh R, Higgins KM, Kuo CC, Woodhouse C, Kay RM & 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.
- Tester I, Smyk-Pearson S, Wang P, Wertheimer A, Yao E, Lewinsohn DM, Tavis JE & Rosen HR (2005) Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med* 201(11):1725-1731.
- Thimme R, Binder M & Bartenschlager R (2012) Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol Rev* 36(3):663-683.
- Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC & Chisari FV (2001) Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194(10):1395-1406.
- Thimme R, Spangenberg HC, Von Weizsacker F & Blum HE (2002) [T cell response to hepatitis B and C: from viral elimination to hepatocellular carcinoma]. *Dtsch Med Wochenschr* 127(43):2277-2279.
- Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P & McKeating JA (2008) Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 47(1):17-24.
- Townsley-Fuchs J, Kam L, Fairhurst R, Gange SJ, Goodglick L, Giorgi JV, Sidell N, Detels R & Braun J (1996) Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) gp120 superantigen-binding serum antibodies. A host factor in homosexual HIV-1 transmission. *J Clin Invest* 98(8):1794-1801.
- Traub E (1936a) An Epidemic in a Mouse Colony Due to the Virus of Acute Lymphocytic Choriomeningitis. *J Exp Med* 63(4):533-546.
- Traub E (1936b) 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.
- Tsuji RF, Kawikova I, Ramabhadran R, Akahira-Azuma M, Taub D, Hugli TE, Gerard C & Askenase PW (2000) Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. *J Immunol* 165(3):1588-1598.
- Tumang JR, Frances R, Yeo SG & Rothstein TL (2005) Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. *J Immunol* 174(6):3173-3177.
- van Lookeren Campagne M, Wiesmann C & Brown EJ (2007) Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol* 9(9):2095-2102.
- Vas J, Gronwall C & Silverman GJ (2013) Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis. *Front Immunol* 4:4.

- Vassallo G, Newton RW, Chieng SE, Haeney MR, Shabani A & Arkwright PD (2007) Clinical variability and characteristic autoantibody profile in primary C1q complement deficiency. *Rheumatology (Oxford)* 46(10):1612-1614.
- Verschoor A, Neuenhahn M, Navarini AA, Graef P, Plaumann A, Seidlmeier A, Nieswandt B, Massberg S, Zinkernagel RM, Hengartner H & Busch DH (2011) A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8alpha+ dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3. *Nat Immunol* 12(12):1194-1201.
- Villadangos JA & Schnorrer P (2007) Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7(7):543-555.
- Vogel CW & Fritzinger DC (2010) Cobra venom factor: Structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. *Toxicon* 56(7):1198-1222.
- Vogel CW & Muller-Eberhard HJ (1984a) Cobra venom factor: improved method for purification and biochemical characterization. *J Immunol Methods* 73(1):203-220.
- Vogel CW, Smith CA & Muller-Eberhard HJ (1984b) Cobra venom factor: structural homology with the third component of human complement. *J Immunol* 133(6):3235-3241.
- Vollmers HP & Brandlein S (2007) Natural antibodies and cancer. *J Autoimmun* 29(4):295-302.
- von Herrath M & Whitton JL (2001) Animal models using lymphocytic choriomeningitis virus. *Curr Protoc Immunol* Chapter 19:Unit 19 10.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R & Liang TJ (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11(7):791-796.
- Wallis R (2007) Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology* 212(4-5):289-299.
- Walport MJ (2001a) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344(14):1058-1066.
- Walport MJ (2001b) Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344(15):1140-1144.
- Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MT, Young JD, Ahmed R & Clark WR (1994) Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23):10854-10858.
- Welsh RM (1977) Host cell modification of lymphocytic choriomeningitis virus and Newcastle disease virus altering viral inactivation by human complement. *J Immunol* 118(1):348-354.
- Welsh RM, Jr., Lampert PW, Burner PA & Oldstone MB (1976) Antibody-complement interactions with purified lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 73(1):59-71.

- Wessels MR, Butko P, Ma M, Warren HB, Lage AL & Carroll MC (1995) Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(25):11490-11494.
- Witteveldt J, Evans MJ, Bitzegeio J, Koutsoudakis G, Owsianka AM, Angus AG, Keck ZY, Fong SK, Pietschmann T, Rice CM & Patel AH (2009) CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* 90(Pt 1):48-58.
- Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP & Prieto J (1998) Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244(2):513-520.
- Yang K, DeAngelis RA, Reed JE, Ricklin D & Lambris JD (2013) Complement in action: an analysis of patent trends from 1976 through 2011. *Adv Exp Med Biol* 734:301-313.
- Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S & Baumert TF (2011) Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol* 54(3):566-576.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T & Chisari FV (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26):9294-9299.
- Zhou S, Cerny AM, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA & Finberg RW (2012) Role of interferon regulatory factor 7 in T cell responses during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol* 86(20):11254-11265.
- Zhu Y, Thangamani S, Ho B & Ding JL (2005) The ancient origin of the complement system. *EMBO J* 24(2):382-394.
- Zignego AL, Giannini C, Monti M & Gragnani L (2007) Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies. *Dig Liver Dis* 39 Suppl 1:S38-45.
- Zinkernagel RM (2002) Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:1-5.