

Université du Québec
INRS – Institut Armand-Frappier

Étude de l'apparition tardive des anticorps neutralisants dans le cadre d'une infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire

Par Matthieu Daugan

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne : Veronika Von Messling
INRS – Institut Armand-Frappier

Examineur externe : Idriss Djilali-Saiah
CHU Sainte-Justine, Montréal

Directeur de recherche : Alain Lamarre
INRS – Institut Armand Frappier

©droits réservés de Matthieu Daugan, 2011

Résumé

Les infections virales persistantes sont un réel problème de santé publique. À l'échelle mondiale, les seuls virus du SIDA et des hépatites B et C représentent plus de 500 millions de cas. Une des particularités de ces infections est de présenter, contrairement aux infections aiguës, une apparition tardive des anticorps neutralisants (AcN) normalement présents pour empêcher la dissémination des particules virales dans tout l'organisme. Le but de ce projet de maîtrise est d'étudier les mécanismes impliqués dans cette réponse humorale tardive suite à une infection par un virus murin modèle des infections humaines persistantes : le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV).

Deux hypothèses ont été privilégiées dans ce projet :

- L'interleukine 10 (IL-10) est fortement produite durant les infections persistantes et inhibe la réponse cellulaire, elle pourrait aussi avoir un effet identique sur la réponse humorale.
- LCMV provoquerait un défaut de la maturation d'affinité, entraînant ainsi un retard dans l'apparition des AcN.

La première hypothèse est basée sur l'analyse de la production d'AcN dans le cadre d'une infection en l'absence d'IL-10. Des souris IL-10 KO et C57BL/6 ont été infectées avec LCMV Clone 13 (persistant) ou Armstrong (non persistant) et l'apparition des AcN contre le virus ou la persistance virale ont été observées. Les résultats ont permis d'arriver à la conclusion que l'IL-10 n'est pas impliquée dans la production tardive des AcN dans le cadre d'une infection par LCMV.

La seconde hypothèse repose sur une analyse parallèle de l'affinité des anticorps (Ac) contre un antigène non lié dans le cadre d'infections à deux virus : LCMV et le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), qui entraîne une infection aiguë. Des souris ont été infectées avec l'un ou l'autre des virus puis immunisées quelques jours après infection par une

injection de nitrophenyl (NP). La réponse humorale montée contre le NP a ensuite été analysée à différents moments post-immunisation par prélèvement de sang sur lequel a été pratiqué un test ELISA contre le NP. Ces études ont démontré un délai de la réponse IgM et IgG contre le NP chez les animaux infectés avec LCMV contrairement aux animaux infectés avec VSV ou non-infectés. Cependant, l'affinité des dits-Ac n'était pas affectée par la nature de l'infection.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus ne démontrent pas une influence de l'IL-10 sur la cinétique et la vigueur de la réponse humorale, mais confirment les spéculations que LCMV module la réponse humorale globale et non pas seulement celle dirigée spécifiquement contre lui-même. Ces résultats ouvrent la porte à la compréhension des mécanismes de persistance des virus humains et murins. Une investigation plus poussée à propos des mécanismes impliqués dans cette apparition tardive globale des Ac et lors d'infections par d'autres virus persistants permettrait de dresser un portrait plus complet du processus menant au retard de la réponse humorale.

Matthieu Daugan

Alain Lamarre

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier mon directeur de recherche, le docteur Alain Lamarre, pour avoir accepté de me prendre dans son laboratoire. Sa patience à mon égard, sa disponibilité, son ouverture d'esprit et sa bonne humeur permanente font de son laboratoire un cadre idéal pour le travail.

Il me paraît ensuite évident de mentionner les collègues de travail présents et passés et qui doivent me supporter au quotidien : Valérie, Tania, Marie-Ève (x2), Marie-Pierre, Dominique, Élodie, Jessica, Marc et Hélène. Une mention spéciale pour Esther, « la maman du laboratoire », toujours souriante et tellement disponible pour répondre à mes questions même les plus triviales. Merci à vous tous.

Un petit mot spécial pour celle qui n'a pas hésité à me suivre lorsque je lui ai annoncé mon projet de traverser l'Atlantique et sans qui tout aurait bien sûr été beaucoup plus difficile. Valérie, tes encouragements quotidiens et ta présence apaisante font qu'il est plus facile pour moi de travailler dans de bonnes conditions.

Cette maîtrise a il est vrai été pour moi le cadre d'un apprentissage scientifique, mais a aussi fortement participé à mon intégration dans la société québécoise. A ce titre je ne peux passer sous silence le soutien parfois involontaire et l'amitié que m'ont apportés de nombreuses personnes à l'intérieur et en dehors de l'institut. Sans ces amis pour me changer les idées il aurait été plus difficile de m'adapter et d'être dans de bonnes dispositions pour le laboratoire. Je ne peux malheureusement pas citer tout le monde mais au moins quelques-uns qui font partie de mon quotidien: Aurélie, Guilhem, Romain, Julien, Ronan, Soizic, Lydie, David et Alex.

Ces remerciements ne pourraient être complets sans mentionner ma famille restée en France : Christine, Gilles et Juliette. Votre soutien moral et votre affection réduisent la trop grande distance qui nous sépare.

Pour terminer, merci à la Fondation Armand-Frappier pour son soutien financier.

Table des matières

Résumé	II
Remerciements.....	IV
Table des matières	V
Liste des figures	VIII
Liste des abréviations.....	IX
Introduction.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE	4
1 Les infections humaines persistantes.....	5
1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	5
1.1.1 Généralités	5
1.1.2 Réponse immunitaire au virus	7
1.2 Le virus de l'hépatite C (VHC).....	8
1.2.1 Généralités	8
1.2.2 Réponse immunitaire au virus	9
2 Les modèles murins.....	12
2.1 Le virus de la chorioméningite lymphocytaire	12
2.1.1 Généralités et structure	12
2.1.2 Les souches de LCMV	14
2.2 Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV)	16
2.3 Réponses immunitaires antivirales	17
3 Les mécanismes d'échappement viraux	19
4 Les lymphocytes B.....	23
4.1 Production et maturation dans la moelle épinière.....	23
4.2 Maturation dans la rate	26
5 Les anticorps.....	27
5.1 Structure générale	28
5.2 Les différentes classes d'anticorps.....	30

5.3 Fonctions des anticorps	31
6 La production des anticorps	33
6.1 La recombinaison somatique	34
6.1.1 La chaîne lourde	36
6.1.2 La chaîne légère	37
6.2 L'hypermutation somatique et la maturation d'affinité	39
6.3 La permutation de classe	40
MATÉRIEL ET MÉTHODES	41
1 Souris	42
2 Lignées cellulaires	43
3 Virus et haptène	43
4 Productions virales.....	44
4.1 LCMV	44
4.2 VSV	44
5 Titrage des virus.....	45
5.1 LCMV	45
5.2 VSV	46
6 Test de neutralisation de LCMV	46
7 Infection et immunisation des souris	46
8 ELISA	47
RÉSULTATS	49
1 Influence de l'IL-10 sur la réponse humorale neutralisante.....	50
2 Comparaison de la réponse contre le nitrophenyl dans le cadre d'une infection aiguë, persistante, ou en l'absence d'infection	53
2.1 Quantité des anticorps.....	54
2.2 Affinité des anticorps	60

DISCUSSION	61
1 Influence de l'IL-10 sur la réponse humorale neutralisante.....	62
2 Comparaison de la réponse contre le nitrophenyl dans le cadre d'une infection aiguë, persistante, ou en l'absence d'infection	64
2.1 Quantité des anticorps.....	64
2.2 Affinité des anticorps	66
Conclusion et perspectives	68
Liste des références.....	70

Liste des figures

Figure 1 Répartition des cas de VIH à travers le monde (tirée de UNAIDS 2010)	5
Figure 2 État de l'épidémie de VIH à travers le monde de 1990 à 2007 (tirée de UNAIDS 2010). 6	
Tableau 1 Les souches de LCMV.....	15
Figure 3 Cinétiques d'apparition de différents effecteurs immunitaires (tirée de Hangartner et al. 2006).....	17
Figure 4 Quantité plus importante de lymphocytes T spécifiques au virus après infection de souris déficiente en IL-10 avec LCMV Clone 13 (tirée de Brooks et al. 2006)	22
Figure 5 La structure du pré-RCB (d'après Monroe 2006).....	24
Figure 6 La structure du RCB (d'après Monroe 2006)	25
Figure 7 Structure de la rate de souris	26
Figure 8 Structure d'IgG.....	29
Figure 9 Les anticorps agissent comme des adaptateurs.....	32
Figure 10 La recombinaison somatique chez les lymphocytes B	35
Figure 11 La recombinaison VDJ	36
Figure 12 Recombinaison de la chaîne κ	37
Figure 13 Recombinaison de la chaîne λ	38
Figure 14 Titres en anticorps dans les différents échantillons de sérum prélevés post-infection.	52
Figure 15 Protocole expérimental pour l'étude de la réponse humorale contre le NP dans le cadre d'une infection par LCMV, VSV ou chez des souris non-infectées.....	54
Figure 16 Cinétique d'apparition des anticorps spécifiques au NP après une immunisation 8 jours après infection.	55
Figure 17 Cinétique d'apparition des immunoglobulines M spécifiques au NP après des immunisations aux jours 0, 4, 8, 12 et 20 après l'infection.	57
Figure 18 Cinétique d'apparition des immunoglobulines G spécifiques au NP après des immunisations aux jours 0, 4, 8, 12 et 20 après l'infection.	58
Figure 19 Fenêtre d'influence des infections aiguës ou persistante sur la production normale d'immunoglobulines.	59
Figure 20 Évolution de l'affinité des anticorps anti-NP après immunisation 8 jours après infection	60

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
AcN	Anticorps neutralisant
Arm	Armstrong (souche de LCMV)
BSA	Bovine serum albumine (sérum-albumine bovine)
CGG	Chicken gammaglobuline (gammaglobuline de poulet)
Cl13	Clone 13 (souche de LCMV)
CLS	Chaîne légère de substitution
CTL	(Cytotoxic T Lymphocyte (lymphocytes T cytotoxique)
DC	(Dendritique cell) cellule dendritique
FcR	Récepteur Fc (aux anticorps)
GC	Germinal centre (centre germinatif)
HRP	Horse Radish Peroxidase (peroxidase de Raifort)
IL-10	Interleukine 10
Ind	Indiana (souche de VSV)
IP	Intrapéritonéale
Kb	kilobase
LCMV	Lymphocytic choriomeningitis virus (virus de la chorioméningite lymphocytaire)
LPS	Lipopolysaccharide
MEM	Earle's Modified Essential Medium
MOI	Multiplicity of infection (multiplicité d'infection)
NP	Nitrophenyl
PTK	Protéine tyrosine kinase
PD-1	Programmed death 1

RCB	Récepteur des cellules B
SVF	Sérum de veau foetal
TFH	Follicular helping t cell (lymphocytes T auxiliaire folliculaire)
Th1	T helper type 1 (lymphocyte T auxiliaire de type 1)
Th2	T helper type 2 (lymphocyte T auxiliaire de type 2)
VSV	Vesicular stomatitis virus (virus de la stomatite vésiculaire)

Introduction

Les infections virales persistantes constituent un réel problème de santé publique à l'échelle planétaire: le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et des hépatites B (VHB) et C (VHC) représentent à eux seuls 500 millions de cas à travers le monde et leur nombre augmente tous les jours. Ces infections sont le résultat d'une coévolution entre le virus et son organisme hôte, le virus ajustant sa pathogénicité et sa réplication afin d'éviter de tuer son hôte ou d'être éliminé par ce dernier. Au cours de cette évolution, de nombreux mécanismes ont été mis en place par le virus pour retarder la réponse des différentes composantes du système immunitaire, à savoir les réponses cellulaires et humorales. Une des principales caractéristiques des infections persistantes réside dans l'apparition faible et tardive des anticorps neutralisants (AcN). Au contraire, cette apparition est rapide dans le cas d'une infection aiguë (poliovirus, virus influenza, virus de la stomatite vésiculaire (VSV)) et joue un rôle très important dans leur contrôle par le système immunitaire.

Bien que leur rôle ne soit pas parfaitement caractérisé, les AcN sont au centre de la lutte contre les infections car c'est sur le déclenchement de leur production que repose le mécanisme de la majorité des vaccins disponibles à l'heure actuelle. Une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'apparition tardive de ces anticorps (Ac) dans le cadre des infections persistantes permettrait éventuellement de définir de nouvelles pistes de développement de vaccins pour s'en protéger. L'objet de mon projet de recherche est justement d'essayer de mieux comprendre les raisons de cette apparition tardive avec principalement deux avenues de travail : une première est plutôt axée sur un possible détournement de cytokines immunomodulatrices par le virus, alors que l'autre se focalise sur un éventuel défaut dans la maturation d'affinité des Ac.

Concernant la première hypothèse, la synchronisation de la réponse immunitaire dans les différentes parties du corps est assurée par la communication au travers de molécules informatrices : les cytokines. Ces molécules ont des rôles très variés mais

peuvent sommairement être séparées en cytokines immunostimulatrices et cytokines immunosuppressives. Dans ce second groupe se trouve l'interleukine 10 (IL-10), cytokine connue principalement pour ses propriétés anti-inflammatoires et produite de manière à réguler à la baisse la réponse immunitaire lors d'une infection. Il a été démontré que lors des infections persistantes comme par le VIH (30, 130), VHC (73, 183) ou le LCMV (48), la quantité d'IL-10 était fortement augmentée par rapport à la quantité produite lors d'une infection aiguë classique. Le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) est un modèle murin d'infection persistante étudié depuis plusieurs décennies pour comprendre les mécanismes de persistance. Dans une étude précédente, cette augmentation de la production d'IL-10 était associée avec une diminution de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et auxiliaires (16). Les lymphocytes T CD4⁺ étant impliqués dans certaines étapes du processus de production des Ac, nous nous sommes demandé si l'influence directe de l'IL-10 sur les cellules T n'impliquerait pas aussi une influence directe ou indirecte sur la composante humorale du système immunitaire. Dans ce but, la production d'AcN spécifiques au virus a été comparée dans des souris sauvages (C57BL/6) et des souris incapables de produire l'IL-10 (IL-10KO). Les souris ont été infectées avec différentes souches de LCMV et des échantillons de sérums ont été prélevés à différents temps post-infection. La quantité d'AcN présents dans ces échantillons a été déterminée par test de neutralisation. Les résultats des différentes expériences ont démontré que les souris IL-10KO ne produisaient pas plus rapidement d'AcN et donc qu'il semblerait que l'IL-10 n'ai pas d'influence directe ou indirecte sur la production de ces Ac.

Dans le cas de la seconde hypothèse, les travaux étaient plus consacrés à la production des Ac en générale et non seulement à celle des AcN. La production d'Ac spécifiques à un antigène est basée sur une augmentation progressive d'affinité des Ac pour cet antigène au travers d'un processus central de la réponse humorale appelé la maturation d'affinité. Il s'agissait donc de démontrer l'implication d'un mauvais fonctionnement de la maturation d'affinité dans l'apparition tardive des AcN, qui sont généralement de haute affinité pour leur antigène. Étant donné que la maturation d'affinité est impliquée

dans la production de tous les Ac de haute affinité, une telle modification impliquerait non seulement un retard de production des Ac contre le virus mais aussi contre tous les antigènes présents dans l'organisme au moment de l'infection. Pour étudier cette question, la réponse humorale dirigée contre un antigène donné, le nitrophenyl (NP), a été analysée dans le contexte immunitaire de deux infections : des souris infectées avec un virus persistant (LCMV), un virus aigu (VSV) ou non infectées. VSV est un modèle d'infection aiguë étudié depuis de nombreuses années qui est éliminé principalement par le biais d'une forte réponse neutralisante. Pour cette étude, des souris ont été infectées (ou non) avec un des deux virus suivi par une injection de NP (immunisation) à différents temps post-infection pour provoquer une réponse immunitaire anti-NP. Des prélèvements de sérums à différents temps post-immunisation sur lesquels ont été effectués des tests ELISA ont permis d'observer l'apparition des Ac contre le NP dans les différents protocoles d'infection. Les résultats des tests ELISA ont démontré un très fort retard d'apparition des Ac anti-NP dans le cas du groupe de souris infectées avec LCMV par rapport aux groupes infectés avec VSV ou non-infectés. Ce constat fait ressortir une modification dans le processus de formation des Ac dans le cas d'une infection par LCMV et pourrait être extrapolé aux autres infections persistantes puisqu'on y observe aussi un retard d'apparition des AcN. L'expérience a été réalisée dans différentes conditions, permettant de discriminer les Ac de haute affinité de l'ensemble des Ac spécifiques au NP. Le taux d'Ac de haute affinité parmi l'ensemble n'étant pas réellement différent dans les trois groupes, il semblerait donc que la modification du processus de production des Ac ne se situe pas à l'étape de la maturation d'affinité.

L'ensemble de ces résultats tend à montrer que le retard d'apparition des AcN dans le cadre d'une infection par LCMV n'est pas attribuable à une influence de l'IL-10 mais qu'il semble y avoir un dysfonctionnement dans le processus de production des AcN en lui-même et que ce dysfonctionnement ne soit pas situé au niveau de la maturation d'affinité. Il serait intéressant d'essayer de déterminer le(s) mécanisme(s) responsable(s) du dysfonctionnement et de voir si ces résultats peuvent être extrapolés à d'autres infections persistantes présentant une production tardive similaire.

Chapitre 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1 Les infections humaines persistantes

1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

1.1.1 Généralités

Le VIH est un virus à ARN de la famille des *Retroviridae* et du genre *lentivirus*. Il comprend deux sérotypes principaux : le VIH-1 et le VIH-2 (29, 62).

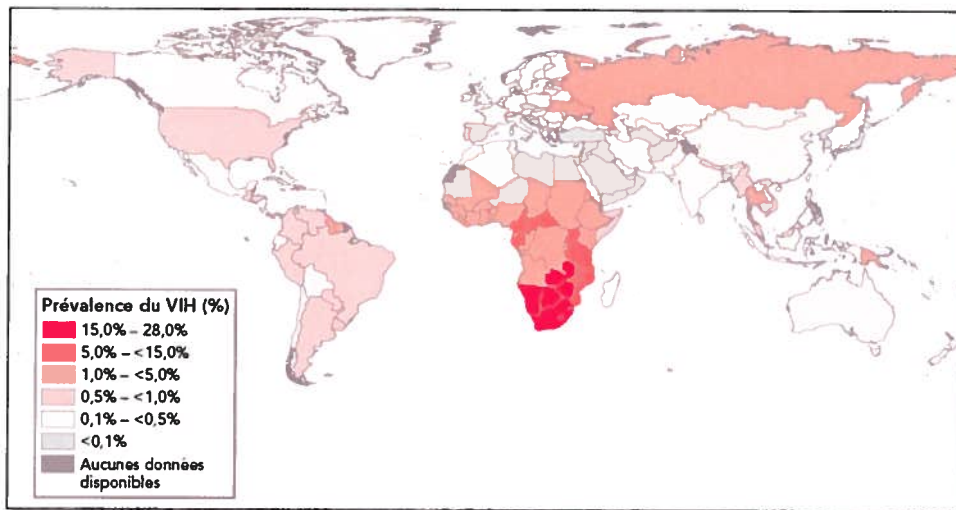


Figure 1 Répartition des cas de VIH à travers le monde (tirée de UNAIDS 2010). C'est dans les pays d'Afrique qu'on retrouve le plus grand nombre de cas d'individus infectés par le VIH.

A la fin de l'année 2008, 33,4 millions de personnes, dont 2,1 millions d'enfants, vivaient avec le VIH à travers le monde. De plus, 2,7 millions de personnes devenaient nouvellement infectées au cours de cette année et 2 millions allaient mourir du SIDA (UNAIDS, 2009). La plupart des cas d'infection au VIH se situent dans les pays en voie de développement du fait de l'absence ou du manque de politique de lutte efficace contre

le virus (figure 1). Bien que ces chiffres soient en relative stagnation depuis quelques années (figure 2), ils démontrent bien l'importance de l'enjeu de santé que représente le VIH.

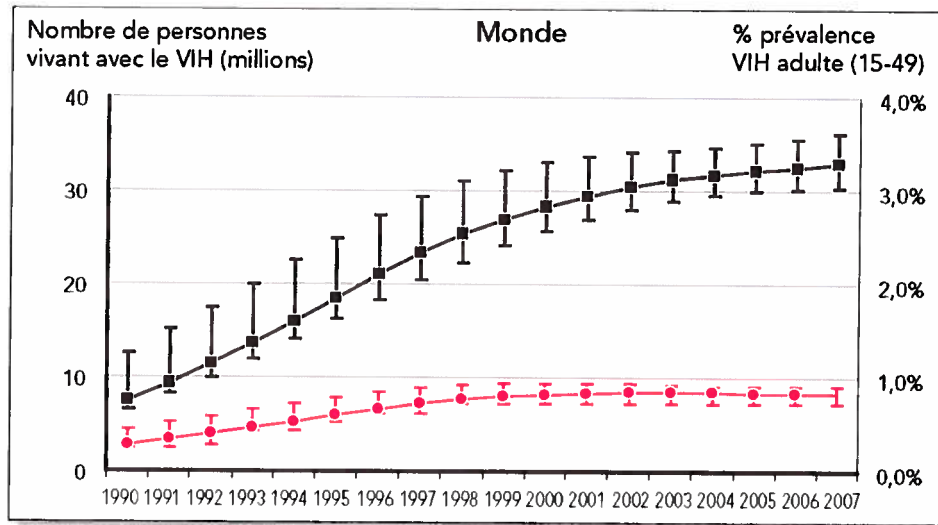


Figure 2 État de l'épidémie de VIH à travers le monde de 1990 à 2007 (tirée de UNAIDS 2010). Le nombre de personnes infectées est représenté en noir et la prévalence en rouge

Depuis la découverte du virus en 1983 (10), d'énormes progrès ont été réalisés dans le développement de médicaments antirétroviraux (ARV) et dans leur accessibilité pour les individus séropositifs. Cependant, l'ensemble des moyens développés pour éviter tous les types de transmissions (sexuelle, par contact sanguin, mère-enfant) conjugué au développement des ARVs n'est pas suffisant pour enrayer la propagation de la maladie ou soigner les patients. Ce constat démontre bien l'importance de la tâche que constitue une meilleure compréhension de la pathogénèse du virus afin de trouver un traitement efficace et un vaccin.

1.1.2 Réponse immunitaire antivirale

Le VIH déclenche des réponses humorales et cellulaires spécifiques chez la plupart des individus infectés. Cependant, la progression de l'infection vers le stade de l'immunodéficience humaine acquise (SIDA) chez un nombre élevé de patients indique que ces réponses ne confèrent pas la protection nécessaire pour contrôler le virus de manière permanente.

L'immunité cellulaire est le premier mécanisme de contrôle de la réplication du VIH (31, 32). En effet, des réponses des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ et des CTL CD8⁺ spécifiques au VIH ont été observées chez les patients infectés bien avant apparition des premiers anticorps (86).

Chez les individus infectés par le VIH, les cytokines peuvent affecter la progression de l'infection vers le SIDA en modulant la réplication virale au niveau des cellules cibles (116, 161). Les individus asymptomatiques présentent principalement une réponse Th1 alors que les patients symptomatiques montent plutôt une réponse Th2 (31, 33), ce qui confirme l'importance d'une réponse cellulaire efficace pour le contrôle de la réplication du virus.

Bien que la réponse des lymphocytes T CD4⁺ soit diminuée par un tropisme préférentiel du virus pour ce type cellulaire, les individus infectés montent une forte réponse CTL CD8⁺ (108). Le pic de la réponse CTL coïncide avec la chute drastique de la virémie et ce bien avant l'apparition des premiers AcN (86).

La réponse humorale est plus ou moins rapide suivant les individus, variant de quelques jours (35, 57) à plusieurs mois (56, 75, 173). Bien que les premiers AcN apparaissent environ 3 semaines après infection, la réelle réponse contre l'enveloppe virale ne se développe vraiment que plusieurs mois après l'infection (117, 176). Cette propriété de l'infection par le VIH est cohérente avec des analyses structurales récentes sur le VIH-1

qui démontrent que dans ses protéines d'enveloppe, de nombreux épitopes neutralisants sont cachés du système immunitaires (155).

Malheureusement, les mécanismes d'échappement viraux assurent une réplication virale élevée malgré la présence de ces AcN (42). Ces faibles titres d'AcN favorisent la sélection de mutants résistants, le résultat étant qu'un sérum prélevé à un moment précis de l'infection par le VIH contient seulement des AcN spécifiques de virus autologues présents plusieurs mois avant dans l'organisme, épargnant le virus présent à ce même moment dans le sang, ce dernier ayant muté.

1.2 Le virus de l'hépatite C (VHC)

1.2.1 Généralités

Dans le courant des années 70, il a été remarqué que des individus étaient affligés d'hépatites n'étant causées ni par le virus de l'hépatite A, ni celui de l'hépatite B. Cette pathologie était alors définie comme étant « non-A, non-B » (50). Le VHC, finalement découvert en 1989 (28), est une des causes les plus répandues de maladies du foie à travers le monde. En 2009, le chiffre de 170 millions de personnes estimées porteuses chroniques du virus (6) démontre bien l'enjeu de santé publique que représente cette maladie. De plus, on estime que 3 à 4 millions de personnes de plus sont infectées chaque année (7). Parmi les individus infectés par HCV, environ 80% restent infectés de manière chronique, 10-20% développent une cirrhose et 1-5% sont atteints d'un cancer du foie au bout de quelques années (177). Il est intéressant de noter que HCV est la première cause de transplantation du foie aux États-Unis (61).

Ce virus à ARN de 9,7kb de polarité positive enveloppé fait partie de la famille des *Flaviviridae* et du genre *hepacivirus* (146). Il en existe 6 génotypes et plus de 100 sous-

types (164) qui peuvent principalement infecter leurs hôtes par voie parentérale, mais aussi suite à une transmission mère-enfant durant la grossesse (168). Cette infection peut être aigüe mais reste malheureusement persistante dans la majorité des cas (5).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la période d'incubation avant apparition des premiers symptômes cliniques est de 15 à 150 jours, bien que l'infection soit asymptomatique dans 60-70% des cas. Cette absence fréquente de symptômes rend son diagnostic précoce particulièrement difficile. Il n'existe aucun vaccin contre une infection par le VHC. Les traitements actuels sont chers, durent plusieurs mois et entraînent des effets secondaires sévères chez les patients (43). De plus, leur efficacité n'est pas garantie car elle dépend du génotype du virus. Des drogues qui interfèrent de façon spécifique avec la réplication ou la traduction virale ne sont pas encore disponibles mais constituent des candidats prometteurs en cours d'études cliniques (105).

Parce qu'un vaccin contre l'infection par VHC n'existe pas encore et que les traitements ne sont pas efficaces pour éliminer le virus, il est crucial de comprendre la réponse immunitaire développée durant une infection ainsi que les stratégies d'évasion et d'infection de ce virus.

1.2.2 Réponse immunitaire au virus

HCV peut infecter les monocytes et lymphocytes (93) mais a un tropisme très fort pour les hépatocytes, dans le cytoplasme desquels il se réplique de manière non-lytique (170). Les mécanismes qui déterminent le devenir d'une infection par le VHC restent encore aujourd'hui mal connus. Il est cependant largement accepté que la composante cellulaire du système immunitaire joue un rôle prédominant dans le contrôle ou non de l'infection de même que les mécanismes d'échappement du virus sont au centre de sa persistance. Les réponses immunitaires adaptatives contre le VHC sont la plupart du temps élaborées en au moins un mois pour la réponse cellulaire et deux mois pour la

réponse humorale, ce qui entraîne un échappement du virus au système immunitaire (171, 172).

Très rapidement après que HCV a infecté une cellule, une série d'évènements intracellulaires se propage aussi bien dans la cellule infectée que dans les cellules alentours. Cet état de stress antiviral est principalement dépendant des interférons de type 1 (α/β) (34, 159). Dans 10 à 30% des cas le virus est spontanément éliminé par l'organisme mais la plupart du temps il établit une infection persistante (74). Les individus infectés ne réussissent à éliminer le virus qu'à condition de monter une réponse cellulaire CD4 et CD8 rapide, efficace et soutenue (38, 44, 65, 89, 163, 172). Cependant, la génération d'une réponse cellulaire n'assure pas le contrôle de l'infection. Cette réponse est souvent détectable lors de l'infection précoce, indépendamment du devenir de l'infection, et elle peut même persister lors d'une infection chronique (37). Il n'est pas encore bien déterminé pourquoi cette réponse n'arrive pas à contrôler l'infection mais certaines équipes ont démontré que la réponse générée durant l'infection aiguë diminue chez les sujets infectés de manière persistante (37, 66).

Le début de l'hépatite coïncide avec le début de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ (172). Ce mécanisme de destruction des cellules hépatiques infectées est au centre de la lutte contre l'infection mais est malheureusement aussi au centre de la pathologie associée à celle-ci. Il apparaît que le contrôle de l'infection implique plus qu'une simple destruction des cellules infectées car cette dernière ne parvient pas à elle seule à éliminer totalement le virus de l'organisme (172). Des expériences réalisées dans des systèmes *in vitro* ont mis en évidence des mécanismes par lesquels HCV bouleverse les réponses antivirales innées nécessaires à la stimulation des fonctions effectrices des lymphocytes (52, 53, 94).

Durant la réponse précoce à l'infection, les LT CD8⁺ se consacrent uniquement à la destruction des cellules infectées, puis il se produit une modification de leur phénotype avec une perte de marqueurs d'activations et une synthèse d'IFN- γ , traduisant une modification de la fonction des lymphocytes T cytotoxiques (de cellules tueuses à

cellules productrices d'IFN) (172). Si cette modification de phénotype est une cause ou une conséquence de la baisse du titre viral reste encore à déterminer. Ceci soulève cependant la possibilité que l'IFN- γ joue un rôle d'effecteur non-cytolytique dans l'infection à HCV, similaire à celle qu'il occupe dans le contrôle de la réplication de HBV dans le foie de souris (67) et chimpanzés (68) infectés.

Malgré la baisse du titre viral et les nombreuses preuves que la séquence d'HCV varie durant les infections aiguës et chroniques, les individus infectés de manière permanente ne développent pas de nouvelles spécificités d'épitope après six mois d'infection. Ces résultats suggèrent que le développement de lymphocytes T spécifiques au VHC est arrêté durant la première année de la phase chronique (20).

A l'opposé de la réponse cellulaire antivirale qui est très étudiée, l'impact des AcN dans la résolution d'une infection à l'hépatite C reste méconnu. Leur étude est rendue particulièrement ardue par le fait que les cohortes de patients ainsi que les souches de virus présentes chez les différents patients sont très hétérologues. Les premiers anticorps aux propriétés neutralisantes envers HCV ont été décrits dans une infection expérimentale de chimpanzés (49).

L'élimination du virus est associée à une induction rapide d'AcN durant la phase aiguë de l'infection. De manière assez surprenante, les chimpanzés qui réussissent à se débarrasser du virus perdent ces anticorps une fois l'infection résolue, ce qui pourrait contribuer à l'absence ou la diminution de l'immunité contre une réinfection ultérieure comme cela est observé chez l'humain (88, 110). A l'inverse, une infection chronique par HCV est caractérisée par une absence complète ou une diminution de la capacité à neutraliser le virus durant cette phase aiguë, s'accompagnant d'un délai dans l'induction des AcN dans la phase tardive de l'infection (133).

2 Les modèles murins

2.1 Le virus de la chorioméningite lymphocytaire

Le LCMV, découvert en 1933 (Armstrong et Lillie, 1934), est un modèle reconnu d'infection persistante. Il a permis de très nombreuses avancées dans le domaine de l'immunologie telles que l'étude des phénomènes d'immunopathologie et de tolérance (18, 189) et de présentation antigénique dans un contexte du soi (189).

Le LCMV présente de nombreuses similitudes avec des virus provoquant des infections persistantes chez l'homme. Il peut entraîner des infections persistantes ou bien être éliminé par le système immunitaire suivant les cas de figures (91). Il peut infecter le foie, entraîner des hépatites (107) et il a été démontré que la réponse cellulaire est au centre du contrôle de cette infection.

Pour son comportement proche des infections persistantes humaines, le virus étant bien caractérisé et de nombreux outils de laboratoire ayant été développés pour étudier LCMV, il s'avérait un modèle de choix pour le travail à réaliser dans ce projet.

2.1.1 Généralités et structure

LCMV est un virus type de la famille des *Arenaviridae* avec des virions à enveloppe lipidique sphérique d'un diamètre moyen de 90 à 110nm et dont la surface est couverte de glycoprotéines (22). C'est un virus non cytopathogène enveloppé, relâché par bourgeonnement (18, 187).

Le génome viral consiste en deux segments d'ARN simple-brin ambisens de tailles inégales : un court (3,4kb) ARN S et un long (7,2kb) ARN L. Chaque segment d'ARN code

pour deux protéines en sens opposés, séparées par une épingle à cheveux intergénique. L'ARN S code pour le précurseur de la glycoprotéine virale (GP-C) et la nucléoprotéine (NP) (167) alors que l'ARN L code pour la polymérase spécifique du virus (L) et une protéine impliquée dans la régulation de la transcription (165). GP-C, une fois transcrit, code les deux glycoprotéines virales : GP-1 (44kD) et GP-2 (35kD) (184). Un homotétramère transmembranaire de GP-2 surmonté d'un homotétramère de GP-1 forment les spicules présentes à la surface des particules virales (23).

L'hôte naturel du LCMV est la souris, mais il peut infecter de nombreuses autres espèces, dont les humains, lorsqu'ils sont en présence d'aérosols d'urine de rongeurs contaminés (18).

Après pénétration dans l'organisme, le virus peut infecter de multiples types cellulaires incluant les macrophages, les cellules dendritiques, mais aussi le système nerveux central (101, 104, 160). Pour cela, il utilise différents récepteurs cellulaires dont l' α -dystroglycan (α -DG), connu comme étant le récepteur commun pour de nombreux arnavirus dont LCMV, mais aussi le virus de la fièvre de Lassa (24). C'est une glycoprotéine de la membrane périphérique qui est associée de manière non-covalente avec la protéine transmembranaire β -dystroglycan (β -DG) (77). L' α -DG interagit avec des composants de la matrice extracellulaire alors que β -DG interagit avec le cytosquelette, faisant le lien entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Le complexe du dystroglycan est exprimé à différents niveaux dans la plupart des organes (47). Dépendamment de quels organes sont infectés, les patients peuvent développer des symptômes d'encéphalite, méningite ou fièvre hémorragique, bien que cela soit très rare (18).

2.1.2 Les souches de LCMV

Dans de nombreuses études *in vivo* les souches de LCMV ont démontré un haut niveau d'homologie avec cependant des tropismes tissulaires variés et différents devenirs d'infections, bien qu'elles aient le même récepteur (14, 41).

Le choix des souches pour notre étude a été fait pour garder une continuité avec les travaux déjà effectués par d'autres équipes. En effet, notre hypothèse de recherche sur l'influence de l'IL-10 s'inscrit plutôt dans la continuité des travaux du laboratoire du Dr. Oldstone, qui utilise les souches Armstrong53b (Arm) et Clone 13 (Cl13) dans ses expériences (16). Au contraire, l'hypothèse sur la modification de la maturation d'affinité par LCMV se base plutôt sur des travaux effectués par le Dr. Zinkernagel, qui lui utilise essentiellement la souche WE du virus (187).

Les souches et leurs variants peuvent être séparés en deux groupes fonctionnels. Le premier groupe dans lequel se retrouve la souche Cl13, mais aussi d'autres comme Traub et WE54, démontre une forte affinité de liaison avec l' α -DG et une dépendance à cette molécule pour l'entrée dans la cellule-cible (166). Ces virus causent généralement une infection persistante, corrélant avec une habileté à infecter les cellules de la pulpe blanche de la rate et une perte de la réponse CTL spécifique au virus (166). Le second groupe, comprenant les souches Arm, E350, WE et WE2.2, démontre une faible liaison ou l'absence de liaison avec l' α -DG et une dépendance réduite à cette molécule pour l'entrée dans la cellule-cible. Ces virus se répliquent majoritairement dans la pulpe rouge de la rate et sont rapidement éliminés par le système immunitaire (166).

Des études ont démontré des différences entre la souche Arm et son variant Cl13. Les deux souches causent une infection persistante lors d'une infection congénitale *in utero* ou néonatale mais seule Cl13 persiste dans le cas de l'infection intraveineuse d'une souris adulte (4, 151, 152). Cl13 injecté i.v. chez une souris adulte a été observé comme se répliquant dans la pulpe blanche de la rate et infectant les cellules dendritiques. Arm

au contraire, se localise préférentiellement dans la pulpe rouge de la rate, avec une absence quasi-complète de la pulpe blanche (14). Cl13 diffère de Arm par 5 nucléotides, provoquant seulement 2 changements d'acides aminés (260 de GP-1 et 1079 de la polymérase virale) dans le cadre ouvert de lecture (152). La présence d'une leucine à l'acide aminé 260 chez Cl13 lui procure une forte affinité dans la liaison à α -DG alors que dans le cas d'Arm, la présence d'une phénylalanine diminue cette liaison mais lui permet d'interagir avec un autre récepteur inconnu, permettant une entrée indépendante du α -DG (166).

Les caractéristiques d'intérêt en rapport avec notre étude, telles que le tropisme *in vivo* pour les organes lymphoïdes par rapport au système nerveux central (2, 3, 100), le potentiel répliquatif en fonction de sa résistance à l'inhibition par les interférons (IFN) (119) ainsi que le potentiel relatif à provoquer un épuisement des CTL et ainsi établir une infection persistante (3, 79, 120, 123, 135) sont représentées pour les souches utilisées dans le cadre de l'étude dans le tableau 1.

Souche virale	Tropisme organes lymphoïdes/SNC	Résistance aux interférons	Potentiel d'établissement de la persistance
Clone 13	Haute	Résistant	Fort
WE	Haute	Sensible	Intermédiaire
Armstrong	Faible (neurotropique)	Sensible	Faible

Tableau 1 Les souches de LCMV. Les souches de LCMV présentent des caractéristiques variées notamment au niveau de la réponse immunitaire, ce qui leur donne un potentiel plus ou moins important d'établissement de persistance lorsqu'elles infectent un hôte.

Les souches de LCMV ayant un tropisme important pour les organes lymphoïdes, une grande vitesse de répliquaison et une relative résistance aux mécanismes de la défense

innée de l'hôte tel que les IFNs ont une forte propension à établir une infection persistante.

2.2 Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV)

Dans le but de comparer l'influence d'une infection persistante par rapport à une infection aiguë, il était nécessaire de faire appel à un modèle murin d'infection aiguë. Notre choix s'est porté sur le VSV car ses caractéristiques sont bien connues et il est largement utilisé comme un modèle d'infection aiguë.

Le VSV fait partie de la famille des *Rhabdoviridae*. Il présente une morphologie particulière en balle de fusil de 180nm de long par 75nm de large. Il existe plusieurs sérotypes de VSV mais les deux principaux sont Indiana (VSV-Ind) et New Jersey (VSV-NJ) (179).

Il possède un génome ARN à polarité négative de 11kb et se réplique entièrement dans le cytoplasme des cellules hôtes (95). L'ARN code pour cinq protéines majeures : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de la matrice (M), la glycoprotéine (G) et une large polymérase (L) (179). La glycoprotéine sert à la fois à la fixation à la cellule hôte mais aussi à la fusion des membranes cellulaires et virales (95). La glycoprotéine se lie à la phosphatidylserine qui procure au virus un tropisme cellulaire très large.

Ses hôtes primaires sont les bovins et les porcs mais il peut aussi infecter d'autres espèces comme les chevaux, les rongeurs ou les humains, bien que cela reste rare (109). Son mode de transmission entre les individus semble être par l'intermédiaire d'un vecteur insecte (moustiques, mouches des sables et mouches noires) (109). La majorité des infections humaines sont asymptomatiques bien que quelques symptômes grippaux

puissent lui être attribués. Un unique cas d'encéphalite a été rapporté chez un enfant de trois ans (145).

2.3 Les réponses immunitaires anti-virales

La réponse immunitaire antivirale joue un rôle central dans le devenir d'une infection par LCMV ou VSV chez la souris. Son rôle de contrôle pour éliminer le virus empêche l'établissement d'une infection persistante et ses conséquences pathologiques associées. De manière assez contradictoire, cette réponse peut aussi entraîner des dégâts importants chez la souris infectée (45). De nombreux facteurs à la fois viraux et de l'hôte conditionnent le déroulement de l'infection, rendant parfois fastidieuses les expériences sur différentes souches du virus. La majorité de ces facteurs agit en modifiant la balance entre réplication virale et réponse immunitaire.

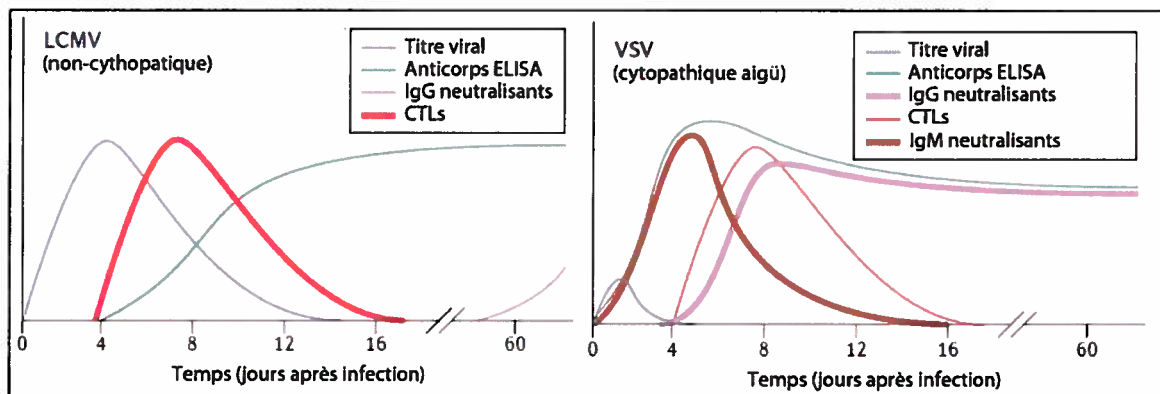


Figure 3 Cinétiques d'apparition de différents effecteurs immunitaires (adaptée de Hangartner *et al.* 2006). Dans le cadre d'une infection à VSV et LCMV, les deux virus provoquent deux cinétiques de réactions immunitaires très différentes. L'infection par VSV est surtout contrôlée par les anticorps alors que celle par LCMV est surtout contrôlée par les lymphocytes T cytotoxiques.

Le principal mécanisme mis en place pour le contrôle d'une infection aiguë par un virus comme VSV est la production d'anticorps neutralisants. Ces derniers apparaissent très rapidement, dans les premiers jours de l'infection (figure 3) (127). Ces anticorps, par de nombreux mécanismes, empêchent la propagation du virus et ainsi limitent la charge virale circulante. Par conséquent, les souris infectées sont capables de produire les anticorps rapidement sans faire intervenir le mécanisme de maturation d'affinité (82). A l'opposée, ces anticorps apparaissent avec un délai très important dans le cas d'une infection par LCMV (figure 3), ce délai variant de deux à plusieurs mois (17, 18) suivant les souches de souris, le virus et l'âge des individus. Il a été démontré en 2004 que les différences de cinétiques d'apparition des AcN pouvaient en partie être attribuées à la glycoprotéine virale en elle-même et non au virus qui la porte (138). En effet, lorsque des virus recombinants VSV et LCMV ont été générés dans lesquels les glycoprotéines ont été échangées, l'apparition d'anticorps neutralisants est inversée, démontrant bien que la glycoprotéine contribue fortement au retard d'apparition des anticorps (138).

La défense contre le pathogène ne pouvant être assurée par les AcN, le mécanisme immunitaire central dans le contrôle de la réplication de LCMV et de sa destruction est la réponse CTL CD8⁺ spécifique au virus (178), avec un pic d'activité environ une semaine après infection (58). Ces CTLs tuent les cellules infectées à l'aide de perforines et l'IFN- γ joue un rôle important dans la résolution de l'infection (81). Les individus incapables de monter une réponse cytotoxique efficace (par exemple des souris infectées au stade néonatal) deviennent infectés de manière persistante à vie (55). Cette réponse optimale est induite quand une charge virale faible voir modérée est présente dans les tissus lymphoïdes d'une souris immunocompétente adulte qui alors éliminera rapidement l'infection (18). Sur le long terme, (après 6 à 8 semaines), les CTLs ne peuvent agir sans le soutien des cellules T CD4⁺ et des cellules B productrices d'AcN. Ces autres composantes ne sont pas en mesure d'assurer l'élimination de l'infection par elles-mêmes mais si elles ne sont pas présentes en plus de la réponse CTL, le virus ré-émerge (139). Toute situation durant laquelle la charge virale critique est dépassée rapidement après l'infection (pendant l'induction de la réponse CTL spécifique au virus) résulte en un

épuisement des CTL antiviraux et fait pencher la balance en faveur de la persistance (18, 122).

3 Les mécanismes d'échappement viraux

Les virus et leurs hôtes ont eu des milliers d'années de coévolution pour développer des stratégies d'adaptation. Alors que leurs hôtes développaient des systèmes immunitaires de plus en plus sophistiqués dans le but de limiter les dommages infligés par les infections virales, les virus ont quant à eux acquis des mécanismes leur permettant d'éviter la destruction par évation de la réponse immunitaire (188). D'un point de vue viral, il existe deux grands modes de fonctionnement de l'évasion, comportant eux-mêmes de nombreux mécanismes.

Les virus à ADN, ayant un génome complexe de grande taille codant pour des centaines de gènes, utilisent une stratégie dite de « camouflages » et « sabotage ». En effet, ils peuvent se permettre de consacrer un certain pourcentage de leurs gènes pour coder des polypeptides très évolués qui vont interagir avec le système immunitaire pour déranger la réponse immunitaire normale et ainsi permettre l'échappement viral (96). À l'inverse les virus à ARN, qui possèdent des génomes à la taille très limitée, échappent la plupart du temps au système immunitaire avec une stratégie basée sur leurs hautes vitesses de réplication et capacité à se modifier, profitant de la très faible fidélité de leur machinerie de réplication pour acquérir de nombreuses mutations (96). Bien que la majorité de ces mutations soient dommageables pour le virus, elles permettent au final une plus grande adaptation de la population virale avec un mode de sélection ressemblant à celui de la théorie darwinienne (80).

Dans la présente revue de littérature, je vais succinctement m'intéresser au premier mode de fonctionnement, qui est celui employé par la plupart des virus persistants d'intérêt pour l'étude dont le VIH, HCV et LCMV.

Le haut taux de réplication des virus à ARN (par exemple HCV : 10^{12} virions/jour) et la faible qualité de l'activité de correction d'épreuve de leur polymérase conduisent au un très haut taux de mutation du génome ($1,5-2.10^3$ /site/génome/an pour HCV), ce qui génère une très grande diversité génétique (19). Le rôle de la réponse immunitaire dans la sélection naturelle des mutants ayant connu un « changement de forme » est cependant contesté. Le modèle LCMV a permis de nombreuses avancées dans ce domaine, notamment la découverte que pour qu'un échappement apparaisse, il faut que la réponse immunitaire soit ciblée et sélective et que la population virale soit importante pour augmenter les chances de voir apparaître des mutations d'intérêt pour la survie du virus (121). Des effets similaires ont été observés *in vitro* (1). Dans la plupart des cas où l'un de ces deux critères n'est pas respecté, le virus se fera éliminer sans avoir eu le temps de s'adapter à son hôte.

La stratégie d'échappement basée sur la vitesse de réplication repose sur la prolifération rapide afin que la quantité de virus produits par réplication virale soit plus importante que la quantité de virus détruits par le système immunitaire. Dans le cas de LCMV comme dans celui du VIH et de HCV, une charge virale forte conduit la plupart du temps à un épuisement des cellules T. Tous les facteurs qui diminuent le maintien de la réponse $CD8^+$ de l'hôte, comme par exemple le manque de cellules T $CD4^+$ (11), sont à même de promouvoir l'échappement favorisé par la rapidité. Il est cependant intéressant de constater que le manque de cellules $CD4^+$ positives ne mène pas systématiquement à un épuisement total mais, dans certaines circonstances, à un maintien de lymphocytes T $CD8^+$ avec des fonctions effectrices réduites (186). Il est probable que l'exposition des lymphocytes T $CD8^+$ à de forts taux d'Ag dans des circonstances où la présentation antigénique ne se fait pas sur des DCs spécialisés (par exemple dans des organes non-lymphoïdes) sans aide des lymphocytes $CD4^+$ favorise la mort cellulaire induite par l'antigène (AICD) (96).

Les mutations peuvent entraîner des modifications des sites cibles des Ac mais aussi des molécules reconnues par les récepteurs des cellules T, conférant alors un avantage au nouveau variants vis-à-vis de l'hôte. Pour les Ac, les variants viraux, aussi appelés quasi-espèces, sont sélectionnés pour avoir modifié ou perdu un site de neutralisation généralement situé sur les protéines de surface virales (21). La sélection des variants viraux ayant subi une mutation sur les protéines internes est elle favorisée par l'activité des lymphocytes T car ces derniers détruisent les virus non-variants et augmentent la niche des variants mutés (153). Les interférons, qui ont une activité antivirale, peuvent quant à eux provoquer l'apparition de variants présentant une résistance accrue à leur action. Ce phénomène a été observé lors d'infections chroniques à HCV, durant lesquelles le manque de réponse aux thérapies par IFN a pu être associé à l'émergence de variants viraux résistants aux IFN (132).

Parmi les nombreux mécanismes de résistance connus, il a récemment été mis en évidence un détournement de la régulation de la réponse immunitaire par certains virus. En effet, des taux anormalement élevés d'IL-10, une cytokine immunosuppressive, ont été associés à des infections persistantes par HCV (73, 183), le VIH (30, 130) et LCMV (48). De manière générale, cette cytokine inhibe un large spectre de réponses immunitaires cellulaires : elle supprime la fonction des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocytes T en inhibant la production de cytokines proinflammatoires, la co-stimulation, l'expression des CMH de classe II et la sécrétion de chimiokines (118, 134). Il a été démontré que lors d'une infection par LCMV d'une souris IL-10KO, il y avait perte de persistance du virus que l'organisme arrivait alors à éliminer plus rapidement (48). Cette découverte ouvre la porte à l'implication de certaines cytokines immunomodulatrices dans le processus de persistance des virus. En 2006, l'équipe de Brooks a caractérisé plus précisément les mécanismes pouvant être à la base de cette perte de persistance.

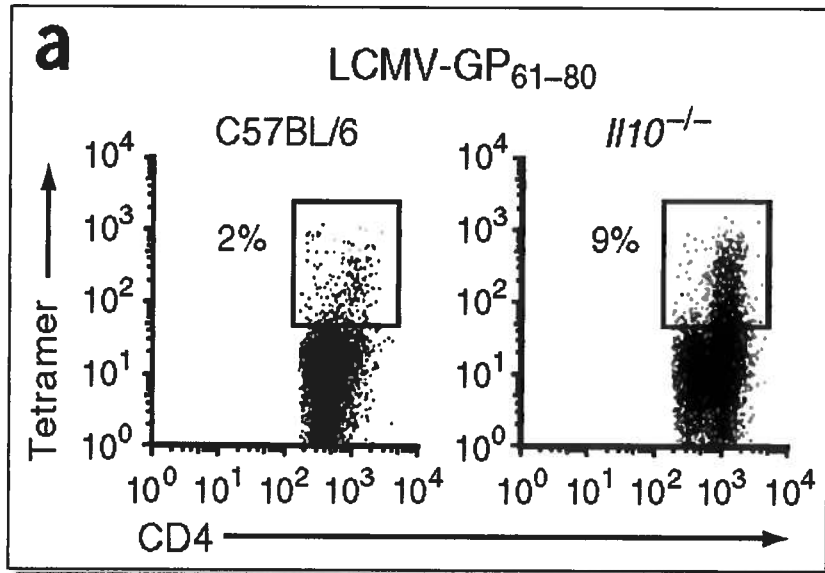


Figure 4 La quantité de lymphocytes T spécifiques au virus est plus importante après infection de souris déficiente en IL-10 avec LCMV Clone 13 (Brooks *et al.* 2006). Quantification des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du virus LCMV Cl13 neuf jours après une infection de souris C57BL/6 ou de souris IL-10KO. Les cellules sont visualisées en cytométrie en flux par marquage tétramérique au GP₆₁₋₈₀ (tétramère spécifique des lymphocytes T CD4⁺).

Leurs travaux mettent notamment en évidence une influence de l'IL-10 sur la quantité de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au virus dans le cadre d'une infection par Cl13 (figure 4) (16). Des résultats similaires sont démontrés concernant les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (16).

4 Les lymphocytes B

Bien qu'ils ne semblent pas vraiment présenter de différences au niveau morphologique, les lymphocytes B présentent une importante hétérogénéité du point de vue du développement et de la fonction. Les lymphocytes B (pour *bursal* ou *bone marrow-derived*) ont originalement été découverts à la fin des années 50 (63) mais il a fallu attendre 1968 pour que leur relation avec la production d'Ac soit mise en évidence (112, 114).

4.1 Production et maturation dans la moelle osseuse

Les lymphocytes B sont continuellement produits dans le foie fœtal avant puis dans la moelle osseuse après la naissance, aussi bien chez l'homme (60) que chez la souris (143). Ils dérivent de cellules souches hématopoïétiques au travers d'un processus complexe qui a lieu dans un environnement idéal pour la maturation et la différenciation. Une succession de contacts cellulaires et d'expression (ou de perte d'expression) de récepteurs spécifiques à leur surface sont la clef de ce processus.

Les premiers précurseurs des lymphocytes B entrent en interaction avec les cellules stromales environnantes dans l'endosteum de la moelle osseuse (136). Cette interaction est médiée par la liaison de l'intégrine VLA-4 du précurseur avec le VCAM-1 des cellules stromales (115). En conséquence de cette première interaction avec les cellules stromales, les gènes d'activation de la recombinaison (RAG-1/2) sont activés et déclenchent le réarrangement des gènes codant pour les chaînes lourdes d'immunoglobulines (réarrangement D avec J) (128, 156). Les lymphocytes B atteignent alors un stade de développement appelé cellule pro-B précoce (148). Suite à cette interaction, ces cellules se mettent aussi à exprimer à leur surface le récepteur de l'IL-7 tout en continuant les réarrangements de gènes d'immunoglobulines. Elles deviennent

alors des cellules pro-B tardives. Le microenvironnement cellulaire, de son côté, se met à produire des cytokines spécifiques qui encouragent la survie et la prolifération, notamment l'IL-7 (90). La liaison de l'IL-7 avec son récepteur va provoquer le réarrangement V avec DJ et la cellule atteint un stade appelé large pré-B une fois sa chaîne lourde totalement constituée (113). A partir de ce stade de maturation, la cellule large pré-B va pour la première fois exprimer à sa membrane un pré-récepteur des cellules B (pré-RCB, figure 5) qui remplira temporairement le rôle du futur RCB complet.

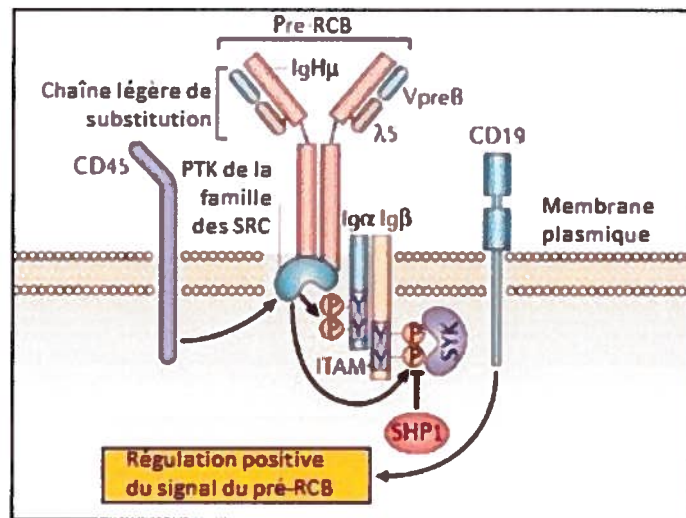


Figure 5 La structure du pré-RCB (traduit de Monroe, 2006). Le pré-RCB contient une forme transmembranaire de chaîne lourde d'immunoglobuline associée de manière non-covalente à un hétérodimère de CD79a et b (Igα et Igβ) et une chaîne légère de substitution composée des molécules λ5 et VpreB (150). Plusieurs protéines associées jouent un rôle dans la transduction du signal du pré-RCB comme : une protéine tyrosine kinase (PTK) de la famille sarc (SRC), une spleen tyrosine kinase (SYK), CD19, CD45 et une protéine tyrosine phosphatase contenant un domaine SH2 (SHP1).

La liaison du pré-RCB aux cellules stromales environnantes inhibe d'autres réarrangements géniques suite à l'exclusion allélique (voir partie 6) et permet la multiplication des futurs lymphocytes B qui deviennent alors des petites cellules pré-B. Ces cellules vont alors arrêter leur multiplication et engager le réarrangement VJ des gènes de leurs chaînes légères (158). Les réarrangements productifs permettront l'expression d'une IgM (RCB complet, figure 6) à la membrane de la cellule qui devient alors une cellule B à part entière. Ces cellules sont cependant encore considérées comme immatures car incapables de proliférer sans activation du RCB.

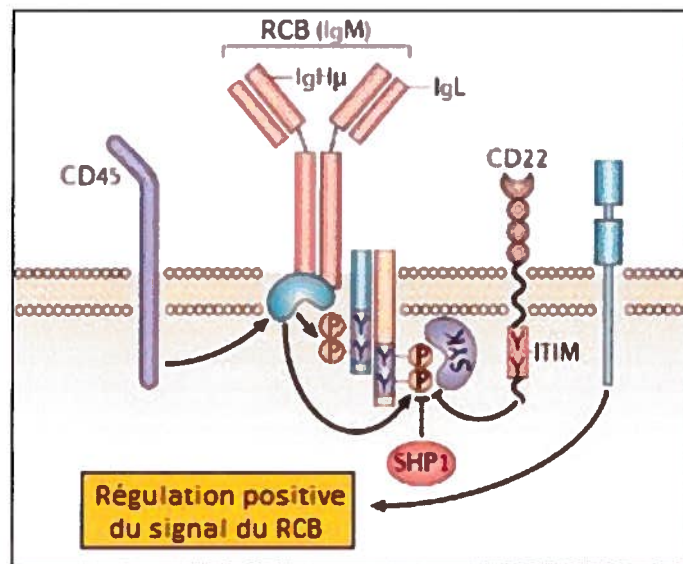


Figure 6 La structure du RCB (traduit de Monroe, 2006). Le RCB complet possède une structure très proche du pré-BCR. La différence majeure étant que dans le BCR, la chaîne lourde est associée à la chaîne légère (IgL) codée par l'ADN réarrangé du lymphocyte B

4.2 Maturation dans la rate

Les cellules immatures, aussi appelées « de transition », peuvent répondre à certains antigènes (comme les lipopolysaccharides de bactéries) de manière T-indépendante, ce qui élicite une réponse d'anticorps rapide (36). Cependant, elles ont une demi-vie très courte (quelques jours) comparée à celle des cellules B folliculaires (plusieurs mois) (27). Elles migrent par la circulation sanguine vers la rate pour y poursuivre leur maturation.

La rate (figure 7) est composée de deux principaux types de tissus. La pulpe rouge (PR) est constituée de sinus veineux et de cordons cellulaires contenant de très nombreux types cellulaires (macrophages, érythrocytes, plaquettes, etc.). La pulpe blanche, correspondant au tissu lymphoïde, est située pour l'essentiel autour d'une artériole centrale, constituant le manchon lymphoïde péri-artériel (PALS). Celui-ci comporte des lymphocytes T principalement localisés autour de l'artériole (zone T) et des lymphocytes B organisés en follicules primaires non-stimulés (cellules B naïves) ou secondaires stimulés (centre germinatif (GC) avec cellules mémoires).

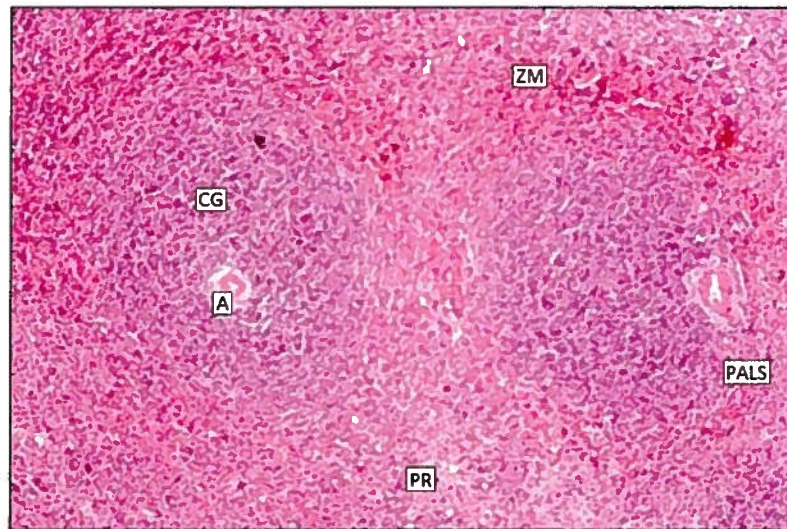


Figure 7 Structure de la rate de souris Coupe de rate montrant un follicule lymphoïde secondaire avec des GCs entourés par leurs zones marginales (ZM) et la PR. Près de chaque follicule, une artériole (A) est entourée par les PALS.

Les GCs furent décrits pour la première fois en 1884 mais leur rôle en tant que site principal de formation de cellules plasmiques sécrétant des Ac de haute affinité et de lymphocytes B mémoires n'a été mis en évidence qu'un siècle plus tard (78). Les lymphocytes B, une fois pénétrés dans les GCs, vont proliférer (expansion clonale) et activer une enzyme appelée la cytidine deaminase induite par l'activation (AID). Cette enzyme provoque un processus appelé hypermutation somatique permettant la génération d'un répertoire de haute affinité formant la mémoire de l'immunité humorale (78, 84). Ils vont ensuite être sélectionnés par une présentation d'antigène par des DCs folliculaires (FDC) et seules les cellules dotées de la plus forte affinité pour le dit-antigène survivront. Elles pourront ensuite éventuellement subir la permutation de classe et quitter le follicule soit en tant que cellule B mémoire soit en tant que précurseur des plasmocytes.

Il existe d'autres sous-types de lymphocytes B aux fonctions différentes. Les lymphocytes B-1, décrits pour la première fois en 1983, sont une sous-population CD5+ (71) distincte des cellules B conventionnelles (B-2) essentiellement car ils sont en charge de la production des anticorps naturels (70). Leur origine reste toujours controversée à l'heure actuelle, notamment à savoir s'ils proviennent des mêmes progéniteurs que les lymphocytes B-2. Les lymphocytes B ZM sont une population de cellules B murines de la rate qui ont les attributs de cellules naïves et mémoires (137). Ils constituent une première barrière contre les infections sanguines de bactéries encapsulées.

5 Les anticorps

Il existe de nombreuses cellules effectrices aux fonctions très différentes dans le système immunitaire. Parmi elles, les lymphocytes B sont génétiquement programmés

pour exprimer des récepteurs extérieurs spécifiques d'un antigène particulier. Cette molécule réceptrice de l'antigène s'appelle un Ac (également appelée immunoglobuline (Ig)). Si une cellule B se lie à son antigène spécifique par ce récepteur, elle se multipliera alors et se transformera en plasmocyte, produisant en grande quantité un Ac et le sécrétant. Ces molécules d'Ac, dans leur forme sécrétée, sont des glycoprotéines de grande taille (plusieurs kilodaltons (kDa)) présentes dans le sang et les liquides tissulaires et, puisqu'elles sont une version soluble de la molécule originale du récepteur (Ac), elles se lient au même antigène que celui qui a activé le lymphocyte B à l'origine.

5.1 Structure générale

La structure de base de chaque molécule d'Ig est une unité en Y faite de deux chaînes polypeptidiques légères (25kDa) et deux chaînes polypeptidiques lourdes (55kDa) liées par des ponts disulfures et des liaisons non covalentes (figure 8) (72). Les séquences d'acides aminés des deux chaînes légères sont identiques et il en va de même pour les chaînes lourdes (85). Elles sont repliées en domaines distincts d'environ 110 acides aminés montrant des homologies significatives permettant la formation de motifs conformationnels appelés boucles d'Ig. Cette structure caractéristique définit les membres de la superfamille des Ig (181).

En 1958, Porter a aussi découvert que la papaïne pouvait cliver les Ac en deux portions de protéines : deux fragments de liaison à l'antigène (Fab) et un fragment cristallisable (Fc) (141). Le clivage permettant l'obtention de ces fragments a lieu au niveau des ponts disulfures les séparant et qui sont appelés le Hinge (125, 131).

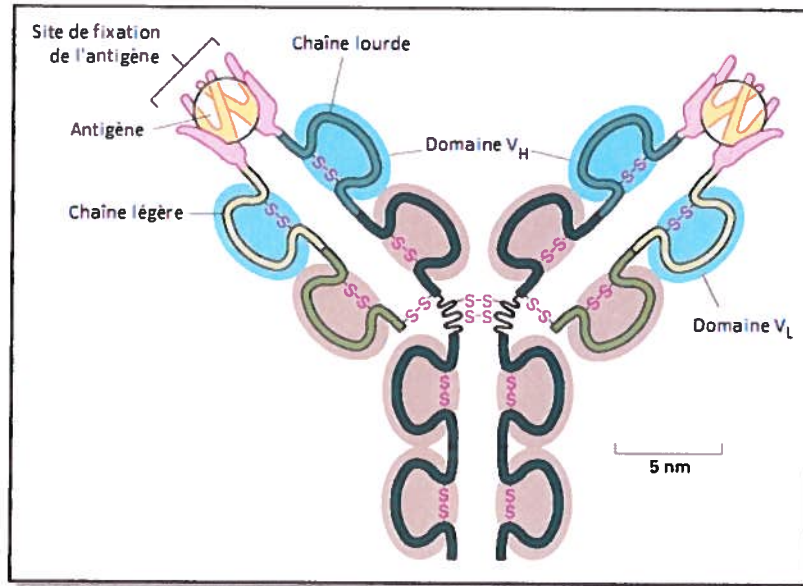


Figure 8 Structure d'IgG La structure des IgG est caractéristique de la structure globale des Ac

Il existe plusieurs types de chaînes lourdes qui varient suivant la classe d'Ig ainsi que deux types de chaînes légères : κ et λ . Dans chaque chaîne légère il y a une partie carboxy-terminale constante (domaine C_L) pour chaque isotype (κ et λ) et une partie amino-terminale unique à chaque protéine (domaine V_L) (97). Dans le même ordre d'idée la partie amino-terminale des chaînes lourdes présente un domaine variable (V_H) alors que les autres domaines de la chaîne sont constants (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} et éventuellement C_{H4} chez certaines classes d'Igs) et ne sont pas impliqués dans la liaison antigénique (85).

Les deux domaines V, qui présentent des segments polypeptidiques avec une variabilité exceptionnelle (régions hypervariables) (25), contiennent des sites de liaison antigénique identiques qui, en général, sont spécifiques d'un seul type d'antigène (185). Les Ig fournissent donc un répertoire très large de sites de fixation antigénique. Cette grande diversité des régions variables est générée par des mécanismes uniques aux cellules B et qui seront décrits plus loin (voir partie 6).

5.2 Les différentes classes d'anticorps

Les Ig forment une famille comportant 5 classes distinctes chez l'Homme : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE (85). Toutes ces classes d'Ac diffèrent par leurs tailles, leurs charges, leurs séquences d'acides aminés ainsi que leurs contenus en glucides. La classe IgG peut elle-même être subdivisée en quatre sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) alors que les IgA comportent deux sous-classes (IgA1 et IgA2) (92). L'ensemble des classes et sous-classes représente donc au total neuf isotypes différents, présents chez tous les individus normaux. Certains antigènes induisent la production d'Ac de tout les isotypes alors que d'autres provoquent une réponse limitée à certaines classes ou sous-classes (97).

Le type de chaîne lourde définit la classe d'Ig : μ (IgM); $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ et γ_4 (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4); α_1 et α_2 (IgA1 et IgA2); δ (IgD); ϵ (IgE) (85).

Les différentes classes ont aussi des rôles différents au sein du système immunitaire :

L'IgG est l'Ig prédominante dans le sérum humain normal du fait de sa stabilité, elle compte pour 70 à 75% de la quantité totale d'Ac sériques (149). C'est une molécule monomérique dont le poids moléculaire est de 146-170 kDa. Les quatre sous-classes ont une structure très homologue mais ont des profils de fonctions effectrices uniques, activant plus ou moins efficacement le complément par sa voie classique (154).

L'IgM compte pour environ 10% de la quantité totale des Igs sériques et est l'Ac qui prédomine au cours de la réponse immunitaire primaire (85). Elle est pentamérique et est d'un poids moléculaire d'environ 970 kDa mais il en existe cependant une forme monomérique transmembranaire qui agit comme un récepteur critique pour la maturation des cellules B (182).

L'IgA comporte deux sous-classes : IgA1 et IgA2 (92). Les IgA1 sont la classe dominante dans les sécrétions séromuqueuses (salive, colostrum, lait, etc.) (111) alors que les IgA sériques comptent pour 15-20% des Ac totaux et sont essentiellement de la seconde

sous-classe (111). Chez l'Homme, plus de 80% des IgA est monomérique mais chez la plupart des mammifères elle est surtout dimérique (40). Son poids moléculaire est d'environ 385 kDa.

L'IgD compte pour moins d'1% des Ig sériques et est probablement l'isotype le moins connu. Sa forme transmembranaire monomérique (IgDm) est cependant le récepteur d'antigène spécifique des cellules B matures (85).

L'IgE est monomérique et est d'environ 188 kDa. Son taux sérique est très faible comparé aux autres classes d'Ac mais elle peut se lier à des récepteurs spécifiques de très haute affinité sur les basophiles et les mastocytes (13, 180).

5.3 Fonctions des anticorps

Les Ac, une fois sécrétés par les cellules B, sont relâchés dans la circulation sanguine et peuvent ainsi entrer en contact avec leur antigène à travers tout l'organisme au moyen de leurs régions Fab (97). Les pathogènes ont typiquement de nombreux antigènes différents à leur surface. Chaque Ac peut se lier à un épitope particulier, qui correspond à une partie restreinte de l'antigène. Un antigène complet peut contenir plusieurs épitopes différents ou répétés et les Ig se lient à un épitope spécifique et non à l'antigène dans son ensemble (141).

Les Ac sont bifonctionnels car ils doivent exécuter deux tâches en même temps : former des complexes avec les antigènes pour éviter leur propagation dans l'organisme ainsi que susciter des réponses de l'hôte pour faciliter l'élimination de l'antigène (97).

La nature de la région constante détermine la fonction effectrice de l'Ac et les réponses provoquées par sa fixation au récepteur (144). La région constante peut se lier au

récepteur Fc (FcR) de nombreuses cellules immunitaires (144). Cette double capacité de liaison à la fois au potentiel pathogène et aux acteurs immunitaires fait des Ig un excellent adaptateur permettant aux différents effecteurs immunitaires de « reconnaître » les intrus et ainsi de faciliter leur activation.

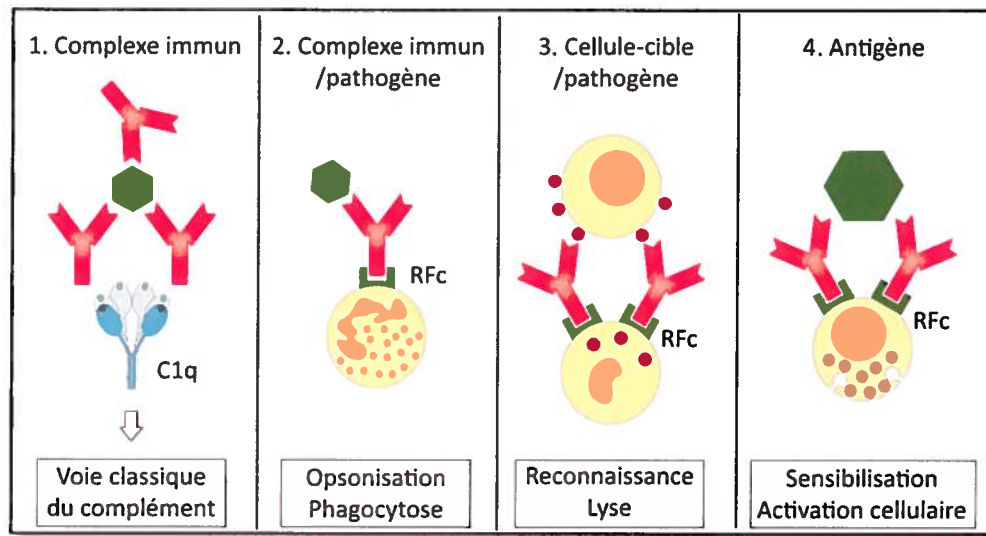


Figure 9 Les anticorps agissent comme des adaptateurs (adapté de Male, D. *Immunologie*, 2010). Ces adaptateurs servent d'intermédiaires pour l'activation du complément, l'opsonisation, la reconnaissance par les cellules NK et les cellules-cibles.

Certaines classes d'Ig, une fois liées à leurs antigènes, sont des activateurs puissants de la voie classique du complément (figure 9). C'est le cas des IgM ainsi que des IgG1, IgG2 et IgG3 (8, 154). Les IgA sont caractéristiques d'une réponse immunitaire secondaire et peuvent se fixer à leur antigène pour former des complexes immuns et activer la phagocytose par l'intermédiaire des récepteurs cellulaires Fc (CD89) (figure 9) (26, 140). Ce processus de recouvrement de la surface antigénique est appelé opsonisation. D'autres molécules, comme celles du complément, peuvent aussi opsoniser les pathogènes, optimisant ainsi l'efficacité de reconnaissance par les cellules immunitaires. Les Ac liés aux cellules infectées peuvent favoriser leur reconnaissance et leur lyse par

les cellules NK (figure 9) (175). Enfin, toujours par l'intermédiaire d'une fixation à un récepteur Fc, les Ac peuvent sensibiliser les cellules (comme les neutrophiles) en leur permettant de reconnaître l'antigène, la cellule est activée si l'antigène se lie aux Ac présents à sa surface (figure 9) (144).

Une autre stratégie utilisée par les Ac consiste à former des complexes avec les antigènes, non pas pour activer ou permettre la reconnaissance par les cellules, mais bien pour empêcher leur dissémination dans l'organisme (98). Les Ac effectuant cette action, appelés Ac neutralisants, sont des Ig de haute affinité pour leur antigène qui sont particulièrement efficaces dans le contrôle de la virémie dans le cas d'infections virales. Cette neutralisation prend effet à plusieurs niveaux au cours du cycle viral et peut se faire avec des Ac seuls ou couplés à des molécules du complément (98). Les différents niveaux d'action sont : la fixation à la cellule, par encombrement stérique, les Ac bloquent la liaison entre les récepteurs viraux et les protéines de surface virales; l'entrée dans la cellule, par stabilisation de la capsidie ou modification de structures virales; la sortie des vésicules d'endocytose, par interférence avec la fusion ou encore une fois stabilisation de la capsidie virale

6 La production des anticorps

Depuis les débuts de la biologie, le dogme avait toujours été « un gène, une protéine ». Partant de cette vérité acceptée par tous, comment un génome aux dimensions limitées pouvait-il contenir suffisamment d'informations pour générer tout le vaste répertoire d'Ac qu'un seul et unique individu est capable de produire ?

Cette question est restée longtemps sans réponse. En 1965, Dreyer et Bennett ont réalisé que la mise en évidence d'une région constante et d'une région variable sur les

Ac impliquait forcément que la protéine soit codée par au moins deux gènes différents chez les cellules B (46). Cette petite révolution dans les mœurs de la biologie a ouvert la voie à la découverte du mode de fabrication des Ac. Quelques années plus tard, Tonegawa continua les travaux de ses deux collègues et démontra que des événements de recombinaison somatique pouvaient créer, à partir de matériel génétique limité, d'innombrables permutations à l'origine de gènes codant un répertoire de récepteurs d'antigène extrêmement vaste (76).

Il existe en fait deux mécanismes fondamentaux chez les cellules B permettant la production d'Ig si variées : la recombinaison somatique et les mutations somatiques. L'ensemble de ces deux mécanismes permet l'émergence « au hasard » de nouveaux lymphocytes B qui sont ensuite sélectionnés pour leur efficacité à se lier à un antigène.

6.1 La recombinaison somatique

L'ADN germlinal à l'origine des Ac possède un niveau supplémentaire de complexité que le simple transcription-épissage-traduction des autres protéines. Les informations nécessaires à la formation des domaines variables sont présentes dans deux ou trois loci différents appelés segments géniques V, D et J (46). Ces segments sont situés à grande distance génétique des exons codant pour les régions constantes (46).

Le réarrangement génique (figure 10) des gènes d'Ig débute au locus de la chaîne lourde (97). C'est un événement précoce obligatoire dans la génération des cellules B.

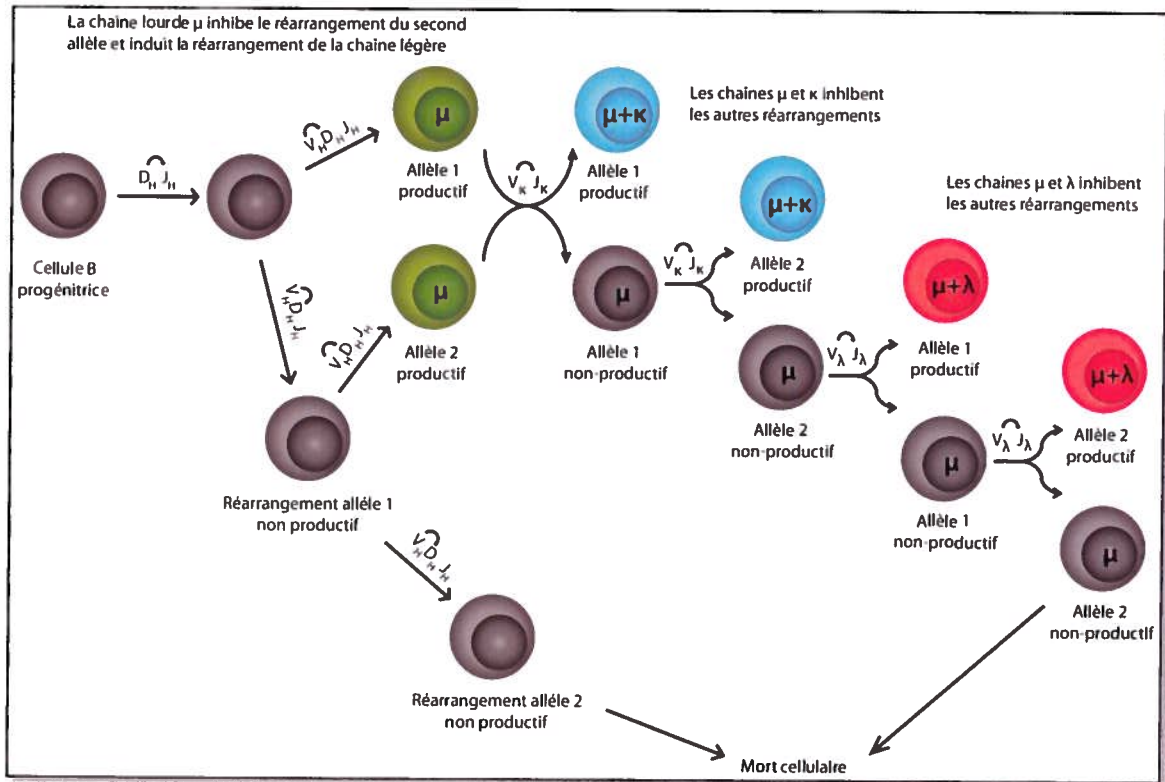


Figure 10 La recombinaison somatique chez les lymphocytes B Grâce aux recombinaisons successives des chaînes lourdes puis légères, chaque progéniteur des cellules B peut donner 64 descendants avec chacun un génome différent. Si aucun des réarrangements successifs ne sont productifs, la cellule progénitrice tombe alors en mort cellulaire.

Si ce réarrangement débouche sur un produit fonctionnel (il est alors dit « productif »), le réarrangement de la chaîne légère peut débuter, commençant avec le locus κ . Si ce réarrangement est productif, l'Ac est alors exprimé comme récepteur membranaire (97). Dans le cas contraire, c'est au locus λ d'être réarrangé. Pour chaque réarrangement il y a deux « chances » puisque l'ADN humain possède deux allèles de chaque gène (46). Si le premier réarrangement est productif, le second est inhibé, c'est ce qu'on appelle l'exclusion allélique. Sans cela, chaque cellule B pourrait exprimer deux récepteurs avec des spécificités différentes.

6.1.1 La chaîne lourde

Le locus germinal de la chaîne lourde humaine se situe sur le chromosome 14. Il contient de 38 à 46 segments géniques V_H qui codent les 95 résidus N terminaux de la région V_H . Les résidus C terminaux sont codés par des segments appartenant à un groupe de 27 D_H et 6 J_H . Pour cette raison, la recombinaison de la chaîne lourde est appelée recombinaison VDJ (figure 11) (97).

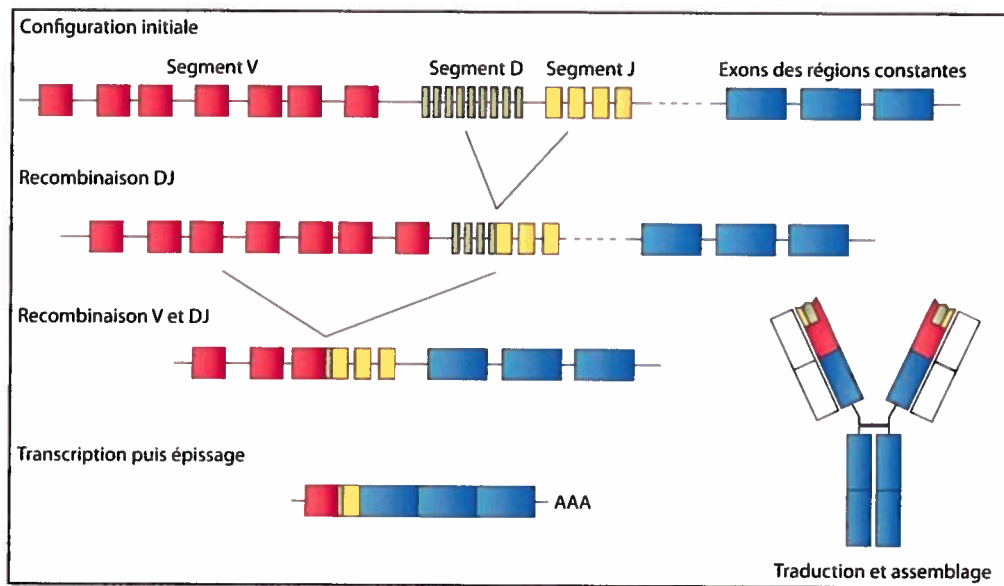


Figure 11 La recombinaison VDJ Les réarrangements sur le locus de la chaîne lourde commencent par la sélection d'un fragment D et d'un segment J. Après cette première sélection, le segment V est choisi au hasard et accolé au segment DJ.

Le premier évènement est une recombinaison entre un segment génique J_H et des segments D_H . Si celle-ci est productive, s'ensuit alors une recombinaison de cette séquence DJ avec un segment V_H , formant ainsi une séquence d'ADN VDJ continue codant la séquence protéique entière de V_H (46).

6.1.2 La chaîne légère

Le locus germinal de la chaîne κ humaine se situe sur le chromosome 2 et contient 31 à 35 segments $V\kappa$ fonctionnels codant pour les 95 résidus N terminaux de la région $V\kappa$. Les résidus C terminaux sont codés par cinq segments $J\kappa$ et un segment $C\kappa$ (ce dernier seul codant pour la partie constante) (103). Au cours du développement de la cellule B, l'ADN est réarrangé de telle manière que l'un des gènes $V\kappa$ soit joint à l'un des cinq gènes $J\kappa$. Une séquence de tête (court segment hydrophobe responsable de l'adressage au réticulum endoplasmique) précède chaque segment $V\kappa$ et permet l'attachement à la chaîne lourde. Cette séquence signal est clivée lors du passage de la protéine dans le réticulum endoplasmique (97). Dans le cas où les deux recombinaisons κ (figure 12) sont infructueuses, d'autres recombinaisons ont lieu sur le gène λ (figure 13).

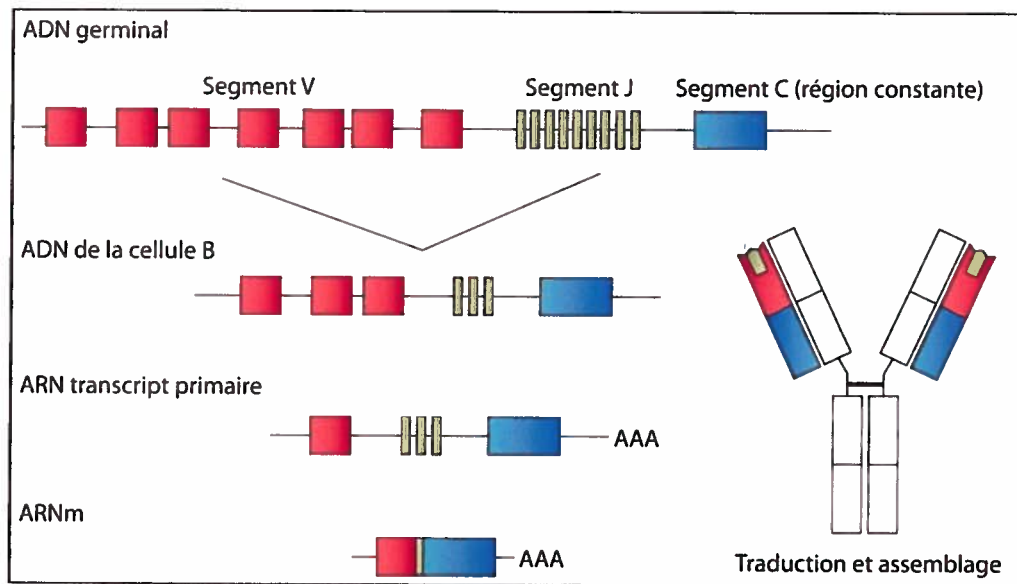


Figure 12 Recombinaison de la chaîne κ Le réarrangement de la chaîne légère κ consiste simplement en la sélection d'un segment J et d'un segment V car le locus ne comporte qu'un segment C.

Le locus germinal de la chaîne λ humaine se situe sur le chromosome 22 et comporte 29 à 33 segments V_λ codant pour les 95 résidus N terminaux de la région V_λ . Il y a 7 à 11 régions J_λ associées chacune à un gène C_λ (codant pour la partie constante) (83). Le locus λ est le résultat de la jonction entre un $V_{S\lambda}$ et 4 ou 5 J_λ . Le nombre de régions variables λ pouvant être produites ainsi varie de 120 à 160. L'imprécision de la jonction VJ amplifie la diversité. En effet, un intron est encore présent entre le gène VJ recombiné et l'exon codant la région C constante (97).

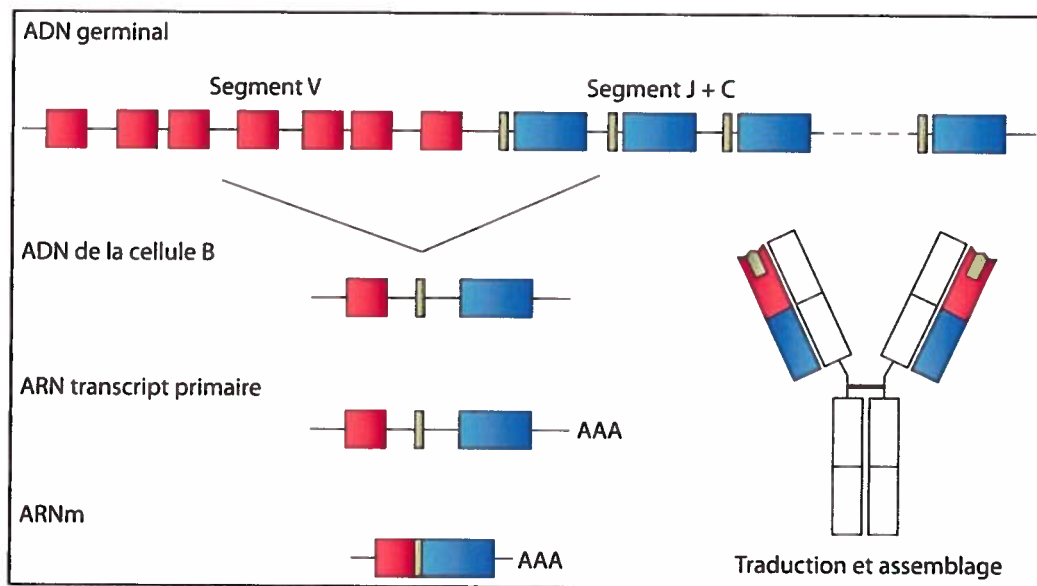


Figure 13 Recombinaison de la chaîne λ Contrairement à la chaîne κ , les segments J et C de la chaîne légère λ sont liés par paires. Le réarrangement de cette chaîne consiste donc en une sélection d'un segment V et d'une paire de segments J+C.

6.2 L'hypermutation somatique et la maturation d'affinité

Suite à la rencontre entre l'antigène et le lymphocytes B, ces derniers entrent dans les GC, prolifèrent et l'ADN codant les séquences variables des chaînes légères et lourdes subit des cycles répétés de mutations aléatoires (de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} par paire de base par génération) appelées hypermutations somatiques (162). Cette étape supplémentaire dans la maturation des lymphocytes B, orchestrée par l'AID (78, 84), a pour but d'accroître encore la variabilité de répertoire des Ac.

La survie et l'expansion des cellules B requièrent que leurs récepteurs se lient de manière spécifique à l'antigène qui leur est présenté par les FDC (39). Une majorité des cellules sera touchée par une mutation délétère et, en l'absence de signal de survie, mourra. Une minorité se liera à l'antigène avec une affinité accrue et entrera en compétition avec celles de plus faible affinité (64). Ce processus, appelé maturation d'affinité, assure une augmentation constante de l'efficacité de la réponse B contre un antigène donné (12).

Une fois les lymphocytes B avec la plus grande affinité sélectionnée, ils entrent dans la zone T des follicules pour y entrer en contact avec des cellules T $CD4^+$ folliculaires (T_{FH}) (59). Le contact avec lymphocytes T auxiliaires entraîne une prolifération clonale puis les cellules B vont se différencier en lymphocytes B mémoires ou en cellules plasmiques à longue durée de vie. Les cellules mémoires persistent pour de longues périodes et recirculent dans les organes lymphoïdes secondaires en plus de coloniser la zone marginale de la rate (157). Elles portent déjà les mutations somatiques et sont donc capables de rapidement répondre de nouveau à un antigène en sécrétant des Ac de haute affinité (106). La mémoire humorale à long terme est quant à elle maintenue par les cellules plasmiques à longue durée de vie qui migrent vers la moelle osseuse et continuent de produire des Ac (99).

6.3 La permutation de classe

Au début de la réponse immunitaire, les Ig qui sont produites sont des IgM. Environ une semaine après infection, les cellules B migrant dans les centres germinatifs reçoivent des stimuli de cytokines et des molécules CD40 et CD154, ce qui peut induire un événement appelé la permutation de classe (102). Cet événement est lui aussi dépendant de l'AID. Plus concrètement il s'agit d'une délétion sur les régions S (pour switch) se trouvant en 5' de tous les gènes codant pour les régions constantes des cellules B (97). Ce processus a pour effet de changer la classe des Ac produits par les lymphocytes (d'IgM à IgG, IgA ou IgE) sans changer la spécificité d'antigène de la protéine (102).

Chapitre 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Souris

Les souris C57BL/6 mâles et femelles de 8 à 10 semaines ont été obtenues de la compagnie Charles River (Saint-Constant, Canada). Les souris IL-10KO (souche B6.129P2-*Il10^{tm1Cgn}/J*), obtenues de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) possèdent un fond génétique de C57BL/6 à l'exception qu'elles n'expriment pas le gène de l'interleukine 10. Plus précisément, un fragment génomique de 500 paires de bases contenant le codon 5-55 du gène codant pour l'IL-10 a été remplacé par une séquence contenant un codon stop suivi d'une cassette codant pour la néomycine. Un codon stop a aussi été introduit dans l'exon 3 du gène. Aucune production d'IL-10 n'était détectable par ELISA dans le supernageant de culture *in vitro* de cellules T spléniques dérivées de souris homozygotes suivant une infection avec le nématode *N. brasiliensis* et stimulées au Con A (87).

Lors des infections avec LCMV ou VSV, les points-limites se limitaient aux signes cliniques classiques d'inconfort : dos bombé, poil ébouriffé, déshydratation. Dans le cas de VSV, ils étaient les suivants : lenteur de mouvement, difficulté à se déplacer, développement d'une fièvre, dyspnée, convulsions, saignements, dos voûté, incoordination, écoulements, déplacements en cercle, perte de poids de 15%, masse de plus de 17 mm de diamètre, difficultés respiratoires, ataxie, fourrure ébouriffée, diarrhée, déshydratation, infections, arrête de l'alimentation, inflammation, état moribond, paralysie, amaigrissements, hypothermie, tremblements, automutilation. Une fois l'expérience terminée, les souris étaient sacrifiées par gazage au dioxyde de carbone puis dislocation cervicale.

2 Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées proviennent toutes de l'ATCC. La lignée MC57G (#CRL-2295) est un fibrosarcome d'un fibrosarcome d'une souris C57BL/6. C'est le standard de nombreux laboratoires pour l'étude de l'immunité virale murine. La lignée L-929 (#CCL-1), un sous-clone de la lignée parentale de cellules L établie en 1940 par Earle, W.R., provient de fibroblastes de souris C3H/An. La lignée BHK-21 (#CCL-10) a été établie à partir de reins de hamsters nouveau-nés. Toutes les cellules ont été cultivées dans du milieu Earle's Modified Essential Medium (MEM, Invitrogen, Carlsbad, USA) dans lequel a été ajouté 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Hyclone, Logan, USA) décomplémenté 30 minutes à 56°C. Les cellules étaient incubées dans une étuve à 37°C dans une atmosphère à 5% CO₂.

3 Virus et haptène

Les virus LCMV-WE, CI13 et Arm ainsi que VSV-Ind ont été obtenus du docteur R.M. Zinkernagel (Institute of Experimental Immunology, Zurich, Suisse).

Le NP est un haptène provoquant une réponse immunitaire bien caractérisée mais qui nécessite un couplage avec une molécule porteuse. Dans notre cas, le NP a été utilisée couplé à deux molécules porteuses : l'albumine sérique bovine (BSA) et la gammaglobuline de poulet (CGG). Plusieurs ratios de molécules porteuse/NP ont été utilisés pour les tests ELISA : faible (1:3, 1:4), intermédiaire (1:7, 1:9) et fort (1:26, 1:30) alors qu'un ratio de 1:53 a été utilisé pour les injections intrapéritonéales aux souris. Deux ratios par catégorie ont été utilisés du fait que la compagnie ne produisait plus le premier ratio. Tous les réactifs contenant du NP ont été obtenus de la compagnie Biosearch Technologies Inc. (Novato, USA).

4 Productions virales

4.1 LCMV

Des cellules L-929 ont été emmenées à 80% de confluence dans des flasques de 150cm² (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) dans du milieu MEM 5% SVF. Le surnageant a ensuite été retiré et les cellules ont été infectées avec LCMV-WE, Arm ou Clone 13 à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 dans 20 mL de milieu MEM 1% SVF. Les flasques ont ensuite été incubées à 37°C 5% CO₂ pendant 48 h puis le surnageant récupéré. Plusieurs flacons ont été utilisés en même temps pour obtenir un volume suffisant à l'étape de concentration du virus. Le virus a été concentré en utilisant un dispositif Jumbosep (Pall Corporation, Ville St. Laurent, QC, Canada) contenant une membrane de filtration avec des pores de 300. Le surnageant de culture a été déposé dans le dispositif par tranches de 60 mL puis centrifugé 30 minutes à 2500 g plusieurs fois jusqu'à obtenir un volume final d'environ 10 mL. Le volume récupéré a été réparti en aliquots de 100µL puis titré.

4.2 VSV

Le protocole pour obtenir le VSV est sensiblement le même que pour LCMV à l'exception que des cellules BHK-21 ont été utilisées et qu'aucune centrifugation n'a été nécessaire pour avoir une concentration de virus exploitable.

5 Titrage des virus

5.1 LCMV

Le titrage des différentes souches de LCMV a été réalisé par décompte des plages infectieuses après culture et marquage sur des cellules MC57G. Brièvement, des dilutions en série 1:10 de production virale concentrée ont été déposées sur une monocouche de cellules MC57G dans une plaque de culture 24 puits. Les cellules ont été cultivées pendant 48 heures à 37°C dans un overlay de 1% méthylcellulose (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) et fixées à l'aide de formaldéhyde (Fisher, Ottawa, Canada) 25% dans du PBS (Invitrogen). Les cellules fixées ont été lavées, perméabilisées puis marquées avec un Ac membranaire de rat VL-4 anti-LCMV (aimablement donné par le Dr. R.M. Zinkernagel). Un Ac de chèvre anti-rat conjugué à la HRP (Jackson ImmunoResearch) puis un Ac de porc anti-chèvre conjugué à la HRP (Invitrogen) ont ensuite été ajoutés. Un substrat contenant de l'ortho-phenyl-diamine (20 mg OPD (Sigma-Aldrich), 20 µL peroxyde d'hydrogène (Sigma-Aldrich) 30%, 12,85 mL Na₂HPO₄ (Sigma) 0,2 M, 12,15 mL C₆H₈O₇ (Fisher) 0,1 M, 25 mL ddH₂O) a été utilisé pour révéler les plages infectieuses. Les titres ont été déterminés avec la formule suivante :

$$\text{Titre} = \frac{\text{Nombre de plages}}{\text{Dilution} \times \text{volume (mL)}}$$

5.2 VSV

Le protocole de titrage de VSV est pratiquement identique à celui de LCMV si ce n'est que comme le virus est lytique, il suffit de colorer avec du crystal violet (Fisher) la monocouche de cellules Vero infectées puis de compter les plages de lyse.

6 Test de neutralisation de LCMV

Des dilutions en série 1:10 d'échantillons de sérum ont été mises en contact avec 100 PFU de virus LCMV WE dans les puits d'une plaque de culture 96 puits (Fisher) pendant 1,5 h. Des cellules MC57G ont ensuite été déposées dans chaque puits pour former une monocouche de cellules et de l'overlay 1% méthylcellulose a été ajouté et les plaques ont été mises à incuber 48h à 37°C. La révélation des plages infectieuses a été faite exactement de la même manière que pour le titrage du virus. Le titre relatif a été déterminé en prenant la dernière dilution de sérum qui a provoqué une disparition de 50% des plages infectieuses.

7 Infection et immunisation des souris

Les différentes souches de souris ont été infectées par une injection intraveineuse de 200 µL contenant 10^6 à 2×10^6 PFU de virus LCMV (WE, Cl13) ou VSV. Par contre l'infection par LCMV-Armstrong a été réalisée avec une injection intrapéritonéale en utilisant les mêmes doses.

L'immunisation des souris au NP a été faite par injection intrapéritonéale de 100µg de NP₅₃-CGG dans 250 µL d'alum (Sigma-Aldrich).

Les prélèvements sanguins ont été réalisés par ponction de la veine saphène des souris à différents temps après infection ou immunisation.

8 ELISA

Le NP-BSA a été dilué à une concentration de 5 µg/mL dans du tampon carbonate (environ 87,49 mM Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich), 12,83 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich) dans de l'eau distillée) et 100 µL ont été déposés dans les puits de plaques ELISA. Ces dernières ont été incubées une heure à 37°C à l'abri de la lumière pour fixer une monocouche de NP-BSA au fond des plaques. L'expérience a été réalisée en triplicata à différents ratios (faible : NP₄-BSA ou NP₃-BSA, intermédiaire : NP₉-BSA ou NP₇-BSA, fort : NP₂₆-BSA ou NP₃₀-BSA) pour permettre de discriminer les anticorps de haute et basse affinité. 100 µL de PBS-Tween 20 (Sigma-Aldrich) 3% SVF ont été déposés et une incubation de 1 h a été réalisée pour éviter le signal non-spécifiques. Les échantillons de sérum ont ensuite été dilués 1:2000 puis en série 1:3 (jusqu'à 4,5x10⁶) et 50 µL ont été déposés dans les puits des plaques ELISA. L'Ac secondaire était 50 µL d'un Ac de chèvre anti-souris (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) couplé au HRP et dilué 1:1000 dans du PBS-Tween 20 (Sigma-Aldrich) 0,05%. L'Ac était dirigé contre les IgM et ou les IgG de souris. La révélation a été réalisée à l'aide de 100 µL d'une solution substrat (0,4 mg/mL d'ortho-phenyldiamine (Sigma-Aldrich), 0,4 µL/mL de H₂O₂ (Sigma-Aldrich), dans du tampon citrate pH5 (0,1M Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich), 0,05M C₆H₈O₇ (Fisher) dans de l'eau distillée)). L'acquisition des données se fait par lecture de densité optique à 490nm sur un spectrophotomètre Biorad Model 680.

9 Analyses statistiques

Toutes les statistiques ont été effectuées avec un test ANOVA à deux dimensions pour chaque groupe suivi d'un post-test de Bonferroni pour comparer les groupes entre eux.

Chapitre 3

RÉSULTATS

1 Influence de l'IL-10 sur la réponse humorale neutralisante

Lors des infections virales persistantes, aussi bien humaines que murines, il a déjà été démontré que la réponse en Ac ainsi que celle en AcN étaient modifiées par rapport à une apparition normale dans le cadre d'une infection aiguë (127).

Ce retard n'a jamais à ce jour pu être concrètement expliqué. Un fait parallèle intrigant est que de nombreux virus persistants provoquent une augmentation drastique de la production d'IL-10 par les cellules immunitaires. Ce phénomène a été observé aussi bien pour HCV (73, 183), le VIH (30, 130) mais aussi LCMV (48). Cette cytokine inhibe la production de cytokines proinflammatoires, la co-stimulation, l'expression des CMH de classe II et la sécrétion de chimiokines, ce qui a pour effet de réduire l'activité des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocytes T (118, 134).

En 2006, une équipe de recherche a démontré que lorsque des souris infectées par LCMV étaient incapables de produire de l'IL-10, il y avait perte de persistance du virus (48). Par la suite, l'équipe de Brooks a caractérisé plus précisément les mécanismes pouvant être à la base de cette perte de persistance. Leurs travaux mettent notamment en évidence une influence de l'IL-10 sur la quantité de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au virus dans le cadre d'une infection par Cl13 ainsi que des résultats similaires concernant les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (16).

Les lymphocytes T CD4⁺ sont importants pour plusieurs processus de maturation des lymphocytes B et de production des Ac (59). Une influence de l'IL-10 ayant été mise en évidence sur la composante cellulaire de la réponse immunitaire dans le cadre d'une infection par LCMV, il se peut que cette cytokine ait aussi une influence directe ou indirecte sur la composante humorale.

Pour mettre en évidence une telle influence, dix souris (cinq mâles et cinq femelles) C57BL/6 et IL-10KO ont été infectées avec 2×10^6 pfu de Cl13 ou Arm. L'expérience a été réalisée une première fois avec une mortalité de 90% des souris IL-10KO infectées avec Cl13 aux alentours de huit jours après l'infection. Des prélèvements de sang ont quand même été réalisés aux jours 0, 4, 8, 12, 20, 30, 40, 50, 60, 80 et 100 après l'infection et les sérums prélevés ont été utilisés pour réaliser des tests de neutralisation pour quantifier les AcN spécifiques au virus présents dans ces sérums. Un fait surprenant lors de l'analyse des résultats de cette première expérience est que, dans chaque groupe, ce sont exclusivement les souris femelles qui ont répondu à l'infection en produisant des AcN alors que les mâles n'ont pas répondu. Malheureusement, les résultats de cette manipulation ne sont pas exploitables dans le cadre de notre étude étant donné qu'il ne reste plus qu'une seule souris dans le groupe IL-10KO infecté avec Cl13.

Pour la seconde expérience, nous nous sommes cantonnés à infecter uniquement des souris femelles pour nous concentrer sur l'effet de l'absence d'IL-10 et non sur l'influence du sexe. Les groupes ont été réduits à 3 souris femelles et seulement 10^6 pfu ont été injectés à chaque souris pour essayer de diminuer la mortalité du groupe IL-10KO infecté avec Cl13. Les prélèvements de sang ont été réalisés aux jours 0, 4, 8, 12, 20, 30, 40, 50, 60, 80 et 100.

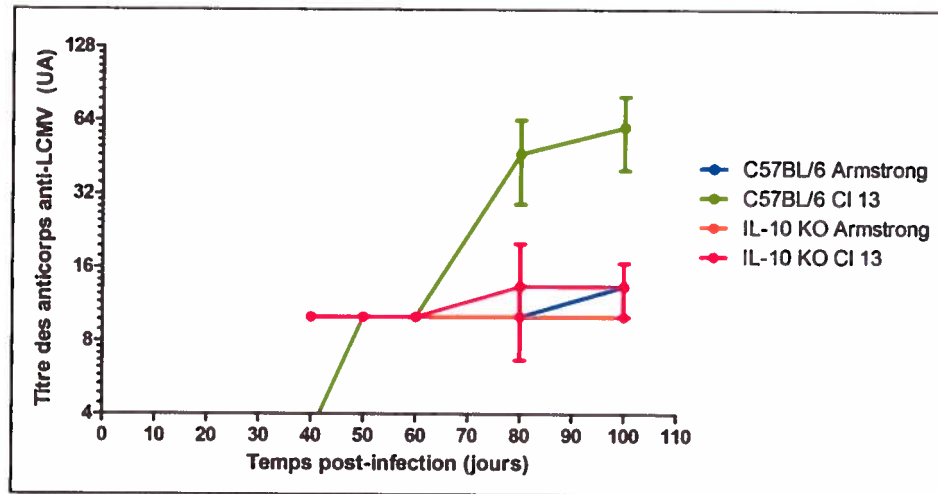


Figure 14 Évolution des titres en anticorps neutralisants spécifiques au virus suite une infection avec LCMV CI13 ou Arm. 3 souris par groupe ont été infectées avec 10^6 pfu de virus i.v. Les sérums ont été prélevés sur les souris à différents temps après infection et utilisés pour réaliser un test de neutralisation afin de quantifier les AcN spécifiques au virus qu'ils contiennent.

Contrairement à la première expérience d'infection aucune mortalité particulière n'a été remarquée, toutes les souris ayant toutes survécu jusqu'à la fin de l'expérience. On remarque tout d'abord que les titres en AcN sont faibles pour les quatre groupes. Il semblerait que le groupe de souris C57BL/6 infectées avec CI13 soit le seul à avoir répondu de manière importante. Cependant, l'importance de la barre d'erreur met bien en évidence le fait que quelques souris ont « fortement » répondu (titre de 160) alors que la majorité n'a produit que peu (titre de 40) ou pas d'Ac.

2 Comparaison de la réponse contre le NP dans le cadre d'une infection aiguë ou persistante

Il a été démontré que les AcN ont un rôle primordial dans le contrôle des infections virales aiguës et que ces Ac apparaissent très tardivement dans le cas de nombreuses infections virales persistantes (127). Cette apparition tardive pourrait être expliquée de multiples façons et ces explications pourraient être séparées en deux hypothèses de base : ou bien c'est le virus qui modifie ses épitopes neutralisants pour empêcher la formation correcte des Ac (hypothèse virale), ou bien l'infection provoque une modification d'un mécanisme immunitaire qui entraîne l'apparition tardive des Ac (hypothèse immunitaire). Dans le cas d'une modification du virus, le retard d'apparition des Ac serait alors limité aux Ac spécifiques du virus, dont le retard a déjà été démontré (127). Dans le cas contraire, si jamais la modification est au niveau immunitaire, il est probable que le retard d'apparition des Ac ne se limite pas seulement aux Ac spécifiques mais que ce retard puisse aussi être mis en évidence dans le cas d'Ac spécifiques d'autres antigènes, cette hypothèse n'a jamais été démontrée.

Pour étudier cette hypothèse, nous avons effectué des expériences (figure 15) dans lesquelles, dans un premier temps, 3 souris C57BL/6 ont été infectées avec LCMV WE ou VSV Indiana (avec un groupe contrôle non infecté) afin de créer un environnement de réponse immunitaire typique d'une infection persistante, aiguë, ou absence d'infection (réponse normale). Par la suite, un antigène exogène a été injecté aux trois groupes de souris pour analyser la réponse en anticorps et c'est la réponse humorale spécifique. Dans notre cas, l'antigène injecté est le NP, pour garder une continuité avec les expériences réalisées précédemment sur l'étude de la réponse immunitaire.

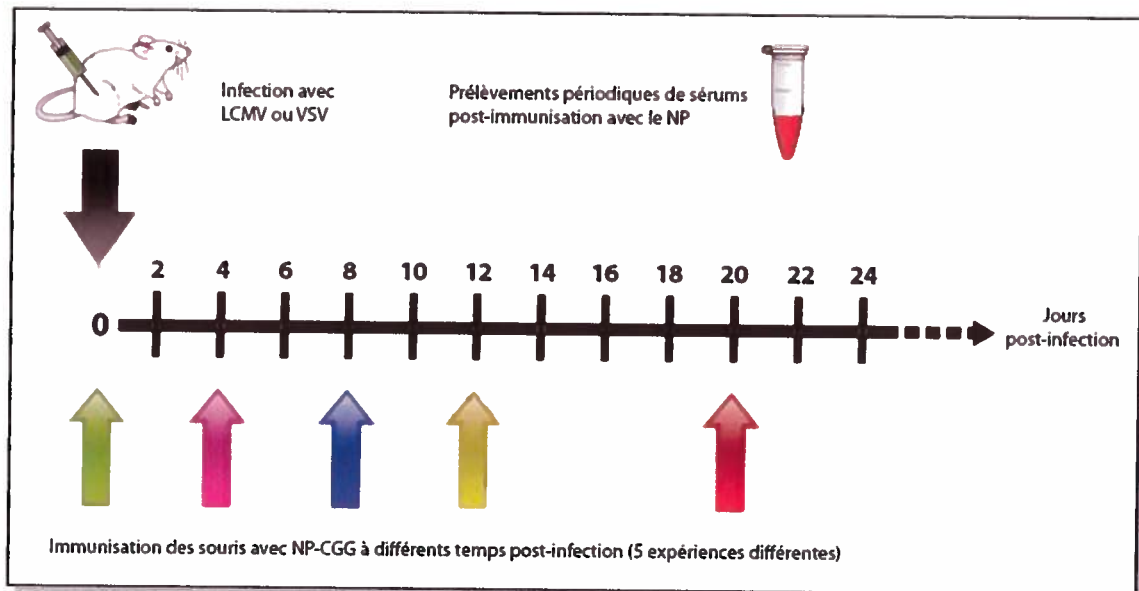


Figure 15 Protocole expérimental pour l'étude de la réponse humorale contre le NP dans le cadre d'une infection par LCMV, VSV ou chez des souris non-infectées. 3 souris par groupe sont infectées avec 2×10^6 pfu de virus au jour 0 puis immunisées avec $100 \mu\text{g}$ de NP-CGG dans l'alum à des temps différents suivant les expériences (jours 0, 4, 8, 12 ou 20 post-infection). Des prélèvements sanguins sont effectués aux jours 0, 4, 8, 12, 20 et 30 post-immunisation et la cinétique d'apparition des anticorps est étudiée par test ELISA spécifique au NP.

2.1 Quantité des anticorps

La présence des anticorps spécifiques au NP est analysée par test ELISA. Afin de pouvoir séparer les anticorps de haute affinité de l'ensemble des anticorps spécifiques au NP, l'expérience a été réalisée en triplicata avec une adsorption de différents ratios de complexes NP-BSA (faible : NP₄ ou NP₃, intermédiaire : NP₉ ou NP₇ et fort : NP₂₆ ou NP₃₀) sur les plaques ELISA. Les anticorps secondaires utilisés ont permis de détecter la présence d'immunoglobulines G ou M dans les échantillons de sérum dilués en série.

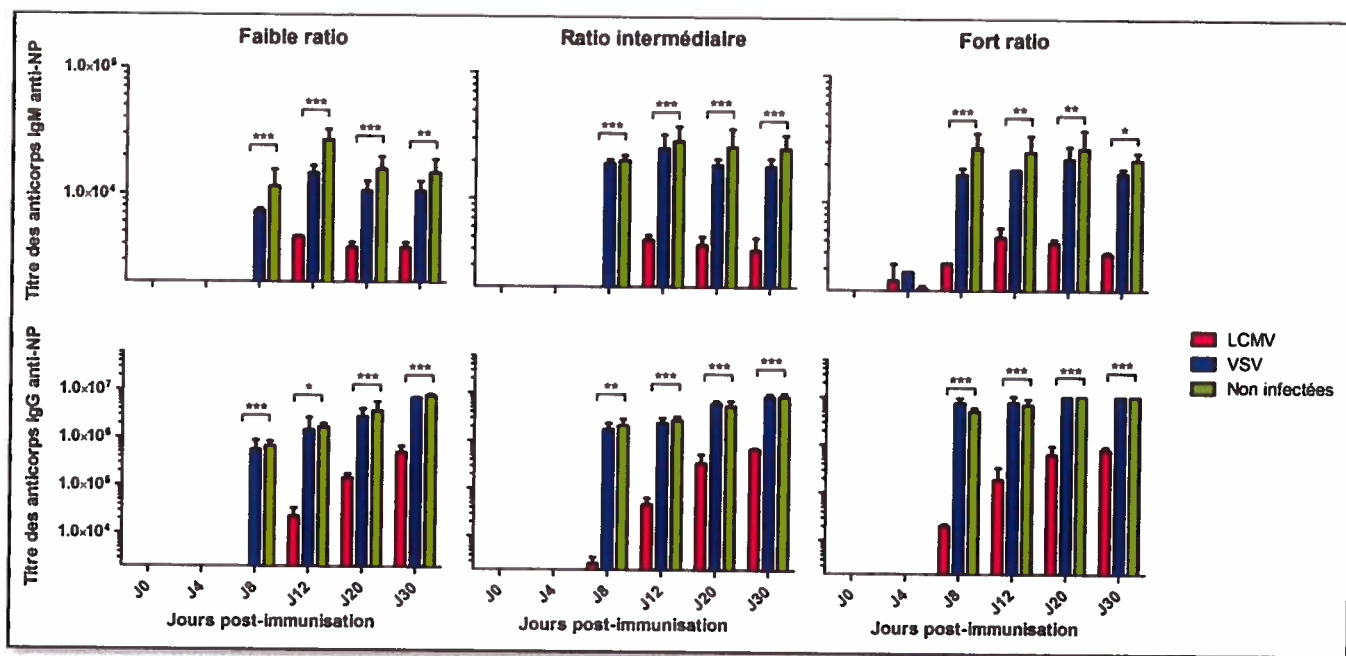


Figure 16 Cinétique d'apparition des anticorps spécifiques au NP après une immunisation 8 jours après infection. Les valeurs représentées sont le résultat de calculs statistiques sur les titres obtenus à partir des tests ELISA sur les sérums des souris de chaque groupe. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Les résultats obtenus dans le cas de l'immunisation 8 jours après infection (figure 16) sont présentés en premier car c'est lors de cette expérience que les résultats les plus représentatifs ont été obtenus. Premièrement, les immunoglobulines apparaissent avec une cinétique typique de leur classe, que cela soit de manière précoce suivie d'une décroissance pour les IgM, ou bien plus tardive et avec des titres plus importants pour les IgG. Il apparaît que les souris infectées par VSV ne présentent pas une réponse en anticorps anti-NP significativement différente de la réponse « normale » dans le cas du groupe de souris non infectées. Par contre, le groupe de souris infecté par LCMV présente d'une part un très net retard d'apparition des anticorps et de plus ce retard s'accompagne d'une quantité d'anticorps plus faible comparée aux titres obtenus dans le cas des deux autres groupes. Cette différence est maximale entre le groupe LCMV et les deux autres au jour 8 après l'immunisation.

Des expériences similaires ont été réalisées avec des temps d'immunisation différents, à savoir jour 0, 4, 12 et 20 post-infection, donnant lieu aux résultats représentés ci-après. En ce qui concerne la production d'IgM (figure 17), des différences significatives apparaissent uniquement aux jours 4 et 8 post-infection alors que les jours 0, 12 et 20 ne présentent aucune différence significative entre le groupe LCMV et les groupes VSV et non infectés. Quelque soit le jour d'immunisation, on retrouve toujours la cinétique d'apparition caractéristique des IgM avec une augmentation progressive jusqu'à un seuil puis une diminution. Par contre pour les IgG (figure 18), lorsque les souris sont infectées et immunisées le même jour il n'y a pas de différence significative. Lorsque l'injection de NP-CGG est retardée dans le temps, il y a un retard de production d'IgG dans le cas du groupe LCMV par rapport aux deux autres et qui est maximale encore une fois aux jours 4-8.

Afin d'étudier l'impact sur la production d'anticorps dans le cas de chacune des infections par rapport à des souris non-infectées, un ratio est calculé entre la quantité d'anticorps anti-NP produite à un moment donné par les souris infectées avec soit LCMV soit VSV, par rapport à la quantité produite au même moment par les souris non-infectées. Ce ratio infectées/non-infectées pour chaque expérience d'immunisation permettra de visualiser l'évolution de la production d'anticorps en fonction de la progression de l'infection (figure 19).

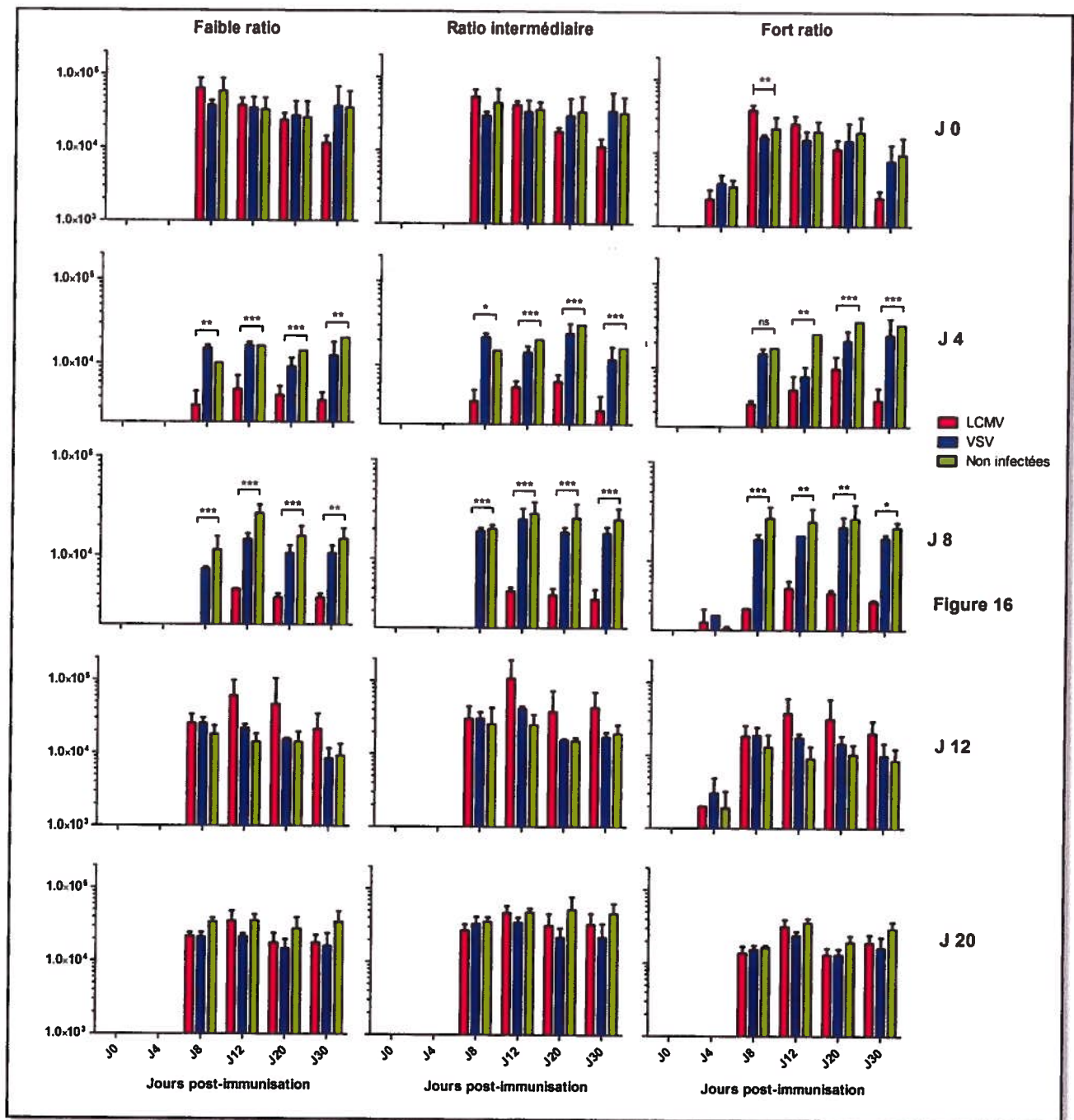


Figure 16

Figure 17 Cinétique d'apparition des immunoglobulines M spécifiques au NP après des immunisations aux jours 0, 4, 8, 12 et 20 après l'infection. Le protocole expérimental est exactement le même que pour l'expérience de l'immunisation jour 8.

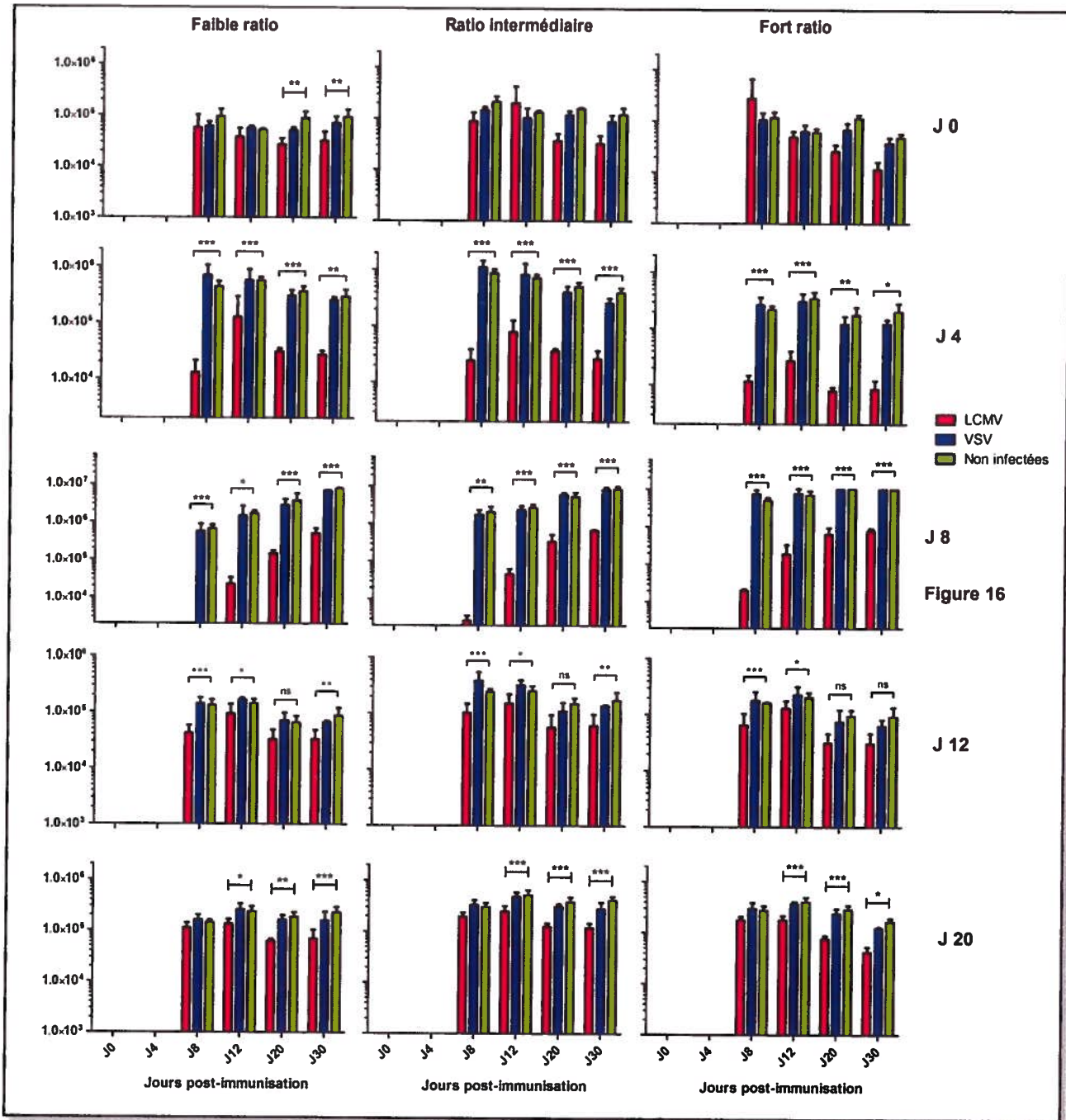


Figure 18 Cinétique d'apparition des immunoglobulines G spécifiques au NP après des immunisations aux jours 0, 4, 8, 12 et 20 après l'infection. Le protocole expérimental est exactement le même que pour l'expérience de l'immunisation jour 8.

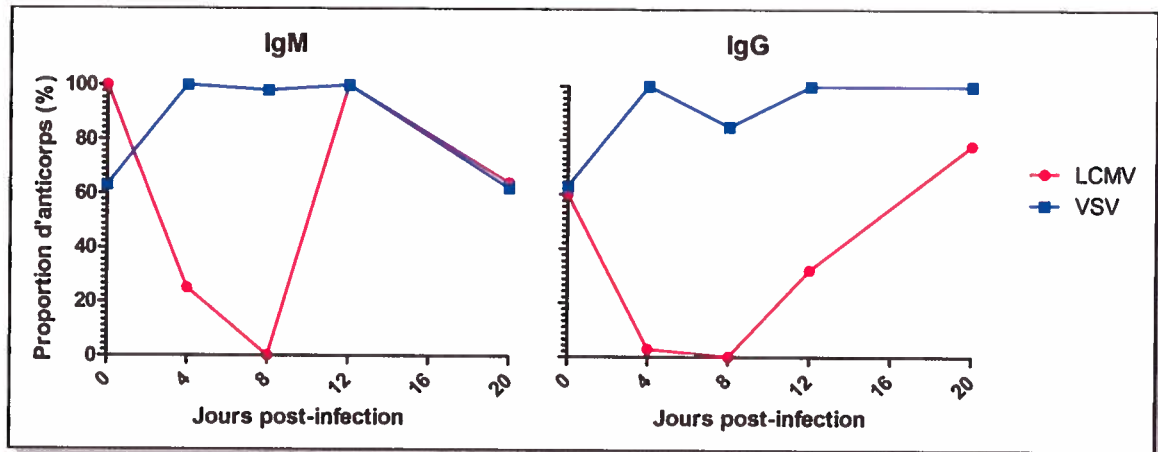


Figure 19 Fenêtre d'influence des infections aiguës ou persistante sur la production normale d'immunoglobulines. Les valeurs sont obtenues en calculant un ratio à partir des valeurs soit du groupe LCMV soit du groupe VSV sur les valeurs du groupe de souris non-infectées. Les valeurs sélectionnées pour le calcul sont celles de l'expérience avec un faible ratio de NP-BSA au jour 8 post-immunisation.

Premièrement, que cela soit pour les IgG ou pour les IgM, la production d'anticorps dans le cas du groupe infecté avec VSV est proche des 100% d'une production normale de souris non-infectées. Concernant la production relative des souris du groupe ayant été infectées avec LCMV, le constat est très différent. Tout d'abord l'impact semble moins constant que dans le cas du groupe VSV. Suivant le moment de l'immunisation la production d'anticorps en est considérablement modifiée. Il apparait que l'influence est maximale aux jours 4 et 8 post-infection avec des inhibitions respectivement de l'ordre de 80 et 100% pour les IgM et 95 et 100% pour les IgG. Cette inhibition perd en intensité avec le temps, rejoignant presque la valeur « normale » au jour 20 post-infection. Il ne semble pas qu'il y ai de différence significative lorsque les souris sont infectées et immunisées avec le NP-CGG le même jour.

2.2 Affinité des anticorps

Pour pouvoir mettre en évidence la modification d'affinité, il faut pouvoir comparer la proportion d'anticorps de haute affinité parmi l'ensemble des anticorps présentant une certaine affinité pour le nitrophenyl. Pour visualiser ceci, un ratio a été calculé pour chaque expérience entre la valeur de la plaque sur laquelle a été adsorbé le BSA couplé à un faible ratio de NP (NP₃ ou NP₄) et la valeur de la plaque au fort ratio de NP (NP₂₆ ou NP₃₀) (figure 20).

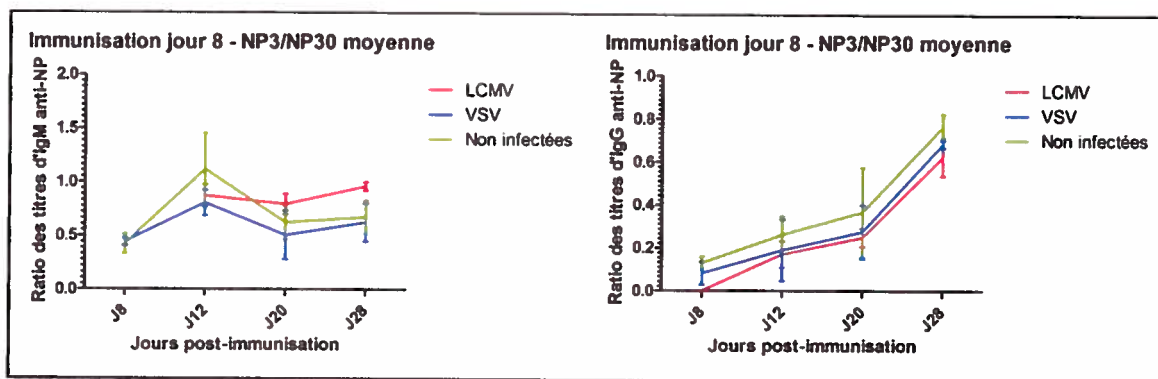


Figure 20 Évolution de l'affinité des anticorps anti-NP après immunisation 8 jours après l'infection Les valeurs des ratios NP3/NP30 sont représentées pour les IgM et IgG à partir du jour 8 car les valeurs sont nulles pour les jours 0 et 4.

Dans les deux cas il n'y a pas de réelle différence significative entre le groupe infecté avec LCMV et les deux autres groupes. Les allures des graphiques sont différentes mais l'allure des courbes des trois groupes sont à chaque fois similaires.

Chapitre 4

DISCUSSION

1 Influence de l'IL-10 sur la réponse humorale neutralisante

Une action de l'IL-10 sur la réponse des lymphocytes T a été démontrée en 2006 dans le cadre d'une étude de l'infection par LCMV (16). Cette action régulatrice ne se limite pas à l'IL-10 et il a aussi été démontré des effets similaires de la part du TGF- β (174). En parallèle, il était découvert que si la souris n'est pas capable de produire de l'IL-10 alors le virus n'est pas capable de persister (48). Cette influence s'étendait à la fois à la réponse des CTLs et à la réponse des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ qui étaient toutes les deux fortement réduites. Cependant, son influence sur la réponse des lymphocytes B n'a jamais été démontrée. Étant donné que les lymphocytes T CD4⁺ sont impliqués dans le processus de formation des Ac, notamment au travers de la présentation d'antigène T-dépendant dans les GC de la rate et la permutation de classe (59), il était pertinent de nous demander si la production de ces Ac ne serait pas à son tour altérée, directement ou indirectement, par la forte production d'IL-10 durant une infection par LCMV et donc une diminution de l'action des lymphocytes T auxiliaires. L'étude comparative entre les réponses de souris IL-10KO et de souris C57BL/6 au fond génétique sauvage devait nous permettre d'avoir une première indication de l'implication de cette cytokine dans le retard d'apparition des AcN.

Les premières expériences ont été marquées par une mortalité de 90% des souris IL-10KO infectées avec la souche Cl13 de LCMV. Une mortalité identique avait été observée lors des travaux de Brooks (M. Martinic, communication personnelle) et une simple diminution de la dose d'infection a permis de considérablement diminuer la mortalité des souris (de 0 à 10% suivant l'expérience). L'IL-10 étant une cytokine immunosuppressive et anti-inflammatoire, il est permis de penser que son absence a empêché un contrôle de la réponse immunitaire qui s'est emballée avec des étapes successives d'activation, débouchant sur une véritable tempête de cytokines

proinflammatoires à l'origine de la mort de la majorité des souris infectées. Ce phénomène de tempête de cytokines est une réaction immunitaire qui devient incontrôlée par l'organisme et dont résulte une activation d'un trop grand nombre de cellules immunitaires à un même endroit. Cette pathologie a pour la première fois été décrite chez l'homme en 1993 (51). L'hypothèse de la tempête de cytokine avait déjà été avancée pour expliquer une morbidité importante dans le cas d'une infection de souris IL-10KO par le cytomégalo virus murin (MCMV) (126).

Dans les différentes expériences réalisées les résultats sont similaires, avec une réponse plus fortes pour le groupe de souris C57BL/6 infectées avec LCMV Cl13 par rapport aux trois autres groupes (B6 infectées avec Arm et IL-10KO infectées avec Arm et Cl13). C'est un résultat surprenant dans la mesure où l'IL-10 étant une cytokine immunosuppressive, nous nous attendions à voir une réponse humorale plus importante dans le cas des souris IL-10KO. Les possibilités de comparaison avec d'autres modèles sont malheureusement rares car la plupart des études en rapport avec notre modèle se focalisent sur la composante cellulaire de la réponse immunitaire. Un fait intéressant est à noter cependant, mis en évidence en 2010 lors d'une infection de souris IL-10KO avec le virus influenza A (169). Dans cette publication, une concentration plus importantes d'immunoglobulines avait été détectée dans le tractus respiratoires des souris IL-10KO infectées par rapport aux témoins C57BL/6. Cette modification de la production d'Ac ne s'étendait cependant pas au niveau systémique (169). Il est probable qu'une telle divergence puisse être attribuée à des mécanismes viraux d'infection différents, la réponse humorale étant plus importante pour le contrôle d'une infection par influenza (142) que pour LCMV, d'autant plus si on tient compte du fait que influenza A est un virus aigu alors que LCMV est un virus persistant.

Il semblerait donc que notre hypothèse ne soit pas vérifiée et que, bien qu'elle ait une influence sur la composante cellulaire de la réponse immunitaire, l'interleukine 10 ne semble pas avoir d'action directe ou indirecte sur la production d'AcN contre le virus.

2 Comparaison de la réponse contre le nitrophenyl dans le cadre d'une infection aiguë, persistante, ou en l'absence d'infection

2.1 Quantité des anticorps

Le retard d'apparition des Ac (dont les AcN) dans le cadre d'infections persistantes humaines et murines, et plus particulièrement des infections par LCMV, est un phénomène qui a été mis en évidence dans de nombreuses publications depuis plusieurs années (69). Cependant, les seuls Ac ayant été observés sont ceux qui sont spécifiques au virus. Il serait intéressant de savoir si ce retard est d'origine virale ou immunologique. Il est bien connu que les virus à ARN, du fait de leur génome restreint, ont une grande facilité à se modifier et à muter (96). Si c'est le virus qui, par divers mécanismes internes, arrive à se modifier pour retarder la reconnaissance de ses épitopes, alors le retard d'apparition des Ac sera limité aux seuls Ac spécifiques au virus. Dans le cas contraire, si jamais un mécanisme immunitaire ne se produit pas correctement dans le cas d'une infection par LCMV, alors la production des Ac spécifiques aux antigènes étrangers au virus devrait aussi être affectée par l'infection. C'est potentiellement l'une de ces causes, ou une action synergique des deux, qui est la cause du retard dans l'apparition des Ac dans le cadre des infections persistantes.

Pour vérifier s'il y a modification de mécanismes immunitaires humoraux lors de l'infection par LCMV, une expérience comparative d'apparition des Ac contre un antigène commun a été réalisée dans le cadre d'une infection persistante (LCMV WE), aiguë (VSV Indiana) ou de l'absence d'infection. Pour cela, trois groupes de souris ont été infectés (ou non dans le cas du groupe témoin) avec l'un ou l'autre des virus puis un

antigène exogène leur a été injecté pour provoquer une réponse immunitaire contre cet antigène. Une étude de l'apparition des Ac contre cet antigène dans les trois contextes d'infections a permis de savoir si le retard de la réponse humorale se limite seulement aux Ac spécifiques au virus ou bien si un processus s'effectue de manière anormale à l'intérieur du système immunitaire des souris.

Lorsque l'on regarde l'apparition des Ac après immunisation, que cela soit pour les IgG ou les IgM, il y a un très net retard dans le cas du groupe de souris infectées avec LCMV par rapport aux deux autres groupes (VSV et non infecté), qui eux ont une cinétique de production similaire. Ce retard se manifeste dès les premiers jours de l'infection et se prolonge tout au long de l'expérience, jusqu'au jour 30 post-immunisation. On peut faire un parallèle entre ce constat et le retard démontré pour les Ac spécifiques au virus (69), nos résultats élargissant juste la possibilité d'influence de l'infection par LCMV à tous les anticorps produits lorsque le virus est présent dans l'organisme. De plus, et cela apparaît encore plus clairement dans le cas des IgM, la quantité d'Ac produite par le groupe LCMV est non seulement en retard mais en plus est très inférieure et ne rattrape pas la quantité produite par les deux autres groupes. Il semble donc bien que l'influence sur la production d'Ac ne se limite pas seulement aux Ac spécifiques au virus mais soit plus générale, trahissant un problème au niveau de la fabrication des Ac dans le système immunitaire. Il est aussi intéressant de noter que l'influence n'est pas la même suivant que l'on immunise les souris avec le NP-CGG à des temps différents post-infection. Fait important : il n'y a pas d'influence significative lorsque les souris sont infectées et immunisées le même jour. Ce constat semble cohérent dans la mesure où si c'est le virus qui provoque un mauvais fonctionnement d'un mécanisme immunitaire, il lui faut probablement un certain laps de temps pour pouvoir asseoir son influence. Le constat est opposé lorsque les souris sont immunisées aux jours 4 et 8 post-infection. En effet, l'inhibition est maximale (100% au jour 8) mais est également très importante au jour 4, bien que plus faible (environ 80% pour les IgM et 95% pour les IgG). Cette importante diminution aux jours 4 et 8 post-infection peut-être facilement expliquée par la cinétique de prolifération du virus qui procure une charge virale circulante maximale à

ce moment de l'infection. De fait, il semble important de noter que la diminution de l'influence sur la production d'Ac anti-NP aux jours 12 et 20 post-infection coïncide avec la diminution de la charge virale circulante dans le cas d'une infection par le virus LCMV (69).

De nombreux mécanismes mis en évidence dans le cadre d'une infection à LCMV ayant pu être extrapolés aux infections humaines, il serait très intéressant de voir ce qu'il se passe au niveau d'une réponse exogène dans le cadre d'infections au VIH ou HCV par exemple. Malheureusement les travaux sur la réponse humorale contre ces virus se sont jusqu'ici toujours limité à la réponse antivirale (133, 173, 176) ce qui fait qu'aucun point de comparaison direct n'est disponible pour d'autres modèles en relation avec le notre. Par contre dans le cas de ces infections la cinétique d'apparition des anticorps spécifiques au virus étant similaire à celle observée dans le cas de LCMV, on peut donc supposer qu'un mécanisme similaire régit le retard d'apparition des anticorps dans le cadre de ces trois pathologies.

2.2 Affinité des anticorps

La réponse humorale retardée a été mise en évidence et le fait qu'elle soit aussi applicable pour un antigène exogène démontre bien que le processus de formation des Ac est affecté. Dans le cas de virus aigüs comme VSV, la maturation d'affinité se fait rapidement et donne lieu à une apparition rapide d'Ac de haute spécificité pour le virus (147). La maturation d'affinité étant un mécanisme clef de la production des Ac, est-ce qu'une des raisons du retard de leur apparition ne pourrait pas être que cette maturation ne se fasse pas correctement ?

Pour répondre à cette question, l'expérience d'ELISA permettant de détecter les anticorps spécifiques au NP a été réalisée avec adsorption de trois ratios différents de NP-BSA, permettant d'adsorber plus ou moins d'antigène au fond des puits des plaques. Ce triplicata a permis de capturer dans une plaque l'ensemble des Ac ayant la moindre affinité pour le NP (Ac de faible affinité) et de capturer dans une autre seulement les Ac possédant l'affinité la plus forte pour l'antigène (Ac de haute affinité). La discrimination des Ac de haute affinité parmi l'ensemble des Ac a permis de voir s'il y avait une influence non pas sur la quantité totale mais sur les proportions et ainsi d'analyser indirectement la maturation d'affinité dans le cadre de chaque infection. Sur l'ensemble des graphiques réalisés il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les trois groupes, ce qui semble indiquer que le (ou un des) mécanisme(s) influencé(s) par l'infection par LCMV ne soit pas au niveau de la maturation d'affinité en elle-même mais à une autre étape du processus de développement des Ac. Dans le cas présent, plusieurs nouvelles hypothèses peuvent être avancées. Il est possible que la maturation d'affinité se fasse correctement mais que le nombre de cellules productrices d'Ac soit réduit. Cette réduction pourrait être due notamment à un nombre plus réduit de centres germinatifs ou encore à un problème dans l'expansion clonale des lymphocytes B.

En 2006, le laboratoire de Rafi Ahmed a démontré que les lymphocytes T cytotoxiques épuisés dans le cadre d'une infection par LCMV exprimaient de manière intense la molécule programmed death 1 (PD-1) alors que ce n'était pas le cas des lymphocytes non épuisés (9). De même, les lymphocytes T auxiliaires folliculaires et les cellules B des centres germinatifs l'expriment fortement (54). PD-1 étant reconnu comme étant un régulateur négatif de la réponse B (124, 129), il pourrait être impliqué dans la diminution de l'activation des lymphocytes B tout en laissant le processus de maturation d'affinité se dérouler correctement, ce qui pourrait expliquer nos résultats.

Conclusion et perspectives

Les AcN sont au centre de la lutte contre les infections virales car ce sont eux qui sont responsables de l'élimination de la plupart des virus aigus et qu'ils sont primordiaux pour le développement de stratégies vaccinales. Malheureusement, il a été démontré que leur production est profondément modifiée lors des infections persistantes et ce constat pourrait être une des explications pour cette persistance.

Suite aux expériences réalisées durant ma maîtrise, il a été mis en évidence que le retard d'apparition des Ac ne se limite pas seulement aux Ac spécifiques du pathogène mais que la production d'Ac contre un antigène exogène soit elle aussi modifiée. Cette constatation ouvre la porte à la notion d'une modification plus profonde et généralisée de la réponse humorale impliquant un dysfonctionnement dans les mécanismes de production des Ac en général.

Les raisons de cette apparition tardive peuvent être extrêmement nombreuses, incluant une modification de la maturation d'affinité, un problème dans la prolifération clonale des lymphocytes B, une diminution du potentiel sécrétoire de chaque cellule, ou encore d'autres encore non envisagées. L'hypothèse de la maturation d'affinité est rejetée puisque nos travaux ont montré que, bien qu'il y ait une différence dans la quantité d'Ac, il n'y a pas de modification de la proportion d'Ac de haute affinité dans le cas de l'infection par LCMV. Afin de mieux cerner les mécanismes qui pourraient être impliqués, il serait intéressant de réaliser des expériences de coupes histologiques sur des rates prélevées sur les souris des trois groupes de l'expérience NP. Une analyse des structures après immunomarquage des rates et notamment des GC pourrait donner de premières pistes pour comprendre la raison du retard d'apparition des Ac, notamment au niveau de l'architecture splénique. Il serait aussi intéressant de réaliser des expériences d'Elispot à partir de prélèvements de moelle osseuse pour quantifier les lymphocytes B matures spécifiques du NP présents dans l'organisme. Une diminution de

la quantité de ces lymphocytes serait une explication logique du retard et de la plus faible quantité d'Ac produits contre le NP dans le cadre d'une infection par LCMV.

Liste des références

1. **Aebischer, T., D. Moskophidis, U. H. Rohrer, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 1991. In vitro selection of lymphocytic choriomeningitis virus escape mutants by cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:11047-51.
2. **Ahmed, R., C. S. Hahn, T. Somasundaram, L. Villarete, M. Matloubian, and J. H. Strauss.** 1991. Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *Journal of Virology* **65**:4242-4247.
3. **Ahmed, R., A. Salmi, L. D. Butler, J. M. Chiller, and M. Oldstone.** 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. *Journal of Experimental Medicine* **160**:521-540.
4. **Ahmed, R., A. Salmi, L. D. Butler, J. M. Chiller, and M. B. Oldstone.** 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**:521-40.
5. **Alter, M. J., H. S. Margolis, K. Krawczynski, F. N. Judson, A. Mares, W. J. Alexander, P. Y. Hu, J. K. Miller, M. A. Gerber, R. E. Sampliner, and et al.** 1992. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* **327**:1899-905.
6. **Alvarez-Lajonchere, L., N. H. Shoukry, B. Gra, Y. Amador-Canizares, F. Helle, N. Bedard, I. Guerra, C. Drouin, J. Dubuisson, E. E. Gonzalez-Horta, G. Martinez, J. Marante, Z. Cinza, M. Castellanos, and S. Duenas-Carrera.** 2009. Immunogenicity of CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, in HCV-chronically infected individuals in a Phase I clinical trial. *J Viral Hepat* **16**:156-67.
7. **Arumugaswami, V., R. Remenyi, V. Kanagavel, E. Y. Sue, T. Ngoc Ho, C. Liu, V. Fontanes, A. Dasgupta, and R. Sun.** 2008. High-resolution functional profiling of hepatitis C virus genome. *PLoS Pathog* **4**:e1000182.
8. **Arya, S., F. Chen, S. Spycher, D. E. Isenman, M. J. Shulman, and R. H. Painter.** 1994. Mapping of amino acid residues in the C mu 3 domain of mouse IgM important in macromolecular assembly and complement-dependent cytolysis. *J Immunol* **152**:1206-12.
9. **Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed.** 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**:682-7.
10. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
11. **Battegay, M., D. Moskophidis, A. Rahemtulla, H. Hengartner, T. W. Mak, and R. M. Zinkernagel.** 1994. ENHANCED ESTABLISHMENT OF A VIRUS CARRIER STATE IN ADULT CD4+ T-CELL-DEFICIENT MICE. *Journal of Virology* **68**:4700-4704.
12. **Berek, C., A. Berger, and M. Apel.** 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**:1121-9.

13. **Bieber, T., H. de la Salle, A. Wollenberg, J. Hakimi, R. Chizzonite, J. Ring, D. Hanau, and C. de la Salle.** 1992. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med* **175**:1285-90.
14. **Borrow, P., C. F. Evans, and M. B. Oldstone.** 1995. Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression. *J Virol* **69**:1059-70.
15. **Borrow, P., and M. B. Oldstone.** 1997. Lymphocytic Choriomeningitis Virus, p. 593-627. *In* N. Nathanson (ed.), *Viral Pathogenesis*. Lippincott-Raven, Philadelphia.
16. **Brooks, D. G., M. J. Trifilo, K. H. Edelmann, L. Teyton, D. B. McGavern, and M. B. Oldstone.** 2006. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* **12**:1301-9.
17. **Bruns, M., J. Cihak, G. Muller, and F. Lehmann-Grube.** 1983. Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization. *Virology* **130**:247-51.
18. **Buchmeier, M. J., R. M. Welsh, F. J. Dutko, and M. B. Oldstone.** 1980. The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Adv Immunol* **30**:275-331.
19. **Bukh, J., R. H. Miller, and R. H. Purcell.** 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* **15**:41-63.
20. **Burke, K. P., and A. L. Cox.** Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. *Immunol Res* **47**:216-27.
21. **Burns, D. P., and R. C. Desrosiers.** 1994. Envelope sequence variation, neutralizing antibodies, and primate lentivirus persistence. *Curr Top Microbiol Immunol* **188**:185-219.
22. **Burns, J. W., and M. J. Buchmeier.** 1993. Glycoproteins of the arenaviruses, p. 17-35. *In* M. S. Salvato (ed.), *The arenaviridae*. Plenum Press, New York.
23. **Burns, J. W., and M. J. Buchmeier.** 1991. Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **183**:620-629.
24. **Cao, W., M. D. Henry, P. Borrow, H. Yamada, J. H. Elder, E. V. Ravkov, S. T. Nichol, R. W. Compans, K. P. Campbell, and M. B. Oldstone.** 1998. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**:2079-81.
25. **Capra, J. D., and J. M. Kehoe.** 1975. Hypervariable regions, idiotype, and the antibody-combining site. *Adv Immunol* **20**:1-40.
26. **Carayannopoulos, L., J. M. Hexham, and J. D. Capra.** 1996. Localization of the binding site for the monocyte immunoglobulin (Ig) A-Fc receptor (CD89) to the domain boundary between Calpha2 and Calpha3 in human IgA1. *J Exp Med* **183**:1579-86.
27. **Carsetti, R., G. Kohler, and M. C. Lamers.** 1995. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* **181**:2129-40.
28. **Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton.** 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**:359-62.
29. **Clavel, F., K. Mansinho, S. Chamaret, D. Guetard, V. Favier, J. Nina, M. O. Santos-Ferreira, J. L. Champalimaud, and L. Montagnier.** 1987. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N Engl J Med* **316**:1180-5.
30. **Clerici, M., M. L. Fusi, S. Ruzzante, S. Piconi, M. Biasin, D. Arienti, D. Trabattoni, and M. L. Villa.** 1997. Type 1 and type 2 cytokines in HIV infection -- a possible role in apoptosis and disease progression. *Ann Med* **29**:185-8.

31. Clerici, M., J. V. Giorgi, C. C. Chou, V. K. Gudeman, J. A. Zack, P. Gupta, H. N. Ho, P. G. Nishanian, J. A. Berzofsky, and G. M. Shearer. 1992. Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *J Infect Dis* **165**:1012-9.
32. Clerici, M., J. M. Levin, H. A. Kessler, A. Harris, J. A. Berzofsky, A. L. Landay, and G. M. Shearer. 1994. HIV-specific T-helper activity in seronegative health care workers exposed to contaminated blood. *JAMA* **271**:42-6.
33. Clerici, M., and G. M. Shearer. 1993. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* **14**:107-11.
34. Cook, D. N., D. S. Pisetsky, and D. A. Schwartz. 2004. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* **5**:975-9.
35. Cooper, D. A., J. Gold, P. Maclean, B. Donovan, R. Finlayson, T. G. Barnes, H. M. Michelmore, P. Brooke, and R. Penny. 1985. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* **1**:537-40.
36. Coutinho, A., and G. Moller. 1975. Thymus-independent B-cell induction and paralysis. *Adv Immunol* **21**:113-236.
37. Cox, A. L., T. Mosbrugger, G. M. Lauer, D. Pardoll, D. L. Thomas, and S. C. Ray. 2005. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* **42**:104-12.
38. Cox, A. L., T. Mosbrugger, Q. Mao, Z. Liu, X. H. Wang, H. C. Yang, J. Sidney, A. Sette, D. Pardoll, D. L. Thomas, and S. C. Ray. 2005. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* **201**:1741-52.
39. Cyster, J. G., K. M. Ansel, K. Reif, E. H. Ekland, P. L. Hyman, H. L. Tang, S. A. Luther, and V. N. Ngo. 2000. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* **176**:181-93.
40. Davis, A. C., K. H. Roux, and M. J. Shulman. 1988. On the structure of polymeric IgM. *Eur J Immunol* **18**:1001-8.
41. de la Torre, J. C., and M. B. Oldstone. 1992. Selective disruption of growth hormone transcription machinery by viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:9939-43.
42. Deeks, S. G., B. Schweighardt, T. Wrin, J. Galovich, R. Hoh, E. Sinclair, P. Hunt, J. M. McCune, J. N. Martin, C. J. Petropoulos, and F. M. Hecht. 2006. Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J Virol* **80**:6155-64.
43. Diedrich, G. 2006. How does hepatitis C virus enter cells? *FEBS J* **273**:3871-85.
44. Diepolder, H. M., R. Zachoval, R. M. Hoffmann, E. A. Wierenga, T. Santantonio, M. C. Jung, D. Eichenlaub, and G. R. Pape. 1995. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* **346**:1006-7.
45. Doherty, P. C., J. E. Allan, F. Lynch, and R. Ceredig. 1990. Dissection of an inflammatory process induced by CD8+ T cells. *Immunol Today* **11**:55-9.
46. Dreyer, W. J., and J. C. Bennett. 1965. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**:864-9.
47. Durbeej, M., M. D. Henry, M. Ferletta, K. P. Campbell, and P. Ekblom. 1998. Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* **46**:449-57.

48. **Ejrnaes, M., C. M. Filippi, M. M. Martinic, E. M. Ling, L. M. Togher, S. Crotty, and M. G. von Herrath.** 2006. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med* **203**:2461-72.
49. **Farci, P., H. J. Alter, D. C. Wong, R. H. Miller, S. Govindarajan, R. Engle, M. Shapiro, and R. H. Purcell.** 1994. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7792-6.
50. **Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter, and P. V. Holland.** 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **292**:767-70.
51. **Ferrara, J. L., S. Abhyankar, and D. G. Gilliland.** 1993. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant Proc* **25**:1216-7.
52. **Foy, E., K. Li, R. Sumpter, Jr., Y. M. Loo, C. L. Johnson, C. Wang, P. M. Fish, M. Yoneyama, T. Fujita, S. M. Lemon, and M. Gale, Jr.** 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2986-91.
53. **Foy, E., K. Li, C. Wang, R. Sumpter, Jr., M. Ikeda, S. M. Lemon, and M. Gale, Jr.** 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* **300**:1145-8.
54. **Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo.** 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* **192**:1027-34.
55. **Fung-Leung, W. P., T. M. Kundig, R. M. Zinkernagel, and T. W. Mak.** 1991. Immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice without CD8 expression. *J Exp Med* **174**:1425-9.
56. **Gaines, H., J. Albert, M. von Sydow, A. Sonnerborg, F. Chiodi, A. Ehrnst, O. Strannegard, and B. Asjo.** 1987. HIV antigenaemia and virus isolation from plasma during primary HIV infection. *Lancet* **1**:1317-8.
57. **Gaines, H., M. von Sydow, J. V. Parry, M. Forsgren, P. O. Pehrson, A. Sonnerborg, P. P. Mortimer, and O. Strannegard.** 1988. Detection of immunoglobulin M antibody in primary human immunodeficiency virus infection. *AIDS* **2**:11-5.
58. **Gallimore, A., A. Glithero, A. Godkin, A. C. Tissot, A. Pluckthun, T. Elliott, H. Hengartner, and R. Zinkernagel.** 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* **187**:1383-93.
59. **Garside, P., E. Ingulli, R. R. Merica, J. G. Johnson, R. J. Noelle, and M. K. Jenkins.** 1998. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* **281**:96-9.
60. **Gathings, W. E., A. R. Lawton, and M. D. Cooper.** 1977. Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. *Eur J Immunol* **7**:804-10.
61. **Gerlach, J. T., H. M. Diepolder, R. Zachoval, N. H. Gruener, M. C. Jung, A. Ulsenheimer, W. W. Schraut, C. A. Schirren, M. Waechtler, M. Backmund, and G. R. Pape.** 2003. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* **125**:80-8.

62. **Gnann, J. W., Jr., J. B. McCormick, S. Mitchell, J. A. Nelson, and M. B. Oldstone.** 1987. Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections. *Science* **237**:1346-9.
63. **Good, R. A., and S. J. Zak.** 1956. Disturbances in gamma globulin synthesis as experiments of nature. *Pediatrics* **18**:109-49.
64. **Goodnow, C. C., C. G. Vinuesa, K. L. Randall, F. Mackay, and R. Brink.** Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* **11**:681-8.
65. **Grakoui, A., N. H. Shoukry, D. J. Woollard, J. H. Han, H. L. Hanson, J. Ghrayeb, K. K. Murthy, C. M. Rice, and C. M. Walker.** 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302**:659-62.
66. **Gruener, N. H., F. Lechner, M. C. Jung, H. Diepolder, T. Gerlach, G. Lauer, B. Walker, J. Sullivan, R. Phillips, G. R. Pape, and P. Klenerman.** 2001. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* **75**:5550-8.
67. **Guidotti, L. G., T. Ishikawa, M. V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber, and F. V. Chisari.** 1996. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **4**:25-36.
68. **Guidotti, L. G., R. Rochford, J. Chung, M. Shapiro, R. Purcell, and F. V. Chisari.** 1999. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* **284**:825-9.
69. **Hangartner, L., R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol* **6**:231-43.
70. **Hardy, R. R., and K. Hayakawa.** 2001. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* **19**:595-621.
71. **Hayakawa, K., R. R. Hardy, D. R. Parks, and L. A. Herzenberg.** 1983. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* **157**:202-18.
72. **Hill, R. L., R. Delaney, R. E. Fellows, and H. E. Lebovitz.** 1966. The evolutionary origins of the immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**:1762-9.
73. **Hofer, H., J. B. Neufeld, C. Oesterreicher, P. Grundtner, F. Wrba, A. Gangl, P. Ferenci, and C. Gasche.** 2005. Bi-allelic presence of the interleukin-10 receptor 1 G330R allele is associated with cirrhosis in chronic HCV-1 infection. *Genes Immun* **6**:242-7.
74. **Hoofnagle, J. H.** 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* **36**:S21-9.
75. **Horsburgh, C. R., Jr., C. Y. Ou, J. Jason, S. D. Holmberg, I. M. Longini, Jr., C. Schable, K. H. Mayer, A. R. Lifson, G. Schochetman, J. W. Ward, and et al.** 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **2**:637-40.
76. **Hozumi, N., and S. Tonegawa.** 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:3628-32.
77. **Ibraghimov-Beskrovnyaya, O., J. M. Ervasti, C. J. Leveille, C. A. Slaughter, S. W. Sernett, and K. P. Campbell.** 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* **355**:696-702.
78. **Jacob, J., G. Kelsoe, K. Rajewsky, and U. Weiss.** 1991. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* **354**:389-92.
79. **Jacobson, S., and P. C. J.** 1980. Viral pathogenesis and resistance to defective interfering particles. *Nature* **283**:311-313.
80. **Jones, J. S.** 2000. Almost like a whale: rewriting the origin of species. *Trans Med Soc Lond* **117**:25-8.

81. **Kagi, D., P. Seiler, J. Pavlovic, B. Ledermann, K. Burki, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 1995. The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur J Immunol* **25**:3256-62.
82. **Kalinke, U., E. M. Bucher, B. Ernst, A. Oxenius, H. P. Roost, S. Geley, R. Kofler, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 1996. The role of somatic mutation in the generation of the protective humoral immune response against vesicular stomatitis virus. *Immunity* **5**:639-52.
83. **Kawasaki, K., S. Minoshima, E. Nakato, K. Shibuya, A. Shintani, J. L. Schmeits, J. Wang, and N. Shimizu.** 1997. One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res* **7**:250-61.
84. **Kelsoe, G.** 1996. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* **4**:107-11.
85. **Kolar, G. R., and J. D. Capra.** 2003. Structure and function of immunoglobulins, vol. 1. Raven Press, New York.
86. **Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho.** 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**:4650-5.
87. **Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller.** 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**:263-74.
88. **Lai, M. E., A. P. Mazzoleni, F. Argioli, S. De Virgili, A. Balestrieri, R. H. Purcell, A. Cao, and P. Farci.** 1994. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* **343**:388-90.
89. **Lechner, F., D. K. Wong, P. R. Dunbar, R. Chapman, R. T. Chung, P. Dohrenwend, G. Robbins, R. Phillips, P. Klenerman, and B. D. Walker.** 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* **191**:1499-512.
90. **Lee, G., A. E. Namen, S. Gillis, L. R. Ellingsworth, and P. W. Kincade.** 1989. Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. *J Immunol* **142**:3875-83.
91. **Lehmann-Grube, F.** 1971. Lymphocytic choriomeningitis virus. Springer-Verlag, New York,.
92. **Lehner, T., L. A. Bergmeier, L. Tao, C. Panagiotidi, L. S. Klavinskis, L. Hussain, R. G. Ward, N. Meyers, S. E. Adams, A. J. Gearing, and et al.** 1994. Targeted lymph node immunization with simian immunodeficiency virus p27 antigen to elicit genital, rectal, and urinary immune responses in nonhuman primates. *J Immunol* **153**:1858-68.
93. **Lerat, H., S. Rumin, F. Habersetzer, F. Berby, M. A. Trabaud, C. Trepo, and G. Inchauspe.** 1998. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* **91**:3841-9.
94. **Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, Jr., and S. M. Lemon.** 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**:2992-7.
95. **Lichty, B. D., A. T. Power, D. F. Stojdl, and J. C. Bell.** 2004. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med* **10**:210-6.
96. **Lucas, M., U. Karrer, A. Lucas, and P. Klenerman.** 2001. Viral escape mechanisms - escapology taught by viruses. *International Journal of Experimental Pathology* **82**:269-286.

97. **Male, D., J. Brostoff, D. B. Roth, and I. Roitt.** 2010. Les anticorps, p. 65-95. *In* E. Masson (ed.), Immunologie.
98. **Male, D., J. Brostoff, D. B. Roth, and I. Roitt.** 2010. Les défenses contre les agents infectieux, p. 274. *In* E. Masson (ed.), Immunologie.
99. **Manz, R. A., A. Thiel, and A. Radbruch.** 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* **388**:133-4.
100. **Matloubian, M., S. R. Kolhekar, T. Somasundaram, and R. Ahmed.** 1993. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology* **67**:7340-7349.
101. **Matloubian, M., S. R. Kolhekar, T. Somasundaram, and R. Ahmed.** 1993. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **67**:7340-9.
102. **Max, E. E.** 2003. Immunoglobulins: Molecular Genetics, p. 138-144. *In* W. E. Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, vol. 1. Lippincott, Williams et Wilkins.
103. **Max, E. E.** 2003. Immunoglobulins: Molecular Genetics, p. 107-150. *In* W. E. Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, vol. 1. Lippincott, Williams et Wilkins.
104. **McGavern, D. B., D. Homann, and M. B. Oldstone.** 2002. T cells in the central nervous system: the delicate balance between viral clearance and disease. *J Infect Dis* **186 Suppl 2**:S145-51.
105. **McGovern, B. H., B. K. Abu Dayyeh, and R. T. Chung.** 2008. Avoiding therapeutic pitfalls: the rational use of specifically targeted agents against hepatitis C infection. *Hepatology* **48**:1700-12.
106. **McHeyzer-Williams, M. G., G. J. Nossal, and P. A. Lalor.** 1991. Molecular characterization of single memory B cells. *Nature* **350**:502-5.
107. **McIntyre, K. W., and R. M. Welsh.** 1986. Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection. *J Exp Med* **164**:1667-81.
108. **McMichael, A.** 1998. Preparing for HIV vaccines that induce cytotoxic T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **10**:379-81.
109. **Mead, D. G., F. B. Ramberg, D. G. Besselsen, and C. J. Mare.** 2000. Transmission of vesicular stomatitis virus from infected to noninfected black flies co-feeding on nonviremic deer mice. *Science* **287**:485-7.
110. **Mehta, S. H., A. Cox, D. R. Hoover, X. H. Wang, Q. Mao, S. Ray, S. A. Strathdee, D. Vlahov, and D. L. Thomas.** 2002. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* **359**:1478-83.
111. **Mestecky, J., and J. R. McGhee.** 1987. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* **40**:153-245.
112. **Miller, J. F., and G. F. Mitchell.** 1968. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* **128**:801-20.
113. **Milne, C. D., and C. J. Paige.** 2006. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol* **18**:20-30.
114. **Mitchell, G. F., and J. F. Miller.** 1968. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* **128**:821-37.

115. **Miyake, K., I. L. Weissman, J. S. Greenberger, and P. W. Kincade.** 1991. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med* **173**:599-607.
116. **Molina, J. M.** 1993. [Role of cytokines in the regulation of HIV expression]. *Pathol Biol (Paris)* **41**:777-80.
117. **Moore, J. P., Y. Cao, D. D. Ho, and R. A. Koup.** 1994. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**:5142-55.
118. **Moore, K. W., A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira, and T. R. Mosmann.** 1993. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* **11**:165-90.
119. **Moskophidis, D., M. Bategay, M. A. Bruendler, E. Laine, I. Gresser, and R. M. Zinkernagel.** 1994. Resistance of lymphocytic choriomeningitis virus to alpha/beta interferon and to gamma interferon. *Journal of Virology* **68**:1951-1955.
120. **Moskophidis, D., M. Bategay, M. van den Broek, E. Laine, U. Hoffmann-Rohrer, and R. M. Zinkernagel.** 1995. Role of virus and host variables in virus persistence or immunopathological disease caused by a non-cytolytic virus. *Journal of General Virology* **76 (Pt 2)**:381-91.
121. **Moskophidis, D., F. Lechner, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 1994. MHC class I and non-MHC-linked capacity for generating an anti-viral CTL response determines susceptibility to CTL exhaustion and establishment of virus persistence in mice. *J Immunol* **152**:4976-83.
122. **Moskophidis, D., F. Lechner, H. Pircher, and R. M. Zinkernagel.** 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* **362**:758-61.
123. **Moskophidis, D., F. Lechner, H. Pircher, and R. M. Zinkernagel.** 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T. *Nature* **362**:758-761.
124. **Nishimura, H., N. Minato, T. Nakano, and T. Honjo.** 1998. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* **10**:1563-72.
125. **Nisonoff, A., F. C. Wissler, and L. N. Lipman.** 1960. Properties of the major component of a peptic digest of rabbit antibody. *Science* **132**:1770-1.
126. **Oakley, O. R., B. A. Garvy, S. Humphreys, M. H. Qureshi, and C. Pomeroy.** 2008. Increased weight loss with reduced viral replication in interleukin-10 knock-out mice infected with murine cytomegalovirus. *Clin Exp Immunol* **151**:155-64.
127. **Ochsenbein, A. F., D. D. Pinschewer, S. Sierro, E. Horvath, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 2000. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13263-8.
128. **Oettinger, M. A., D. G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore.** 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**:1517-23.
129. **Okazaki, T., A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, and T. Honjo.** 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13866-71.
130. **Ostrowski, M. A., J. X. Gu, C. Kovacs, J. Freedman, M. A. Luscher, and K. S. MacDonald.** 2001. Quantitative and qualitative assessment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4+ T cell immunity to gag in HIV-1-infected individuals with

- differential disease progression: reciprocal interferon-gamma and interleukin-10 responses. *J Infect Dis* **184**:1268-78.
131. **Palmer, J. L., and A. Nisonoff.** 1964. Dissociation of Rabbit Gamma-Globulin into Half-Molecules after Reduction of One Labile Disulfide Bond. *Biochemistry* **3**:863-9.
 132. **Pavio, N., and M. M. Lai.** 2003. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* **28**:287-304.
 133. **Pestka, J. M., M. B. Zeisel, E. Blaser, P. Schurmann, B. Bartosch, F. L. Cosset, A. H. Patel, H. Meisel, J. Baumert, S. Viazov, K. Rispeter, H. E. Blum, M. Roggendorf, and T. F. Baumert.** 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:6025-30.
 134. **Pestka, S., C. D. Krause, D. Sarkar, M. R. Walter, Y. Shi, and P. B. Fisher.** 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* **22**:929-79.
 135. **Pfau, C. J., J. K. Valenti, D. C. Pevear, and H. K. D.** 1982. Lymphocytic choriomeningitis virus killer T cells are lethal only in weakly disseminated murine infections. *Journal of experimental Medicine* **156**:79-89.
 136. **Pietrangeli, C. E., S. Hayashi, and P. W. Kincade.** 1988. Stromal cell lines which support lymphocyte growth: characterization, sensitivity to radiation and responsiveness to growth factors. *Eur J Immunol* **18**:863-72.
 137. **Pillai, S., A. Cariappa, and S. T. Moran.** 2005. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* **23**:161-96.
 138. **Pinschewer, D. D., M. Perez, E. Jeetendra, T. Bachi, E. Horvath, H. Hengartner, M. A. Whitt, J. C. de la Torre, and R. M. Zinkernagel.** 2004. Kinetics of protective antibodies are determined by the viral surface antigen. *Journal of Clinical Investigation* **114**:988-993.
 139. **Planz, O., S. Ehl, E. Furrer, E. Horvath, M. A. Brundler, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 1997. A critical role for neutralizing-antibody-producing B cells, CD4(+) T cells, and interferons in persistent and acute infections of mice with lymphocytic choriomeningitis virus: implications for adoptive immunotherapy of virus carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6874-9.
 140. **Pleass, R. J., J. I. Dunlop, C. M. Anderson, and J. M. Woof.** 1999. Identification of residues in the CH2/CH3 domain interface of IgA essential for interaction with the human fcalpha receptor (FcalphaR) CD89. *J Biol Chem* **274**:23508-14.
 141. **Porter, R. R.** 1958. Separation and isolation of fractions of rabbit gamma-globulin containing the antibody and antigenic combining sites. *Nature* **182**:670-1.
 142. **Puck, J. M., W. P. Glezen, A. L. Frank, and H. R. Six.** 1980. Protection of infants from infection with influenza A virus by transplacentally acquired antibody. *J Infect Dis* **142**:844-9.
 143. **Raff, M. C., M. Megson, J. J. Owen, and M. D. Cooper.** 1976. Early production of intracellular IgM by B-lymphocyte precursors in mouse. *Nature* **259**:224-6.
 144. **Ravetch, J. V., and S. Bolland.** 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **19**:275-90.
 145. **Roberts, A., L. Buonocore, R. Price, J. Forman, and J. K. Rose.** 1999. Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* **73**:3723-32.
 146. **Robertson, B., G. Myers, C. Howard, T. Brettin, J. Bukh, B. Gaschen, T. Gojobori, G. Maertens, M. Mizokami, O. Nainan, S. Netesov, K. Nishioka, T. Shin i, P. Simmonds, D. Smith, L. Stuyver, and A. Weiner.** 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol* **143**:2493-503.

147. **Roost, H. P., M. F. Bachmann, A. Haag, U. Kalinke, V. Pliska, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 1995. Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1257-61.
148. **Rumfelt, L. L., Y. Zhou, B. M. Rowley, S. A. Shinton, and R. R. Hardy.** 2006. Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp Med* **203**:675-87.
149. **Saji, F., M. Koyama, and N. Matsuzaki.** 1994. Current topic: Human placental Fc receptors. *Placenta* **15**:453-466.
150. **Sakaguchi, N., S. Kashiwamura, M. Kimoto, P. Thalmann, and F. Melchers.** 1988. B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *EMBO J* **7**:3457-64.
151. **Salvato, M., P. Borrow, E. Shimomaye, and M. B. Oldstone.** 1991. Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. *J Virol* **65**:1863-9.
152. **Salvato, M., E. Shimomaye, P. Southern, and M. B. Oldstone.** 1988. Virus-lymphocyte interactions. IV. Molecular characterization of LCMV Armstrong (CTL+) small genomic segment and that of its variant, Clone 13 (CTL-). *Virology* **164**:517-22.
153. **Sanchez-Merino, V., S. Nie, and K. Luzuriaga.** 2005. HIV-1-specific CD8+ T cell responses and viral evolution in women and infants. *J Immunol* **175**:6976-86.
154. **Sandlie, I., and T. E. Michaelsen.** 1991. Engineering monoclonal antibodies to determine the structural requirements for complement activation and complement mediated lysis. *Mol Immunol* **28**:1361-8.
155. **Saphire, E. O., P. W. Parren, R. Pantophlet, M. B. Zwick, G. M. Morris, P. M. Rudd, R. A. Dwek, R. L. Stanfield, D. R. Burton, and I. A. Wilson.** 2001. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* **293**:1155-9.
156. **Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and D. Baltimore.** 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* **59**:1035-48.
157. **Schitteck, B., and K. Rajewsky.** 1990. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* **346**:749-51.
158. **Schlissel, M. S., and D. Baltimore.** 1989. Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell* **58**:1001-7.
159. **Sen, G. C.** 2001. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**:255-81.
160. **Sevilla, N., S. Kunz, A. Holz, H. Lewicki, D. Homann, H. Yamada, K. P. Campbell, J. C. de La Torre, and M. B. Oldstone.** 2000. Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J Exp Med* **192**:1249-60.
161. **Sher, A., R. T. Gazzinelli, I. P. Oswald, M. Clerici, M. Kullberg, E. J. Pearce, J. A. Berzofsky, T. R. Mosmann, S. L. James, and H. C. Morse, 3rd.** 1992. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev* **127**:183-204.
162. **Shlomchik, M. J., A. Marshak-Rothstein, C. B. Wolfowicz, T. L. Rothstein, and M. G. Weigert.** 1987. The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* **328**:805-11.
163. **Shoukry, N. H., A. Grakoui, M. Houghton, D. Y. Chien, J. Ghayeb, K. A. Reimann, and C. M. Walker.** 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **197**:1645-55.

164. **Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D. G. Murphy, H. Okamoto, J. M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I. T. Shin, L. J. Stuyver, H. J. Thiel, S. Viazov, A. J. Weiner, and A. Widell.** 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**:962-73.
165. **Singh, M. K., F. V. Fuller-Pace, M. J. Buchmeier, and P. J. Southern.** 1987. Analysis of the genomic L RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **161**:448-456.
166. **Smelt, S. C., P. Borrow, S. Kunz, W. Cao, A. Tishon, H. Lewicki, K. P. Campbell, and M. B. Oldstone.** 2001. Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics. *J Virol* **75**:448-57.
167. **Southern, P. J., M. K. Singh, Y. Riviere, D. R. Jacoby, M. J. Buchmeier, and M. B. A. Oldstone.** 1987. Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **157**:145-155.
168. **Stauber, R.** 2000. [Epidemiology and transmission of hepatitis C]. *Wien Med Wochenschr* **150**:460-2.
169. **Sun, K., L. Torres, and D. W. Metzger.** 2010. A detrimental effect of interleukin-10 on protective pulmonary humoral immunity during primary influenza A virus infection. *J Virol* **84**:5007-14.
170. **Suzuki, T., K. Ishii, H. Aizaki, and T. Wakita.** 2007. Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev* **59**:1200-12.
171. **Thimme, R., J. Bukh, H. C. Spangenberg, S. Wieland, J. Pemberton, C. Steiger, S. Govindarajan, R. H. Purcell, and F. V. Chisari.** 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15661-8.
172. **Thimme, R., D. Oldach, K. M. Chang, C. Steiger, S. C. Ray, and F. V. Chisari.** 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **194**:1395-406.
173. **Tindall, B., and D. A. Cooper.** 1991. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**:1-14.
174. **Tinoco, R., V. Alcalde, Y. Yang, K. Sauer, and E. I. Zuniga.** 2009. Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity* **31**:145-57.
175. **Titus, J. A., P. Perez, A. Kaubisch, M. A. Garrido, and D. M. Segal.** 1987. Human K/natural killer cells targeted with hetero-cross-linked antibodies specifically lyse tumor cells in vitro and prevent tumor growth in vivo. *J Immunol* **139**:3153-8.
176. **Tomaras, G. D., N. L. Yates, P. Liu, L. Qin, G. G. Fouda, L. L. Chavez, A. C. Decamp, R. J. Parks, V. C. Ashley, J. T. Lucas, M. Cohen, J. Eron, C. B. Hicks, H. X. Liao, S. G. Self, G. Landucci, D. N. Forthal, K. J. Weinhold, B. F. Keele, B. H. Hahn, M. L. Greenberg, L. Morris, S. S. Karim, W. A. Blattner, D. C. Montefiori, G. M. Shaw, A. S. Perelson, and B. F. Haynes.** 2008. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* **82**:12449-63.
177. **Tong, M. J., N. S. el-Farra, A. R. Reikes, and R. L. Co.** 1995. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* **332**:1463-6.
178. **Virgin, S.** 2007. Pathogenesis of viral infection, p. 352. *In* W. Lippincott (ed.), *Fields Virology*, vol. 1, Philadelphia.

179. **Wagner, R. R., and J. K. Rose (ed.).** 1996. Rhabdoviridae: the viruses and their replication. Lippincott-Raven.
180. **Wang, B., A. Rieger, O. Kilgus, K. Ochiai, D. Maurer, D. Fodinger, J. P. Kinet, and G. Stingl.** 1992. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc epsilon RI. *J Exp Med* **175**:1353-65.
181. **Williams, A. F., and A. N. Barclay.** 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* **6**:381-405.
182. **Williams, G. T., A. R. Venkitaraman, D. J. Gilmore, and M. S. Neuberger.** 1990. The sequence of the mu transmembrane segment determines the tissue specificity of the transport of immunoglobulin M to the cell surface. *J Exp Med* **171**:947-52.
183. **Woitas, R. P., U. Petersen, D. Moshage, H. H. Brackmann, B. Matz, T. Sauerbruch, and U. Spengler.** 2002. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* **8**:562-6.
184. **Wright, K. E., R. C. Spiro, J. W. Burns, and M. J. Buchmeier.** 1990. Post-translational processing of the glycoproteins of the lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **177**:175-183.
185. **Wu, T. T., and E. A. Kabat.** 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* **132**:211-50.
186. **Zajac, A. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, D. J. Sourdive, M. Suresh, J. D. Altman, and R. Ahmed.** 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* **188**:2205-13.
187. **Zellweger, R. M., L. Hangartner, J. Weber, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 2006. Parameters governing exhaustion of rare T cell-independent neutralizing IgM-producing B cells after LCMV infection. *Eur J Immunol* **36**:3175-85.
188. **Zinkernagel, R. M.** 1996. Immunology taught by viruses. *Science* **271**:173-8.
189. **Zinkernagel, R. M., and P. C. Doherty.** 1974. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* **251**:547-8.