

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**RÔLE DES ANTICORPS NATURELS DANS LA PRÉSENTATION
ANTIGÉNIQUE LORS D'INFECTIONS VIRALES**

Par
Maude Bigras

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

Claude Daniel
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe :

Hugo Soudeyns
Centre de recherche du CHU Sainte-Justine
Université de Montréal

Directeur de recherche :

Alain Lamarre
INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Les infections virales chroniques constituent un problème majeur de santé publique. Dans le cas du virus de l'hépatite C (VHC), on compte 170 millions de porteurs à travers le monde. L'hépatite C chronique peut entraîner de graves conséquences, telles que des cirrhoses ou des hépatocarcinomes. Dix à trente pourcent des individus seront par contre épargnés et élimineront le virus suite à l'infection aiguë. Il est maintenant connu que l'élaboration rapide d'une réponse cellulaire vigoureuse et multispécifique mène à l'élimination du virus. Cependant, les raisons limitant cette réponse ne sont pas encore déterminées.

L'hypothèse de notre laboratoire est que les individus qui réussissent à éliminer le virus possèdent un répertoire plus adéquat d'anticorps naturels (AcNat). Ces anticorps, présents sans immunisation, se lieraient au virus dès son entrée dans l'organisme et formeraient ainsi des complexes immuns. Ceci permettrait un drainage plus rapide aux organes lymphoïdes secondaires, une présentation antigénique plus efficace et une meilleure élaboration de l'immunité adaptative. L'objectif plus spécifique de ce projet était de mieux comprendre l'interaction des AcNat avec des virus persistants.

Afin d'observer la liaison d'AcNat à ce type de virus, le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), ayant pour hôte naturel la souris, a été utilisé. Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) a quant à lui servi de modèle d'infection aiguë, pour comparer la réponse des anticorps naturels face à ces deux extrêmes. Des ELISAs et des tests de capture ont été effectués avec ces deux modèles et des sérums de différentes lignées de souris, présentant des répertoires d'anticorps plus ou moins diversifiés. De plus, des tests de présentation antigénique ont été réalisés pour vérifier si ces anticorps permettaient d'augmenter la réponse des lymphocytes T à LCMV. Lors de ces tests, les cellules présentatrices d'antigènes utilisées étaient des cellules dendritiques. Chez cette

population cellulaire, la présence d'un récepteur permettant de lier les IgMs a été vérifiée par PCR quantitatif et par cytométrie en flux. Finalement, des expériences préliminaires ont été effectuées avec des pseudoparticules du VHC (VHCpp) et des sérums provenant d'une cohorte d'utilisateurs de drogues intraveineuses.

Les résultats obtenus démontrent que la liaison des anticorps naturels aux virus utilisés est influencée par la diversité du répertoire et la concentration en IgMs. De plus, les cellules dendritiques semblent posséder un récepteur permettant de lier les anticorps naturels. Finalement, les tests de présentation antigénique démontrent clairement le rôle de ces anticorps dans le drainage aux organes lymphoïdes secondaires.

Maude Bigras

Alain Lamarre

Remerciements

Ce que j'ai appris durant cette maîtrise dépasse largement le cadre académique.

Je souhaite remercier grandement mon directeur de recherche, Alain Lamarre, qui encourage beaucoup notre formation et qui m'a permis d'essayer de nombreuses techniques. Un merci particulier pour sa patience et sa compréhension.

Puis notre chère Esther Tarrab, qui est le ciment de l'équipe, mais surtout le réconfort et l'énergie nous permettant de persévérer. C'est en grande partie grâce à elle que je me suis accrochée à ce projet. De plus, son ouverture d'esprit et sa culture ont contribué à de nombreuses discussions intéressantes, agrémentant mon passage au laboratoire.

Je tiens aussi à souligner l'amitié de mes nombreux collègues de travail qui ont donné une âme à ma maîtrise : Marie-Hélène Côté, Julie Lahaie, Patrick Lacasse, Isabelle Meunier, Emmanuel Moreau, Véronique Bougie, Bélinda Akhué, Marie-Ève Bilodeau, Isabelle Poirier et Tania Charpentier. Une mention spéciale aux Talbotins avec qui nous formons une grande équipe.

Ma liste ne saurait être complète sans reconnaître la présence de mon amoureux, François D'Amour, avec qui j'ai partagé non seulement mon milieu de travail, mais aussi ma vie. Merci pour sa patience et ses nombreux encouragements.

Table des matières

Résumé	iii
Remerciements.....	v
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xii
Liste des abréviations	xiii

REVUE DE LITTÉRATURE..... 5

1	Immunité humorale innée	6
1.1	Les lymphocytes B-1	6
1.1.1	Caractéristiques des lymphocytes B-1	6
1.1.2	Développement des lymphocytes B-1	7
1.1.2.1	Origine des lymphocytes B-1	7
1.1.2.2	Différentiation des lymphocytes B-1a et B-1b.....	9
1.1.3	Les lymphocytes B-1 chez l'humain.....	10
1.1.4	Le rôle des lymphocytes B-1	11
1.1.4.1	Production d'anticorps naturels.....	11
1.1.4.2	Autoimmunité	12
1.2	Les anticorps naturels	14
1.2.1	Caractéristiques.....	14
1.2.2	Rôles des anticorps naturels.....	15
1.3	Diversité du répertoire.....	17
1.3.1	Structure des immunoglobulines.....	17
1.3.2	Réarrangement des gènes des immunoglobulines.....	19
1.3.3	Diversité chez les lymphocytes B-1	21
1.3.4	Modèles de souris	22
1.3.4.1	La souris HC1	23
1.3.4.2	La souris QM.....	23
1.3.4.3	La souris J _H T	24
1.3.4.4	La souris RAG ^{-/-}	25
2	Réponse adaptative à médiation cellulaire.....	25
2.1	Les lymphocytes T	26
2.1.1	Les lymphocytes T auxiliaires	27
2.1.2	Les lymphocytes T cytotoxiques	28
2.1.3	Souris P14.....	30
2.2	Les cellules présentatrices d'antigènes	30
2.2.1	Les cellules dendritiques.....	31
2.2.2	Les cellules dendritiques folliculaires.....	32
2.3	Le complexe majeur d'histocompatibilité	33
2.3.1	CMH I.....	34
2.3.2	CMH II	35
2.4	Mécanismes menant à la présentation antigénique.....	35
2.4.1	L'internalisation.....	36
2.4.1.1	Récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines.....	36
2.4.1.2	Récepteur Fcα/μ.....	37

2.4.1.3	Récepteurs des molécules du système du complément	38
2.4.2	Génération de peptides.....	39
2.4.2.1	Voie d'apprêtement cytosolique.....	39
2.4.2.2	Voie d'apprêtement endocytaire	41
2.4.2.3	Présentation croisée.....	41
2.4.3	Présentation aux lymphocytes T	43
3	Modèles viraux	43
3.1	Virus de l'hépatite C (VHC).....	43
3.1.1	Caractéristiques du virus.....	43
3.1.2	L'hépatite C	45
3.1.3	Interaction du VHC avec le système immunitaire	46
3.1.4	Mécanismes d'évasion du système immunitaire.....	48
3.1.5	Les modèles d'étude du virus	49
3.2	Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)	50
3.2.1	Caractéristiques du virus.....	51
3.2.2	L'infection par LCMV.....	52
3.2.3	Interaction avec le système immunitaire.....	53
3.3	Virus de la stomatite vésiculaire (VSV).....	54
3.3.1	Caractéristiques du virus.....	55
3.3.2	L'infection par VSV	56
3.3.3	Interaction avec le système immunitaire.....	56
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	58
1.	Lignées cellulaires	59
2.	Virus / plasmides	59
3.	Production virale - VSV	60
4.	Production virale - LCMV	60
5.	Purification des virus (VSV et LCMV)	61
6.	Production des pseudoparticules du virus de l'hépatite C par transfection	61
7.	Concentration des VHCpp	62
8.	ELISA - anticorps naturels contre LCMV-WE et VSV-IND	63
9.	Dosage par ELISA de la concentration sérique en IgMs chez la souris	64
10.	Purification des IgMs.....	65
11.	ELISA IgMs purifiées contre LCMV-WE et VSV-IND.....	66
12.	Capture des complexes immuns formés des anticorps naturels et de VSV-IND	66
13.	Capture des complexes immuns formés des anticorps naturels et de LCMV-WE... ..	67
14.	Test de présentation antigénique « <i>in vivo</i> ».....	67
15.	Test de présentation antigénique <i>in vitro</i>	70

16.	Recherche de la présence du Fc α / μ R chez les cellules dendritiques par PCR quantitatif.....	70
17.	Recherche de la présence du Fc α / μ R chez les cellules dendritiques par cytométrie en flux	72
18.	ELISA anticorps naturels contre les VHCpp.....	73
19.	Dosage par ELISA de la concentration en IgMs sériques chez l'humain.....	74

RÉSULTATS 75

1	Interactions anticorps naturels – virus.....	76
1.1	Liaison des IgMs de différentes souches de souris naïves aux virus LCMV et VSV ..	76
1.2	Concentration sérique d'IgMs chez différentes souches de souris	79
1.3	Liaison aux virus LCMV et VSV des IgMs de différentes souches de souris lorsque la concentration est normalisée.....	81
1.4	Capture de complexes immuns entre les anticorps naturels et les virus VSV et LCMV	84
2	Impact des anticorps naturels sur la présentation antigénique	86
2.1	Présentation antigénique au niveau de la rate de souris infectées par LCMV-WE, en présence ou en absence d'anticorps naturels.....	86
3	Mécanisme d'action des anticorps naturels	88
3.1	Présentation antigénique in vitro, en présence ou en absence d'anticorps naturels.....	88
3.2	Recherche de la présence du Fc α / μ R chez les cellules dendritiques.....	90
3.2.1	Recherche de l'ARNm du récepteur Fc α / μ par qPCR.....	90
3.2.2	Recherche de l'expression du Fc α / μ R par cytométrie en flux.....	92
4	Étude préliminaire chez l'humain	94
4.1	Liaison des anticorps naturels aux pseudoparticules du VHC.....	94

DISCUSSION..... 98

1	Interactions anticorps naturels - virus	101
1.1	Effet de la diversité du répertoire d'anticorps naturels sur la liaison des IgMs de différentes souches de souris naïves aux virus LCMV et VSV	101
1.2	La concentration en IgMs sériques varie d'une souche de souris à l'autre.....	102
1.3	La diversité du répertoire en anticorps naturels joue un rôle important dans la liaison de virus purifiés	103
1.4	Les anticorps naturels peuvent former, chez certains individus, des complexes immuns avec VSV et LCMV	104
2	Rôles des anticorps naturels.....	105
2.1	In vivo, la présentation antigénique au niveau de la rate de souris infectées par LCMV-WE est augmentée en présence d'anticorps naturels	105
2.2	In vitro, la présentation antigénique ne semble pas plus efficace en présence d'anticorps naturels.....	106
2.3	Expression du Fc α / μ R chez les cellules dendritiques	107
3	Étude préliminaire chez l'humain	111
3.1	Liaison d'anticorps naturels humains aux pseudoparticules du VHC	111

Conclusion et perspectives	114
Liste des références.....	117

Liste des figures

Figure 1 : Modèles possibles du développement des lymphocytes B-1a et B-1b...	9
Figure 2: Représentation schématique du rôle hypothétique des anticorps naturels dans les réponses immunitaires.....	16
Figure 3: Représentation de la structure classique d'une immunoglobuline d'isotype IgG.	18
Figure 4: Représentation des segments géniques des chaînes lourdes et légères et de leur réarrangement pour former les immunoglobulines.....	21
Figure 5 : Schéma général de la diversité du répertoire des immunoglobulines des souris utilisées dans ce travail, ainsi qu'un abrégé des déficiences qui leur sont attribuées.	22
Figure 6 : Représentation des gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines de la souris HC1.....	23
Figure 7 : Représentation des gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines de la souris QM.....	24
Figure 8 : Interaction entre le lymphocyte T auxiliaire et la cellule présentatrice d'antigènes.	28
Figure 9 : Interaction entre le lymphocyte T cytotoxique et la cellule présentatrice d'antigènes.	29
Figure 10 : Schématisation de la voie d'apprêtement cytosolique.....	40
Figure 11 : Représentation de la polyprotéine du VHC et de la protéine F, produit d'un cadre de lecture alternatif. Les fonctions connues de chaque protéine sont inscrites.....	44
Figure 12 : Comparaison de la réponse cellulaire entre les individus qui éliminent le VHC et ceux qui développent une maladie chronique.....	47
Figure 13 : Représentation de la réponse immunitaire classique dirigée contre LCMV chez une souris adulte. Les CTLs permettent le contrôle du virus sous le seuil de détection.....	54
Figure 14 : Image caractéristique de VSV-IND et VSV-NJ en microscopie électronique.....	55
Figure 15 : Représentation de la réponse immunitaire classique dirigée contre VSV chez une souris adulte. Les anticorps d'isotype IgM contrôlent rapidement le virus et font place ensuite aux IgG.....	57
Figure 16 : Détection d'anticorps naturels d'isotype IgM produits par les souris C57BL/6, QM, HC1, et J _H T, liés à LCMV-WE purifié.....	77
Figure 17 : Détection d'anticorps naturels d'isotype IgM produits par les souris C57BL/6, QM, HC1, et J _H T, liés à VSV-IND purifié.	78
Figure 18 : Quantification de la concentration en IgMs sériques des souris C57BL/6, QM, HC1, J _H T, RAG-1 ^{-/-}	80
Figure 19 : Liaison des IgMs purifiées des souris C57BL/6, QM, HC1, et J _H T au LCMV purifié.	82
Figure 20 : Liaison des IgMs purifiées des souris C57BL/6, QM, HC1, et J _H T au VSV purifié.	83

Figure 21 : Capture des complexes immuns composés d'anticorps naturels de souris C57BL/6 et de LCMV.....	84
Figure 22 : Capture des complexes immuns composés d'anticorps naturels de souris C57BL/6 et de VSV.	85
Figure 23 : Prolifération des lymphocytes T CD8 ⁺ LCMV-spécifiques mis en culture avec des cellules dendritiques spléniques, activées aux LPS, provenant de souris infectées par LCMV-WE.....	87
Figure 24 : Prolifération des lymphocytes T CD8 ⁺ de souris P14 suite à la présentation antigénique de LCMV-WE inactivé aux UVs, complexé ou non à des anticorps naturels, par des cellules dendritiques de souris C57BL/6, activées aux LPS.	89
Figure 25 : Expression de l'ARNm du récepteur Fcα/μ chez différentes populations cellulaires.	91
Figure 26 : Liaison d'IgMs-APC par différentes populations cellulaires de la rate de souris C57BL/6.	93

Liste des tableaux

Tableau 1 : Anticorps naturels d'isotype IgM dirigés contre des pseudoparticules du virus de l'hépatite C chez différents donneurs non-infectés ainsi que la concentration en IgMs sériques pour chaque donneur.....	96
--	----

Liste des abréviations

°C : degré Celcius

µg : microgramme

µl : microlitre

ADN : acide désoxyribonucléique

AID : *activated induce cytidine deaminase*

ARN_m: acide ribonucléique messenger

APC: allophycocyanine

BCR : *B-cell receptor*

BLIMP-1 : *B lymphocyte-induced maturation protein 1*

CDR : *complementarity determining region*

C_H : constant heavy

C_L : constant light

CMH I: molécule de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité

CMH II : molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CTL : *cytotoxic T lymphocytes*

D : diversité

DC : *dendritic cell*

ELISA : *enzyme-linked immunoabsorbant assay*

Fc : fragment Fc de la molécule d'Ig (de fragment cristallisable)

FITC : fluorescéine isothiocyanate

GALT : *gut associated lymphoïd tissue*

GFP : *green fluorescent protein*

GP : glycoprotéine

HVR : *hypervariable region*

Ig : immunoglobuline

IgG : immunoglobuline G

IgM : immunoglobuline M

IgA: immunoglobuline A
 IgE: immunoglobuline E
 IL : interleukine
 IFN : interféron
 J_H : jonction *heavy*
 J_L : jonction *light*
 Kb : kilobase
 kDa : kilodalton
 LCMV: *lymphochoriomeningitidis virus* (virus de la chorioméningite lymphocytaire)
 LCMV-WE : virus de la chorioméningite lymphocytaire, souche WE
 LPS : lipopolysaccharides
 ml : millilitre
 MLV : *murine leukemia virus*
 MOI : *multiplicity of infection*
 NK: natural killer
 nm: nanometre
 NP: 4-hydroxy-3-nitrophényl acétyl
 NP : nucléoprotéine
 nt : nucléotide
 P : palindromique
 pb : paire de base
 PAMPs : *pathogen associated molecular patterns*
 PCR : *polymerase chain reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)
 pIgR : *polymeric immunoglobulin receptor*
 PRR : *pattern recognition receptor*
 p/v: poids/volume
 QM : quasimonoclonal
 RAG : *recombination-activating gene*
 RE : réticulum endoplasmique
 RER : réticulum endoplasmique rugueux

SBF : sérum bovin fœtal

SCID : *severe combined immunodeficiency*

SG: segment génique

TCR : *T cell receptor* (récepteur des lymphocytes T)

TdT: *terminal deoxytransferase* (désoxynucléotidyle transférase terminale)

TLR : *toll-like receptor*

TNF : *tumor necrosis factor*

UTR : *untranslated regions*

V_H : variable *heavy*

V_L : variable *light*

VHC : virus de l'hépatite C

VHCpp : pseudoparticules du virus de l'hépatite C

VSV-IND : virus de la stomatite vésiculaire sérotype Indiana

v/v : volume/volume

Introduction

Il est bien connu que les anticorps jouent un rôle important dans l'élaboration de réponses immunitaires acquises et dans la protection à long terme contre certains pathogènes. Les cellules produisant ces anticorps sont nommées lymphocytes B, ou lymphocytes B-2, pour les différencier d'autres cellules B beaucoup moins connues, les lymphocytes B-1. Ces cellules produisent des anticorps sans rencontre préalable avec un antigène et sont donc appelés anticorps naturels. Ces anticorps font partie de la réponse immunitaire innée et peuvent être utiles durant le temps que met la réponse adaptative à s'élaborer.

Plusieurs équipes ont démontré que les anticorps naturels pouvaient reconnaître et se lier à différents microorganismes, tels que le virus influenza, les virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) et la bactérie *Listeria monocytogenes* (Baumgarth *et al.*, 2000; Ochsenbein *et al.*, 1999). Il a été proposé que ces anticorps seraient utiles soit par la neutralisation directe de certains pathogènes, soit par la formation de complexes immuns qui pourraient participer à l'élaboration de la réponse immunitaire cellulaire (Ochsenbein and Zinkernagel, 2000). Lorsqu'on sait que certains virus ayant tendance à entraîner des infections persistantes sont principalement contrôlés par cette réponse, ce mécanisme d'action des anticorps naturels semble d'autant plus important. Le virus de l'hépatite C en est un bon exemple. Ce virus entraîne une maladie chronique dans environ 70% des cas (Hoofnagle, 2002). Il a été démontré que lorsqu'il est éliminé, une réponse cellulaire rapide et multispécifique était en cause (Grakoui *et al.*, 2003; Shoukry *et al.*, 2003; Thimme *et al.*, 2001; Lechner *et al.*, 2000; Diepolder *et al.*, 1995). Par contre, les raisons pour lesquelles cette réponse n'est pas élaborée dans la majorité des cas nous échappent.

Comme une réponse cellulaire efficace dépend, entre autres, d'une présentation antigénique adéquate, il est possible qu'un défaut à ce niveau soit en

cause dans l'échec de la réponse immunitaire contre le VHC. L'hypothèse de notre laboratoire est que les anticorps naturels joueraient un rôle d'initiateurs de la réponse et que les individus qui réussissent à éliminer le VHC possèdent un répertoire plus adéquat d'anticorps naturels. Ainsi, dès l'entrée du virus dans l'organisme, ils permettraient la formation de complexes immuns, plus facilement drainés aux organes lymphoïdes secondaires et entraînant donc plus facilement l'internalisation du pathogène et sa présentation antigénique. Il a d'ailleurs été observé que les cellules présentatrices d'antigènes étaient beaucoup plus efficaces pour présenter à des cellules T CD8⁺, des antigènes complexés à des IgGs par rapport à des antigènes solubles (Amigorena and Bonnerot, 1999; Manca *et al.*, 1991). Il se pourrait donc que ce soit aussi le cas pour les anticorps naturels. Comme ils sont pour la plupart d'isotype IgM, le récepteur Fcα/μ serait alors le récepteur de choix pour entraîner l'internalisation de ces complexes immuns. La présence de ce récepteur, liant les IgAs et les IgMs, a été démontrée sur les cellules B et les macrophages, mais aucune mention n'a été faite par rapport aux cellules dendritiques, qui sont pourtant de puissantes activatrices des cellules T (Shibuya *et al.*, 2000).

Par ce projet, nous souhaitons démontrer la présence du récepteur Fcα/μ sur les cellules dendritiques de la rate et que ces cellules présentaient plus efficacement les antigènes aux cellules T en présence d'anticorps naturels. De plus, nous avons pour but de vérifier qu'il y avait bel et bien formation de complexes immuns entre certains virus et les anticorps naturels et que ce phénomène se produisait en fonction de la diversité du répertoire d'anticorps naturels.

Pour ce faire, nous avons utilisé deux modèles de virus, diamétralement opposés, afin de comparer la liaison des anticorps naturels de certaines souches de souris présentant différentes lacunes au niveau de la diversité de leur répertoire d'anticorps. Le premier virus, LCMV, entraîne souvent des infections persistantes chez la souris et lorsqu'il est éliminé, c'est grâce à la réponse cellulaire. Ce virus

est aussi utilisé dans cette étude comme modèle du VHC. Le second virus, VSV, entraîne plutôt des infections aiguës chez la souris, qui sont éliminées par la réponse humorale (Hangartner *et al.*, 2006). Des ELISA mesurant la liaison des anticorps naturels à chacun d'eux ont démontré un rôle important de la concentration et de la diversité des anticorps naturels dans l'activité de liaison. Par contre, des tests de capture en ELISA ont suggéré la formation de complexes immuns chez certaines souris seulement, ce qui corroborerait notre hypothèse que cette réaction efficace n'a pas lieu chez tous les individus.

LCMV a été utilisé afin d'infecter des souris possédant ou non des anticorps naturels. Les cellules dendritiques de la rate de ces souris ont ensuite été isolées pour effectuer des tests de présentation antigénique à des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au virus. La prolifération des lymphocytes T était beaucoup plus importante lorsque les cellules dendritiques provenaient de la rate des souris possédant des anticorps naturels. Dans ces conditions expérimentales, deux facteurs pourraient expliquer l'augmentation de la présentation antigénique. Il est possible que la présence d'anticorps naturels permette une meilleure internalisation des antigènes capturés et donc une meilleure présentation antigénique ou encore qu'un meilleur drainage aux organes lymphoïdes secondaires se reflète par une concentration accrue de virus dans la rate de la souris possédant des anticorps naturels et donc qu'il y ait plus d'antigènes pour effectuer la présentation antigénique. Pour vérifier les mécanismes en cause, des tests de présentation antigénique similaires ont été réalisés, cette fois complètement *in vitro*. LCMV était alors incubé avec des cellules dendritiques, en présence ou en absence d'anticorps naturels et des lymphocytes T spécifiques étaient ajoutés. Nous n'avons pas pu démontrer de différence significative entre ces deux conditions. Comme notre hypothèse proposait que le Fc α / μ R entraînerait l'internalisation des complexes immuns formés du virus et d'anticorps naturels, nous avons voulu vérifier la présence de ce récepteur au niveau des cellules dendritiques. Lorsque les résultats du PCR quantitatif et de la cytométrie en flux sont mis en commun, il apparaît très probable que les cellules dendritiques

possèdent un récepteur pour les IgMs, mais il est beaucoup moins certain qu'il s'agisse du Fc α / μ R caractérisé par Shibuya et collaborateurs. Il est possible aussi que le rôle des anticorps naturels ne se situe pas au niveau de l'internalisation des complexes immuns.

Finalement, des études préliminaires ont été réalisées chez l'humain avec des pseudoparticules du virus de l'hépatite C (VHCpp) et des sérums de volontaires n'ayant pas été exposés à ce virus, afin de comparer les réponses en anticorps naturels des donneurs envers ce pathogène. Les résultats obtenus démontrent une très grande variabilité interindividuelle dans l'activité de liaison des anticorps naturels humains aux VHCpp.

Ces résultats, en commun avec d'autres du laboratoire, démontrent clairement qu'un répertoire diversifié en anticorps naturels augmente le drainage aux organes lymphoïdes secondaires, soutenant ainsi une partie de notre hypothèse. Par contre, plusieurs expériences sont encore à effectuer pour prouver qu'ils puissent jouer un rôle prépondérant dans l'élimination de virus persistants. Cependant, cette étude apporte quelques pistes permettant d'affirmer qu'ils pourraient faire partie d'une réponse orchestrée par toutes les branches de l'immunité et impliquant plusieurs facteurs, tant viraux que de l'hôte.

Chapitre 1

Revue de littérature

1 Immunité humorale innée

Le sérum est d'une incroyable complexité moléculaire. Parmi le nombre impressionnant de ses composantes, certaines réagissent avec des molécules étrangères. C'est le cas des anticorps classiques, produits lors d'une infection ou d'une immunisation, ou des nombreuses composantes du système du complément. Ces composantes contribuent à plusieurs fonctions importantes du système immunitaire, de la neutralisation à l'induction de la phagocytose. Les anticorps naturels sont des acteurs un peu moins connus de l'immunité humorale. Ceux-ci sont présents naturellement dans le sérum, en absence de toute stimulation antigénique. Ils offrent ainsi une première ligne de défense face aux infections et font donc partie de l'immunité innée. Contrairement aux anticorps classiques, ils sont produits par une classe différente de lymphocytes, soit les lymphocytes B-1.

1.1 *Les lymphocytes B-1*

1.1.1 Caractéristiques des lymphocytes B-1

Les lymphocytes B-1 représentent environ 5% de la population totale de lymphocytes B chez la souris et sont retrouvées dans plusieurs tissus, tels que la rate, l'intestin et surtout dans les cavités pleurales et péritonéales, où elles représentent la principale population de lymphocytes B (Fagarasan *et al.*, 2000; Kantor and Herzenberg, 1993; Kroese *et al.*, 1992). Contrairement aux lymphocytes B-2, dérivés de la moelle osseuse et colonisant ensuite la rate, les lymphocytes B-1, proviennent du foie fœtal. Des expériences de transfert de cellules ont révélé que cette population s'auto-renouvelle dans un organisme adulte (Kantor *et al.*, 1995; Kantor *et al.*, 1992b; Hayakawa *et al.*, 1986; Hayakawa *et al.*, 1985), ce qui n'est pas le cas chez les lymphocytes B-2, qui sont constamment renouvelées à partir des précurseurs de la moelle osseuse. Une autre différence marquée concerne leurs gammes d'antigènes reconnus. Alors que les

B-2 présentent une diversité de récepteurs quasi-infinie, les B-1 ont un répertoire beaucoup plus restreint dû à l'absence de certains mécanismes de diversification au stade précoce de leur développement (ces mécanismes seront décrits plus en détails ultérieurement). Alors que les lymphocytes B-2 peuvent sécréter toutes les classes d'immunoglobulines (Ig), les B-1 sécrètent principalement des IgMs et des IgG3, mais aussi des IgAs lorsqu'elles se retrouvent au niveau du tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT de *Gut Associated Lymphoid Tissue*) (Fagarasan *et al.*, 2000b; Tarakhovsky, 1997; Hardy, 1992; Herzenberg *et al.*, 1986; Sidman *et al.*, 1986). De plus, les deux types de lymphocytes B répondent différemment aux stimuli chimiotactiques. L'équipe de Tasuku Honjo (Fagarasan *et al.*, 2000a) a démontré qu'une stimulation *in vitro* aux lipopolysaccharides (LPS) des cellules de la cavité péritonéale, entraîne une régulation à la hausse de l'ARN messager (ARNm) des récepteurs de chimiokines CCR7 et BLR1 et augmente aussi la réponse chimiotactique aux chimiokines des tissus lymphoïdes secondaires et aux chimioattractants des lymphocytes B, alors que cet effet n'est pas observé lorsqu'il s'agit de cellules de la rate.

1.1.2 Développement des lymphocytes B-1

1.1.2.1 Origine des lymphocytes B-1

L'origine des lymphocytes B-1 fait l'objet d'une grande controverse et deux hypothèses principales s'affrontent.

Tout d'abord, le modèle de la sélection avance que les lymphocytes B-1 et les lymphocytes B-2 proviennent des mêmes précurseurs et qu'elles sont ensuite sélectionnées par l'antigène au stade sIgM⁺ (Berland and Wortis, 2002; Wortis and Berland, 2001; Lam and Rajewsky, 1999). Dans ce sens, il a été démontré que la liaison croisée du récepteur des lymphocytes B (BCR), en absence d'antigène et de l'aide des cellules T, menait à l'expression du CD5 (un marqueur différenciant

les lymphocytes B-1) par les lymphocytes B-2 de la rate et qu'elles pouvaient ensuite proliférer suite à des stimuli typiques des lymphocytes B-1, tels les phorbol-esters (Wortis *et al.*, 1995; Rothstein *et al.*, 1991). Cette hypothèse provient du fait que les B-1 expriment un répertoire restreint de chaînes variables lourdes (V_H) des Ig, distinct de celui des B-2 (Pennell *et al.*, 1989; Forster *et al.*, 1988; Pennell *et al.*, 1988; Tarlinton *et al.*, 1988) et donc que la spécificité du BCR déterminerait la différenciation de ces cellules (Clarke and Arnold, 1998; Arnold *et al.*, 1994). Une expérience appuyant cette hypothèse est celle de Lam et collaborateurs (Lam and Rajewsky, 1999), qui ont généré une souris transgénique en insérant dans le locus de la chaîne lourde des Ig, un gène de la famille V_H12 , exprimé de façon préférentielle par les lymphocytes B-1. Cette souris produisait ainsi principalement des lymphocytes B-1.

Le second modèle est celui de la lignée, qui propose que les lymphocytes B-1 et les lymphocytes B-2 proviennent de deux lignées hématopoïétiques différentes. Ce modèle a été élaboré puisque les tissus fœtaux semblent mieux repeupler en lymphocytes B-1 des receveurs irradiés immunodéficients, alors que la moelle osseuse adulte produit plutôt des lymphocytes B-2 (Kantor and Herzenberg, 1993; Kantor *et al.*, 1992a). De plus, il a été démontré que les deux populations de lymphocytes B nécessitaient des cytokines différentes pour leur développement (Vosshenrich *et al.*, 2004; Vosshenrich *et al.*, 2003) et dernièrement, un progéniteur de lymphocytes B-1 a été isolé (Montecino-Rodriguez *et al.*, 2006), soutenant cette hypothèse. Ce progéniteur serait de phénotype $Lin^-CD19^+CD45R^{-/low}$ et permettrait la reconstitution des populations de lymphocytes B-1a ($sIgM^{hi}CD11b^+CD5^+$) et B1-b ($sIgM^{hi}CD11b^+CD5^-$) mais pas des lymphocytes B-2 ($sIgM^{hi}CD11b^-$). Lorsque l'on prend en considération que dans la lignée des lymphocytes B-2, le CD45R est exprimé avant le CD19, ceci est un argument important pour ce modèle (Dorshkind and Montecino-Rodriguez, 2007), mais qui n'exclut pas que certaines B-1 pourraient passer par le modèle de la sélection.

1.1.2.2 Différentiation des lymphocytes B-1a et B-1b

Bien que le modèle de la lignée semble prévaloir en ce qui concerne le développement des lymphocytes B-1 par rapport aux B-2, la successive différenciation en lymphocytes B-1a et B-1b reste pour le moment beaucoup plus nébuleuse. Plusieurs modèles ont été proposés, tels qu'illustrés à la figure 1. Le premier stipule que ces deux populations proviennent de progéniteurs différents qui se différencient ensuite en B-1a et B-1b, mais cette hypothèse doit être rejetée étant donné la récente découverte d'une cellule progénitrice permettant la reconstitution de ces deux populations (Montecino-Rodriguez *et al.*, 2006). Par contre, des informations sont encore manquantes pour déterminer si ces cellules se différencient en deux populations différentes ou si les B-1a et B-1b sont uniquement le résultat de différents stades de développement (Dorshkind and Montecino-Rodriguez, 2007).

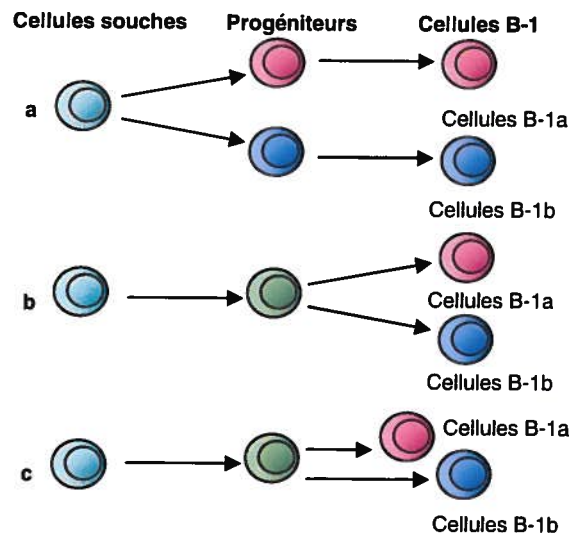


Figure 1 : Modèles possibles du développement des lymphocytes B-1a et B-1b

- a) Les lymphocytes B-1a et B-1b se développent à partir de précurseurs différents
- b) Les lymphocytes B-1a et B-1b se développent à partir d'un précurseur commun
- c) Les lymphocytes B-1a et B-1b se développent à partir d'un précurseur commun qui produit d'abord des lymphocytes B-1a, puis des B-1b

Tiré de (Dorshkind and Montecino-Rodriguez, 2007)

Quoiqu'il en soit, ces deux populations présentent des fonctions différentes. Il a été démontré que les lymphocytes B-1a sécrétaient de façon spontanée des anticorps importants lors de la phase précoce d'une infection par *Streptococcus pneumoniae*. C'est donc de cette population cellulaire en particulier dont il est question lorsque l'on aborde le thème des anticorps naturels. Cette même étude a établi que les lymphocytes B-1b semblent plutôt importants pour la production des premiers anticorps anti-polysaccharide pneumococcal de la réponse adaptative et qu'ils jouent un rôle dans la protection à long terme (Haas *et al.*, 2005). Il a aussi été démontré que les anticorps produits par les lymphocytes B-1b permettaient d'élaborer une immunité T-indépendante contre *Borrelia hermsii* (Alugupalli *et al.*, 2004). La conclusion de ces études est que ces deux populations collaborent pour éliminer certains pathogènes ou pour prévenir leurs infections, les lymphocytes B-1a faisant partie d'une réponse plus précoce et innée par rapport aux B-1b.

D'autres caractéristiques distinguent aussi ces deux populations, telles que l'importance de la signalisation par le CD19, pour les B-1a, (Knoops *et al.*, 2004) et le répertoire des Ig (Kantor *et al.*, 1997).

1.1.3 Les lymphocytes B-1 chez l'humain

Tout comme chez la souris, on retrouve dans la cavité péritonéale de l'humain des cellules B sIgM⁺CD5⁺ (Donze *et al.*, 1997) et elles sont aussi fortement représentées au niveau du foie fœtal (Lydyard *et al.*, 1990). Elles peuvent être identifiées chez les embryons humains 15 à 24 semaines après le début de la gestation (Bofill *et al.*, 1985) et elles représentent 40% des lymphocytes B matures de l'omentum (Solvason and Kearney, 1992). Chez l'adulte sain, environ 20% des lymphocytes B circulants expriment le CD5 (Bohm, 2004). Ces cellules partagent plusieurs similarités avec celles de la souris. Leur développement se fait de façon très précoce et elles se retrouvent ensuite minoritaires par rapport à une population n'exprimant pas le CD5 (Herzenberg

and Tung, 2006). Lors d'expériences utilisant du sang de cordon humain, il a été démontré qu'elles sécrétaient des IgMs polyréactives dirigées contre des auto-antigènes (Avrameas, 1991) ou des composantes de microorganismes (Lydyard *et al.*, 1990). Il a été observé que des IgMs de sérums humains normaux augmentaient la phagocytose du parasite *Leishmania donovani* par des monocytes humains (Navin *et al.*, 1989) et qu'elle permettaient la neutralisation du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Beebe and Cooper, 1981). Comme chez les lymphocytes B-1 murins, le répertoire en anticorps des lymphocytes B-1 humains est restreint, en partie en raison de leur capacité réduite à produire des mutations somatiques (Brezinschek *et al.*, 1997). Par contre, plusieurs informations sont incertaines concernant l'origine de ces cellules chez l'humain et leur capacité à s'auto-renouveler.

1.1.4 Le rôle des lymphocytes B-1

1.1.4.1 Production d'anticorps naturels

La caractéristique principale des lymphocytes B-1 (B-1a), est la sécrétion d'anticorps en absence d'infection ou d'immunisation, d'où le terme anticorps naturels (Bos *et al.*, 1988; Forster and Rajewsky, 1987; Hayakawa *et al.*, 1983). Cette propriété a été attribuée au répresseur de transcription Blimp-1 (de *B lymphocyte-induced maturation protein 1*) (Savitsky and Calame, 2006). Cette équipe avait tout d'abord démontré que Blimp-1 était requis dans la différenciation des lymphocytes B-2 en plasmocytes et dans leur maintenance dans la moelle osseuse en tant que cellules sécrétrices d'Igs de longue durée de vie. De plus, des souris ayant des lymphocytes B déficientes pour Blimp-1 ont des taux d'IgMs sériques beaucoup plus faibles par rapport aux souris sauvages (Shapiro-Shelef *et al.*, 2005). Une autre preuve du rôle de cette molécule dans la sécrétion des anticorps naturels, est que des lymphocytes B-1 déficients en Blimp-

1 sont moins efficaces pour protéger des souris contre le virus influenza (Savitsky and Calame, 2006). Les rôles joués par les anticorps naturels seront discutés dans la section 1.2.2.

1.1.4.2 Autoimmunité

Comme le récepteur des lymphocytes B-1 reconnaît des motifs conservés (voir section 1.2.1), il arrive qu'il soit auto-réactif. La plupart du temps, les anticorps auto-réactifs produits sont de faible affinité et n'entraînent pas de conséquence. Par contre, cette propriété a fait germer l'hypothèse que ces cellules pourraient être la source d'anticorps auto-réactifs de plus haute affinité, associés à des maladies auto-immunes. Il existe maintenant quelques exemples de maladies auto-immunes associées aux lymphocytes B-1, telles le syndrome de Sjorgen (Dauphinee *et al.*, 1988) et l'arthrite rhumatoïde (Youinou *et al.*, 1990). Ces maladies découlent possiblement d'un dérèglement du contrôle des lymphocytes B-1, puisque le CD5, et possiblement d'autres molécules aussi, contribue à limiter l'activation des lymphocytes B-1 en les maintenant dans un état semblable à l'anergie (Hippen *et al.*, 2000). La théorie selon laquelle le CD5 régule à la baisse le signal transmis par le récepteur des lymphocytes B est soutenue par deux expériences. Tout d'abord, l'injection intrapéritonéale de doses élevées d'anti-IgMs induit l'apoptose des lymphocytes B-1 chez des souris de souche sauvage, alors que le même traitement, appliqué à des souris déficientes en CD5, entraîne la prolifération de ces cellules (Tarakhovsky, 1997; Bikah *et al.*, 1996). Dans le cas des lymphocytes B-1b, d'autres molécules joueraient le rôle du CD5. Le CD22 a été suggéré comme candidat potentiel (Tarakhovsky, 1997). L'auto-immunité résulterait donc d'une diminution ou d'un défaut dans la régulation négative des lymphocytes B-1, qui leur permettrait par exemple de recevoir de l'aide des lymphocytes T, de faire de la commutation de classe et de l'hypermutation somatique. Ces phénomènes pourraient être dépendants du recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-1 au complexe BCR-CD5, puisqu'un

modèle de souris ayant une mutation pour cette enzyme présente plus de lymphocytes B-1 que la normale (Sidman *et al.*, 1986).

Conclusion

Plusieurs caractéristiques distinguent les lymphocytes B-1 des lymphocytes B-2. Ces différences incluent leurs localisations, leurs répertoires d'anticorps, leurs propriétés de croissance et l'expression des marqueurs de surface (Hardy, 1992; Marcos *et al.*, 1989; Herzenberg *et al.*, 1986; Hayakawa *et al.*, 1985). Il existe par contre une controverse concernant leurs origines. Certains ont apporté des preuves en faveur du modèle de la sélection, selon lequel ces deux types cellulaires se seraient différenciés à partir d'un même précurseur et d'autres appuient plutôt le modèle de la lignée, ces deux populations proviendraient selon eux de précurseurs différents. De plus en plus d'évidences supportent maintenant ce dernier modèle. Aussi, ce modèle est cohérent avec celui des « couches évolutives du système immunitaire », selon lequel les cellules souches hématopoïétiques générant des cellules lymphoïdes plus primitives seraient encore effectrices malgré l'apparition de cellules souches donnant lieu à des cellules avec des fonctions beaucoup plus élaborées (Kantor *et al.*, 1995; Kantor and Herzenberg, 1993; Herzenberg and Herzenberg, 1989). Par contre, tous s'entendent pour dire que les lymphocytes B-1 auraient un rôle important à jouer lors de la période très précoce suivant l'entrée d'un pathogène dans l'organisme, grâce à la sécrétion d'anticorps naturels.

1.2 Les anticorps naturels

1.2.1 Caractéristiques

Les anticorps naturels sont présents dans le sérum d'individus normaux en absence de toute stimulation antigénique. Ceci est observable par exemple chez des souris maintenues dans des conditions stériles (Berneman *et al.*, 1992) ou dans le sang de cordon humain (Mouthon *et al.*, 1995). Le répertoire d'antigènes reconnus par ces anticorps reste constant tout au long de la vie (Mouthon *et al.*, 1995), ce qui est cohérent avec la capacité d'auto-renouvellement de leurs principales cellules productrices, les B-1a (Hamilton *et al.*, 1994). Les anticorps produits par ces cellules sont principalement d'isotype IgM mais peuvent aussi être d'isotype IgA et IgG3 (Kasaian *et al.*, 1992). Ces immunoglobulines ont tendance à avoir une affinité de liaison plutôt faible et une spécificité moins définie par rapport aux anticorps de l'immunité acquise qui sont très spécifiques et d'une grande affinité (Lalor and Morahan, 1990).

Les anticorps naturels reconnaissent principalement des molécules phylogénétiquement conservées, telles que les acides nucléiques, les protéines du choc thermique, des hydrates de carbone et des phospholipides (Baumgarth *et al.*, 2005; Hardy and Hayakawa, 1994; Kantor and Herzenberg, 1993). Il s'avère que plusieurs microorganismes partagent des épitopes similaires à ces structures, permettant ainsi leur reconnaissance. C'est le cas notamment du virus influenza (Baumgarth *et al.*, 2000), du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) et des bactéries *Listeria monocytogenes* (Ochsenbein *et al.*, 1999), et *Streptococcus pneumoniae* (Haas *et al.*, 2005). Un modèle propose qu'au cours de l'évolution, le répertoire des lymphocytes B-1a aurait été sélectionné pour permettre la reconnaissance de pathogènes communs, constituant donc une sorte de mémoire immunitaire protectrice (Martin and Kearney, 2000).

1.2.2 Rôles des anticorps naturels

Dans la réponse adaptative, les lymphocytes B-2 matures collaborent avec les lymphocytes T pour entraîner la production d'anticorps monospécifiques et de haute affinité, d'abord d'isotype IgM et ensuite IgG après le changement de classe. Cette réponse est très précise mais nécessite un délai d'au moins une semaine (MacLennan *et al.*, 1997). Par contre, immédiatement après l'entrée d'un pathogène, les anticorps naturels peuvent le lier et contribuent ainsi à la première ligne de défense du système immunitaire. Ces anticorps peuvent agir directement en neutralisant certains pathogènes (Gobet *et al.*, 1988), ou bien indirectement en limitant la dissémination des pathogènes vers les organes vitaux et en augmentant la réponse adaptative par séquestration des microorganismes dans les organes lymphoïdes secondaires (voir figure 2) (Martin *et al.*, 2001; Baumgarth *et al.*, 2000; Ochsenbein *et al.*, 1999). Un modèle d'infection systémique chez la souris a d'ailleurs permis de démontrer que les anticorps naturels pouvaient confiner une infection et en limiter la mortalité subséquente. Dans ce modèle de péritonite aiguë (CLP pour *cecal ligation and puncture*), des souris déficientes en IgMs sécrétées présentaient un taux de mortalité de 70% par rapport à 20% chez des souris de souche sauvage, ce qui était restauré lorsque les souris déficientes étaient reconstituées avec des IgMs polyclonales purifiées à partir de sérums de souris normales (Boes *et al.*, 1998a).

La réponse en anticorps naturels peut aussi favoriser la réponse humorale adaptative. Lorsque des souris déficientes en IgMs sécrétées sont immunisées avec des doses sous-optimales d'un antigène T-dépendant, elles produisent significativement moins d'IgGs spécifiques que les souris de souche sauvage (Boes *et al.*, 1998b). Ce phénomène semble impliquer des récepteurs du complément, puisque dans un modèle de souris déficiente en CD21/CD35, la présence d'IgMs spécifiques à l'antigène utilisé n'augmente pas la production d'IgGs (Applequist *et al.*, 2000). Cette action des anticorps naturels serait donc due à la formation de complexes immuns entraînant la liaison de composantes du

système du complément. Comme les anticorps naturels activent le système du complément, ils pourraient contribuer à la lyse directe de certains pathogènes, ainsi qu'à l'augmentation de la phagocytose de ceux-ci (Ochsenbein and Zinkernagel, 2000). Il semble que les anticorps naturels, probablement aussi grâce au recrutement du complément, favoriseraient le développement des réponses cellulaires adaptatives (Stager *et al.*, 2003). Il est possible que les IgMs de ces complexes immuns soient reconnues par un récepteur spécifique permettant ainsi l'internalisation d'antigènes. Un récepteur reconnaissant les IgMs et les IgAs (Fc α / μ R) a d'ailleurs été découvert (Shibuya *et al.*, 2000) pour appuyer cette hypothèse. Les anticorps naturels agiraient donc à de nombreux niveaux et constitueraient un pont entre les réponses innées et adaptatives.

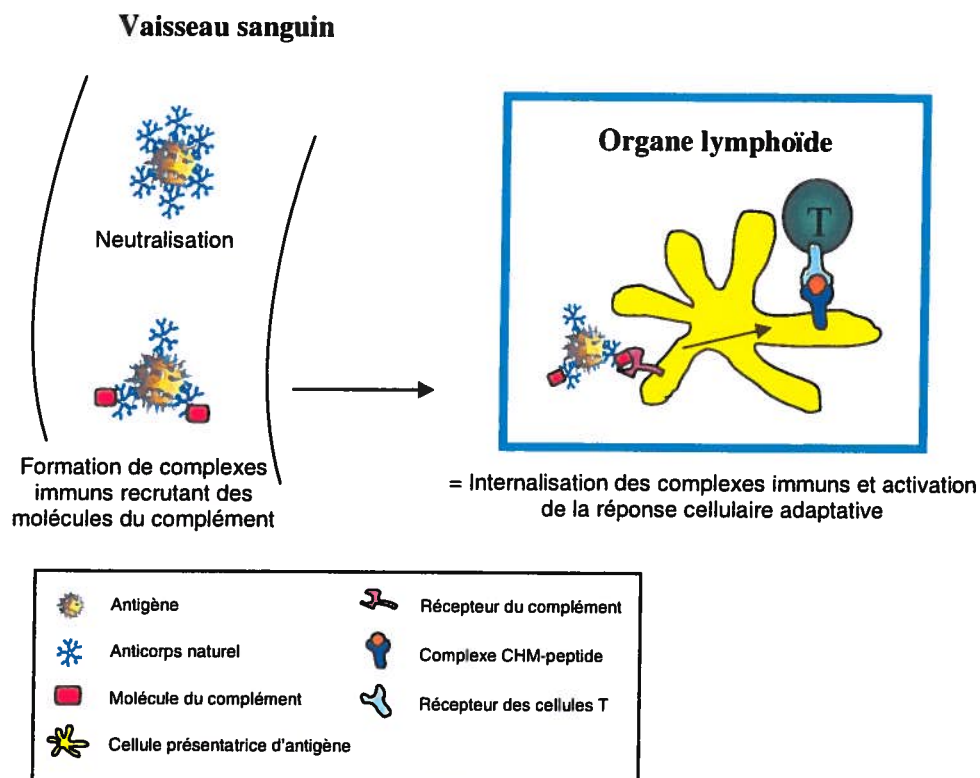


Figure 2: Représentation schématique du rôle hypothétique des anticorps naturels dans les réponses immunitaires.

Adapté de : (Ochsenbein and Zinkernagel, 2000).

1.3 Diversité du répertoire

1.3.1 Structure des immunoglobulines

Tel qu'illustré à la figure 3, les immunoglobulines sont composées de quatre chaînes polypeptidiques, deux lourdes (H de *heavy*) et deux légères (L de *light*). Les chaînes légères sont reliées aux chaînes lourdes par un pont disulfure et des interactions salines, hydrogènes et hydrophobes. Deux dimères sont liés ensuite entre eux par les mêmes types d'interactions, pour former la molécule entière (Edelman *et al.*, 1961; Edelman and Poulik, 1961). C'est aux extrémités amino-terminales des chaînes lourdes et légères que l'on retrouve la plus grande variabilité d'un anticorps à l'autre, c'est pourquoi on les nomme régions variables (V). La variabilité de ces régions est concentrée dans trois sous-régions hypervariables par chaîne, nommées régions de complémentarité 1 à 3 (CDR de *complementarity determining region*), le CDR3 de la chaîne lourde étant le plus diversifié. C'est à ces endroits qu'a lieu la liaison avec l'antigène et c'est donc les CDRs qui donnent la spécificité à un anticorps (Davies *et al.*, 1990; Davis and Bjorkman, 1988). Les autres sections des chaînes lourdes et légères varient beaucoup moins d'une Ig à une autre, c'est pourquoi elles sont nommées régions constantes (C).

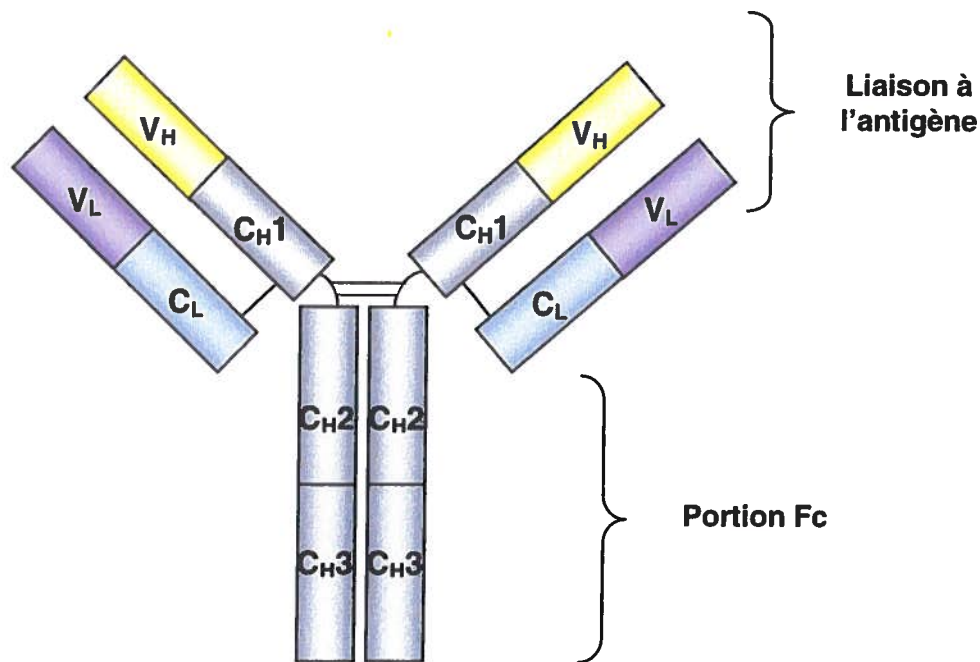


Figure 3: Représentation de la structure classique d'une immunoglobuline d'isotype IgG.

V_L = région variable légère (*light*), V_H = région variable lourde (*heavy*), C_L = région constante légère, C_H = région constante lourde, traits = ponts disulfures)

Il existe cinq types de chaînes lourdes et deux types de chaînes légères. Les chaînes lourdes constituent l'isotype de l'Ig et sont les suivantes : δ (IgD), μ (IgM), γ (IgG), α (IgA) et ϵ (IgE). Certaines comportent des sous-classes soit, $\gamma 1$ à 4 chez l'humain et $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ et $\gamma 3$ chez la souris. Chez les deux espèces on retrouve les sous-classes $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Chaque chaîne lourde peut se combiner à une chaîne légère kappa (κ) ou lambda (λ). L'IgM se retrouve sous forme pentamérique et l'IgA peut être soit monomérique ou former des dimères, tandis que les autres classes d'Ig sont présentes sous la forme de monomères seulement. Dans le cas des IgMs et des IgAs dimériques, la chaîne J permet leur polymérisation. Lorsque les Ig sont sous forme de pentamères ou de dimères, leur avidité face à l'antigène est grandement augmentée puisqu'elles présentent de plus nombreux sites de liaison (Edelman, 1991).

1.3.2 Réarrangement des gènes des immunoglobulines

Plusieurs mécanismes contribuent à la très grande diversité du répertoire des immunoglobulines. Tout d'abord, les gènes permettant l'élaboration des chaînes légères et des chaînes lourdes sont séparés en différents segments. On retrouve des segments V (*variable*), J (*joining*) et C (*constant*) dans les gènes codant pour les chaînes légères et V, D (*diversity*), J et C pour les lourdes (voir la figure 4). Les segments C codent pour la région constante de l'immunoglobuline alors que les V, D et J servent à l'élaboration des régions variables. Il y a de nombreux segments V, D et J pour chaque chaîne, ce qui contribue déjà à créer une très grande diversité. Ensuite, leur combinaison aléatoire est un mécanisme important de diversification (Tonegawa, 1983). La flexibilité jonctionnelle, qui consiste en différentes possibilités de lier les segments au niveau de leurs séquences codantes joue aussi un rôle (Weigert *et al.*, 1980). Afin de joindre les segments, une coupure dans l'ADN se produit grâce aux enzymes Rag-1 et Rag-2 (Oettinger *et al.*, 1990). Suite à ce clivage, il y a formation d'une structure en épingle à cheveux qui sera aussi coupée par l'action d'endonucléases, laissant à l'occasion une section d'ADN simple brin. Des enzymes de réparation pourront ensuite ajouter des nucléotides P (palindromiques), complémentaires. Ces nucléotides P, dont l'insertion dépend de l'endroit où s'est produite la coupure au sein de l'épingle à cheveux, ajoute une variabilité au niveau du CDR3 (Gauss and Lieber, 1996). Lors de ce processus, la désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT) peut catalyser l'addition de jusqu'à 15 nucléotides N (« nontemplated »), apparemment au hasard, au niveau de la jonction des segments, contribuant de façon considérable à l'augmentation de la diversité des récepteurs des lymphocytes B (Komori *et al.*, 1993). L'association combinatoire des chaînes lourdes et légères constitue ensuite une autre forme de variabilité. En effet, puisque la région de reconnaissance de l'antigène, ou paratope, est formée de la combinaison des régions variables des deux chaînes, la modification de l'une ou de l'autre, entraînera un changement de spécificité de l'anticorps produit (Lee *et al.*, 1993). Finalement, lors de l'activation des lymphocytes B au sein des centres

germinatifs, un dernier processus vient contribuer grandement à la quasie-infinie diversité du répertoire des immunoglobulines, il s'agit de l'hypermutation somatique. Lors de ce phénomène, des nucléotides sont mutés au hasard au niveau des régions V, mais surtout dans des endroits particulièrement sensibles aux mutations (*hot spots*). Ces modifications à l'intérieur de la région de reconnaissance des épitopes, permettent d'augmenter l'affinité des anticorps pour leurs antigènes et constituent donc le processus de maturation d'affinité (Neuberger *et al.*, 1998). À ce moment, les lymphocytes B peuvent procéder au changement de classe, c'est-à-dire au remplacement de la région constante μ par une autre, ce qui changera l'isotype de l'anticorps mais ne contribuera pas à la modification de l'affinité. Ces deux processus, soit l'hypermutation somatique et la permutation isotypique sont effectués grâce à l'enzyme AID (activation-induce cytidine deaminase) (Luo *et al.*, 2004; Muramatsu *et al.*, 2000). Un dernier mécanisme est impliqué dans la diversité des récepteurs des lymphocytes B, soit les réarrangements secondaires. Ceci se produit lorsque l'immunoglobuline produite reconnaît un antigène du soi ou tout simplement pour augmenter la variabilité (Zhang *et al.*, 2003; Gay *et al.*, 1993; Tiegs *et al.*, 1993). Grâce à l'expression des gènes *rag*, des segments de la chaîne lourde ou légère peuvent être remplacés par d'autres (Pelanda *et al.*, 1997).

effectuent peu ou pas d'hypermutation somatique ou de réarrangements secondaires (Forster *et al.*, 1988).

Les lymphocytes B-1 vont donc développer une gamme plus restreinte de spécificités, mais qui sera complémentaire à celle exprimée par les lymphocytes B-2. En effet, les anticorps produits par les lymphocytes B-2 reconnaissent des antigènes de nature protéique bien spécifiques, alors que ceux produits par les B-1 vont plutôt reconnaître des motifs répétés qui peuvent aussi être d'autres natures, tels que des hydrates de carbones et des phospholipides (voir section 1.2.1).

1.3.4 Modèles de souris

Lors des expériences effectuées dans le cadre de ma maîtrise, différents modèles de souris ont été utilisés, chaque modèle présentant un répertoire d'immunoglobulines plus ou moins restreint (voir la figure 5). Toutes les souches possèdent néanmoins un fond génétique C57BL/6.

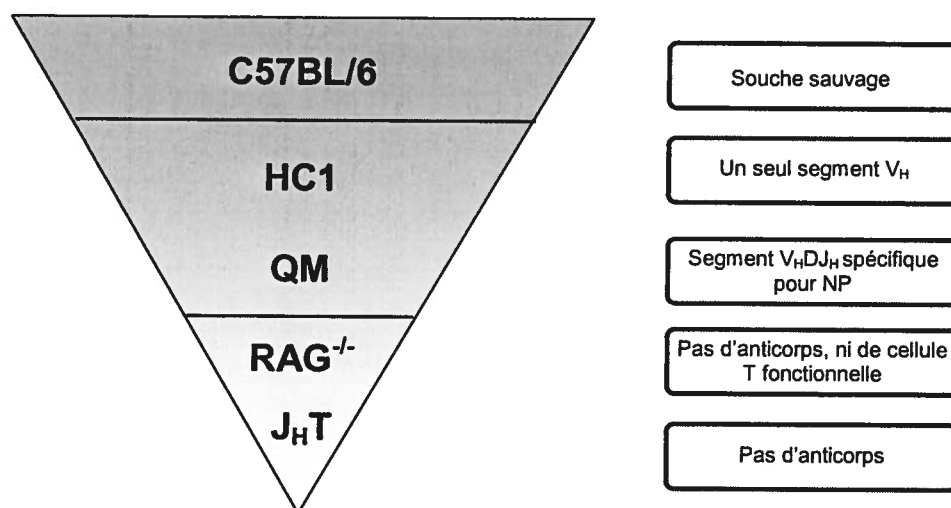


Figure 5 : Schéma général de la diversité du répertoire des immunoglobulines des souris utilisées dans ce travail, ainsi qu'un abrégé des déficiences qui leur sont attribuées.

1.3.4.1 La souris HC1

La souris HC1 a été produite dans le but d'évaluer la diversité que pouvait présenter le CDR3 des immunoglobulines lorsque très peu de segments V sont disponibles (Xu and Davis, 2000). Tel que représenté à la figure 6, cette souris possède seulement un segment humain V_H (V_H5-51), dix segments D et six segments J_H , ainsi que les segments C_μ et $C_{\gamma 1}$ de la région constante (Taylor *et al.*, 1994). Puisqu'elle a un fond génétique $IgH^{-/-}$ et $Ig\kappa^{-/-}$ (Chen *et al.*, 1993a; Chen *et al.*, 1993b), ses seules immunoglobulines fonctionnelles combinent donc le segment humain V_H5-51 à l'un des trois segments V_λ endogènes disponibles. Cette souris présente toutefois une faible population de lymphocytes B et des taux en anticorps circulants aussi beaucoup plus faibles qu'une souris normale. À l'aide de ce modèle, l'équipe de Xu a démontré que l'hypermutation somatique permettait de diversifier grandement le CDR3 de la chaîne lourde des immunoglobulines, puisque ces souris produisent des anticorps pouvant lier plusieurs antigènes différents (Xu and Davis, 2000).

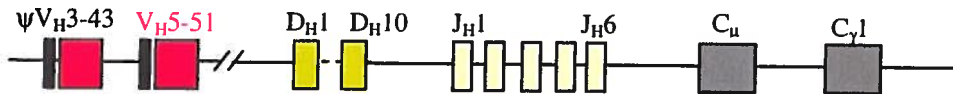


Figure 6 : Représentation des gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines de la souris HC1.

Adapté de (Xu and Davis, 2000).

1.3.4.2 La souris QM

La souris QM est hémizigote pour un segment V_HDJ_H réarrangé (nommé 17.2.25), qui a été inséré par mutagenèse dirigée dans le locus J_H de la chaîne lourde des immunoglobulines (voir la figure 7). L'autre allèle étant non fonctionnel puisque tous les segments J_H y ont été supprimés, ce segment est

nécessairement utilisé en combinaison avec une chaîne légère lambda, puisque l'allèle permettant de produire des chaînes légères kappa est aussi non fonctionnel chez cette souris. Cette combinaison produit des anticorps spécifiques à l'haptène 4-hydroxy-3-nitrophényl (NP). Cette souris possède donc un répertoire primaire d'immunoglobulines monospécifique. Par contre, les phénomènes d'hypermutation somatique et de réarrangements secondaires permettent une certaine variabilité au niveau des récepteurs des lymphocytes B, entraînant un changement de spécificité dans approximativement 20% des cas (Cascalho *et al.*, 1996). Il a été démontré que cette diversité était suffisante pour élaborer des réponses humores protectrices contre certains virus, quoique ces réponses soient retardées par rapport à une souris de souche sauvage (Lopez-Macias *et al.*, 1999).

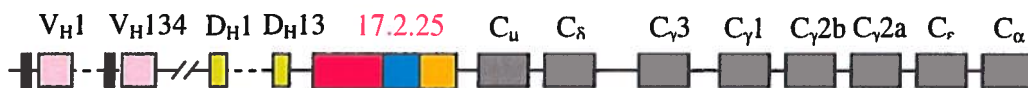


Figure 7 : Représentation des gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines de la souris QM

1.3.4.3 La souris J_HT

La souris J_HT a été élaborée par délétion ciblée des segments J de la chaîne lourde des immunoglobulines dans des cellules souches embryonnaires. Ces cellules ont ensuite été utilisées pour produire des souris de fond génétique C57BL/6 ayant l'impossibilité de combiner leurs segments V-D-J de la chaîne lourde des immunoglobulines. Ceci empêche la progression subséquente du processus de différenciation du lymphocyte B. La souris J_HT ne possède donc pas de lymphocytes B matures et par le fait même, pas d'anticorps (Chen *et al.*, 1993a). Chez cette souris, l'architecture splénique est affectée par l'absence d'une des principales populations cellulaires de cet organe (Mebius *et al.*, 2004; Fu and Chaplin, 1999).

1.3.4.4 La souris RAG^{-/-}

Les enzymes RAG-1 et RAG-2, catalysent les recombinaisons des segments V(D)J des immunoglobulines, mais aussi des récepteurs des lymphocytes T (Oettinger *et al.*, 1990). Des souris déficientes pour l'un ou l'autre de ces gènes, ne présentent donc pas de lymphocytes B, ni de lymphocytes T fonctionnels. Les organes lymphoïdes de ces souris sont plus petits que ceux de souris sauvages et ne contiennent évidemment pas de cellules B et T matures, puisque l'arrêt de la différenciation de ces cellules se produit à un stade précoce vu l'impossibilité de générer des recombinaisons V(D)J. Ces souris présentent un phénotype d'immunodéficience sévère combinée (SCID de *Severe Combined ImmunoDeficiency*). Certains auteurs ont rapporté que cela n'entraînait pas d'anomalie d'un point de vue neuroanatomique ou comportemental (Mombaerts *et al.*, 1992; Shinkai *et al.*, 1992), mais une étude plus récente démontre que chez des souris adultes, les lymphocytes T jouaient un rôle dans la neurogénèse de l'hippocampe et dans les capacités d'apprentissage spatial (Ziv *et al.*, 2006).

2 Réponse adaptative à médiation cellulaire

Jusqu'à présent, il a été question de la réponse humorale, soit innée, via les lymphocytes B-1, soit adaptative, via les lymphocytes B-2. Lors de réponses adaptatives, l'immunité à médiation cellulaire joue aussi un rôle très important. Dans ce cas, les cellules effectrices sont les lymphocytes T. Ces cellules vont reconnaître des antigènes présentés par d'autres cellules et pourront soit permettre l'élaboration de la réponse (lymphocytes T auxiliaires ou T_H), soit lyser les cellules infectées ou tumorales (lymphocytes T cytotoxiques ou CTLs). Pour qu'un antigène soit présenté aux lymphocytes T, il doit d'abord être internalisé à l'intérieur d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA), pour être ensuite dégradé

en peptides qui seront liés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I ou de type II (CMH I ou II). Ceci permet aux lymphocytes T de reconnaître l'antigène dans un contexte du soi. Pour que le lymphocyte T soit activé, il doit aussi recevoir des signaux de co-stimulation de la part des CPAs. Les prochaines sections expliquent plus en détails ces différents phénomènes.

2.1 *Les lymphocytes T*

Quelques principes permettent l'efficacité de la réponse T. Tout d'abord, les lymphocytes T génèrent un répertoire de récepteurs (TCRs de *T cell receptors*) très diversifié de façon similaire aux lymphocytes B, ce qui permet la reconnaissance d'une immense gamme d'antigènes (Davis and Bjorkman, 1988). La spécificité des lymphocytes T est assurée par la clonalité des TCRs au sein d'une même cellule, ce qui empêche la production de réponses indésirables, par exemple de l'auto-immunité. Ensuite, lorsqu'ils sont activés lors de la rencontre avec leur antigène, les lymphocytes T spécifiques s'engagent dans un processus d'expansion clonale qui leur permet d'acquérir leurs fonctions effectrices.

La distinction entre les lymphocytes T auxiliaires ($CD4^+$) et les lymphocytes T cytotoxiques ($CD8^+$) est basée entre autres sur l'expression des co-récepteurs, mais n'est pas absolue. Les co-récepteurs, CD4 ou CD8, font partie de la reconnaissance du CMH par le TCR et permettent la transduction des signaux qui s'ensuivent grâce à leurs queues cytoplasmiques (Fleury *et al.*, 1991). Le CD3, faisant partie du TCR, est aussi une molécule importante dans la transduction des signaux (Kuhns *et al.*, 2006).

Contrairement aux lymphocytes B, qui peuvent reconnaître directement l'antigène via leur récepteur, Rosenthal et Shevach, ainsi que Zinkernagel et

Doherty, démontrèrent que les récepteurs des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ nécessitent que l'antigène soit dégradé en peptides et qu'il soit présenté lié à une molécule de CMH de classe II ou de classe I, respectivement (Zinkernagel and Doherty, 1974; Rosenthal and Shevach, 1973).

2.1.1 Les lymphocytes T auxiliaires

Tel que représenté à la figure 8, le lymphocyte T_H exprime le co-récepteur CD4 à sa surface et est activé par l'interaction de celui-ci et de son TCR avec le complexe antigène-CMH de classe II, pour lequel son TCR est spécifique. L'activation du lymphocyte T_H naïf nécessite aussi un signal de costimulation, donné par l'interaction de la molécule CD28, présente à sa surface, avec les molécules de la famille B7 (B7-1 ou CD80 et B7-2 ou CD86), exprimées par les CPAs (Lenschow *et al.*, 1996). L'interaction du lymphocyte T avec la CPA entraîne chez cette dernière une augmentation de l'expression de ces molécules de costimulation, ainsi que l'apparition du CD40. Cette même interaction induit chez le lymphocyte T l'expression du ligand de CD40 (CD40L) et d'ICOS (de *inducible co-stimulator*), une autre molécule co-stimulatrice (Hutloff *et al.*, 1999). La liaison de CD40 et CD40L permet l'activation complète du lymphocyte T_H et l'induction de changements chez la CPA pour lui permettre d'augmenter son expression de molécules costimulatrices, d'adhésion et de cytokines, afin qu'elle soit plus efficace pour activer les lymphocytes T (Clarke, 2000). Suite à ces événements, CTLA-4 (de *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) est régulé à la hausse et transloqué à la surface cellulaire. Cette molécule inhibitrice ayant une affinité et une avidité pour B7-1 et B7-2 plus élevées par rapport à CD28, permet de limiter ou de terminer la réponse des lymphocytes T, de concert avec PD-1 (de *programmed death-1*) (Chambers *et al.*, 2001; Freeman *et al.*, 2000).

Suite à son activation, le lymphocyte T_H sécrète différentes cytokines, qui ont une influence sur l'activation des lymphocytes B, des CTLs, des macrophages

ou d'autres cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Le profil des cytokines sécrétées oriente la réponse immunitaire pour qu'elle soit à médiation cellulaire (réponse de type T_H1) ou humorale (de type T_H2). La sous-population T_H1 sécrète principalement de l'IL-2, de l'IFN- γ et les TNF- β et α , ce qui contribue à l'activation des CTLs. Pour sa part, la sous-population T_H2 active les lymphocytes B par l'intermédiaire de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'interaction CD40-CD40L, pour ne nommer que celles-ci (O'Garra and Arai, 2000; Belardelli, 1995; Ranges *et al.*, 1987).

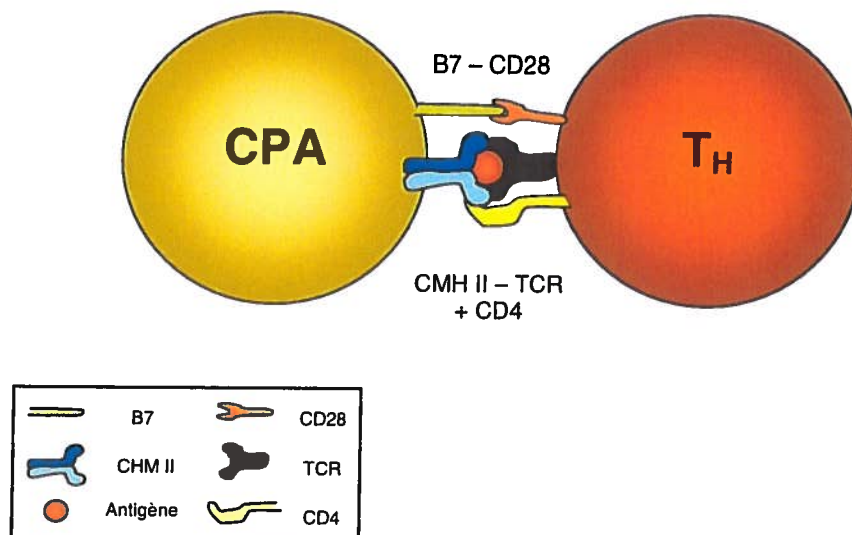


Figure 8 : Interaction entre le lymphocyte T auxiliaire et la cellule présentatrice d'antigènes.

2.1.2 Les lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T $CD8^+$ expriment quant à eux le co-récepteur CD8 (voir figure 9). Pour exercer leurs fonctions effectrices et pour proliférer, ces cellules, lorsqu'elles sont naïves, doivent d'abord être activées par trois signaux distincts, soit la reconnaissance de l'antigène dans le contexte du CMH de classe I par le

TCR, le signal de costimulation CD28-B7 et la présence d'IL-2, sécrétée principalement par les lymphocytes T_H préalablement activés. Dans certains cas, si un de ces signaux est absent, les lymphocytes T $CD8^+$ inadéquatement activés deviennent alors tolérants (Chai *et al.*, 1999). Par contre, lors d'infections, la nécessité des signaux de costimulation semble varier en fonction du pathogène. Une étude effectuée avec le virus ectromelia, infectant naturellement la souris et entraînant une infection aiguë, suggère en fait que la costimulation des lymphocytes T $CD8^+$ via le CD28 jouerait un rôle principalement dans la rapidité de l'activation de ces cellules, ce qui est critique lors de ce type d'infection (Fang and Sigal, 2006). Au contraire, si la rapidité de l'élaboration de la réponse n'est pas critique, la nécessité de ce récepteur semble pouvoir être contournée, ce qui a été démontré avec LCMV. Dans cette étude, des souris déficientes en CD28 et infectées par LCMV pouvaient élaborer une réponse T $CD8^+$ aussi efficace que les souris de type sauvage (Kundig *et al.*, 1996).

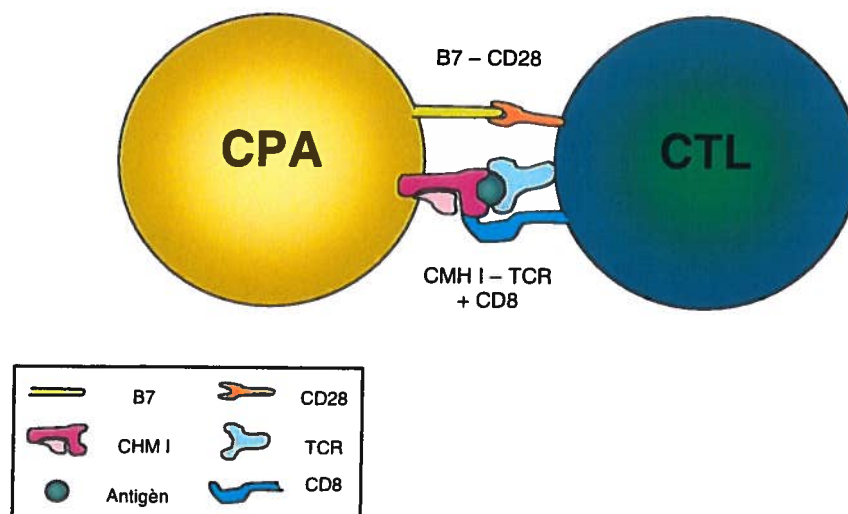


Figure 9 : Interaction entre le lymphocyte T cytotoxique et la cellule présentatrice d'antigènes.

Les CTLs sont reconnus pour lyser les cellules tumorales ou infectées par des pathogènes intracellulaires. Cette fonction s'effectue par l'entremise de perforines, de granzymes ou par une voie dépendante de Fas. Lorsque la perforine est libérée de façon polarisée en direction de la cellule cible, elle permet la formation de pores dans la membrane cellulaire afin que les molécules de granzyme puissent entrer dans la cellule et fragmenter son ADN, ce qui entraîne sa mort. Les CTLs possèdent aussi le ligand de Fas (FasL), qui permet l'interaction avec Fas à la surface de la cellule cible. Ceci a pour effet de déclencher la cascade de l'apoptose. Les CTLs peuvent aussi produire de l'IFN- γ afin de promouvoir la réponse antivirale au sein des cellules infectées (Kagi *et al.*, 1996).

2.1.3 Souris P14

La souris P14 a été générée à partir d'un clone de lymphocyte T CD8⁺ spécifique pour le peptide gp33 du LCMV dans un contexte H-2D^b (Pircher *et al.*, 1987a). Les chaînes V α 2 et V β 8 spécifiques de ce clone ont été insérées sur fond génétique C57BL/6. Ces souris ont ensuite été rétrocroisées avec des souris C57BL/6 déficientes pour la chaîne α du TCR, en raison d'une délétion ciblée de ce gène (Mombaerts *et al.*, 1993). Ainsi, le transgène est utilisé chez 70 à 90% des lymphocytes T CD8⁺ (Pircher *et al.*, 1987b).

2.2 Les cellules présentatrices d'antigènes

Il existe deux types de cellules présentatrices d'antigènes. Toute cellule nucléée, exprime les molécules de classe I du CMH et peut donc présenter des antigènes intracellulaires, elles sont nommées cellules cibles par convention. Le deuxième type est appelé CPA professionnelles, ou simplement CPA, et peut

présenter des antigènes extracellulaires via les molécules de classe II du CMH. On retrouve dans ce groupe les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B (Unanue, 2002).

2.2.1 Les cellules dendritiques

Il existe plusieurs types de cellules dendritiques (DCs), présentant des fonctions différentes. Les cellules de Langerhans se retrouvent au niveau de la peau et des muqueuses, alors que celles qui colonisent les organes sont nommées cellules dendritiques interstitielles (Strunk *et al.*, 1997; Caux *et al.*, 1996). Les cellules dendritiques interdigitées CD11c⁺, sont quant à elles présentes dans les zones des cellules T du tissu lymphoïde secondaire et de la médulla du thymus et sont particulièrement efficaces pour activer cette population cellulaire (Grouard *et al.*, 1996). Finalement, les cellules dendritiques circulantes parcourent les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (Banchereau and Steinman, 1998).

Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans l'initiation et la modulation des réponses immunitaires. Elles peuvent être impliquées dans l'induction de la tolérance, dans le contrôle de la polarisation (T_H1/T_H2) des lymphocytes T et dans le recrutement des lymphocytes T aux sites d'inflammation. Comme les DCs matures expriment de façon constitutive des taux élevés de molécules de classe II du CMH et de molécules de costimulation de la famille B7, elles sont les CPAs les plus puissantes pour activer les lymphocytes T naïfs (Banchereau *et al.*, 2000). Elles présentent d'ailleurs dix à cent fois plus de complexes CMH-peptides que les autres CPAs (Inaba *et al.*, 1997). Lorsqu'elles rencontrent un antigène, les cellules dendritiques peuvent utiliser différentes voies pour l'internaliser, soit la phagocytose, la macropinocytose ou l'endocytose via des récepteurs, tels que DEC-205, le récepteur du mannose et les récepteurs Fcγ et Fcε (Mahnke *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 1999; Sallusto *et al.*, 1995; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Suite à cette rencontre, elles empruntent les vaisseaux sanguins ou lymphatiques

pour se rendre aux organes lymphoïdes, lieu d'interaction avec les lymphocytes T (Banchereau and Steinman, 1998). Elles entrent alors dans un processus de maturation entraînant l'arrêt de la phagocytose et de la macropinocytose (Garrett *et al.*, 2000; West *et al.*, 2000; Sallusto *et al.*, 1995) et qui provoque l'augmentation de l'expression de molécules costimulatrices et d'adhérence (Villadangos, 2001). La reconnaissance de motifs associés aux pathogènes (PAMPs de *pathogen associated molecular patterns*) par les DCs, contribue à l'induction de leur migration et de leur maturation. Cette reconnaissance s'effectue par différents récepteurs, tels que les Toll-like receptors (TLRs) et autres récepteurs de ce type de motifs (PRRs de *pattern recognition receptors*) (Janssens and Beyaert, 2003). Un exemple connu de PAMP permettant la maturation des DCs, est les LPS (De Smedt *et al.*, 1996; MacPherson *et al.*, 1995; Roake *et al.*, 1995; Sallusto *et al.*, 1995). Des cytokines peuvent aussi induire leur maturation, c'est le cas notamment de l'IL-1, du GM-CSF et du TNF- α (Banchereau and Steinman, 1998). Au contraire, l'IL-10 inhibe leur maturation (Buelens *et al.*, 1997).

2.2.2 Les cellules dendritiques folliculaires

Il existe aussi un type de cellules dendritiques qui est différent des autres et qui se localise dans les follicules lymphoïdes, structures organisées des ganglions, où se retrouve une concentration élevée de cellules B. Il s'agit des cellules dendritiques folliculaires. Ces cellules ne fonctionnent pas comme des CPA professionnelles puisqu'elles n'expriment pas les molécules de classe II du CMH. Elles possèdent par contre des taux élevés de récepteurs des anticorps et du complément, tels que Fc γ RIIb (CD32), Fc γ RII (CD32), CR2 (CD21) et CR1 (CD35), qui serviraient à retenir à leur surface des complexes immuns pendant des semaines à des mois, jouant un rôle important dans le développement des lymphocytes B mémoires (Haberman and Shlomchik, 2003; Banchereau and Steinman, 1998; Liu *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996). Ce phénomène serait aussi

impliqué dans l'activation de lymphocytes B naïfs, où les antigènes intacts leur seraient présentés, ce qui entraînerait leur activation, leur différenciation ainsi que l'induction de leurs capacité de CPAs, tel que suggéré par la régulation à la hausse des molécules de classe II du CMH et de molécules costimulatrices (Burton *et al.*, 1993; Kosco-Vilbois *et al.*, 1993). De plus, certains complexes immuns peuvent être capturés par les lymphocytes B pour générer l'aide nécessaire à l'activation de lymphocytes T (Tew *et al.*, 2001; Tew *et al.*, 1997).

2.3 Le complexe majeur d'histocompatibilité

La notion de CMH provient de l'étude du rejet de greffe par Peter Gorer et George Snell. Ces chercheurs ont remarqué que le rejet de greffe était une conséquence de la réponse du receveur à des antigènes présents à la surface des cellules du donneur. Chez l'homme, ce complexe est appelé HLA et H-2 chez la souris (Snell, 1992).

Il existe trois classes de gènes du CMH. Les gènes de classe III produisent entre autres des protéines jouant des rôles dans les réponses immunitaires, telles que des molécules de la réponse inflammatoire et du système du complément. Les molécules du CMH de classe I et de classe II jouent quant à elles un rôle critique dans la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T. Les gènes des molécules du CMH, très polymorphes, déterminent les antigènes qui pourront être présentés et par le fait même, expliquent une partie de la variabilité interindividuelle des réponses immunitaires (Heise *et al.*, 1987). Chez un individu, on retrouve au maximum 6 molécules différentes de classe I et 8 de classe II. Heureusement, chacune peut lier plusieurs peptides différents et un même peptide peut être lié par plusieurs molécules de CMH différentes (Bjorkman *et al.*, 1987).

Dans une cellule saine, les peptides ayant passé par la voie d'apprêtement cytosolique et étant ensuite présentés par les molécules de classe I du CMH, proviennent de protéines intracellulaires normales. Lorsque des protéines du Soi passent par la voie d'apprêtement endocytaire, les peptides qui en résultent sont plutôt présentés sur les molécules de classe II du CMH. Cette présentation contribue à la tolérance face aux antigènes du soi (Adler *et al.*, 1998; Kurts *et al.*, 1997).

2.3.1 CMH I

Les molécules de classe I du CMH sont présentes à différents degrés à la surface de toutes les cellules somatiques. Les cellules exprimant la plus grande quantité de ces molécules sont les lymphocytes. Les cellules musculaires, les fibroblastes et les hépatocytes n'en expriment que très peu, tandis que certaines cellules, les neurones par exemple, à certains stades de différenciation, n'en expriment pas du tout (van den Elsen *et al.*, 2004). L'expression de ces molécules est aussi régulée par diverses cytokines, notamment l'IFN- γ et le TNF- α , qui augmentent leur présence à la surface des cellules (van den Elsen *et al.*, 1998). Les molécules du CMH de classe I peuvent aussi être régulées à la baisse lors d'infections virales (cytomégalovirus humain, virus Epstein-Barr), évidemment pour limiter la reconnaissance antigénique du virus et ainsi échapper à la réponse immunitaire (Leong *et al.*, 1998; Masucci *et al.*, 1987).

Les antigènes intracellulaires, apprêtés en peptides dans le cytosol des cellules sont liés aux molécules de classe I du CMH et sont ensuite reconnus par les CTLs qui pourront ainsi être activés et lyser les cellules cibles.

2.3.2 CMH II

L'expression des molécules de classe II du CMH est réservée aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, les principales étant les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Là encore, les taux d'expression varient d'un type cellulaire à l'autre. Les cellules dendritiques expriment un taux élevé de ces molécules de façon constitutive, alors que le macrophage en exprime seulement de faibles taux jusqu'à ce qu'il soit activé par l'interaction avec un antigène ou par des cytokines adéquates (Trombetta and Mellman, 2005). Tout comme les molécules de classe I du CMH, l'expression des molécules de classe II est régulée par certaines cytokines. Par exemple, sur les cellules pré-B, leur expression est inductible par l'IL-4. Par contre, sur les lymphocytes B matures l'expression est constitutive, mais elle sera perdue lorsque ces dernières deviendront des plasmocytes (Glimcher and Kara, 1992). Finalement, l'IFN- γ peut induire l'expression des molécules de classe II du CMH sur des cellules n'étant pas des CPA professionnelles (Chang *et al.*, 1994).

Les antigènes extracellulaires qui ont été internalisés par la voie endocytaire sont apprêtés et présentés sur les molécules de classe II du CMH aux lymphocytes T auxiliaires (T_H). Ceci est vrai sauf dans le cas de la présentation croisée (voir sous-thème 2.4.2).

2.4 Mécanismes menant à la présentation antigénique

Une fois que les rôles du CMH et des CPAs furent établis dans la reconnaissance antigénique des lymphocytes T, on découvrit qu'un moment était nécessaire pour permettre aux CPAs d'internaliser et d'apprêter l'antigène afin de le présenter (Ziegler and Unanue, 1981).

2.4.1 L'internalisation

Comme il a été mentionné dans la section 2.2.1 pour les DCs, il existe différentes façons pour une CPA d'internaliser l'antigène. Évidemment, une façon très simple est qu'elle soit elle-même infectée par un pathogène. À ce moment, l'entrée peut se faire par les récepteurs cellulaires du virus. Les microorganismes peuvent aussi être internalisés par phagocytose, pour les macrophages et les DCs, par macropinocytose, ce qui permet de faire un échantillonnage des molécules solubles du milieu et finalement par endocytose. L'endocytose peut être médiée par de nombreux récepteurs, comme le récepteur du mannose, les récepteurs des molécules du système du complément et le FcγR.

2.4.1.1 Récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines

L'interaction des complexes antigènes-anticorps avec des cellules peut entraîner de nombreuses réponses immunitaires, telles que la cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps, la dégranulation des mastocytes, la prolifération cellulaire, la sécrétion d'anticorps, mais les fonctions qui nous intéressent ici sont l'induction de la phagocytose et l'augmentation de la présentation antigénique (Ravetch and Clynes, 1998; Daeron, 1997; Ravetch, 1997). Ces réactions proviennent de l'interaction de la portion Fc des immunoglobulines, avec le récepteur de ces molécules à la surface cellulaire (FcR). Lorsque le phagocyte, via son FcR, lie un complexe formé d'un microorganisme et d'anticorps, il y a ensuite formation de pseudopodes qui permettent de piéger ce complexe par la formation d'une vésicule, le phagosome.

Il existe trois types de récepteurs Fc pour les IgGs : FcγRI à III. Ces récepteurs permettent entre autres la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles de microorganismes opsonisés, ainsi que la sécrétion de cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire (Ravetch and Bolland, 2001). Le Fcε, quant à lui, entraîne la libération de médiateurs chimiques par les mastocytes et

les basophiles lorsqu'il lie des IgE (Takai, 2002). Un troisième type de récepteur, le récepteur pIgR (*polymeric immunoglobulin receptor*), reconnaît principalement les IgAs, mais aussi les IgMs, lorsque ces anticorps sont sous forme polymérique et qu'ils contiennent la chaîne J. Il est utilisé au niveau des muqueuses pour effectuer la transcytose, c'est-à-dire le transport actif des molécules à travers les cellules épithéliales, de la surface basolatérale vers la lumière intestinale par exemple (Mostov, 1994).

Comme les anticorps naturels sont principalement d'isotype IgM et qu'ils semblent jouer un rôle important dans la réponse précoce aux infections, la découverte d'un récepteur cellulaire est un argument supplémentaire en ce sens.

2.4.1.2 Récepteur Fc α / μ

Shibuya et collègues ont découvert l'existence d'un récepteur permettant la liaison des IgMs et des IgAs, qu'ils ont nommé Fc α / μ R (Shibuya *et al.*, 2000). Il est à noter que certaines équipes avaient quand même bien avant remarqué la présence d'un récepteur pour les IgMs (Mathur *et al.*, 1988; Hattori *et al.*, 1980), mais comme le gène de ce dernier n'avait jamais été cloné, les caractéristiques structurales et fonctionnelles de ce récepteur restaient nébuleuses. Le Fc α / μ R, découvert par Shibuya, a tout d'abord été observé chez la souris, mais la présence de son homologue humain a aussi été démontrée. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type 1, d'environ 70 kD, qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines. Chez la souris, ce récepteur est constitutivement exprimé chez la majorité des macrophages et des lymphocytes B matures, mais est absent des granulocytes, des cellules NK et des lymphocytes T (Sakamoto *et al.*, 2001; Shibuya *et al.*, 2000). On remarque sa présence dans les organes lymphoïdes secondaires, au niveau du foie, des reins, des intestins, des testicules et du placenta. L'expression stable du récepteur murin par transfection d'une lignée de cellules pro-B (Ba/F3), a permis de constater qu'il liait aussi les IgMs et IgAs de rat et les IgMs humaines. La liaison croisée de ce récepteur par des IgMs libres ou

adsorbées sur des billes, entraîne son internalisation (Shibuya *et al.*, 2000). Cette équipe a aussi démontré qu'il pouvait permettre l'endocytose, par les lymphocytes B, de *Staphylococcus aureus* recouverts d'IgMs, ce qui indique un rôle potentiel pour ce récepteur dans la réponse précoce contre les microorganismes. Il pourrait ainsi entraîner l'internalisation des microorganismes reconnus par les anticorps naturels et faciliter ensuite l'apprêtement et la présentation antigénique aux lymphocytes T.

2.4.1.3 Récepteurs des molécules du système du complément

Les protéines impliquées dans le système du complément jouent des rôles tant au niveau de l'immunité innée, qu'adaptative. Ce système peut entraîner la lyse de cellules, de bactéries ou de virus. Il permet aussi d'opsoniser des antigènes pour favoriser leur internalisation, leur apprêtement et leur présentation aux lymphocytes T. Lorsqu'une de ses composantes est reconnue par un récepteur à la surface d'une cellule du système immunitaire, il s'ensuit une cascade d'évènements menant à des réponses telles que l'inflammation et la sécrétion de cytokines. Finalement, il peut aussi contribuer à l'élimination des complexes immuns de la circulation par leur dépôt dans la rate ou le foie.

Le fragment C3 (iC3b et C3dg), lorsqu'il est reconnu par son récepteur CR2/CD21, peut agir en synergie avec le BCR pour activer les lymphocytes B. Plusieurs études ont aussi démontré son rôle dans l'induction des réponses primaires humérales, particulièrement lorsque l'immunisation se faisait avec de faibles doses d'antigènes, ce qui est plus représentatif d'une infection naturelle. Dans ces conditions, le fragment C3 peut se lier aux antigènes pour mener à la cascade du complément. Il peut aussi être recruté au sein de complexes immuns, où les anticorps arrivent à l'activer par la voie classique. Ce mécanisme peut être effectif lors de réponses primaires, puisque les anticorps naturels présentent cette capacité (Pour une revue de littérature : (Nielsen and Leslie, 2002; Nielsen *et al.*, 2000)).

2.4.2 Génération de peptides

Il y a plus de 20 ans, l'équipe du Dr. Grey a démontré que des lymphocytes B fixés pouvaient présenter des antigènes à des lymphocytes T, seulement s'ils étaient préalablement dégradés en peptides (Shimonkevitz *et al.*, 1983). Les CPAs ont donc besoin d'apprêter les antigènes pour les présenter aux lymphocytes T dans le contexte du CMH. Les voies empruntées par ces antigènes varient selon leurs origines. Classiquement, les antigènes endogènes (virus, bactéries intracellulaires, antigènes tumoraux) suivent la voie d'apprêtement cytosolique pour être présentés par les molécules de classe I du CMH et les antigènes exogènes empruntent plutôt la voie endocytaire pour se retrouver complexés aux molécules de classe II du CMH. Il arrive par contre que des antigènes exogènes soient présentés dans un contexte de molécules de classe I du CMH, on parle alors de présentation croisée (Bevan, 1976). L'inverse existe aussi, soit la présentation de peptides provenant de la voie d'apprêtement cytosolique liés par des molécules de classe II du CMH (Chicz *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1992; Rudensky *et al.*, 1991).

2.4.2.1 Voie d'apprêtement cytosolique

Tel qu'illustré à la figure 10, les antigènes endogènes qui se retrouvent au niveau du cytoplasme, sont apprêtés en peptides par le protéasome, qui clive les protéines ubiquitinylées. En présence d'IFN- γ , des sous-unités du protéasome sont remplacées pour former l'immunoprotéasome, qui produit des peptides s'adaptant mieux aux sites de liaison des molécules de classe I du CMH. Les peptides se retrouvent ensuite dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux (RER), grâce à l'action du complexe TAP, composé des protéines TAP1 et TAP2, qui se situe au niveau de la membrane de cette organelle. Ce complexe protéique a une affinité marquée pour les peptides de 8 à 13 acides aminés et possédant des résidus carboxy-terminaux hydrophobes ou basiques, ce qui correspond à la préférence des molécules de classe I du CMH. Les peptides peuvent subir une

dernière protéolyse par les aminopeptidases ERAP1 et ERAP2 chez l'humain et ERAP1 chez la souris. Les peptides ainsi préparés peuvent être assemblés avec les molécules de classe I du CMH, ce qui stabilise l'association de la chaîne α de classe I avec la β 2-microglobuline. Avant leur assemblage avec des peptides, les molécules de classe I du CMH interagissent avec différentes chaperones. Tout d'abord, la calnexine lie la chaîne alpha afin d'entraîner son repliement jusqu'à son association avec la β -2 microglobuline. C'est ensuite la calréticuline et l'oxydoréductase Erp57 qui interviennent. Finalement, la tapasine rapproche le complexe de TAP pour favoriser l'insertion d'un peptide antigénique. Lorsque cet événement se produit, la tapasine et la calréticuline se dissocient et les complexes produits traversent l'appareil de Golgi pour se rendre à la membrane plasmique, où ils pourront interagir avec le TCR (Pour une revue de littérature : (van Endert, 2006)).

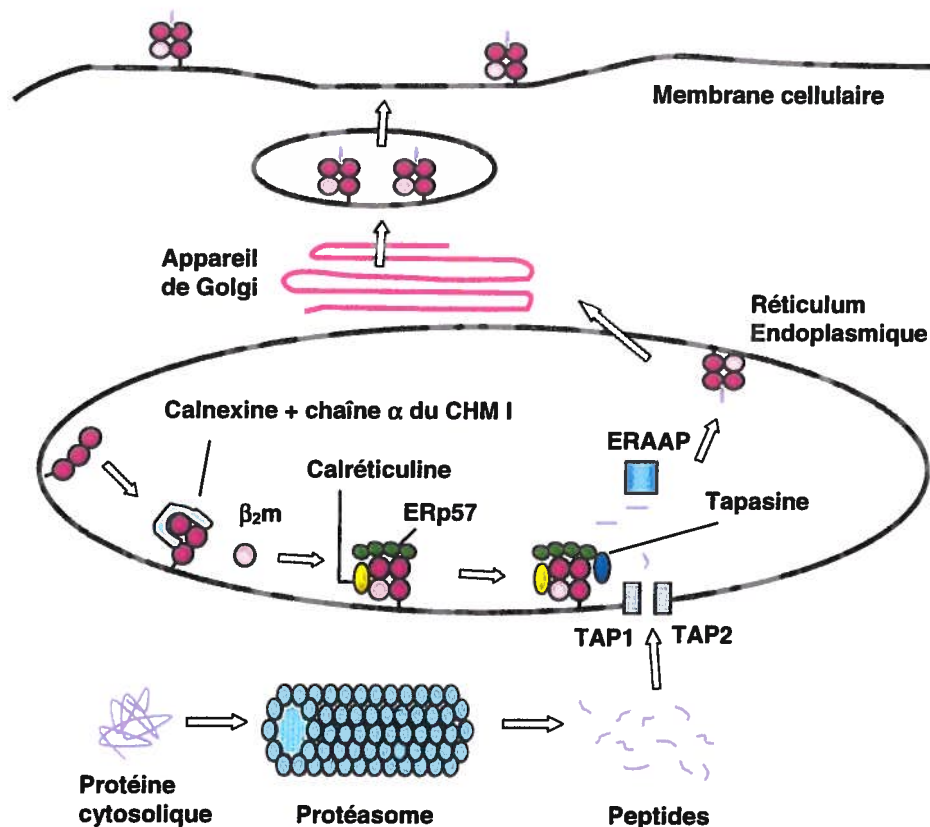


Figure 10 : Schématisation de la voie d'apprêtement cytosolique.

Reproduit et adapté à partir de (Flutter and Gao, 2004)

2.4.2.2 Voie d'apprêtement endocytaire

Dans les compartiments endocytaires de plus en plus acides, les antigènes exogènes internalisés par phagocytose ou endocytose, sont apprêtés par différentes enzymes hydrolytiques, telles que l'asparaginyl endoprotéase, les nombreuses cathepsines (S, L, F, etc.) et la thiol réductase lysosomale induite par l'IFN- γ (*GILT*). Les molécules de classe II du CMH sont formées dans le RER et sont tout d'abord associées à la chaîne invariante Ii pour éviter de lier des peptides ne provenant pas des endosomes. Ces molécules se rendent ensuite à travers l'appareil de Golgi et le trans-Golgi vers les compartiments endocytaires où la chaîne invariante sera progressivement dégradée pour ne laisser qu'un fragment dans la cavité de liaison, le CLIP. HLA-DM permet finalement l'échange du CLIP pour un peptide antigénique, mais cette réaction peut être inhibée par HLA-DO. Lorsque les complexes CMH-peptide sont formés, ils sont ensuite présentés à la surface cellulaire (Pour une revue de littérature : (Villadangos, 2001; Riese and Chapman, 2000)).

2.4.2.3 Présentation croisée

Au milieu des années 70, Bevan a suggéré l'existence de la présentation croisée pour expliquer la stimulation de la réponse CTL par des pathogènes sans que les cellules présentatrices d'antigènes ne soient infectées (Bevan, 1976). Ce système a été prouvé plusieurs années plus tard (Moore *et al.*, 1988; Yewdell *et al.*, 1988).

La présentation croisée s'effectue principalement au sein des cellules dendritiques. Les macrophages sont aussi capables de présentation croisée mais leur efficacité est beaucoup moindre (Delamarre *et al.*, 2003; Albert *et al.*, 1998). Les autres cellules ayant démontré cette capacité sont les lymphocytes B (Ke and Kapp, 1996), les neutrophiles (Potter and Harding, 2001), et certaines cellules endothéliales (Limmer *et al.*, 2000). Les sources d'antigènes au niveau de cette

voie sont diverses. Il peut s'agir de cellules nécrotiques ou apoptotiques, d'exosomes (microvésicules relâchées à partir des endosomes tardifs vers le milieu extracellulaire (Keller *et al.*, 2006)), de complexes immuns ou d'antigènes solubles (Cresswell *et al.*, 2005; Groothuis and Neefjes, 2005). Neijssen et collaborateurs ont aussi démontré qu'un transfert d'antigènes via des jonctions lacunaires, du cytosol d'une cellule infectée à celui d'une CPA, pouvait mener à une certaine forme de présentation croisée (Neijssen *et al.*, 2005). Outre ce mécanisme direct, l'internalisation d'antigènes exogènes et leur subséquente présentation dans un contexte de molécules de classe I du CMH, implique une communication entre la voie endocytaire, le cytosol et le réticulum endoplasmique (RE). Certains modèles tentent d'expliquer ce phénomène. Tout d'abord, l'équipe d'Ackerman a proposé que des peptides des endosomes soient libérés dans le cytosol par transport membranaire (Ackerman *et al.*, 2005). Une autre possibilité implique le recyclage par la voie endocytaire des molécules de CMH I présentes à la surface cellulaire, elles échangeraient alors leurs peptides endogènes pour des peptides exogènes contenus dans ces vésicules (Gromme *et al.*, 1999). Dans ce modèle, le protéasome ne serait pas impliqué et des enzymes endosomales seraient responsables de la dégradation des antigènes en peptides. Une hypothèse très controversée est celle du RE-phagosome : le phagosome engouffrerait des membranes et des protéines du RE, permettant ainsi de réunir les éléments nécessaires à la présentation croisée (Ackerman *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003). Par contre, Touret et collaborateurs n'ont pas retrouvé de présence significative de composantes de membrane du RE à l'intérieur du phagosome (Touret *et al.*, 2005). De plus, une revue récente a mis en lumière plusieurs failles de ce modèle (Groothuis and Neefjes, 2005). Les mécanismes exacts menant à la présentation croisée restent donc à déterminer.

2.4.3 Présentation aux lymphocytes T

L'interaction du TCR avec le complexe antigène-CMH à la surface de la CPA peut se produire dans une jonction cellule-cellule spécialisée, nommée synapse immunologique. Au sein de cette synapse, on retrouve un site central d'interactions TCR - complexe CHM-peptide, puis un anneau de molécules d'adhésion, incluant LFA-1/ICAM-1. C'est au moment où le lymphocyte T balaie la surface de la CPA et que sa liaison avec le complexe-CMH peptide atteint un certain seuil d'affinité, que les signaux sont transmis aux cellules pour que la synapse se forme et stabilise ainsi l'interaction des deux cellules pour plusieurs heures (Grakoui *et al.*, 1999; Monks *et al.*, 1998).

3 Modèles viraux

3.1 *Virus de l'hépatite C (VHC)*

3.1.1 Caractéristiques du virus

Durant les années 70, il a été remarqué que des individus étaient affligés d'hépatites n'étant pas causées par le virus de l'hépatite A, ni celui de l'hépatite B. On parlait alors d'hépatites non-A, non-B (Feinstone *et al.*, 1975). Le virus en cause fut isolé en 1989 et porte depuis le nom de virus de l'hépatite C (Choo *et al.*, 1989). Il s'agit d'un membre de la famille des *Flaviviridae*, du genre Hepacivirus (Lauer and Walker, 2001; Robertson *et al.*, 1998). Il existe 6 génotypes et plus de 100 sous-types (Simmonds *et al.*, 2005). Les particules virales, d'un diamètre de 50nm (Shimizu *et al.*, 1996), consistent en une enveloppe dérivée des membranes cellulaires de l'hôte, dans laquelle sont insérées les glycoprotéines E1 et E2 et une nucléocapside constituée des protéines core et

renfermant le génome, soit un ARN positif de 9.6 kb. L'ARN est traduit en une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés via un cadre de lecture ouvert, compris entre deux régions conservées non-traduites (UTRs de *untranslated regions*) (Choo *et al.*, 1991). L'UTR en 5' contient un site interne d'entrée des ribosomes (IRES pour internal ribosome entry site), permettant l'initiation de la traduction de la polyprotéine virale. Cette polyprotéine est ensuite clivée en au moins 10 protéines par des enzymes cellulaires et virales. Tel qu'illustré à la figure 11, la partie N-terminale contient les protéines structurales core, E1 et E2 et le reste de la polyprotéine est constitué des protéines non-structurales (NS2 à NS5b), impliquées dans la réplication du virus (pour une revue de littérature concernant la biologie moléculaire du VHC : (Penin *et al.*, 2004; Rosenberg, 2001; Major and Feinstone, 1997). Récemment, un rôle de viroporine a été attribué à la protéine P7 et elle semble essentielle à l'assemblage et au relargage des particules infectieuses (Steinmann *et al.*, 2007). Une autre protéine, de fonction pour le moment inconnue, nommée protéine F, a aussi été identifiée. Cette protéine résulte d'un cadre de lecture alternatif dans la région codant pour la protéine core (Xu *et al.*, 2001) (Walewski *et al.*, 2001).

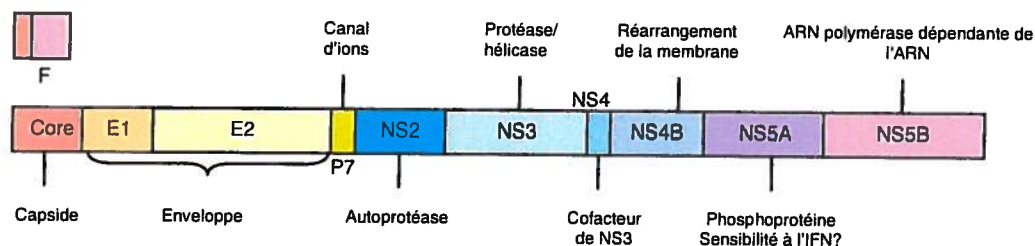


Figure 11 : Représentation de la polyprotéine du VHC et de la protéine F, produit d'un cadre de lecture alternatif. Les fonctions connues de chaque protéine sont inscrites.

Référence : (Dustin and Rice, 2007)

Plusieurs protéines cellulaires, liées par la glycoprotéine E2, ont été identifiées comme potentiels récepteurs du virus. À ce sujet, le CD81, membre de

la famille des tétraspanines (Pileri *et al.*, 1998) et le *scavenger receptor* B de type 1 (SR-B1), reconnu pour lier les lipoprotéines de haute densité (HDL de *high density lipoprotein*) (Scarselli *et al.*, 2002) (Kapadia *et al.*, 2007), sont bien documentés. D'autres protéines, telles que les lectines L-SIGN et DC-SIGN (Gardner *et al.*, 2003) (Lozach *et al.*, 2003), le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDL-R de *low density lipoprotein receptor*) (Agnello *et al.*, 1999) (Monazahian *et al.*, 1999), les protéoglycans héparine-sulfate (Barth *et al.*, 2003), les claudines 1, 6 et 9 (Evans *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007) et le récepteur à l'asialoglycoprotéine (Saunier *et al.*, 2003), semblent aussi jouer un rôle dans l'entrée du virus dans les cellules cibles, les hépatocytes (Castet *et al.*, 2002) (Verslype *et al.*, 2003). D'autres cellules sont aussi soupçonnées d'être des hôtes possibles du virus. Il s'agit principalement des lymphocytes B et des cellules dendritiques (Sung *et al.*, 2003) (Goutagny *et al.*, 2003) (Navas *et al.*, 2002).

3.1.2 L'hépatite C

Le VHC entraîne des hépatites aiguës et chroniques. Son infection est asymptomatique dans 60 à 70% des cas, ce qui contribue grandement à sa propagation et à sa pathogénicité, puisque le diagnostique précoce est ainsi plus difficile à réaliser. Le virus est éliminé spontanément dans environ 10-30% des cas, alors que la plupart du temps il établit une infection persistante (Hoofnagle, 2002). Chez les porteurs chroniques, la maladie évolue vers une cirrhose dans environ 20% des cas et peut éventuellement poursuivre vers un cancer hépatique (Alter and Seeff, 2000). On estime à 170 millions le nombre d'individus infectés à travers le monde, ce qui en fait un problème majeur de santé publique (World Health Organization, 1999). Il s'agit de la principale raison entraînant des maladies du foie et des transplantations de cet organe (Pessoa and Wright, 1997). Il n'y a pour le moment aucun vaccin et le traitement, qui consiste en une combinaison d'interféron pegylé et de ribavirine est dispendieux, comporte de nombreux effets secondaires et est efficace dans 70 à 80% pour les génotypes 2 et

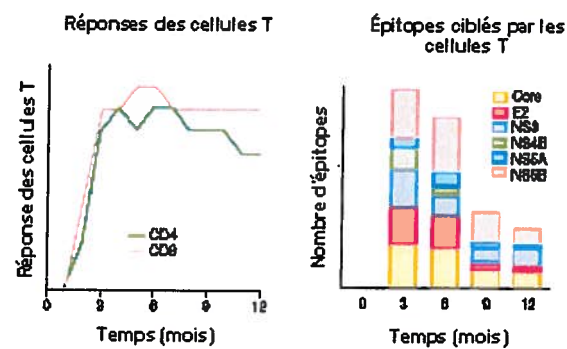
3 et environ 40 à 50% pour les génotypes 1, 4, 5 et 6 (Chevaliez and Pawlotsky, 2007) (Poynard *et al.*, 2003). Quoique relativement efficace lorsqu'on compare à d'autres traitements antiviraux, l'idéal demeure néanmoins la prévention. Depuis l'implantation des tests de dépistage pour les produits sanguins vers 1991, la principale source d'infection est l'utilisation de drogues injectables (Alter *et al.*, 1999).

3.1.3 Interaction du VHC avec le système immunitaire

Durant la première semaine suivant l'infection, le VHC induit plusieurs changements d'expression des gènes au niveau du foie. On observe ainsi une réponse vigoureuse à l'interféron de type 1, contre laquelle il semble résister vu son taux élevé de persistance (Su *et al.*, 2002) (Bigger *et al.*, 2001). Les réponses immunitaires adaptatives contre le VHC sont généralement élaborées en au moins un mois pour la réponse cellulaire et au moins deux mois pour la réponse humorale, c'est pourquoi le VHC a la réputation d'échapper au système immunitaire (Thimme *et al.*, 2002; Thimme *et al.*, 2001). Les individus qui réussissent à éliminer le virus, tel que présenté à la figure 12, ont en commun l'élaboration d'une réponse cellulaire CD4⁺ et CD8⁺ rapide, multispécifique et soutenue (Grakoui *et al.*, 2003; Shoukry *et al.*, 2003; Thimme *et al.*, 2001; Lechner *et al.*, 2000; Diepolder *et al.*, 1995). Certaines équipes soutiennent que les anticorps neutralisants, principalement dirigés contre la région hypervariable-1 (HVR-1) de la glycoprotéine E2, auraient aussi un rôle à jouer dans l'élimination du virus (Pestka *et al.*, 2007; Zibert *et al.*, 1997; Farci *et al.*, 1994). Par contre, suite à l'élimination du virus, ces anticorps disparaissent graduellement, contrairement à la réponse cellulaire qui est maintenue (Takaki *et al.*, 2000). Ceci pourrait expliquer qu'il n'y ait pas toujours de protection contre une nouvelle infection (Mehta *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 1994; Farci *et al.*, 1992). Il a néanmoins été observé chez le chimpanzé et chez l'humain, que s'il y avait réinfection, celle-ci était atténuée ou avait moins propension à persister (Lanford *et al.*, 2004; Nascimbeni *et al.*, 2003; Shoukry *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2002). Les

interactions du VHC avec le système immunitaire sont complexes et il est plus plausible que les mécanismes menant à son élimination soient multiples et nécessitant une collaboration étroite.

Réponse efficace:



Réponse inefficace:

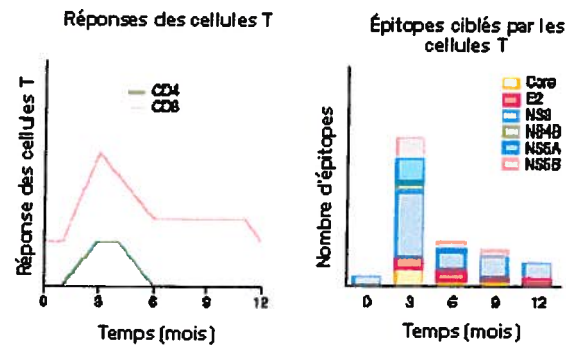


Figure 12 : Comparaison de la réponse cellulaire entre les individus qui éliminent le VHC et ceux qui développent une maladie chronique.

Adapté de: (Dustin and Rice, 2007).

3.1.4 Mécanismes d'évasion du système immunitaire

Plusieurs hypothèses ont été proposées et en partie vérifiées à ce sujet (pour des revues de littérature concernant les mécanismes décrits dans cette section : (Bowen and Walker, 2005; Gale and Foy, 2005; Gremion and Cerny, 2005)). Tel que mentionné précédemment, le VHC induit une réponse IFN de type 1, mais y résiste puisque cette réponse n'est corrélée d'aucune façon avec le cours de l'infection. Différentes stratégies élaborées par le virus pour atténuer l'expression de gènes stimulés par l'IFN, ou pour court-circuiter la signalisation par cette cytokine ont été mises à jour (voir spécifiquement : (Gale and Foy, 2005)). Uniquement par son taux de réplication élevé, de l'ordre de 10^{12} virions par jour, certains ont supposé qu'il surchargeait le système immunitaire. De plus, puisqu'il possède une ARN-dépendante ARN-polymérase sans activité de correction, on retrouve chez le VHC approximativement $1,5-2 \times 10^{-3}$ substitutions par site génomique par année, lui permettant d'échapper au système immunitaire par la génération de quasiespèces au sein d'un même individu. Ceci peut éventuellement mener à l'apparition de mutants sans correspondance de récepteur au niveau du répertoire, tant des lymphocytes B que des lymphocytes T. Il est aussi possible que lors de l'infection par le VHC, les lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques au virus entrent dans un état d'anergie. D'ailleurs, certaines équipes ont avancé l'hypothèse que l'aide provenant de la part des lymphocytes T $CD4^+$ n'était pas adéquate, soit parce que les lymphocytes spécifiques au virus ont été éliminés du répertoire, soit par une perte de fonction, comme la sécrétion de cytokines inappropriées. Le problème se situe peut-être au niveau de la présentation antigénique et dans ce cas, les cellules dendritiques pourraient être une cible de choix. Le virus pourrait agir directement sur ces cellules ou indirectement par son action sur d'autres cellules. Il a été démontré que la protéine E2 inhibe les fonctions des cellules NK et ces dernières ne pourraient donc plus mener à la maturation des cellules dendritiques. L'hyperinduction de cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ par le virus, pourrait aussi expliquer l'établissement de la persistance. Finalement, l'environnement hépatique, lieu de

la réplication du virus, pourrait aussi jouer un rôle dans la capacité du VHC à échapper au système immunitaire (Dustin and Rice, 2007). En effet, les réponses immunitaires élaborées au niveau de cet organe sont plutôt du type tolérogénique, puisqu'il reçoit plusieurs antigènes alimentaires et de la flore intestinale.

En contrepartie, des caractéristiques de l'hôte pourraient aussi avoir un impact déterminant sur le cours de la maladie. Certains auteurs ont démontré une association entre des HLAs spécifiques ou un polymorphisme au niveau du récepteur de l'IL-10 et l'élimination ou la persistance du virus.

3.1.5 Les modèles d'étude du virus

L'étude du VHC a été longtemps ralentie par l'absence de modèle. Le virus ne se réplique pas en culture cellulaire et il n'est possible d'infecter que le chimpanzé, le tupaia et le marmousset (Alter *et al.*, 1978) (Xie *et al.*, 1998) (Feinstone *et al.*, 1981). L'étude de ces animaux comporte de nombreux obstacles, tels qu'une longue période de gestation, des coûts élevés reliés à leur entretien et certains problèmes d'éthique (Kremsdorf and Brezillon, 2007). Différentes stratégies ont tenté de contourner ce problème.

In vitro, l'élaboration de protéines recombinantes a d'abord permis l'étude de certaines interactions, par exemple de commencer à explorer les récepteurs cellulaires potentiels du virus.

Par la suite, des pseudoparticules virales ont été mises au point. Ce système consiste en la transfection de cellules 293T par trois plasmides différents. Le premier comporte les gènes *gag-pol* du virus MLV (de *Murine Leukemia Virus*), le second encode les glycoprotéines E1 et E2 du VHC et le troisième permet de suivre la transfection ou l'infection de cellules Huh7 grâce à un gène rapporteur, tel que celui de la GFP (de *Green fluorescent Protein*) ou la luciférase.

Les protéines Gag et Pol permettent l'encapsidation des pseudoparticules contenant le gène rapporteur et présentant à leur surface les glycoprotéines du VHC. Elles permettent aussi la transcription inverse du gène rapporteur et son intégration subséquente dans le génome de la cellule hôte. Les trois plasmides contiennent des promoteurs CMV pour permettre leur traduction et transcription par la cellule hôte (Bartosch *et al.*, 2003).

D'autres équipes ont mis au point des réplicons sous-génomiques, permettant l'étude de la réplication du virus, mais pas celles de l'infection puisque ce modèle ne produit pas de particules virales complètes (Lohmann *et al.*, 1999). Finalement, depuis 2005, l'apparition du JFH1 a révolutionné ce domaine de recherche (Wakita *et al.*, 2005). Ce modèle provient d'un isolat de génotype 2a ayant provoqué une hépatite fulminant chez un japonais (d'où JFH). La transfection de cellules Huh-7 avec le génome complet du JFH1, entraîne la production de particules infectieuses permettant ensuite l'infection de cellules ou de chimpanzés. De plus, des chimères ont été élaborées afin de permettre l'étude d'autres génotypes (Pietschmann *et al.*, 2006).

3.2 Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)

Comme plusieurs difficultés sont rencontrées dans l'étude du virus de l'hépatite C et que la recherche chez l'humain comporte aussi de nombreux obstacles, la majeure partie de ce projet repose sur l'étude d'un virus murin ayant certaines similarités avec le VHC, soit le virus de la chorioméningite lymphocytaire. En effet, ce virus peut aussi entraîner des infections persistantes ou éliminées par le système immunitaire selon le cas, il peut infecter le foie et entraîner des hépatites (McIntyre and Welsh, 1986) et il a été démontré que la réponse cellulaire était essentielle au contrôle de l'infection. Ce virus étant bien caractérisé, et de nombreux outils de travail ayant été élaborés pour son étude, il s'avérait ici un modèle de choix.

3.2.1 Caractéristiques du virus

LCMV a apporté une énorme contribution au domaine de l'immunologie en permettant l'étude des phénomènes d'immunopathologie et de tolérance (Buchmeier *et al.*, 1980) et en permettant l'élaboration du concept de présentation antigénique dans un contexte du soi (Zinkernagel and Doherty, 1974).

LCMV a été découvert en 1933, en tant que premier membre de la famille des *Arenaviridae* (Armstrong and Lillie 1934). Dans cette famille, on ne retrouve qu'un seul genre, celui des *Arenavirus*, qui peut ensuite être divisé en virus du Nouveau Monde et ceux de l'Ancien Monde, dont fait partie LCMV (Wolff *et al.*, 1978). Ce virus est pléiomorphe et son diamètre varie entre 50 et 300nm (Buchmeier *et al.*, 1980). C'est un virus non-cytopathogène, relâché par bourgeonnement et enveloppé (Zellweger *et al.*, 2006; Buchmeier *et al.*, 1980). Son génome est constitué d'ARN simple brin, ambisens et bi-segmenté. Le segment le plus long (L), d'environ 7200 nucléotides (nt), contient le gène de la polymérase et le gène « Z », qui semble impliqué dans la régulation de la transcription (Lee *et al.*, 2000). Le segment court (S pour *small*), d'approximativement 3500 nt, encode la glycoprotéine (GP) et la nucléoprotéine (NP). La glycoprotéine est clivée post-traductionnellement en GP1 et GP2 (Buchmeier *et al.*, 1987). À la surface du virus, ces glycoprotéines forment des complexes tétramériques (Burns and Buchmeier, 1991). GP1 est le ligand permettant la liaison du virus à son récepteur cellulaire, l'alpha-dystroglycan (Cao *et al.*, 1998), alors que GP2 permet la fusion avec la membrane des endosomes, pour permettre au virus de se retrouver dans le cytoplasme (Borrow and Oldstone, 1994; Di Simone *et al.*, 1994).

3.2.2 L'infection par LCMV

L'hôte naturel du LCMV est la souris, ce qui en fait un bon modèle d'étude. Ce virus peut infecter une vaste gamme d'hôtes, dont les humains, lorsqu'ils sont en contact avec de l'urine contaminée de rongeurs. La transmission se fait alors par aérosol (Buchmeier *et al.*, 1980). Une fois à l'intérieur de l'organisme, le virus peut infecter différents types cellulaires, tels que les macrophages et les cellules dendritiques et peut aussi se retrouver au niveau du système nerveux central (McGavern *et al.*, 2002; Sevilla *et al.*, 2000; Matloubian *et al.*, 1993). L'humain peut à ce moment ressentir des symptômes associés à une encéphalite, à une méningite ou à une fièvre hémorragique (Buchmeier *et al.*, 1980).

Chez la souris, le cours de l'infection dépend de la souche et de la voie d'inoculation, ainsi que de l'âge de l'animal. Les souris infectées de manière congénitale, ou jusqu'à 24 heures après la naissance, développent normalement une infection persistante associée à la production du virus dans les principaux organes et à sa présence dans le sang. Ces souris peuvent avoir une durée de vie normale et n'exposer aucun symptômes, mais la plupart du temps elles présentent des glomérulonéphrites, des foyers de nécrose au niveau du foie, de l'arthrite et de l'infiltration de lymphocytes dans plusieurs tissus (Oldstone and Dixon, 1970; Oldstone and Dixon, 1969). Les souris adultes immunocompétentes, pour leur part, meurent lors de l'infection aiguë, ou survivent avec une immunité permanente contre le virus. Bien qu'il y ait une certaine variabilité de la réponse quant aux souches et à la dose, en règle générale les souris adultes inoculées intracérébralement meurent des suites d'une leptoméningite, alors que celles inoculées par une autre voie survivent et ne présentent souvent aucun symptôme (Buchmeier *et al.*, 1980).

3.2.3 Interaction avec le système immunitaire

Tel qu'illustré à la figure 13, lors d'une infection intra-péritonéale par LCMV, chez la souris adulte immunocompétente, la virémie atteint un maximum vers le jour 4-5 et décline rapidement, ce qui coïncide avec l'apparition des CTLs. Des anticorps non-neutralisants dirigés contre le virus apparaissent aussi à ce moment, alors que les anticorps neutralisants sont élaborés beaucoup plus tardivement, soit vers le 60^{ième} jour post-infection (Buchmeier *et al.*, 1980).

Tel que mentionné précédemment, le virus a servi de modèle dans l'étude de l'immunopathologie, puisque les lésions observées chez les individus infectés sont dues aux réponses du système immunitaire. Ainsi, lors de l'infection chronique de souris, la déposition de complexes anticorps-antigènes-complément, entraîne le développement de glomérulonéphrites et d'arthrite (Oldstone and Dixon, 1970; Oldstone and Dixon, 1969) et l'activation des lymphocytes T en phase aiguë de l'infection peut entraîner la mort (Cole *et al.*, 1972; Cole *et al.*, 1971). Ces cellules contribuent aussi à la destruction de l'architecture splénique, qui est caractéristique de cette infection (Odermatt *et al.*, 1991). Par contre, l'élimination du virus en phase aiguë et la protection immunitaire qui s'en suit, sont aussi dues à cette population cellulaire (Zinkernagel and Welsh, 1976). La réponse cellulaire peut donc être protectrice, mais aussi entraîner beaucoup de dommages et même la mort, d'où l'importance de sa régulation.

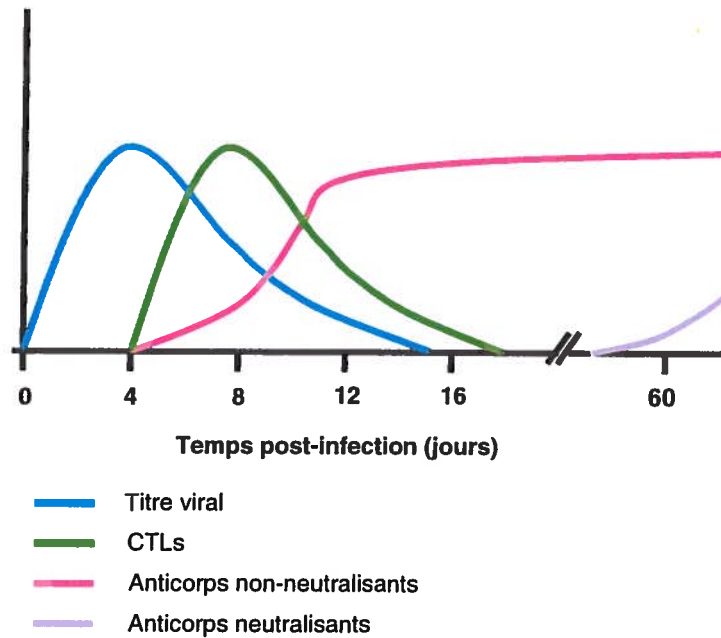


Figure 13 : Représentation de la réponse immunitaire classique dirigée contre LCMV chez une souris adulte. Les CTLs permettent le contrôle du virus sous le seuil de détection.

Reproduit à partir de: (Hangartner *et al.*, 2006).

3.3 *Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)*

Dans le but de comparer l'action des anticorps naturels avec d'autres modèles d'infection, le virus de la stomatite vésiculaire a aussi été utilisé dans certaines expériences. Ce virus est cytopathogène et entraîne des infections aiguës, rapidement éliminées par le système immunitaire, particulièrement grâce à la réponse humorale adaptative. Le contrôle de l'infection s'effectue donc d'une façon bien différente par rapport aux deux autres virus décrits précédemment. Ce virus a aussi été choisi parce qu'il infecte la souris et qu'il est bien caractérisé.

3.3.1 Caractéristiques du virus

Le virus de la stomatite vésiculaire est un membre du genre Vésiculovirus de la famille des *Rhabdoviridae*. Il existe plusieurs Vésiculovirus infectant les vertébrés et les invertébrés. Parmi ceux-ci, les deux principales souches sont le VSV-Indiana (VSV-IN) et le VSV-New Jersey (VSV-NJ). Ce sont des virus à ARN monocaténaire antisens de 11 kb, qui encode 5 protéines : la nucléocapside (N), le complexe de la polymérase, qui est composé des protéines P (*phosphoprotein*) et L (*large protein*), la matrice (M) et la glycoprotéine (G) (Barber, 2005). Ils possèdent aussi une membrane lipidique dérivée des cellules de l'hôte. VSV a été utilisé comme virus modèle en raison de sa structure relativement simple, de son taux de réplication élevé et du cours rapide de la maladie qu'il entraîne (Letchworth *et al.*, 1999). Son apparence en forme d'obus en microscopie électronique est très caractéristique (voir figure 14) (Cartwright and Brown, 1972). À la surface cellulaire, la phosphatidylsérine serait impliquée dans son entrée (Schlegel *et al.*, 1983).

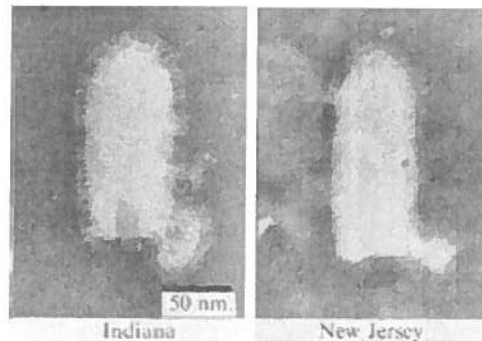


Figure 14 : Image caractéristique de VSV-IND et VSV-NJ en microscopie électronique.

(Cartwright and Brown, 1972).

3.3.2 L'infection par VSV

VSV a la possibilité d'infecter une vaste gamme d'hôtes, entre autres, les bovins, les porcs et les chevaux, chez lesquels il cause une infection aiguë, qui est rapidement éliminée par le système immunitaire. Les humains peuvent aussi être infectés. Des éclosions de ce virus surviennent chaque année de façon saisonnière au sud-est des Etats-Unis, au sud du Mexique, à travers l'Amérique centrale et le nord de l'Amérique du sud. La transmission s'effectue par injection, dans le cas d'infections naturelles possiblement par l'intermédiaire d'insectes piqueurs, ou par aérosols. Les signes cliniques varient entre l'absence de symptômes et la présence de vésicules et d'ulcérations sur la langue, les sabots, les mamelles et autres tissus. Chez l'humain, l'infection est souvent asymptomatique, ou on remarque des conjonctivites, de la fièvre, des symptômes grippaux et rarement, des encéphalites. La pathologie chez les souris de laboratoire est par contre bien différente de celle des hôtes naturels. Lorsque le virus est inoculé intranasalement, il peut infecter le cerveau et causer une encéphalite mortelle, alors que s'il est injecté intrapéritonéalement, il entraîne la protection par la production d'anticorps neutralisants, en produisant très peu de symptômes (Letchworth *et al.*, 1999).

3.3.3 Interaction avec le système immunitaire

Les travaux de Zinkernagel avec ce virus ont contribué à une partie importante des connaissances concernant les réponses antivirales. Lors de l'infection par VSV, une réponse très vigoureuse en anticorps est rapidement élaborée (voir la figure 15) (Bachmann *et al.*, 1994). La rapidité de cette réponse pourrait être due, en partie, à la présence de lymphocytes B possédant un récepteur spécifique au virus sans besoin de maturation d'affinité (Kalinke *et al.*, 1996). Les anticorps produits protègent les animaux contre ce virus, tel que démontré par l'infection de souris déficiente en anticorps, complémentées ou non avec des anticorps neutralisants (Brundler *et al.*, 1996).

La réponse T n'est peut-être pas nécessaire puisque des souris n'ayant pas de lymphocytes B mais possédant des lymphocytes T intacts sont totalement susceptibles à l'infection (Brundler *et al.*, 1996) et que d'autres souris, déficientes en lymphocytes T CD8⁺ résistent bien à l'infection (Kagi *et al.*, 1995; Fung-Leung *et al.*, 1991). De plus, il a été démontré que l'induction rapide de la réponse humorale de type IgM, est indépendante de l'aide des lymphocytes T_H (Zimmermann *et al.*, 1997). Par contre, la production des IgGs nécessite la participation de ces cellules (Leist *et al.*, 1987). La réponse T-indépendante qui survient en début d'infection serait due à la densité des glycoprotéines à la surface du virion, qui forment une structure quasie-cristalline très immunogène (Bachmann *et al.*, 1995).

Finalement, l'interféron semble jouer un rôle important pour le contrôle de l'infection. Il permettrait de limiter la propagation du virus pendant l'élaboration de la réponse humorale (Steinhauer *et al.*, 1989).

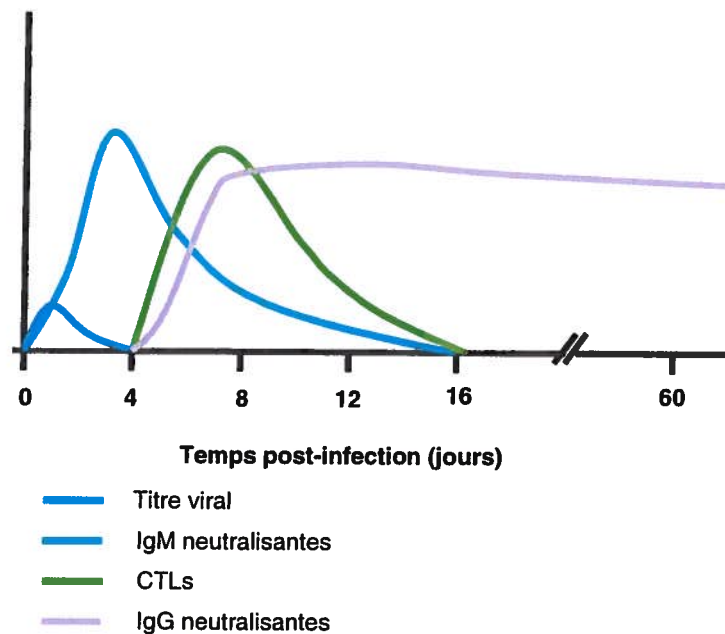


Figure 15 : Représentation de la réponse immunitaire classique dirigée contre VSV chez une souris adulte. Les anticorps d'isotype IgM contrôlent rapidement le virus et font place ensuite aux IgG.

Reproduit à partir de: (Hangartner *et al.*, 2006).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. Lignées cellulaires

Les lignées utilisées proviennent toutes de l'ATCC (*American Type Culture Collection*). La lignée L929, un sous-clone de la lignée parentale de cellules L établie en 1940 par Earle WR, provient de fibroblastes de souris C3H/An. La lignée BHK-21 (*baby hamster kidney*) a été établie en 1961 par I.A Macpherson et M.G.P Stoker à partir de reins de hamsters nouveaux-nés. Ces cellules ont été cultivées à 37°C dans un atmosphère à 5% de CO₂, dans du milieu MEM (*Earle's Modified Essential Medium*) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dans lequel a été ajouté 5 % (volume/volume, v/v) de sérum de bovin fœtal (SBF) décomplémenté 30 minutes à 56°C (Hyclone, Logan, UT, USA). Les cellules 293T (HEK 293T/17) proviennent de reins d'embryon humain et dérivent de la lignée 293 établie par transformation par adénovirus par Van der Eb A., au début des années 70. Ces cellules ont été maintenues dans des conditions similaires à celles des L929 et BHK-21 à l'exception du milieu de culture qui était du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Invitrogen).

2. Virus / plasmides

Les virus VSV-IND et LCMV-WE proviennent du Dr. Rolf Zinkernagel (Institut of Experimental Immunology, Zurich, Suisse).

Les plasmides nécessaires à la production des pseudoparticules du VHC ont été fournis par la Dre. Birke Bartosch (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Lyon, France). Le phCMV-7a encode les glycoprotéines E1 et E2 provenant d'un VHC de génotype 1a (Bartosch *et al.*, 2003). Le pTG5349 est un plasmide d'encapsulation dérivé du virus de la leucémie murine (*murine leukemia virus* - MLV) et le pTG13077 permet l'expression de la protéine GFP (Negre *et al.*, 2000).

3. Production virale - VSV

Des cellules BHK-21 en pétris (150 mm, Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) ont été amenées à une confluence de 50% dans du milieu MEM à 5% (v/v) de SBF. Le surnageant a ensuite été retiré et les cellules ont été infectées par VSV-IND à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01, dans 5 ml de milieu MEM à 1% (v/v) de SBF. Les pétris ont ensuite été incubés sur un plateau balançant pendant deux heures. Quinze ml de milieu MEM à 1% (v/v) de SBF ont ensuite été ajoutés par pétri et les cellules ont été incubées à 37°C et 5% (v/v) de CO₂. Vingt-quatre heures post-infection, les surnageants ont été récupérés pour la purification. En général, pour obtenir un volume suffisant pour la purification d'une grande quantité de virus, 20 pétris étaient utilisés.

4. Production virale - LCMV

Des cellules L-929 en pétris (150 mm) ont été amenées à une confluence de 80% dans du milieu MEM à 5% (v/v) de SBF. Le surnageant a ensuite été retiré et les cellules ont été infectées par LCMV-WE à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01, dans 5 ml de milieu MEM à 1% (v/v) de SBF. Les pétris ont ensuite été incubés sur un plateau balançant pendant une heure. Quinze ml de milieu MEM à 1% (v/v) de SBF ont ensuite été ajoutés par pétri. Quarante-huit heures post-infection, les surnageants ont été récupérés pour la purification. En général, pour obtenir un volume suffisant pour la purification d'une grande quantité de virus, 20 pétris étaient utilisés.

5. Purification des virus (VSV et LCMV)

Les surnageants de cellules infectées (approximativement 400 ml par virus) ont d'abord été centrifugés (Beckman J2-21M, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) à 9500 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a ensuite été récupéré et amené à 0,5M de NaCl (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) et 10% (p/v) de PEG 8000 (USB corporation, Cleveland OH USA). La solution a ensuite été incubée en agitation douce à 4°C pendant environ 16 heures. Une autre centrifugation à 9500 rpm à 4°C pendant 30 minutes a suivi. Le surnageant a été retiré et le précipité a été resuspendu dans environ 2 ml de TNE¹. Dans des tubes (Ultraclear #344059, Beckman), 1,5 ml d'une solution à 50% (p/v) d'Accudenz (Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, USA) a été déposé. Huit ml d'une solution à 10% (p/v) ont ensuite été ajoutés avant d'y déposer la solution de TNE contenant les particules virales. Les tubes ont ensuite été ultracentrifugés (Beckman L5-65) pendant 153 minutes à 31 000 rpm à 4°C (sans frein). Les précipités obtenus à l'interphase ont été récupérés à l'aide d'une longue pipette pasteur et ont été dialysés trois fois à 4°C dans une solution de TNE. Les virus purifiés ainsi obtenus ont été conservés à -80°C.

6. Production des pseudoparticules du virus de l'hépatite C par transfection

Dans des plateaux 6 puits (Corning), 8×10^5 cellules 293T ont été ajoutées par puits dans 2 ml de milieu DMEM à 5% (v/v) de SBF. La journée suivante, le milieu a été changé une heure avant la transfection et le volume a été diminué à 1 ml par puits. Pendant ce temps, des eppendorfs ont été préparés en déposant 5,7 µg du plasmide codant pour E1 et E2, 8,1 µg de celui contenant les gènes gag et pol et 8,1 µg du troisième plasmide portant le gène rapporteur (GFP). De l'eau

¹ TNE : 50 mM Tris-base (USB), 100 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1 mM Na₂EDTA (Sigma-Aldrich)

distillée stérile a ensuite été ajoutée pour un volume total de 450 µl par eppendorf, un eppendorf permettant la transfection des cellules de deux puits. Des tubes contenant 500 µl de HBS² à la température de la pièce ont aussi été préparés. Juste avant la transfection, 50 µl d'une solution de CaCl₂ à 2,5M (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés par eppendorf d'ADN et mélangés 3 fois en pipetant (pour un maximum de 5 eppendorfs à la fois). Le mélange d'ADN et de CaCl₂ a ensuite été ajouté goutte à goutte dans le HBS, tout en injectant de l'air dans celui-ci à l'aide d'une longue pipette pasteur et d'une poire automatique. Cinq-cents µl de cette solution ont été ajoutés par puits de cellules. Les plateaux ont été agités délicatement à la main, puis ils ont été incubés à 37°C et 5% (v/v) de CO₂. Douze à seize heures plus tard, le milieu a été changé et le volume par puits a été ajusté à 2 ml de DMEM. Quarante-huit heures post-transfection, le surnageant des cellules a été récupéré et filtré à l'aide de seringues de 10 ml (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) et de filtres 0,45 µm (Pall corporation, Ann Arbor, MI, USA). Comme les cellules étaient transfectées avec un plasmide permettant l'expression de la GFP, l'efficacité de la transfection pouvait être observée en microscopie à fluorescence (résultats non présentés). De plus, le pouvoir infectieux pouvait aussi être vérifié en infectant des cellules HuH 7.5 (résultats non présentés).

7. Concentration des VHCpp

Afin de concentrer les VHCpp, la technique d'ultracentrifugation sur coussin de sucrose a été utilisée. Le surnageant filtré des cellules 293T transfectées a été déposé dans des tubes (ultraclear #344059) à raison de 10 ml par tube. À l'aide de longues pipettes pasteur, 1,5 ml d'une solution de TNE contenant 20% (v/v) de sucrose (USB) a été ajouté au fond de chaque tube. Les tubes ont ensuite été centrifugés (Beckman L5-65) à 25 000 rpm pendant 150

² HBS : 250 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 50 mM HEPES (Sigma), 1,5 mM Na₂HPO₄ (USB)

minutes à 4°C, sans frein. Les culots obtenus ont ensuite été resuspendus dans 100 µl de PBS par tube. Les VHCpp ont été conservées à -80°C.

8. ELISA - anticorps naturels contre LCMV-WE et VSV-IND

Du sang de 5 souris naïves C57BL/6, HC1, QM et J_HT, toutes âgées de quatre mois, a été prélevé par ponction intracardiaque. Le sérum a été récupéré pour réaliser un ELISA avec VSV et LCMV purifiés. Cent ng de ces virus ont été adsorbés par puits d'une plaque ELISA (Corning incorporated, Corning, NY, USA) dans 50 µl pendant une nuit à 4°C dans du tampon carbonate³. Les puits ont ensuite été lavés une fois avec du PBS, puis bloqués pendant au moins une heure, à la température de la pièce, avec du PBS contenant 1% de BSA (Fisher, Fair Lawn, NJ, USA). Après un autre lavage avec du PBS, 50 µl des dilutions en séries des sérums de souris dans du PBS-0,1% BSA ont été ajoutés pour une heure à la température de la pièce. Les puits ont ensuite été lavés cinq fois avec du PBS-0,1% tween20 (USB corporation). Une autre incubation d'une heure à la température de la pièce a suivi, avec un conjugué de chèvre anti-IgMs de souris – peroxidase dilué 1 :5000 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA). Pour la souris HC1, un conjugué de chèvre anti-IgMs d'humain – peroxidase, dilué 1 :10000, a été utilisé (Jackson Immuno Research). L'usage de ces dilutions est basé sur des tests comparant différentes dilutions des conjugués pour des concentrations similaires d'IgMs. Les dilutions pour lesquelles étaient obtenues des courbes quasi-superposées ont été choisies. Après cette incubation, 5 lavages ont été effectués avec du PBS-0,1% Tween20. Cent µl par puits d'une solution⁴ contenant le substrat et le chromogène ont ensuite été ajoutés et après 12 minutes la réaction fut arrêtée par l'ajout de 50 µl par puits de HCl 1M (Sigma-Aldrich).

³ Tampon carbonate : 87,49 mM Na₂CO₃, 12,83 mM NaHCO₃, dans de l'eau distillée

⁴ 0,4 mg/ml d'ortho-phényldiamine (OPD) (Sigma), 0,4 µl/ml % de H₂O₂ (Sigma) dans du tampon citrate pH5 (0,1M Na₂HPO₄ (USB), 0,05M C₆H₈O₇ (Fisher), dans de l'eau distillée

Les résultats ont été obtenus par spectrophotométrie (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) à 490 nm.

9. Dosage par ELISA de la concentration sérique en IgMs chez la souris

Des anticorps anti-IgMs de souris (Jackson ImmunoResearch) ont été adsorbés dans les puits d'une plaque ELISA (Corning) à une concentration de 1 µg/ml dans du tampon carbonate (100 µl par puits) pendant 16 heures à 4°C. Pour les souris HC1, la même procédure a été effectuée avec des anticorps de chèvre anti-IgMs d'humain (Jackson Immuno Research). Les puits ont ensuite été lavés avec du PBS et bloqués pendant une heure à la température de la pièce par du PBS contenant 0,1% de Tween20 et 1% de lait en poudre (p/v). La plaque a été lavée une fois avec du PBS et des dilutions d'un mélange de sérums de six souris par souche, en duplicata, ont été ajoutées. Pour les souris C57BL/6, QM, J_HT et RAG^{-/-}, le mélange de sérums a d'abord été dilué 5000 fois, puis des dilutions d'un facteur trois ont été effectuées. Pour la souris HC1, les mêmes procédures ont été appliquées mais la dilution de départ était 1:1000. Dans le but de quantifier la concentration en IgMs, des standards d'IgMs de souris et d'humain ont été utilisés (Sigma et Jackson Immuno Research, respectivement). Ces standards ont été dilués pour obtenir 50 µg/ml et ils ont ensuite été dilués aussi en série, d'un facteur trois. Après une heure d'incubation à la température de la pièce, cinq lavages ont été effectués avec du PBS contenant 0,1% de Tween20 (v/v). Ensuite, 100 µl/puits d'anticorps de chèvre anti-IgMs de souris couplés à la peroxidase et dilués 5000 fois dans du PBS contenant 0,1% de Tween20 (v/v) et 0,1% de lait en poudre (p/v) ont été ajoutés pendant une heure à la température de la pièce. Pour la souris HC1, un conjugué de chèvre anti-IgMs humaines couplé à la peroxidase et dilué 10 000 fois a été utilisé. Suite à cinq lavages, 100 µl/puits d'une solution de tampon citrate contenant de l'OPD et de la peroxidase ont été ajoutés pendant 10 minutes et 50 µl/puits de HCl 1M ont arrêté la réaction.

L'absorbance à 490 nm a ensuite été mesurée par un lecteur de plaque ELISA (Bio-Rad). Des courbes standard ont ensuite été tracées afin de déterminer les concentrations en IgMs pour chaque échantillon.

10. Purification des IgMs

Le sang de 15 souris HC1 et 15 souris QM a été prélevé par ponction intracardiaque. Le sérum a été récupéré suite à une centrifugation (Sorvall Legend RT, Mandel, Guelph, Ontario) de 10 minutes à 3000 rpm. Le sérum de souris C57BL/6 a été acheté (Innovative Research, Plymouth, MN, USA).

Les sérums de chaque souche de souris ont été dilués 1 :2 avec du tampon de liaison⁵. La purification des IgMs de ces sérums s'est effectuée par chromatographie d'affinité (Akta Prime, Pharmacia Amersham, Buckinghamshire, Royaume Uni) en utilisant des colonnes *HiTrap IgM Purification HP* (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA). Une colonne différente a été utilisée pour chaque souche de souris. Après le passage des échantillons, la colonne a été lavée avec du tampon de liaison, puis deux étapes d'élution ont été réalisées afin de récupérer les IgMs, une première avec du tampon phosphate 20 mM et une seconde avec le du tampon phosphate 20 mM contenant 30 % d'isopropanol (Sigma-Aldrich). La pureté des fractions obtenues a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide et par immunobuvardage sur membrane de nitrocellulose (résultats non présentés).

Les fractions positives ont été mises en commun et la concentration en IgMs a été mesurée par spectrophotométrie à 280 nm et à l'aide du facteur de conversion pour les IgMs (1,2 mg/ml par unité de densité optique) (Harlow and Lane, 1999). Les solutions d'IgMs purifiées ont ensuite été concentrées et

⁵ Tampon de liaison : 0,8 M (NH₄)₂SO₄ (Sigma-Aldrich) dans du tampon phosphate 20 mM

dialysées 3 fois dans du PBS par centrifugation sur colonnes (Vivaspin 100 000 MWCO, Sartorius group, Göttingen, Allemagne).

11. ELISA IgMs purifiées contre LCMV-WE et VSV-IND

Ce test a été réalisé tel que décrit à la section 8. Par contre, les sérums ont été remplacés par des préparations d'IgMs purifiées par chromatographie d'affinité (section 10). Pour chaque souche de souris, la concentration en IgMs purifiées a été mesurée par spectrométrie et des solutions à 1600 g/ml ont été préparées. Puis des dilutions en série ont été effectuées.

12. Capture des complexes immuns formés des anticorps naturels et de VSV-IND

Du sang de souris naïves C57BL/6 et RAG^{-/-} âgées de 4 mois, a été prélevé par ponction intracardiaque. Après une centrifugation (Sorvall Legend RT, Mandel) de 3000 rpm pendant 10 minutes, les sérums ont été récupérés. Pour effectuer le test de capture par ELISA, 130 ng d'anticorps de chèvre anti-IgMs de souris dans du tampon carbonate ont été adsorbés dans 50 µl par puits à 4°C pendant 16 heures. Les puits ont ensuite été lavés une fois avec du PBS, puis bloqués pendant au moins une heure, à la température de la pièce, avec du PBS contenant 1% (poids/volume, p/v) de lait en poudre. Les puits ont ensuite été lavés une fois avec du PBS et 50 µl par puits d'un mélange 1 :2 de VSV-IND purifié (concentration initiale de 64 µg/ml = 32 µg/ml) et de dilutions en série des sérums de souris dans du PBS-0,1% Tween20-0,1% lait ont été ajoutés pour 1h30 à la température de la pièce. Les puits ont ensuite été lavés trois fois avec du PBS-0,1% tween20. Une incubation d'une heure à la température de la pièce a suivi, avec un anticorps spécifique au virus (VI10) et biotinylé (produit au laboratoire, 2 mg/ml) dilué 1 :1000 (50 µl par puits). Trois lavages avec du PBS-0,1% tween20 ont suivi. De la streptavidine conjuguée à de la peroxidase (Sigma-Aldrich) a été

diluée 2000 fois dans du PBS-0,1% Tween20-0,1% lait et ajoutée à raison de 50 µl par puits. Après cette incubation, quatre lavages ont été effectués avec du PBS-0,1% Tween20. La réaction a été lue à 490 nm par un lecteur de plaque ELISA (Bio-Rad) après l'ajout 100 µl/puits d'une solution contenant 0,4 µl/ml de peroxide et 0,4 mg/ml d'O-PhenyleneDiamine (OPD) dans du tampon citrate et l'arrêt de la réaction par 50 µl/puits de HCl 1M.

13. Capture des complexes immuns formés des anticorps naturels et de LCMV-WE

Ce test a été effectué comme à la section 12, mis à part certains détails. La source de virus était ici du surnageant de cellules L-929 infectées par LCMV-WE dilué 1:2 avec les dilutions de sérums de souris. Pour révéler la présence du virus, un anticorps spécifique (KL25) biotinylé (produit au laboratoire, 2 mg/ml) et dilué cent fois a été ajouté à raison de 50 µl par puits.

14. Test de présentation antigénique « *in vivo* »

Trois souris C57BL/6 et trois souris J_HT de 2 à 3 mois ont été infectées intraveineusement par 2×10^6 pfu de LCMV-WE. Vingt-quatre heures post-infection, les rates des souris ont été prélevées et déposées dans des tubes contenant 5 ml de collagénase D (160 U/ml ou 1 mg/ml) (Roche, Bâle, Suisse) dans du PBS supplémenté en Ca^{2+} (GIBCO, Invitrogen corporation, Grand island, NY, USA). Le contenu des tubes a ensuite été transféré dans des pétris pour culture cellulaire. À l'aide d'une pince et d'une seringue munie d'une aiguille 25G, 500 µl de la solution de collagénase D ont été injectés par rate. Les rates ont ensuite été coupées en petits morceaux et incubées une heure à 37°C et à 5% de

CO₂. Les contenus des pétris ont été versés à travers un tamis cellulaire (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) dans d'autres pétris et les rates en morceaux ont été écrasées à l'aide d'un piston de seringue de 3 ml (BD). Les cellules ainsi obtenues ont été transférées dans des tubes de 50 ml (Corning) en passant à travers un autre tamis cellulaire. Les cellules ont ensuite été lavées en ajoutant environ 10 ml de tampon pour auto-MACS⁶, puis centrifugées (Sorvall Legend RT, Mandel) à 1500 rpm pendant 5 minutes. Pour isoler les cellules dendritiques, le surnageant a été retiré délicatement et les cellules ont été resuspendues dans 400 µl de tampon pour auto-MACS par 10⁸ cellules et 100 µl de billes magnétiques anti-CD11c (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Allemagne) par 10⁸ cellules ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été incubé pendant 20 minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées avec 10 à 20 fois le volume de marquage de tampon pour auto-MACS et centrifugées 10 minutes à 300g à 4°C. Le surnageant a été retiré délicatement et les cellules ont été resuspendues dans 500 µl de tampon pour auto-MACS pour 10⁸ cellules. La préparation cellulaire a ensuite subi une double sélection positive par tri-magnétique automatisé (auto-MACS, Miltenyi). La fraction positive a été récoltée et lavée avec du milieu RPMI (+ 1:100 strep/pen + 1:100 L-glutamine + 10 % SFV + 10⁻⁵ M β-mercaptoéthanol) et centrifugée à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le culot a été resuspendu dans du milieu RPMI (+ 1:100 strep/pen + 1:100 L-glutamine + 10 % SFV + 10⁻⁵ M β-mercaptoéthanol) et filtré à travers un tamis cellulaire. La concentration de cellules dendritiques a ensuite été ajustée à 5x10⁵ cellules/ml. Cent µl ont été déposés par puits d'une plaque 96 puits à fonds ronds (Corning), (6 puits pour chaque souris).

Pour induire la maturation des cellules dendritiques, des LPS (Sigma) ont été ajoutés pour obtenir une concentration de 1 µg/ml et les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 16 heures. Par la suite, les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu RPMI (+ 1:100 strep/pen + 1:100 L-glutamine +

⁶ Tampon pour auto-MACS : 0.5% (p/v) de BSA et 2mM EDTA dans du PBS

10 % SFV + 10^{-5} M β -mercaptoéthanol) en centrifugeant les plateaux à 400 rpm pendant 5 minutes.

Dans le but d'obtenir des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au LCMV, des rates de souris P14 ont été prélevées et déposées dans des tubes contenant du milieu MEM. Le contenu des tubes a ensuite été transféré à travers des tamis cellulaires dans des pétris pour culture cellulaire et les rates ont été écrasées à l'aide d'un piston de seringue de 3 ml. Les cellules ainsi obtenues ont été transférées dans des tubes de 50 ml en passant à travers un autre tamis cellulaire. Les cellules ont ensuite été lavées en ajoutant environ 10 ml de tampon pour auto-MACS, puis centrifugées (Sorvall Legend RT, Mandel) à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant a été retiré délicatement et les cellules ont été resuspendues dans 90 μ l de tampon pour auto-MACS par 10^7 cellules et 10 μ l de billes magnétiques anti-CD8 par 10^7 cellules ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été incubé pendant 15 à 20 minutes à 4°C (pas sur la glace!). Les cellules ont été lavées avec 10 à 20 fois le volume de marquage de tampon pour auto-MACS et centrifugées 10 minutes à 300g à 4°C. Le surnageant a été retiré délicatement et les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de tampon pour auto-MACS pour 10^7 cellules. La préparation cellulaire a ensuite subi une simple sélection positive par tri-magnétique automatisé. La fraction positive a été récoltée et lavée avec du milieu RPMI (+ 1:100 strep/pen + 1:100 L-glutamine + 10 % SFV + 10^{-5} M β -mercaptoéthanol) et centrifugée à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le culot a été resuspendu dans du milieu RPMI (+ 1:100 strep/pen + 1:100 L-glutamine + 10 % SFV + 10^{-5} M β -mercaptoéthanol) et filtré à travers un tamis cellulaire. La concentration de cellules dendritiques a ensuite été ajustée à 1×10^6 cellules/ml. Cent μ l de cette préparation ont été ajoutés aux puits contenant les cellules dendritiques et l'incubation à 37°C, 5% de CO₂ s'est poursuivie pendant 72 heures. Afin de quantifier la prolifération des CTLs, 0,44 μ Ci/puits de [³H]Thymidine (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) ont été ajoutés. Seize heures plus tard, l'ADN contenu dans les puits a été adsorbé sur membrane

(PerkinElmer, Waltham, MA, USA) à l'aide du Harvester (Tomtec, Hamden, CT, USA) et du liquide à scintillation (Perkin-Elmer) a été étalé sur ces membranes. La radioactivité due à l'incorporation dans l'ADN de [³H]Thymidine a ensuite été quantifiée par un compteur à scintillations (TRILUX 1450 microbeta – PerkinElmer).

Une fois les résultats obtenus, un test statistique t de student pour des données non paires a été effectué à l'aide du logiciel PRISM.

15. Test de présentation antigénique *in vitro*

Les cellules dendritiques nécessaires à la réalisation de cette expérience ont été isolées de la façon décrite à la section 14 et ont été mises en culture, en triplicata pour chaque condition. Elles ont ensuite été incubées avec LCMV inactivé aux UVs (1 :2 dans du PBS, à partir d'une préparation à 200 µg/ml) ou dilué 1 :2 avec différentes dilutions de sérums de souris C57BL/6 ou J_HT. La suite de l'expérience s'est poursuivie tel que décrit à la section 14.

16. Recherche de la présence du Fcα/µR chez les cellules dendritiques par PCR quantitatif

Des rates de souris C57BL/6 ont été utilisées pour obtenir les cellules nécessaires à cette expérience. Les cellules dendritiques et les lymphocytes T ont été isolés par tri-magnétique automatisé tel que décrit à la section 14. Pour les lymphocytes B, le tri s'est effectué de la même manière que pour les lymphocytes T, en utilisant des billes couplées à des anti-CD19 (Miltenyi). Les cellules dendritiques (2,38 x 10⁷ cellules) et les lymphocytes T (1 x 10⁷ cellules) ont été resuspendus dans 2 ml de TRIZOL (Invitrogen) alors que les lymphocytes B (4,2

x 10⁷ cellules) ont été resuspendus dans 4 ml. Pour obtenir la préparation de cellules totales, une rate de souris C57BL/6 a été broyée par polytron (Kinematica AG, Lucerne, Suisse) directement dans 2 ml de TRIZOL.

Les cellules dans le TRIZOL ont été séparées pour obtenir 1 ml par eppendorf et elles ont été incubées 5 minutes à la température de la pièce. Ensuite, 200 µl de chloroform (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés par eppendorf, puis les tubes ont été agités vigoureusement pendant 15 secondes et laissés à la température de la pièce pendant 2 à 3 minutes. Les eppendorfs ont ensuite été centrifugés (5415 R, Eppendorf, Hamburg, Allemagne) à 11 000g pendant 15 minutes et la phase aqueuse de chacun a été transférée dans un nouvel eppendorf. Par tube, 500 µl d'isopropanol ont été ajoutés. Après 10 minutes d'incubation à la température de la pièce, une centrifugation s'est effectuée à 11 000g pendant 10 minutes, à 4°C. Le surnageant a été retiré et 1 ml d'éthanol 75% a été ajouté par eppendorf et a été mélangé au vortex (VWR, Fontenay sous Bois, France). Les eppendorfs ont ensuite été centrifugés à 7 400g pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants ont été retirés et les culots séchés à l'air et resuspendus dans de l'eau DEPC (Ambion, Foster City, CA, USA), puis chauffés 10 minutes à 60°C. La concentration en ARN a ensuite été dosée par spectrométrie.

Pour chaque population cellulaire, 4 µg d'ARN ont été utilisés pour effectuer une rétro-transcription à l'aide de la transcriptase inverse *SuperScript II* selon le protocole recommandé par la compagnie (Invitrogen).

Le PCR quantitatif a été réalisé avec l'ensemble pour PCR DyNAmo HS SYBR GREEN (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) selon les instructions de la compagnie, à l'aide de l'appareil Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Leipzig, Allemagne). Chaque condition a été testée en triplicata et 1,3 µl d'ADNc, provenant de la transcription inverse de 4 µg d'ARN, a été ajouté par tube. Les amorces utilisées pour la détection du Fcα/µR étaient : F : 5'-CGTTCCACAGAGCGGTTTGT-3' et R : 5'-ATGTCGTTTCGGTCT-CCTATGCCA-3' et le gène témoin utilisé était celui de la β-actine pour lequel

les amorces étaient : F : 5'-CCTTCCTGTGCATGGAGTCCT-3' et R : 5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3' (Lin *et al.*, 1997). Le programme utilisé était le suivant : 95°C pendant 15 minutes, 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C, pour 40 cycles. Chaque échantillon a été traité en triplicata.

Pour chaque population cellulaire, la moyenne des résultats par gène a été calculée, puis un ratio β -actine / Fc α / μ R a été effectué (méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$). Les lymphocytes B servant ici de témoin positif, le ratio obtenu pour ces cellules a été rapporté à 100% et les ratios des autres populations cellulaires y ont été comparés.

17. Recherche de la présence du Fc α / μ R chez les cellules dendritiques par cytométrie en flux

Afin d'isoler les cellules dendritiques, un tri-magnétique automatisé a été effectué tel que décrit à la section 14. Puisque les lymphocytes B (témoin positif) et T (témoin négatif) sont négatifs quant à l'expression du marqueur CD11c, la fraction négative du tri a été utilisée pour ces cellules.

Les échantillons ont été lavés une première fois avec du tampon de cytométrie⁷ puis en centrifugeant 5 minutes à 1500 rpm à 4°C (Sorvall Legend, Mandel). Les surnageants ont été éliminés et le culot de cellules resuspendu. Les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T ont été marqués avec des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome, soit respectivement des anti-CD11c-FITC, anti-B220-FITC et anti-CD8-FITC (BD), à raison de 1 μ l par 10⁶ cellules. Une incubation de 20 minutes s'est effectuée à 4°C. Suite à deux lavages dans du tampon de cytométrie, 2,5 μ g d'IgMs normales de souris couplées à de l'APC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ont été ajoutés par tube

⁷ PBS contenant 1% de BSA (p/v) (Fisher) et 0,1% d'azide de sodium (v/v) (USB)

pendant 30 à 40 minutes à 4°C. Dix minutes avant la fin de cette incubation, 5 µl d'une solution de 7-AAD (BD Biosciences) ont été ajoutés par tube. Chaque tube a ensuite été lavé avec du tampon de cytométrie puis les échantillons ont été resuspendus dans une solution contenant 1% de paraformaldéhyde (Fisher). Les échantillons ont été analysés en cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

18. ELISA anticorps naturels contre les VHCpp

Les sérums humains utilisés dans cette étude proviennent en partie d'une collaboration avec Naglaa Shoukry, professeure-chercheure à l'hôpital Saint-Luc et ont pu être prélevés suite à l'approbation du protocole SL05.014 par le comité d'éthique du CHUM (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal).

Des VHCpp ont été adsorbées à raison de 380 ng/puits dans une plaque ELISA dans 50 µl pendant une nuit à 4°C dans du tampon carbonate. Les puits ont ensuite été lavés une fois avec du PBS, puis bloqués pendant deux heures, à la température de la pièce, avec du 150 µl/puits de PBS contenant 1% de BSA (p/v). Après un lavage avec du PBS, 50 µl des dilutions en séries des sérums humains dans du PBS-0,1% BSA ont été ajoutés pour une heure à la température de la pièce. Les puits ont ensuite été lavés cinq fois avec du PBS-0,1% tween20. Une autre incubation d'une heure à la température de la pièce a suivi, avec un conjugué d'anticorps de chèvre anti-IgMs d'humain couplé à la peroxidase dilué 1 :10 000. Après cette incubation, 5 lavages ont été effectués avec du PBS-0,1% Tween20. Une solution contenant 0,4 µl/ml de peroxide et 0,4 mg/ml d'O-PhenyleneDiamine (OPD) dans du tampon citrate a ensuite été ajoutée à raison de 100 µl par puits et la réaction a été arrêtée par 50 µl de HCl 1M. Les plaques ont ensuite été lues par un spectrophotomètre à 490 nm.

19. Dosage par ELISA de la concentration en IgMs sériques chez l'humain

Cette expérience a été réalisée de la même façon qu'à la section 9. Toutefois, des anti-IgMs humain dilués 2000 fois ont été adsorbés au fond des puits des plaques ELISA. Les sérums humains et le standard d'IgMs ont été d'abord dilués 1 :1000 et 1 :10 000 respectivement et d'un facteur trois par la suite. Un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgMs humaines dilué 1 :10 000 a été utilisé.

Chapitre 3

Résultats

1 Interactions anticorps naturels – virus

1.1 Liaison des IgMs de différentes souches de souris naïves aux virus LCMV et VSV

Dans le but de démontrer la liaison des anticorps naturels aux virus VSV et LCMV, les sérums de différentes souches de souris ont été utilisés pour effectuer des tests ELISAs. Ces virus ont d'abord été purifiés, tel que décrit à la section 5 du chapitre 2, pour limiter les réactions dues à la liaison des anticorps à d'autres molécules. La présence d'anticorps se fixant aux virus a été révélée à l'aide d'un conjugué anti-IgMs couplé à la peroxidase, dirigé contre la portion Fc des immunoglobulines M de souris. Dans le cas de la souris HC1, les anti-IgMs étaient dirigés contre la portion Fc des immunoglobulines M d'humain, puisque cette souris possède des chaînes lourdes d'immunoglobulines humaines.

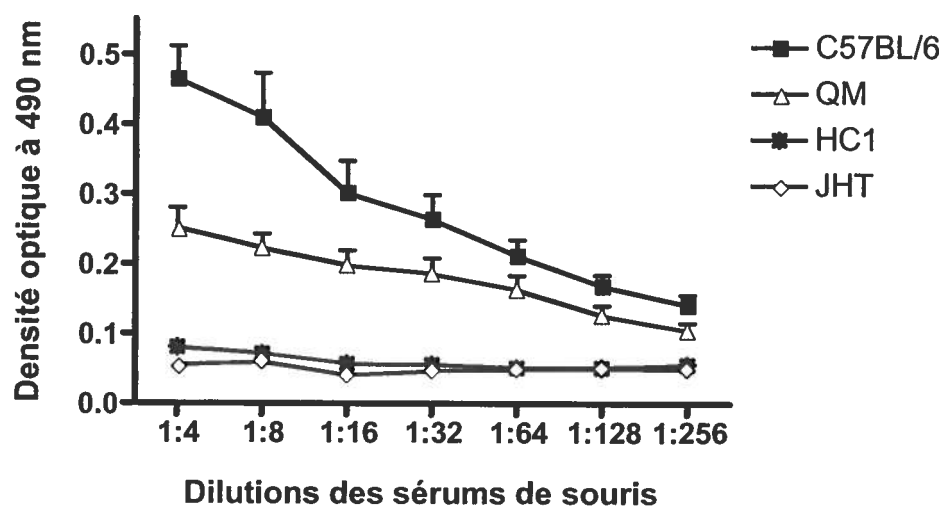


Figure 16 : Détection d'anticorps naturels d'isotype IgM produits par les souris C57BL/6, QM, HC1, et JHT, liés à LCMV-WE purifié.

LCMV-WE a été adsorbé à raison de 100 ng par puits et la liaison d'IgMs du sérum de différentes souches de souris naïves âgées d'environ 4 mois a été évaluée à l'aide d'un conjugué anti-IgMs de souris couplé à la peroxidase, sauf dans le cas des sérums de souris HC1, pour lesquels des anti-IgMs humaines couplés à la peroxidase ont été utilisés. ($n = 5$).

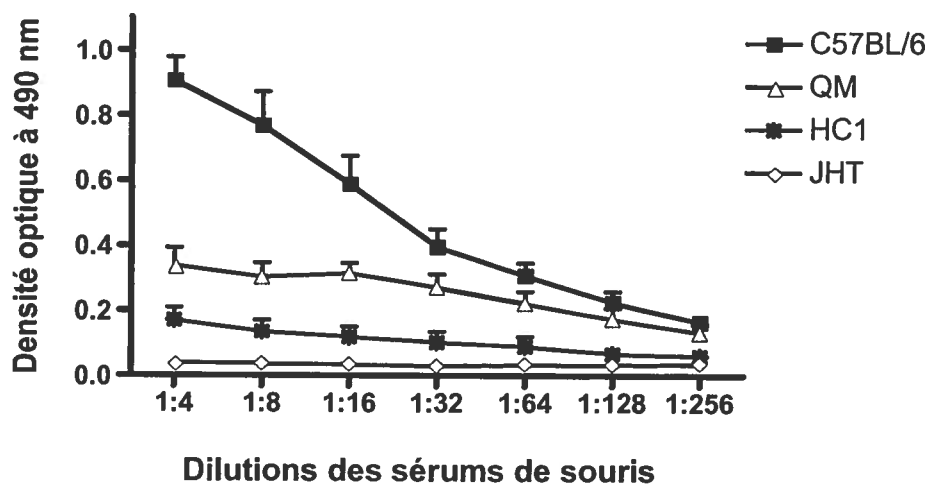


Figure 17 : Détection d'anticorps naturels d'isotype IgM produits par les souris C57BL/6, QM, HC1, et JHT, liés à VSV-IND purifié.

VSV-IND a été adsorbé à raison de 100 ng par puits et la liaison d'IgMs du sérum de différentes souches de souris naïves âgées d'environ 4 mois a été évaluée à l'aide d'un conjugué anti-IgMs de souris couplé à la peroxidase, sauf dans le cas des sérums de souris HC1, pour lesquels des anti-IgMs humaines couplés à la peroxidase ont été utilisés. ($n = 5$).

On remarque d'abord une différence importante au niveau des densités optiques obtenues pour VSV (figure 17) par rapport à LCMV (figure 16), les valeurs étant plus faibles pour ce dernier. Ensuite, les courbes démontrent une liaison dose-dépendante des IgMs aux virus, étant donné la diminution des valeurs de densités optiques au fil des dilutions. Tel qu'attendu, la souris ayant le répertoire le plus diversifié, la C57BL/6, présente une courbe de densités optiques supérieure aux autres souches de souris, tant pour VSV que pour LCMV. Lorsque nous comparons les courbes des souris QM et HC1, la QM présente une activité de liaison plus élevée que la HC1, pour les deux virus. Il est important de noter ici que le système de détection des IgMs est différent entre ces deux souches de souris. Puisque les chaînes lourdes des immunoglobulines de la souris HC1 sont humaines, l'utilisation d'un anticorps anti-IgMs de souris est donc inappropriée

dans ce cas. Par contre, des tests ont été réalisés pour déterminer les concentrations de conjugués à utiliser pour obtenir une densité optique similaire à concentration d'IgMs équivalentes (résultats non présentés). Ce facteur ne devrait donc pas influencer les résultats. Évidemment, comme les souris J_HT ne possèdent pas d'Ig, elles ne présentent pas non plus d'activité de liaison aux virus utilisés et servent ici de témoins négatifs.

1.2 Concentration sérique d'IgMs chez différentes souches de souris

Dans le but de mieux comprendre les interactions des anticorps naturels avec ces pathogènes et les facteurs menant à une meilleure reconnaissance, la concentration en IgMs sériques a été quantifiée pour chaque souche de souris. Pour ce faire, un ELISA a été effectué en utilisant des sérums de souris naïves et une référence de concentration connue. Ainsi, des anti-IgMs de souris, ou d'humain dans le cas de la souris HC1, ont été adsorbés au fond des puits de plaques 96 puits et des mélanges de sérums provenant de 6 souris par souche ont été ajoutés. La présence des IgMs a ensuite été détectée par des conjugués anti-IgMs couplés à la peroxidase.

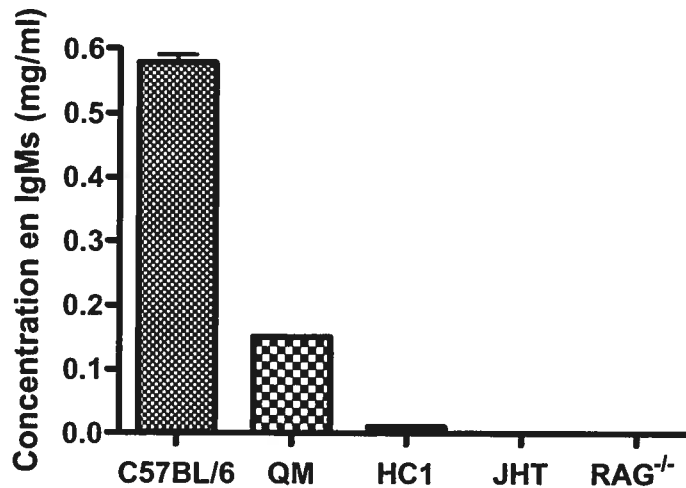


Figure 18 : Quantification de la concentration en IgMs sériques des souris C57BL/6, QM, HC1, J_HT, RAG-1^{-/-}.

Des sérums de six souris naïves âgées d'environ 4 mois ont été mis en commun pour chaque souche et utilisés pour déterminer la quantité d'IgM par ELISA. Des anti-IgMs ont été adsorbées au fond des puits et des anti-IgMs de souris conjugués à la peroxidase (anti-humain dans le cas de la souris HC1) ont été utilisés pour quantifier la liaison des IgMs sériques. Les densités optiques obtenues à 490 nanomètres (nm) ont été comparées à celle d'un échantillon d'IgMs de concentration connue. (En duplicata)

Telles que représentées à la figure 18, les concentrations en IgMs des différentes souches de souris ne sont pas équivalentes. Les souris C57BL/6 possèdent une concentration en anticorps naturels approximativement 4 fois plus élevée par rapport à la souris QM, qui elle présente une concentration d'environ 15 fois celle de la HC1. Évidemment, les souris J_HT et RAG^{-/-} ont une concentration nulle en IgMs. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus aux figures 16 et 17. Nous constatons maintenant que les activités de liaisons sont réparties en fonction de la concentration en IgMs du sérum des différentes souches de souris.

Afin de vérifier que ces réactions n'étaient pas dues uniquement à de l'adsorption non spécifique des IgMs au fond des puits de la plaque ELISA, deux tests ont été effectués. Tout d'abord, un ELISA avec du sérum de souris C57BL/6

et différentes concentrations de virus (résultats non présentés) a démontré que, autant avec VSV que LCMV, les densités optiques étaient proportionnelles à la concentration de virus purifiés par puits. Ensuite, il apparaissait logique de normaliser les concentrations en anticorps naturels pour vérifier les activités de liaison des sérums des différentes souches de souris.

1.3 Liaison aux virus LCMV et VSV des IgMs de différentes souches de souris lorsque la concentration est normalisée

Pour mieux évaluer le rôle de la diversité du répertoire des anticorps naturels par rapport à leur liaison aux antigènes, les IgMs de différentes souches de souris ont été purifiées par chromatographie d'affinité. Les concentrations en IgMs ont ensuite été normalisées pour effectuer un ELISA sur les deux modèles de virus purifiés de la même façon qu'à la section 1.1.

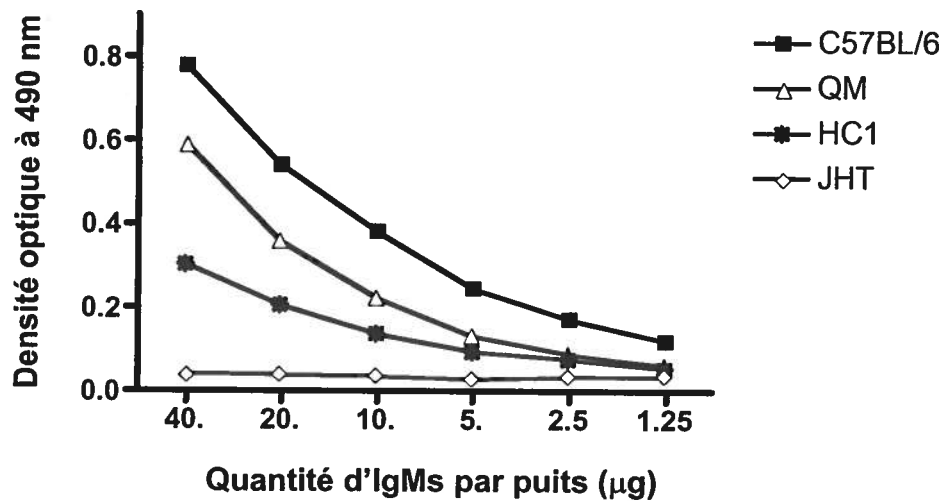


Figure 19 : Liaison des IgMs purifiées des souris C57BL/6, QM, HC1, et J_HT au LCMV purifié.

Du sang de quinze souris naïves de chaque souche a été prélevé et mis en commun afin de purifier les IgMs. La concentration en IgMs a ensuite été normalisée à 1600 µg/ml pour chaque souche de souris et la liaison de ces IgMs aux virus purifiés a été quantifiée par ELISA à l'aide d'un conjugué anti-IgMs-peroxidase. Puisque les souris J_HT ne possèdent pas d'anticorps et qu'il était donc impossible de purifier leurs IgMs, du sérum pur a été utilisé en tant que témoin négatif. LCMV purifié a été adsorbé à 100 ng/puits et différentes dilutions des IgMs purifiées ont été faites à partir de la préparation normalisée. (En duplicata)

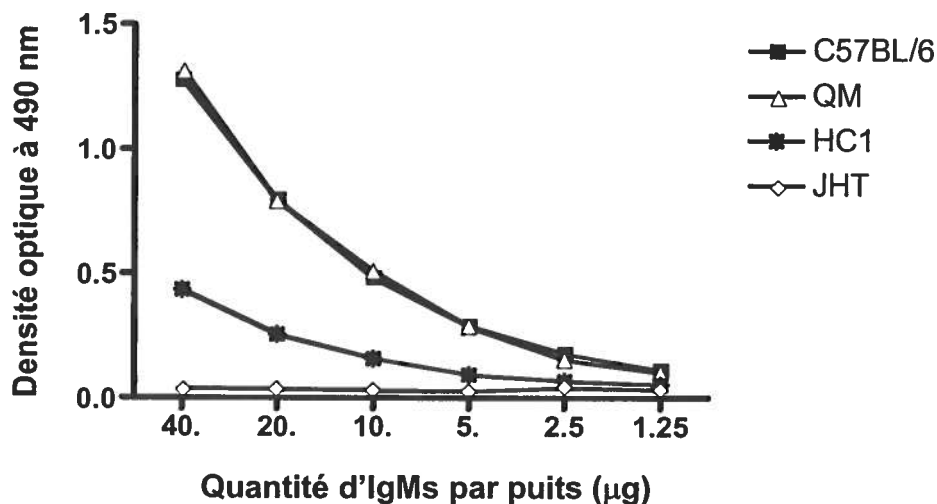


Figure 20 : Liaison des IgMs purifiées des souris C57BL/6, QM, HC1, et J_HT au VSV purifié.

Du sang de quinze souris naïves de chaque souche a été prélevé et mis en commun afin de purifier les IgMs. La concentration en IgMs a ensuite été normalisée à 1600 μg/ml pour chaque souche de souris et la liaison de ces IgMs aux virus purifiés a été quantifiée par ELISA à l'aide d'un conjugué anti-IgMs-peroxidase. Comme il était impossible de purifier les IgMs du sérum de souris JHT, le sérum pur a été utilisé en tant que témoin négatif. VSV purifié a été adsorbé à 100 ng/puits et différentes dilutions des IgMs purifiées ont été faites à partir de la préparation normalisée. (En duplicata)

L'ELISA effectué pour LCMV (figure 19) présente des différences au niveau de la liaison des IgMs des différentes souches de souris. Les IgMs de la souris C57BL/6, possédant une plus grande diversité de répertoire, semblent mieux lier le virus par rapport aux autres souches. Encore une fois, les densités optiques obtenues pour la souris QM sont supérieures à celles de la souris HC1, ce qui est cohérent avec les figures 16 et 17. D'ailleurs, les densités optiques obtenues pour cette souris avec VSV (figure 20) sont aussi plus faibles. Par contre, pour ce virus, l'activité de liaison des IgMs purifiées de souris QM est semblable à celle observée pour la souris C57BL/6. Tel qu'attendu, pour les deux virus, le sérum de souris J_HT est négatif.

1.4 Capture de complexes immuns entre les anticorps naturels et les virus VSV et LCMV

Pour confirmer la liaison d'anticorps naturels aux deux modèles viraux utilisés, des tests de capture ont été élaborés. Lors de ces tests, des anticorps anti-IgMs de souris (ou d'humain pour la souris HC1) ont été adsorbés au fond des puits d'une plaque ELISA. Ensuite, des sérums de souris ont été mélangés à du virus purifié dans le cas de VSV (figure 22) et à du surnageant de cellules infectées dans le cas de LCMV (figure 21). La présence de complexes immuns a été détectée par des anticorps biotinylés spécifiques aux virus et un conjugué streptavidine-peroxidase. Les mises au point ont été effectuées avec le sérum d'une souris C57BL/6 et d'une souris RAG^{-/-}, toutes deux naïves.

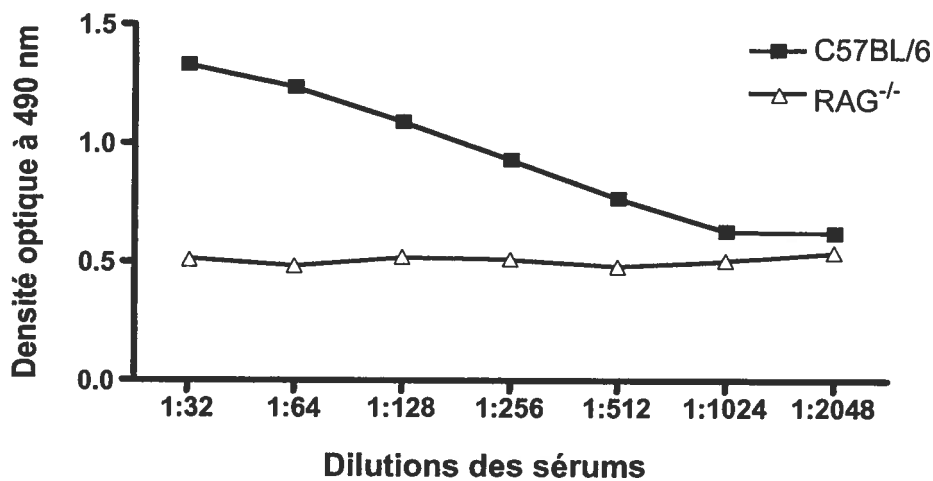


Figure 21 : Capture des complexes immuns composés d'anticorps naturels de souris C57BL/6 et de LCMV.

Différentes dilutions du sérums d'une souris C57BL/6 et d'une souris RAG^{-/-} ont été incubées avec une concentration constante de LCMV, provenant de cellules infectées, dans les puits d'une plaque ELISA préalablement adsorbés avec des anti-IgMs de souris. La formation de complexes immuns a ensuite été révélée par des anticorps monoclonaux biotinylés dirigés contre LCMV et un conjugué streptavidine-peroxidase.

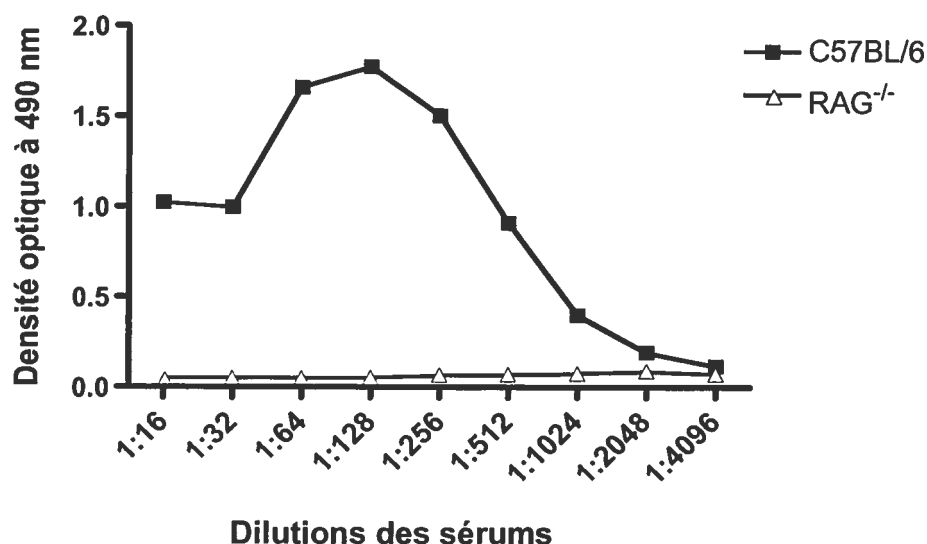


Figure 22 : Capture des complexes immuns composés d'anticorps naturels de souris C57BL/6 et de VSV.

Différentes dilutions du sérums d'une souris C57BL/6 et d'une souris RAG^{-/-} ont été incubées avec une concentration constante de VSV purifié dans les puits d'une plaque ELISA, préalablement adsorbés avec des anti-IgMs de souris. La formation de complexes immuns a ensuite été révélée par des anticorps monoclonaux biotinylés dirigés contre VSV et un conjugué streptavidine-peroxidase.

Ces résultats démontrent clairement la formation de complexes immuns entre les anticorps naturels de la souris C57BL/6 et les deux virus utilisés. Dans le cas de VSV, il semble que la formation de complexes immuns soit au départ limitée par l'excès d'IgMs, qui saturent les puits de la plaque ELISA et par la suite par la trop faible concentration de ces anticorps, passant par un état d'équilibre antigène/anticorps, permettant de bien visualiser la formation des complexes. Bien que le phénomène soit plus difficile à observer avec LCMV, on note tout de même une différence non négligeable entre la souris C57BL/6 et la RAG^{-/-}. Par contre, lorsque cette expérience a été effectuée en mettant en commun des sérums de six autres souris C57BL/6 ainsi que des souris QM, HC1 et J_HT, les souris C57BL/6 utilisées ne se démarquaient alors pas des autres souches

(résultats non présentés). Il est important de noter qu'en raison de certaines difficultés techniques cette expérience n'a pas été répétée. Nous nous sommes par contre assuré que la souris C57BL/6 utilisée pour les mises au point (figures 21 et 22) n'ait pas été infectée par l'un ou l'autre de ces virus (résultats non présentés). Toutefois, elle présentait une concentration en IgMs légèrement plus élevée que la moyenne des autres souris de cette souche (résultats non présentés). Comme ces résultats étaient plus ou moins concluants, nous avons voulu vérifier l'effet des anticorps naturels dans un système se rapprochant plus de la réalité, soit par des tests de présentation antigénique.

2 Impact des anticorps naturels sur la présentation antigénique

2.1 Présentation antigénique au niveau de la rate de souris infectées par LCMV-WE, en présence ou en absence d'anticorps naturels

La prochaine expérience a été réalisée pour déterminer si les anticorps naturels ont une influence sur la présentation antigénique. Pour ce faire, trois souris C57BL/6 et trois J_HT ont été infectées par 2×10^6 PFU de LCMV-WE et 24 heures plus tard, les cellules dendritiques spléniques ont été isolées et mises en culture, puis leur maturation a été induite par l'ajout de LPS pendant 16 heures. Ces cellules ont été choisies puisqu'elles sont les plus puissantes activatrices des lymphocytes T naïfs. Des lymphocytes T CD8⁺ provenant de la rate de souris P14 et spécifiques au virus ont ensuite été ajoutés et leur prolifération après 72 heures a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée à l'ADN.

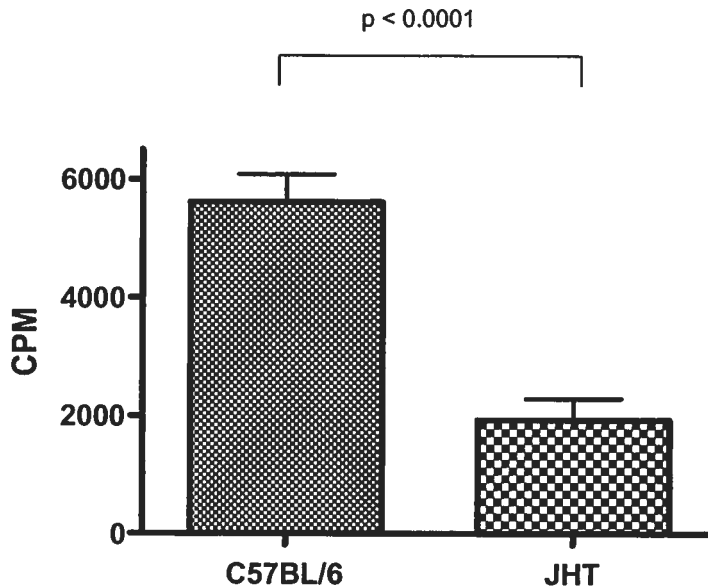


Figure 23 : Prolifération des lymphocytes T CD8⁺ LCMV-spécifiques mis en culture avec des cellules dendritiques spléniques, activées aux LPS, provenant de souris infectées par LCMV-WE.

Des souris C57BL/6 et JHT ont été infectées intraveineusement (i.v.) par 2×10^6 PFU de LCMV-WE. Vingt-quatre heures post-infection, la rate de ces souris a été prélevée et les cellules dendritiques ont été isolées par tri-magnétique et transférées dans des puits d'une plaque 96 puits à fonds ronds (6×10^4 cellules par puits). La maturation de ces cellules a été activée par l'ajout de LPS à une concentration de $1 \mu\text{g/ml}$ pendant 16 heures. Par puits, 1×10^5 lymphocytes T CD8⁺ provenant de la rate de souris P14 ont ensuite été ajoutés. Après 72 heures de prolifération, de la thymidine tritiée a été ajoutée au milieu. Seize heures plus tard, la lecture de la radioactivité a été effectuée. ($n=3$)

On remarque une différence hautement significative, de près de trois fois, entre la moyenne de la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ en contact avec les cellules dendritiques de souris C57BL/6 par rapport aux souris J_HT (figure 23). Les anticorps naturels jouent donc un rôle au niveau la réponse à certains pathogènes lors des étapes précoces de l'infection. Ce résultat peut être dû à deux phénomènes différents : soit les anticorps naturels ont facilité le drainage de LCMV à la rate et sa concentration plus élevée se reflète dans la prolifération des lymphocytes T CD8⁺, soit ils permettent aussi une meilleure internalisation des complexes immuns via des récepteurs à la surface des cellules dendritiques.

Comme les anticorps naturels sont principalement d'isotype IgM (Kasaian et al., 1992), le récepteur permettant l'internalisation des complexes immuns pourraient être le Fc α / μ R (Shibuya et al., 2000). Afin de mieux cibler le rôle des anticorps naturels dans cette réponse, nous avons testé leur impact sur l'internalisation du LCMV et sur sa présentation aux lymphocytes T cytotoxiques *in vitro*.

3 Mécanisme d'action des anticorps naturels

3.1 *Présentation antigénique in vitro, en présence ou en absence d'anticorps naturels*

Dans le but d'observer si la présence d'anticorps naturels augmente l'internalisation et la présentation antigénique dans un contexte de molécules de classe I du CMH, LCMV a été inactivé aux ultraviolets (LCMV-UV) en l'exposant à deux reprises durant cinq minutes. L'efficacité de l'inactivation a été vérifiée lors d'un test de titrage de foyers infectieux sur cellules MC57G. Le virus inactivé ne produisait aucun foyer d'infection (résultats non présentés). Sa présentation au niveau du CMH de classe I serait donc proportionnelle à la capacité d'internalisation et de présentation croisée des CPAs et non à leur simple infection. Dans cette expérience, des cellules dendritiques ont été mises en présence de LCMV-UV avec ou sans sérum de souris C57BL/6 ou J_HT. Après une période d'internalisation des antigènes de 2 à 3 heures, les DCs ont été activées par des LPS durant 16 heures. Ensuite, elles ont été lavées et des lymphocytes T CD8⁺ de la rate de souris P14, spécifiques au peptide GP33 de LCMV, ont été ajoutés au milieu. La prolifération de ces cellules, après 72 heures, a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée.

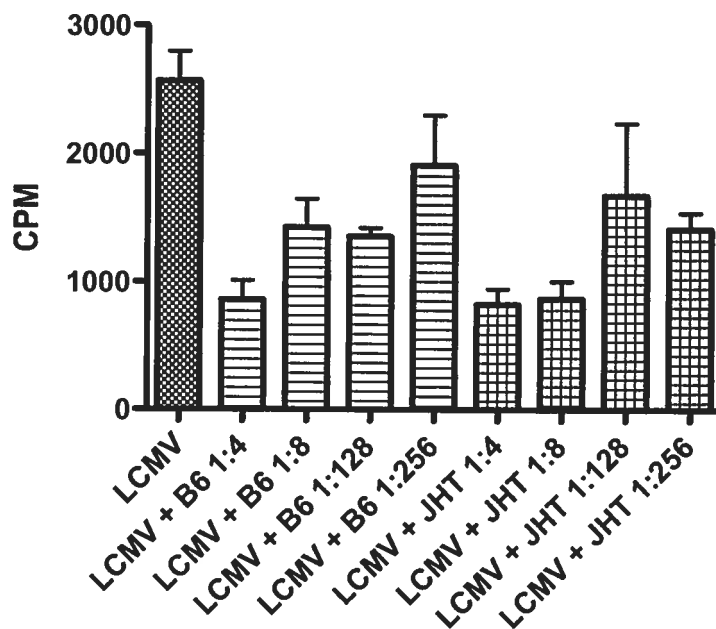


Figure 24 : Prolifération des lymphocytes T CD8⁺ de souris P14 suite à la présentation antigénique de LCMV-WE inactivé aux UVs, complexé ou non à des anticorps naturels, par des cellules dendritiques de souris C57BL/6, activées aux LPS.

Des rates de souris C57BL/6 ont été prélevées et les cellules dendritiques ont été isolées par tri-magnétique et transférées dans des puits d'une plaque 96 puits à fonds ronds à une concentration de 5×10^4 cellules par puits. LCMV-UV a été ajouté à ces puits, seul (dilué 1 :2 avec du PBS) ou dilué 1 :2 avec du sérum de souris C57BL/6 ou J_HT. La maturation des cellules dendritiques a ensuite été activée par l'ajout de $1 \mu\text{g/ml}$ de LPS pendant 16 heures avant que les cellules ne soient lavées. Par puits, 1×10^5 lymphocytes T CD8⁺ provenant de la rate de souris P14 ont ensuite été ajoutés. Après 72 heures de prolifération, de la thymidine tritiée a été ajoutée au milieu. Seize heures plus tard, la lecture de la radioactivité a été effectuée. (En triplicata)

Tel que présenté à la figure 24, dans les conditions expérimentales utilisées la présence d'anticorps naturels ne semble pas augmenter l'internalisation et la présentation antigénique. En effet, il n'y a pas de différence notable entre la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ mis en présence de cellules dendritiques incubées avec du virus complexé à du sérum de souris C57BL/6 et à du sérum de souris J_HT. De plus, le virus seul semble entraîner une meilleure présentation

antigénique que lorsqu'il est en présence de sérum de souris, particulièrement lorsque des concentrations plus élevées de sérums sont utilisées.

Puisque nous avons émis comme hypothèse que des complexes immuns entre le virus et les anticorps naturels pourraient être internalisés par endocytose du récepteur $Fc\alpha/\mu R$, il s'avère donc essentiel de vérifier si ce récepteur est présent à la surface des cellules dendritiques, CPAs utilisées pour nos tests de présentation antigénique.

3.2 Recherche de la présence du $Fc\alpha/\mu R$ chez les cellules dendritiques

3.2.1 Recherche de l'ARNm du récepteur $Fc\alpha/\mu$ par qPCR

Dans le but de déterminer si le récepteur $Fc\alpha/\mu$ est présent à la surface des cellules dendritiques de la rate, l'idéal aurait été d'utiliser un anticorps monoclonal spécifique à ce récepteur et couplé à un fluorochrome. Comme nous n'avions pas accès à ce type d'anticorps nous avons d'abord essayé d'évaluer l'expression de l'ARN messager (ARNm) du récepteur chez les cellules dendritiques par PCR quantitatif. Puisqu'il a été démontré que les lymphocytes B possèdent ce récepteur et qu'il est absent des lymphocytes T (Shibuya *et al.*, 2000), ces deux populations cellulaires ont servi de témoins, positif et négatif respectivement.

Pour réaliser cette expérience, des rates de souris C57BL/6 ont été prélevées et broyées afin d'extraire les différentes populations cellulaires, soit les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules dendritiques. Ces types cellulaires ont été isolés par tri-magnétique automatisé à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à des billes magnétiques. L'extraction d'ARN a ensuite été réalisée par TRIZOL et la transcription inverse a été effectuée tel que décrite à la

section 16 du chapitre 2, en utilisant la même quantité d'ARN pour chaque population cellulaire. Finalement, un PCR quantitatif, en utilisant du SyBr Green et des amorces spécifiques au gène du récepteur et à celui de la β -actine, a permis d'obtenir les résultats présentés à la figure 25. Le ratio de l'expression du gène du récepteur $Fc\alpha/\mu$ sur celui de la β -actine a été calculé par la méthode $2^{-\Delta\Delta TC}$ et ensuite exprimé en pourcentage du ratio obtenu pour les lymphocytes B, qui constituent notre témoin positif.

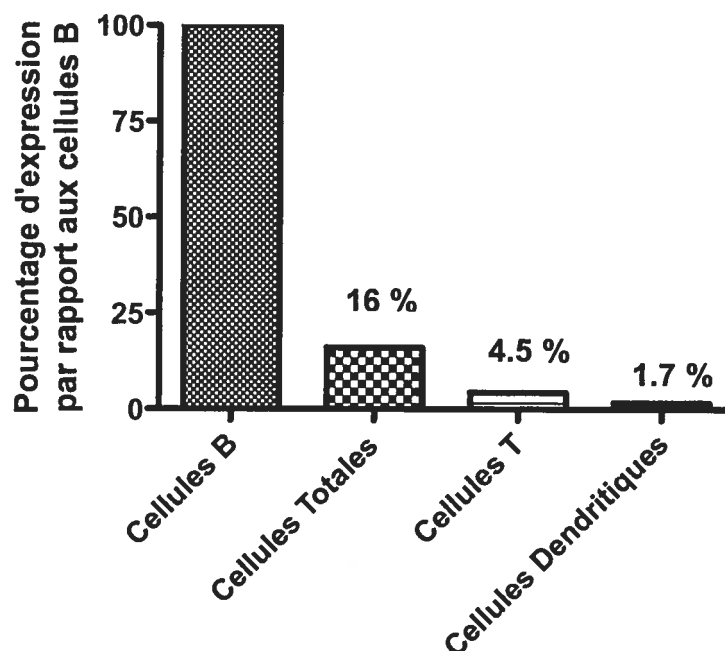


Figure 25 : Expression de l'ARNm du récepteur $Fc\alpha/\mu$ chez différentes populations cellulaires.

Suite à une isolation par tri-magnétique, l'ARN de différentes populations cellulaires de la rate de souris C57BL/6 a été extraite et rétro-transcrite. L'ADNc a ensuite servi à faire un PCR quantitatif afin de comparer le ratio de l'expression de l'ARN du récepteur sur celui de la β -actine et de comparer les ratios entre les différents types de cellules. Comme les lymphocytes B constituent le témoin positif, le ratio obtenu pour cette population a été représenté à 100% et les ratios des autres populations, soit les cellules totales de la rate, les lymphocytes T (témoin négatif) et les cellules dendritiques, ont été comparés à la valeur obtenue pour les lymphocytes B.

Tel qu'observé à la figure 25, les cellules totales de la rate de souris C57BL/6 présente un ratio d'expression de l'ARNm $Fc\alpha/\mu R$ sur l'ARNm β -actine de 16% par rapport aux lymphocytes B. Ceci démontre bien que les populations cellulaires retrouvées au niveau de cet organe n'expriment pas toutes le récepteur recherché. Les lymphocytes T, notre témoin négatif, présentent tout de même un ratio de 4,5% par rapport aux lymphocytes B. Les résultats obtenus nous portent à croire que les cellules dendritiques ne possèdent pas le récepteur $Fc\alpha/\mu$, puisque leur ratio par rapport aux lymphocytes B se situe autour de 1,7%, ce qui est encore plus faible que notre témoin négatif. Nous avons donc voulu vérifier directement l'expression de ce récepteur à la surface des cellules dendritiques.

3.2.2 Recherche de l'expression du $Fc\alpha/\mu R$ par cytométrie en flux

Puisque nous n'avions pas accès à un anticorps monoclonal spécifique au récepteur $Fc\alpha/\mu$, nous avons utilisé des IgMs de souris naïves marquées à l'allophycocyanine (APC) pour déterminer si les cellules dendritiques expriment ce récepteur à leur surface. Puisqu'il a été démontré que les lymphocytes B sont positifs quant à l'expression du $Fc\alpha/\mu R$ et que les lymphocytes T sont négatifs, ces deux populations cellulaires ont servi de témoins positif et négatif respectivement (Shibuya *et al.*, 2000).

La rate d'une souris C57BL/6 a été prélevée afin d'en isoler les cellules dendritiques par tri-magnétique. Les lymphocytes B et T étant $CD11c^-$, la fraction négative du tri a été utilisée pour effectuer les marquages des témoins avec des anticorps anti-B220-FITC pour les lymphocytes B et anti-CD8-FITC pour les lymphocytes T $CD8^+$. Les cellules dendritiques ont pour leur part été marquées avec des anti-CD11c-FITC. Par la suite, ces trois populations cellulaires ont été incubées en présence d'IgMs-APC de souris naïves, afin d'observer la liaison de

ces anticorps à la surface des cellules. Ces préparations ont été analysées par cytométrie en flux (voir figure 26).

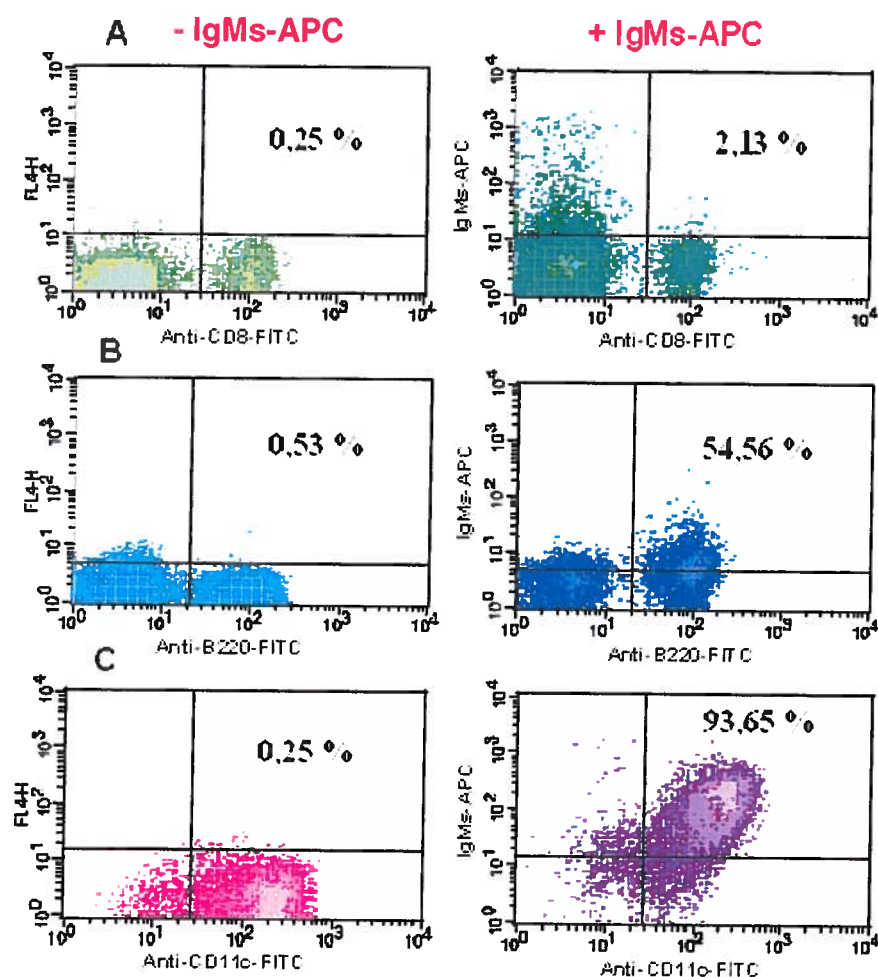


Figure 26 : Liaison d'IgMs-APC par différentes populations cellulaires de la rate de souris C57BL/6.

Des cellules dendritiques de rates de souris C57BL/6 ont été isolées par tri magnétique et ont été marquées par un anti-CD11c-FITC avant incubation avec des IgMs normales de souris couplées à de l'APC (C). La fraction négative du tri magnétique contenait des lymphocytes B (B) et T (A), utilisées respectivement comme témoins positif et négatif et marquées avec des anti-CD45R(B220)-FITC et anti-CD8-FITC. Des IgMs-APC ont aussi été ajoutées à ces préparations et les résultats ont été obtenus en cytométrie en flux.

Tel qu'attendu, les lymphocytes T ne lient pas les IgMs-APC, comme nous le montre l'augmentation non significative de moins de 2% des cellules dans le quadrant supérieur droit en présence de ces IgMs (figure 26A) et plus de la

moitié des lymphocytes B semblent lier les IgMs-APC (figure 26B). À notre surprise et en opposition avec les résultats de la section précédente, les cellules dendritiques semblent posséder un récepteur capable de lier les IgMs puisque plus de 93% des cellules CD11c⁺ sont positives (figure 26C).

4 Étude préliminaire chez l'humain

4.1 *Liaison des anticorps naturels aux pseudoparticules du VHC*

Dans le but d'étudier la réponse des anticorps naturels envers le virus de l'hépatite C chez différents donneurs humains, des pseudoparticules du virus (VHCpp) ont tout d'abord été produites. Pour ce faire, des cellules 293T ont été transfectées avec trois plasmides différents : un premier codant les gènes gag-pol du virus MLV, permettant l'encapsidation, un deuxième servant à produire les glycoprotéines E1 et E2 du VHC et un dernier codant pour un gène rapporteur, soit la luciférase ou la GFP (Bartosch *et al.*, 2003). Ces pseudoparticules ont ensuite été récoltées, concentrées et semi-purifiées sur coussin de sucrose. L'expression des glycoprotéines d'intérêt a été vérifiée par ELISA avec des anticorps spécifiques (résultats non présentés).

Par la suite, des sérums gracieusement fournis par la Dre. Naglaa Shoukry de l'hôpital Saint-Luc et ceux obtenus d'autres volontaires ont été utilisés pour effectuer des tests ELISA. La cohorte de l'hôpital Saint-Luc consiste en 120 utilisateurs de drogues injectables, principale source d'infection par le VHC depuis 1992. Ces individus sont suivis aux trois mois par prélèvement sanguin. L'avantage de cette cohorte dans notre étude est la disponibilité d'échantillons pré-immuns. Ceci nous donne accès à l'étude des anticorps naturels liant le VHC sans interférence avec les anticorps élaborés lors de la réponse immunitaire au

virus, mais permettant de faire des corrélations avec le cours que prendra la maladie chez ces individus. Le sérum d'autres donneurs n'appartenant pas à cette cohorte a été utilisé afin d'augmenté le nombre d'échantillons, nous permettant ainsi d'avoir un meilleur aperçu de la variabilité interindividuelle de la réponse en anticorps naturels.

Pour évaluer cette réponse, les VHCpp ont d'abord été adsorbées au fond des puits d'une plaque ELISA, à raison de 380 ng par puits. Différentes dilutions des sérums ont ensuite été ajoutées, puis la liaison des anticorps naturels aux VHCpp a été révélée à l'aide d'un conjugué anti-IgMs humaines – peroxidase. De plus, la concentration en IgMs a été évaluée par ELISA. Pour ce faire, des anti-IgMs humaines ont été adsorbées et les sérums ainsi qu'une référence de concentration connue ont été ajoutés avant de quantifier les anticorps liés par un conjugué anti-IgMs humaines – peroxidase. Une courbe a ensuite été tracée pour permettre l'évaluation de la concentration en IgMs de chaque échantillon. Le tableau 1 présente la compilation de ces deux données pour chaque individu.

Tableau 1 : Titres en anticorps naturels d'isotype IgM dirigés contre des pseudoparticules du virus de l'hépatite C chez différents donneurs non-infectés ainsi que la concentration en IgMs sériques pour chaque donneur.

Donneur	Titre	Concentration en IgMs (mg/ml) du sérum
COHORTE		
A	<1 :4	0,429
B	1 :16	0,746
C	1 :16	0,722
D*	1 :32	1,047
E	1 :256	0,957
F	1 :128	1,034
G	1 :16	0,418
H	1 :32	0,613
I	1 :8	0,227
J*	1 :16	0,784
K	1 :16	0,633
L	1 :16	0,469
AUTRES DONNEURS		
1	1 :16	0,634
2	<1 :4	0,355
3	1 :32	0,500
4	<1 :4	0,371
5	1 :16	0,311
6	1 :16	0,256
7	1 :64	0,790
8	1:512	2,063
9	1 :4	0,271
10	1 :8	0,565
11	1 :4	0,653
12	1 :16	1,251

Le titre en anticorps naturels dirigés contre les VHCpp a été déterminé en utilisant une valeur arbitraire de 1 de densité optique. La dilution du sérum pour laquelle la densité optique était la plus proche de 1 a donc été retenue. La concentration en IgMs du sérum a été déterminée à l'aide d'une courbe de référence d'un échantillon de concentration connue.

* donneurs de la cohorte ayant éliminé le VHC

La compilation des résultats obtenus (tableau 1) démontre qu'il existe une grande variabilité entre les individus humains pour la reconnaissance des VHCpp par les anticorps naturels. Il en va de même concernant la concentration sérique en

IgMs. Certains individus se démarquent concernant ces deux critères. Un individu en particulier, le donneur #8, présentait un titre très élevé en IgMs liant les VHCpp. Le sérum du même individu, collecté un mois plus tard a donné le même résultat (résultats non montrés), la concentration en IgMs étant probablement la cause des titres élevés observés. Par contre, le titre obtenu n'est pas toujours proportionnel à la concentration. Par exemple, l'individu D présente une concentration très élevée et un titre plutôt moyen. Lorsque tous les individus sont regroupés, la médiane des titres obtenus est de 1 :16. La même médiane est aussi obtenue pour chacun des groupes, soit les individus de la cohorte et les autres donneurs. De plus, entre ces deux groupes, la concentration moyenne en IgMs est comparable, soit 0,673 et 0,668 mg/ml, respectivement.

Pour le moment, seulement deux donneurs de la cohorte ont réussi à éliminer le VHC (donneurs D et J). Ces deux individus ne présentent toutefois pas des titres en anticorps naturels particulièrement élevés (1 :32 et 1 :16). Un plus grand nombre d'échantillons devront être testés pour pouvoir tirer des conclusions quant au rôle potentiel des anticorps naturels dans l'élimination de l'infection par le VHC.

Chapitre 4

Discussion

Il est maintenant connu que les systèmes immunitaires inné et adaptatif travaillent en synergie dans l'élaboration de la réponse immunitaire. Le système adaptatif a la possibilité d'élaborer des réponses contre une infinité d'antigènes, mais il doit être stimulé par le système inné. Plusieurs éléments font partie du système immunitaire inné, par exemple les macrophages, les cellules NK, les molécules du système du complément et les anticorps naturels. Ces derniers reconnaissent des motifs conservés et sont présents dans la circulation de façon constante, sans immunisation (Mouthon *et al.*, 1995; Berneman *et al.*, 1992). Ils constituent donc une première ligne de défense contre les envahisseurs. Ces anticorps pourraient lier différents pathogènes et permettre la neutralisation directe, l'activation de la cascade du complément ou le drainage vers les organes lymphoïdes secondaires. Ce mécanisme aurait deux fonctions, soit de limiter la propagation des pathogènes vers les organes vitaux et d'apporter les antigènes nécessaires à l'élaboration de la réponse adaptative aux cellules effectrices de cette réponse (Ochsenbein and Zinkernagel, 2000). Ils pourraient aussi opsoniser les microorganismes en formant des complexes immuns qui seraient reconnus par exemple par le récepteur Fc α/μ (Shibuya *et al.*, 2000) ou du complément (CR1-CR2), ce qui entraînerait leur internalisation et l'augmentation de la présentation antigénique aux cellules de la réponse adaptative.

Les cellules dendritiques constituent une population cellulaire importante pour faire le lien entre la réponse innée et adaptative. Elles sont les plus puissantes activatrices des lymphocytes T et ont la capacité de présenter des antigènes internalisés autant dans un contexte de CMH de classe II que de classe I (Delamarre *et al.*, 2003; Banchereau *et al.*, 2000). Elles pourraient donc jouer un rôle prépondérant, de concert avec les anticorps naturels, lors de l'élaboration de réponses cellulaires CD4 et CD8 contre des pathogènes.

Il a été démontré que la réponse des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ rapide et dirigée contre plusieurs épitopes était essentielle dans l'élimination du virus de l'hépatite C (Grakoui *et al.*, 2003; Shoukry *et al.*, 2003; Thimme *et al.*, 2001;

Lechner *et al.*, 2000; Diepolder *et al.*, 1995). Peut-être que les anticorps naturels et les cellules dendritiques ont un rôle à y jouer. Comme cette réponse n'est pas adéquate dans la majorité des cas, nous proposons comme hypothèse que la diversité des anticorps naturels expliquerait en partie la persistance du virus. Les individus ne possédant pas un répertoire adéquat en anticorps naturels ne réussiraient pas à éliminer le virus alors que chez les autres, le VHC serait reconnu par les anticorps naturels et apporté aux cellules dendritiques des organes lymphoïdes secondaires sous forme de complexes immuns. Ces complexes seraient internalisés par le Fc α / μ R et les peptides du virus seraient présentés aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, qui pourraient ensuite contrôler l'infection.

Afin d'étudier ces hypothèses, des souris naïves ayant des répertoires en anticorps plus ou moins diversifiés et les virus LCMV et VSV ont été utilisés comme modèle. De plus, des pseudoparticules du VHC ont permis d'effectuer une étude préliminaire chez l'humain. Les objectifs spécifiques de ce projet étaient les suivants : 1- Démontrer la liaison des IgMs de souris naïves aux virus LCMV et VSV, 2- Prouver qu'il y a formation de complexes immuns entre les anticorps naturels et ces virus, 3- Vérifier si la présentation antigénique est augmentée chez les cellules dendritiques par la présence d'anticorps naturels, 4- Découvrir si le Fc α / μ R est présent sur les cellules dendritiques, 5- Démontrer la liaison d'anticorps naturels humains à des VHCpp.

1 Interactions anticorps naturels - virus

1.1 Effet de la diversité du répertoire d'anticorps naturels sur la liaison des IgMs de différentes souches de souris naïves aux virus LCMV et VSV

Il a déjà été démontré que les anticorps naturels pouvaient reconnaître les virus VSV et LCMV (Ochsenbein *et al.*, 1999). Ce qui nous intéressait ici était de voir l'impact de la diversité du répertoire dans cette reconnaissance, ce qui a été testé en ELISA. L'activité de liaison, aux virus purifiés VSV et LCMV, des IgMs de souris de souche sauvage (C57BL/6), a été comparée à celles de souris ayant des restrictions au niveau de leurs répertoires en anticorps naturels ou ne possédant pas d'anticorps, soit les souris HC1, QM et J_HT (voir figures 16 et 17).

Tout d'abord, il semble y avoir une concentration plus élevée d'anticorps naturels reconnaissant VSV par rapport à LCMV pour une même souche de souris. Kalinke et collaborateurs ont démontré que le répertoire primaire de BCRs des souris naïves présentait des réarrangements adéquats pour lier les glycoprotéines de VSV, sans nécessiter de maturation d'affinité (Kalinke *et al.*, 1996). Ceci se refléterait donc au niveau des anticorps naturels et ils seraient ainsi plus nombreux chez une même souris à lier VSV par rapport à LCMV, expliquant l'écart observé. Il est aussi possible que la structure quasie-cristalline du virus favorise sa reconnaissance par les anticorps naturels (Bachmann *et al.*, 1995).

Comme prévu, chez la souris C57BL/6, possédant le répertoire le plus diversifié, la quantité d'IgMs liées aux deux virus utilisés est plus élevée que pour les autres souches et la souris J_HT, ne possédant pas d'anticorps, présente une réaction nulle et sert donc de témoin négatif (Chen *et al.*, 1993a). Des deux souris présentant une diversité restreinte, la QM semble avoir une meilleure capacité à reconnaître les virus VSV et LCMV que la HC1. Cette dernière possède seulement un segment V_H, son répertoire est donc limité à environ 13 000

combinaisons possibles (Xu and Davis, 2000). La souris QM peut quant à elle effectuer des réarrangements secondaires, ce qui entraîne l'expression de spécificités différentes chez environ 20% de ses anticorps (Lopez-Macias *et al.*, 1999). Il se pourrait donc que ce processus lui permette de mieux reconnaître ces virus par rapport à une souris HC1.

1.2 La concentration en IgMs sériques varie d'une souche de souris à l'autre

Dans le but de déterminer si la concentration sérique en IgMs influence l'activité de liaison des anticorps naturels, leur concentration a été mesurée en ELISA pour chaque souche de souris. La figure 18 démontre que la souris C57BL/6 possède une concentration plus élevée en IgMs par rapport à la souris HC1, ce qui avait d'ailleurs été démontré, autant pour les IgMs que pour les IgG1s (Xu and Davis, 2000). Par contre, cette souris possède une quantité normale d'IgMs à la surface de ses lymphocytes B et un nombre de lymphocytes B-1 comparable aux souris de souche sauvage (Mémoire de maîtrise d'Isabelle Meunier, 2008) et (Taylor *et al.*, 1994). Elle possède peut-être un défaut au niveau de la sécrétion des anticorps, mais ceci reste à vérifier. Quant à la souris QM, des équipes ont rapporté des taux sériques en IgMs comparables à ceux observés chez une souris de souche sauvage (Cascalho *et al.*, 1996). Ce n'est pas ce que nous obtenons ici, et d'autres membres du laboratoire ont aussi démontré cette différence (Mémoire d'Isabelle Meunier, 2008). Les souris J_HT et RAG^{-/-}, ne possédant aucun anticorps servaient ici de témoins négatifs (Chen *et al.*, 1993a; Mombaerts *et al.*, 1992).

Les résultats obtenus aux figures 16 et 17 ne tiennent pas compte de la variabilité des concentrations sériques en IgMs des différentes souches de souris. Par contre, cette concentration peut être un facteur important influençant la

réponse. Ces résultats ne sont donc pas à écarter. Néanmoins, il apparaissait logique de comparer l'activité de liaison des IgMs des différentes souches de souris lorsque la concentration était normalisée. Ceci permettrait de mieux voir l'impact de la diversité du répertoire sur la liaison aux pathogènes.

1.3 La diversité du répertoire en anticorps naturels joue un rôle important dans la liaison de virus purifiés

Afin de comparer la liaison des anticorps naturels des différentes souches de souris lorsque les concentrations sont normalisées, leurs IgMs ont été purifiées et des solutions de concentrations équivalentes ont été préparées pour effectuer des ELISAs avec les virus purifiés VSV et LCMV (voir figures 19 et 20).

Pour LCMV, les résultats obtenus sont cohérents avec ceux présentés à la figure 16. Il semble donc qu'un répertoire diversifié soit important pour la reconnaissance de ce virus par les anticorps naturels. Par contre, pour VSV, nous avons été étonnés de constater que les IgMs provenant de souris QM reconnaissent aussi bien le virus que celles de souris C57BL/6. Peut-être que cette souris réussie à générer assez de diversité au niveau de ses anticorps naturels pour être comparable à une souris de souche sauvage quant à la reconnaissance de VSV. Il faut se rappeler que les lymphocytes B-1 de souris de souche sauvage ne présentent pas un répertoire aussi diversifié que celui des B-2, alors l'écart entre les deux souches de souris est peut-être amenuisé au niveau des répertoires en anticorps naturels. De plus, comme les anticorps naturels sont souvent polyréactifs, il est possible que certains reconnaissant l'haptène NP puissent aussi lier VSV. Toutefois, il serait intéressant d'utiliser une technique plus sensible, telle que la technologie BIAcore, basée sur la résonance plasmonique de surface (GE Healthcare).

1.4 Les anticorps naturels peuvent former, chez certains individus, des complexes immuns avec VSV et LCMV

Afin de prouver la formation de complexes immuns entre les anticorps naturels et les virus VSV et LCMV, des tests de capture en ELISA ont été élaborés.

Dans le but de mettre au point ce test, le sérum d'une souris de souche sauvage (C57BL/6) et celui d'une souris ne possédant pas d'anticorps (RAG^{-/-}) ont été utilisés. Les figures 21 et 22 démontrent clairement la formation de complexes immuns lorsque les virus sont en présence des anticorps de la souris C57BL/6 utilisée pour cette mise au point, ce qui n'est pas le cas avec le sérum de souris RAG^{-/-}. Par contre, lorsque nous avons utilisé un mélange de six sérums de souris pour chaque souche, nous n'avons pas obtenu ce résultat (résultats non présentés), mais comme cette expérience n'a pas été répétée en raison de certaines difficultés techniques, ceci n'est pas concluant. Il est aussi possible que la concentration en IgMs aurait un rôle à jouer, mais il serait étonnant que ce facteur explique à lui seul l'écart obtenu entre la souris C57BL/6 et la souris RAG^{-/-}. Il est plus probable que la variabilité interindividuelle au niveau du répertoire des Igs explique que la formation de complexes immuns ne soit détectable que chez certains individus. Pour confirmer cette hypothèse, un plus grand nombre d'échantillons devront être testés. Il serait alors possible de déterminer à quelle fréquence se produit ce phénomène et de comparer cette fréquence à celle des individus qui arrivent à éliminer le virus de l'hépatite C.

2 Rôles des anticorps naturels

2.1 In vivo, la présentation antigénique au niveau de la rate de souris infectées par LCMV-WE est augmentée en présence d'anticorps naturels

Les anticorps naturels qui forment des complexes immuns avec des antigènes peuvent activer la voie classique du complément pour ainsi contribuer au contrôle des infections (Cooper, 1985). Ils pourraient aussi permettre l'internalisation des pathogènes par les CPAs, via le récepteur Fc α/μ (Shibuya *et al.*, 2000). Ceci aurait pour effet d'augmenter la présentation antigénique et de mener à une élaboration plus efficace de la réponse adaptative. Afin de vérifier cette hypothèse, des souris de souche sauvage (C57BL/6) et des souris ne possédant pas d'anticorps (J_HT), ont été infectées par LCMV. Les cellules dendritiques de la rate de ces souris ont ensuite été isolées pour effectuer des tests de présentation antigénique à des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au virus. Les résultats obtenus témoignent d'une différence hautement significative entre les souris possédant des anticorps naturels par rapport à celles qui n'en possèdent pas.

Il est donc possible que les anticorps naturels favorisent l'internalisation des complexes immuns, ce qui se manifesterait par une meilleure présentation antigénique. Une autre hypothèse est qu'ils contribueraient à un drainage plus efficace vers les organes lymphoïdes secondaires. Il est aussi concevable qu'ils agissent à ces deux niveaux. Il a déjà été démontré que les anticorps naturels jouaient un rôle dans le drainage vers les organes lymphoïdes secondaires (Ochsenbein *et al.*, 1999) et (Mémoire de maîtrise d'Isabelle Meunier, 2008). Dans le cas où leur rôle se situerait uniquement à ce niveau, les résultats obtenus seraient le reflet d'une présence accrue du virus dans la rate de la souris C57BL/6 par rapport à la souris J_HT, puisque les cellules dendritiques peuvent être infectées

par LCMV (Sevilla et al., 2000). Il aurait été intéressant de reprendre cette expérience en inactivant le système du complément à l'aide de facteur de venin de cobra pour vérifier s'il joue un rôle dans cette réponse (Azadegan *et al.*, 1984).

2.2 In vitro, la présentation antigénique ne semble pas plus efficace en présence d'anticorps naturels

Pour mieux observer le rôle des anticorps naturels dans l'internalisation et la présentation antigénique, un test *in vitro* a été élaboré. Dans ce test, des cellules dendritiques ont été isolées à partir de rates de souris C57BL/6 et mises en culture en présence de LCMV inactivé aux ultraviolets (LCMV-UVs), avec du sérum contenant des anticorps naturels (souris C57BL/6) ou n'en contenant pas (souris J_HT). La prolifération de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à LCMV a ensuite été mesurée.

Les résultats présentés à la figure 24 montrent que la présence d'anticorps naturels n'augmente pas la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au virus. On y voit plutôt une inhibition lorsque LCMV est en présence de concentrations élevées de sérum. Il est possible que certaines molécules, telles que l'albumine par exemple, bloquent les sites potentiels de liaison au virus. Il est évident qu'il ne s'agit pas des anticorps puisque la souris J_HT n'en possède pas et que son sérum produit le même effet.

Il serait intéressant de reproduire cette expérience en utilisant des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques à LCMV provenant de souris SMARTA (Oxenius *et al.*, 1998). Ces cellules reconnaîtraient donc l'antigène dans un contexte de molécules de classe II du CMH et l'influence des anticorps naturels sur l'internalisation et la présentation antigénique par la voie endocytaire pourrait être observée. Peut-être que l'augmentation de la présentation antigénique aurait été plus facilement observable dans ces conditions.

Finalement, comme nous avons émis l'hypothèse que les cellules dendritiques internaliseraient les complexes immuns par le récepteur $Fc\alpha/\mu$, il était important de vérifier sa présence au niveau des DCs afin de comprendre les résultats obtenus à la figure 24. Il aurait été aussi souhaitable de faire les mêmes tests en utilisant des macrophages en tant que CPAs puisque la présence du récepteur a été démontrée pour ces cellules (Shibuya *et al.*, 2000).

2.3 Expression du $Fc\alpha/\mu R$ chez les cellules dendritiques

Il a été démontré par Shibuya et collaborateurs que les lymphocytes B et les macrophages possédaient un récepteur permettant la liaison des IgMs et des IgAs, le $Fc\alpha/\mu R$ (Shibuya *et al.*, 2000). Ils ont observé que ce récepteur pouvait entraîner l'endocytose de *Staphylococcus aureus* recouvert d'IgMs. Comme les cellules dendritiques sont les CPAs les plus puissantes pour activer les lymphocytes T naïfs, nous souhaitons vérifier si elles possédaient ce récepteur permettant l'internalisation d'antigènes couplés à des IgMs. D'après les résultats de cette équipe, les lymphocytes T n'expriment pas le récepteur, elles ont donc servi de témoin négatif dans notre expérience.

Nous avons d'abord évalué l'expression de l'ARNm chez les cellules dendritiques par PCR quantitatif. Le ratio du niveau d'expression du gène du récepteur sur celui de la β -actine, gène de ménage utilisé (*housekeeping gene*), a été déterminé pour chaque population cellulaire et a été présenté à la figure 25 par comparaison au résultat pour les lymphocytes B.

Comme les lymphocytes T ne sont pas supposés exprimer le $Fc\alpha/\mu R$, le résultat obtenu ici, soit un pourcentage d'expression de 4,5 % par rapport aux lymphocytes B, est possiblement dû à la présence de cellules contaminantes lors de l'extraction d'ARN. En effet, le tri cellulaire magnétique n'offre pas une pureté

de 100% des populations cellulaires ainsi sélectionnées, mais plutôt autour de 85 à 95% (résultats non présentés). Sachant que les lymphocytes B constituent la population cellulaire principale au niveau de la rate (40 à 60% des cellules), ils sont donc la source majeure de contamination dans la préparation de lymphocytes T (Mori *et al.*, 2000; Fruman *et al.*, 1999). Le taux d'expression observé chez les DCs étant plus faible que pour les lymphocytes T, cela nous porte à croire que ces cellules ne possèderaient pas le Fc α / μ R. Si tel est le cas, son pourcentage d'expression par rapport aux lymphocytes B aurait dû être approximativement le même que celui des lymphocytes T. Par contre, les DCs étant une population plus rare, le tri-magnétique avait été effectué par double sélection positive, alors qu'une sélection simple avait été utilisée pour les lymphocytes T. Il est donc possible que la proportion de cellules contaminantes soit plus élevée pour cette dernière population.

Les cellules dendritiques expriment peut-être tout de même le récepteur à leur surface mais à un taux très faible. Cette hypothèse est par contre peu probable. Compte tenu que le résultat présenté est un ratio considérant l'expression de la β -actine, peut-être que la variabilité de son expression d'une population cellulaire à l'autre aurait pu induire un biais dans les résultats. Il est vrai que l'expression d'un gène de ce type peut varier légèrement et qu'il aurait été préférable d'utiliser un gène témoin supplémentaire ou encore l'ARNr 18S ou 28S, qui est moins variable (Thellin *et al.*, 1999). Les résultats obtenus en PCR quantitatif démontrent justement que les cellules dendritiques présentent une expression de l'ARNm de la β -actine légèrement supérieure par rapport aux lymphocytes (résultats non présentés). Cette différence est néanmoins négligeable et n'influence pas les conclusions de l'expérience.

Il est aussi tout à fait possible qu'elles aient un autre récepteur pour les IgMs qui ne soit pas celui caractérisé par l'équipe de Shibuya, ce qui ne permettrait donc pas la reconnaissance par les amorces utilisées.

Nous avons donc testé directement la présence d'un récepteur pour les IgMs à la surface des DCs. Comme nous n'avions pas accès à des anticorps monoclonaux dirigés contre le Fc α /μR et qu'il est possible que les cellules dendritiques possèdent un récepteurs pour les IgMs, sans que ce soit celui caractérisé par l'équipe de Shibuya, nous avons utilisé des IgMs normales de souris, couplées à de l'allophycocyanine. Des anti-B220, anti-CD8 et anti-CD11c, tous couplés à de la fluorescéine isothiocyanate, ont été utilisés pour identifier les populations de lymphocytes B, de lymphocytes T et de cellules dendritiques, respectivement. Ensuite, des IgMs-APC ont été ajoutées pour vérifier si elles se liaient aux différentes populations cellulaires.

Les résultats obtenus à la figure 26 prouvent d'abord que les lymphocytes B lient les IgMs, ce qui n'est pas le cas des lymphocytes T, tel qu'avancé par l'équipe de Shibuya (Shibuya *et al.*, 2000). Pour leur part, les cellules dendritiques semblent bien retenir les IgMs. Par contre, il est connu que ces cellules ont une morphologie bien différente de celle des lymphocytes et il est possible que ce facteur influence la liaison des IgMs. Pour confirmer la spécificité de cette réaction, nous avons tenté de faire des tests de compétition. Ainsi, différentes concentrations d'IgMs non marquées ou d'IgGs non marquées étaient incubées soit en même temps que les IgMs-APC, soit avant. Si la liaison des IgMs-APC était spécifique, la présence d'IgMs non-marquées aurait diminué le signal de fluorescence alors qu'il serait resté inchangé suite à l'incubation avec des IgGs non-marquées (résultats non présentés). Comme cette compétition n'a pas fonctionné pour les lymphocytes B, utilisés ici en tant que témoin positif pour la présence du récepteur, nous n'avons pas pu utiliser les résultats concernant les cellules dendritiques. En effet, il y avait seulement une légère diminution du signal donné par la liaison des IgMs-APC suivant l'incubation avec les IgMs non marquées. De plus, l'incubation avec les IgGs non marquées donnait le même résultat. Il serait donc intéressant de recommencer ce test en remplaçant les Ig par des fragments Fc.

Les deux techniques utilisées pour démontrer la présence du Fc α / μ R ayant donné des résultats contradictoires, il apparaît difficile d'en tirer une conclusion certaine. Il est très probable que les cellules dendritiques présentent à leur surface un récepteur permettant la liaison des IgMs, mais n'étant pas celui caractérisé par Shibuya. D'autres études seront nécessaires pour déterminer la véracité de cette hypothèse.

Par contre, si les cellules dendritiques possèdent bien la capacité de lier les IgMs, comment se fait-il que la présentation antigénique n'ait pas été augmentée par la présence d'anticorps naturels (figure 24)? Il est possible qu'au sein des cellules dendritiques le Fc α / μ R ne permette pas l'endocytose d'antigènes opsonisés par des IgMs. Comme ce récepteur a été caractérisé seulement par une équipe et qu'aucune autre n'a publié d'article à ce sujet, cette fonction n'est pas tout à fait établie. D'ailleurs, deux publications récentes laissent sous-entendre un rôle potentiel des anticorps naturels au niveau du transport des pathogènes (Carrasco and Batista, 2007; Phan *et al.*, 2007). Dans l'étude réalisée par Phan et collègues, des expériences d'imagerie *in vivo* (microscopie intra-vitale à deux photons) ont démontré le transport de complexes immuns intacts du sinus souscapsulaire des ganglions aux cellules dendritiques folliculaires. Les résultats obtenus par cette équipe démontrent que lors de l'injection de phycoérythrine et d'IgGs spécifiques, il y a formation de complexes immuns et que ces derniers arrivent aux organes lymphoïdes par le sinus souscapsulaire. Ils sont ensuite captés, sans internalisation, par des macrophages spécifiques à cette région et présentant une activité phagocytaire réduite. Ces cellules rencontrent alors des lymphocytes B, qui transporteront à leur tour les complexes immuns jusqu'aux FDCs. Ces dernières pourront présenter ces complexes immuns pendant de longues périodes, allant jusqu'à quelques mois et même des années. Comme il a été démontré que les récepteurs du complément étaient importants dans ce transport, ceci pourrait avoir lieu avec des anticorps naturels, d'isotype IgM et donc ayant un potentiel très élevé pour recruter les molécules du complément, sans que la présence du Fc α / μ R ne soit nécessaire. Il est néanmoins possible que

ce récepteur soit impliqué dans le transport des complexes immuns formé d'anticorps naturels, puisque tant les lymphocytes B que les macrophages possèdent ce récepteur. En résumé, les anticorps naturels formeraient des complexes immuns avec certains pathogènes et ces CI seraient transportés jusqu'aux FDC, soit via les récepteurs des molécules du complément ou via le $Fc\alpha/\mu R$. Ensuite, les lymphocytes B rencontrant ces complexes immuns à la surface des FDCs s'activeraient et pourraient migrer vers la zone T, où ils présenteraient l'antigène aux lymphocytes T et les activeraient pour permettre l'élaboration d'une réponse cellulaire efficace dirigée contre le pathogène rencontré par les anticorps naturels. De plus cette hypothèse est soutenue par une étude récente qui a démontré que chez l'humain, le récepteur $Fc\alpha/\mu$ était exprimé principalement chez les FDCs des centres germinatifs (Kikuno *et al.*, 2007).

3 Étude préliminaire chez l'humain

3.1 *Liaison d'anticorps naturels humains aux pseudoparticules du VHC*

Le but ultime de cette étude étant de vérifier si la diversité du répertoire en anticorps naturels influence le cours de la maladie chez les individus infectés par le virus de l'hépatite C, des études préliminaires ont été réalisées chez l'humain. Comme le virus ne se réplique pas en laboratoire et que le système de particules infectieuses complètes (JFH1) (Wakita *et al.*, 2005) n'était pas encore disponible au début de ces expérimentations, des pseudoparticules du VHC ont été utilisées (Bartosch *et al.*, 2003). Afin d'observer la liaison des anticorps naturels aux VHCpp et que cette liaison ne soit pas biaisée par la présence d'anticorps provenant des lymphocytes B-2, les sérums pré-immuns de la cohorte ont été utilisés. Les sérums d'autres individus volontaires ont aussi été testés pour augmenter l'échantillonnage.

Tel que compilé au tableau 1, les résultats témoignent d'une très grande variabilité interindividuelle dans l'activité de liaison des anticorps naturels aux VHCpp. Cette activité est parfois proportionnelle à la concentration en IgMs, mais ce n'est pas toujours le cas. Il est vrai que les individus présentant des activités de liaison les plus élevées ont aussi des concentrations en IgMs supérieures aux autres, notamment les individus #8, E et F. Par contre, l'individu D présente une concentration en IgMs aussi élevée que ces individus mais possède une activité de liaison aux VHCpp plutôt moyenne. Il est donc possible de penser que la diversité du répertoire en anticorps naturels pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance des pathogènes.

Comme la capside des VHCpp provient de MLV (Bartosch *et al.*, 2003), il est possible que les anticorps naturels soient aussi dirigés contre cet antigène. La découverte d'un outil révolutionnaire dans ce domaine d'étude, soit l'isolat JFH1, permettant la production de particules infectieuses complètes, pourrait remédier à ce problème (Wakita *et al.*, 2005). Comme ces particules possèdent toutes les constituantes du VHC, la réaction des anticorps naturels serait nécessairement dirigée uniquement vers ce virus. Des tentatives de purification de ce virus ont d'ailleurs été effectuées afin de l'utiliser pour les expérimentations concernant les anticorps naturels, mais d'autres essais seront nécessaires. L'idéal serait d'utiliser un système de capture pour prouver la formation de complexes immuns. Il serait alors intéressant de vérifier si les individus ayant la capacité de former des complexes immuns sont ceux qui parviennent à éliminer le virus. De plus, puisque des chimères des différents génotypes sont aussi disponibles (Pietschmann *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2006; Lindenbach *et al.*, 2005), il serait plus approprié d'utiliser le génotype correspondant pour chaque patient, ainsi nous pourrions voir le comportement des anticorps naturels par rapport au virus de même génotype que celui ayant infecté le patient.

Jusqu'à présent, des 12 individus infectés de la cohorte, 2 seulement ont réussi à éliminer le virus. Ces individus ne présentent par contre pas des titres en anticorps naturels liant les VHCpp particulièrement élevés. Étant donné le faible échantillonnage, il n'est pas possible pour le moment de tirer de conclusion quant à ce paramètre. Par contre, il est important de considérer que cette réaction n'est évidemment pas tout à fait représentative de ce qui se produit *in vivo*. Tel qu'il a été démontré, le VHC s'associe à de nombreuses molécules dans la circulation sanguine telles que des anticorps (Kanto *et al.*, 1994) ou des lipoprotéines (Prince *et al.*, 1996), de plus, il possède une enveloppe dérivée de la membrane cellulaire de l'hôte et comportant de nombreux site de glycosylation (Op De Beeck *et al.*, 2001). Un article publié récemment apporte une piste de réflexion intéressante à ce sujet. Dürrbach et collaborateurs, partant du fait que le galactosyl $\alpha 1,3$ – galactosyl et les antigènes ABO des groupes sanguins sont transférés sur certains virus par les cellules les produisant et qu'une proportion importante des anticorps naturels est dirigée contre ces antigènes, ont démontré que le virus de la rougeole lorsqu'il expose ces antigènes et qu'il est en présence de sérum et de cellules dendritiques, entraîne la prolifération de lymphocytes T humains, alors que sans cette cible il a plutôt un effet inhibiteur (Dürrbach *et al.*, 2007). Ils ont prouvé que les anticorps naturels et le complément étaient responsables de cet effet et que la prolifération des lymphocytes T était entraînée par la présentation croisée des complexes immuns. Dans ce système, la présence de ces hydrates de carbone a un effet d'adjuvant et permet ainsi l'élaboration des réponses adaptatives grâce au recrutement des anticorps naturels et du complément. Il est donc très intéressant d'émettre l'hypothèse que ce pourrait être le cas pour l'infection par le virus de l'hépatite C. Ainsi, la compatibilité entre l'individu d'où provient le virus et celui à qui il est transmis pourrait expliquer le cours que prendra la maladie. Selon cette hypothèse, si les individus présentent plus de divergences au niveau de ces hydrates de carbone, les anticorps naturels seraient plus prompts à reconnaître le virus et à former des complexes qui seraient reconnus et ensuite présentés par les cellules dendritiques, ce qui mènerait à une élaboration plus adéquate de la réponse immunitaire adaptative. En même temps, ces complexes seraient

transportés jusqu'au FDCs où ils seraient exposés pendant des mois, permettant une réponse soutenue (voir la discussion de la section 2.2). Au contraire, lorsque les deux individus présenteraient trop de similarités au niveau de ces antigènes, le virus serait moins bien reconnu et les complexes immuns ne pourraient pas jouer ce rôle précoce d'initiation de la réponse adaptative. Cette dernière serait retardée, ce qui permettrait au virus de s'installer et de se multiplier pour produire des quasie-espèces avant que ne soit élaborée la réponse adaptative.

Conclusion et perspectives

Les anticorps naturels, produits par les lymphocytes B-1, font partie de la réponse immunitaire innée. Il a été démontré qu'ils pouvaient neutraliser certains pathogènes et contribuer à la survie d'animaux infectés (Ochsenbein *et al.*, 1999; Boes *et al.*, 1998a). Ces anticorps pourraient aussi, via la formation de complexes immuns, activer le système du complément et ainsi permettre la lyse de pathogènes ou encore le drainage vers les organes lymphoïdes secondaires et l'internalisation des pathogènes par les CPAs via des récepteurs reconnaissant les IgMs, par exemple le Fcα/μR. Ceci aurait pour effet d'augmenter la présentation antigénique aux cellules de la réponse cellulaire adaptative. Ce phénomène pourrait être décisif dans l'établissement d'infections persistantes par des virus contrôlés par cette réponse, par exemple le virus de l'hépatite C. Lors de l'infection par ce virus, près de 80% des individus développent une maladie chronique (Hoofnagle, 2002). Par contre, dans 10 à 30% des cas, le virus est éliminé grâce à l'élaboration d'une réponse cellulaire, CD4⁺ et CD8⁺, rapide, soutenue et dirigée contre plusieurs épitopes (Grakoui *et al.*, 2003; Shoukry *et al.*, 2003; Thimme *et al.*, 2001; Lechner *et al.*, 2000; Diepolder *et al.*, 1995). L'hypothèse du projet de recherche est qu'un répertoire diversifié en anticorps naturels permettrait la reconnaissance de ce virus et permettrait ensuite l'élaboration d'une réponse cellulaire efficace.

Pour étudier cette hypothèse, le virus de la chorioméningite lymphocytaire a été utilisé en tant que modèle, puisqu'il partage de nombreuses caractéristiques avec le VHC. À des fins de comparaison, le virus de la stomatite vésiculaire a aussi été employé dans certaines expériences puisqu'il est un virus entraînant des infections aiguës, contrôlées principalement par la réponse humorale, en opposition au VHC et au LCMV (Hangartner *et al.*, 2006). De plus, différentes souches de souris ont permis de vérifier l'impact d'un répertoire plus ou moins diversifié sur l'action des anticorps naturels. Une étude préliminaire a aussi été réalisée chez l'humain avec des pseudoparticules du VHC et des sérums pré-immuns d'une cohorte d'utilisateurs de drogues intraveineuses.

Les résultats obtenus ont démontré que plusieurs facteurs semblaient influencer la liaison des anticorps naturels aux pathogènes, soit la diversité du répertoire, la concentration en IgMs et la structure des antigènes.

Chez la souris, des tests de capture en ELISA ont confirmé la liaison des anticorps naturels à nos virus. Par contre, ce phénomène semble peu fréquent et pourrait être une piste de réponse concernant le faible pourcentage d'individus capables d'éliminer le VHC.

De plus, il a été constaté que lorsque des souris étaient infectées par LCMV, les anticorps naturels augmentaient significativement la présentation antigénique aux CTLs. Il serait maintenant intéressant d'observer l'établissement d'infections persistantes chez des souris possédant ou non des anticorps naturels. Chez la souris adulte, certaines souches du virus LCMV ont plus tendance à établir des infections persistantes, c'est le cas notamment du clone 13 (Althaus *et al.*, 2007). Ce virus pourrait donc être utilisé pour cette étude.

Comme des tests de présentation antigéniques *in vitro* n'ont pas prouvé que la présence des anticorps naturels augmente l'internalisation des antigènes et leur présentation antigénique, il est possible que le rôle des anticorps naturels se

situe plutôt au niveau du drainage vers les organes lymphoïdes secondaires. Par contre, dans ces tests, des cellules dendritiques ont été utilisées comme CPAs et nos expérimentations n'ont pas permis de déterminer si elles possèdent ou non le Fc α / μ R. Il se pourrait aussi que le rôle des anticorps naturels se situe à un autre niveau, par exemple dans le transport de cellules à cellules des complexes immuns jusqu'aux FDCs, tel qu'il est suggéré par Dürrbach et collaborateurs (Dürrbach *et al.*, 2007).

Cette étude était exploratoire, mais elle installe les bases qui permettront de poursuivre la recherche concernant les rôles des anticorps naturels lors d'infections virales. Il n'est pas encore possible d'affirmer qu'ils préviendraient l'établissement d'infections persistantes, mais plusieurs études portent à croire que les anticorps naturels serviraient de pont entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif.

Liste des références

- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R. and Cresswell, P. (2003) Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 12889-12894.
- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R. and Cresswell, P. (2005) Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol*. **6**: 107-113.
- Adler, A.J., Marsh, D.W., Yochum, G.S., Guzzo, J.L., Nigam, A., Nelson, W.G. and Pardoll, D.M. (1998) CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med*. **187**: 1555-1564.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. and Zhang, Q.X. (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 12766-12771.
- Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L. and Bhardwaj, N. (1998) Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. **188**: 1359-1368.
- Alter, H.J. and Seeff, L.B. (2000) Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis*. **20**: 17-35.
- Alter, H.J., Purcell, R.H., Holland, P.V. and Popper, H. (1978) Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*. **1**: 459-463.
- Alter, M.J., Kruszon-Moran, D., Nainan, O.V., McQuillan, G.M., Gao, F., Moyer, L.A., *et al* (1999) The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med*. **341**: 556-562.
- Althaus, C.L., Ganusov, V.V. and De Boer, R.J. (2007) Dynamics of CD8+ T cell responses during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol*. **179**: 2944-2951.
- Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T. and Gerstein, R.M. (2004) B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*. **21**: 379-390.
- Amigorena, S. and Bonnerot, C. (1999) Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing. *Immunol Rev*. **172**: 279-284.

- Applequist, S.E., Dahlstrom, J., Jiang, N., Molina, H. and Heyman, B. (2000) Antibody production in mice deficient for complement receptors 1 and 2 can be induced by IgG/Ag and IgE/Ag, but not IgM/Ag complexes. *J Immunol.* **165**: 2398-2403.
- Avrameas, S. (1991) Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnosthi seauton'. *Immunol Today.* **12**: 154-159.
- Azadegan, A.A., Tabor, D.R., Schell, R.F. and LeFrock, J.L. (1984) Cobra venom factor abrogates passive humoral resistance to syphilitic infection in hamsters. *Infect Immun.* **44**: 740-742.
- Bachmann, M.F., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1995) T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur J Immunol.* **25**: 3445-3451.
- Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Kalberer, C.P., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1994) How many specific B cells are needed to protect against a virus? *J Immunol.* **152**: 4235-4241.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**: 245-252.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., *et al* (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* **18**: 767-811.
- Barber, G.N. (2005) VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene.* **24**: 7710-7719.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., *et al* (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem.* **278**: 41003-41012.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. and Cosset, F.L. (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* **197**: 633-642.
- Baumgarth, N., Tung, J.W. and Herzenberg, L.A. (2005) Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol.* **26**: 347-362.
- Baumgarth, N., Herman, O.C., Jager, G.C., Brown, L.E., Herzenberg, L.A. and Chen, J. (2000) B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med.* **192**: 271-280.

- Beebe, D.P. and Cooper, N.R. (1981) Neutralization of vesicular stomatitis virus (VSV) by human complement requires a natural IgM antibody present in human serum. *J Immunol.* **126**: 1562-1568.
- Belardelli, F. (1995) Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apmis.* **103**: 161-179.
- Berland, R. and Wortis, H.H. (2002) Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* **20**: 253-300.
- Berneman, A., Ternynck, T. and Avrameas, S. (1992) Natural mouse IgG reacts with self antigens including molecules involved in the immune response. *Eur J Immunol.* **22**: 625-633.
- Bevan, M.J. (1976) Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med.* **143**: 1283-1288.
- Bigger, C.B., Brasky, K.M. and Lanford, R.E. (2001) DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol.* **75**: 7059-7066.
- Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J.R., Tarakhovsky, A. and Bondada, S. (1996) CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science.* **274**: 1906-1909.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* **329**: 506-512.
- Boes, M., Prodeus, A.P., Schmidt, T., Carroll, M.C. and Chen, J. (1998a) A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med.* **188**: 2381-2386.
- Boes, M., Esau, C., Fischer, M.B., Schmidt, T., Carroll, M. and Chen, J. (1998b) Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol.* **160**: 4776-4787.
- Bofill, M., Janossy, G., Janossa, M., Burford, G.D., Seymour, G.J., Wernet, P. and Kelemen, E. (1985) Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J Immunol.* **134**: 1531-1538.
- Bohm, I. (2004) Increased peripheral blood B-cells expressing the CD5 molecules in association to autoantibodies in patients with lupus erythematosus and evidence to selectively down-modulate them. *Biomed Pharmacother.* **58**: 338-343.
- Borrow, P. and Oldstone, M.B. (1994) Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology.* **198**: 1-9.

Bos, N.A., Meeuwssen, C.G., Wostmann, B.S., Pleasants, J.R. and Benner, R. (1988) The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. *Cell Immunol.* **112**: 371-380.

Bowen, D.G. and Walker, C.M. (2005) Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.* **436**: 946-952.

Brezinschek, H.P., Foster, S.J., Brezinschek, R.I., Dorner, T., Domiati-Saad, R. and Lipsky, P.E. (1997) Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest.* **99**: 2488-2501.

Brundler, M.A., Aichele, P., Bachmann, M., Kitamura, D., Rajewsky, K. and Zinkernagel, R.M. (1996) Immunity to viruses in B cell-deficient mice: influence of antibodies on virus persistence and on T cell memory. *Eur J Immunol.* **26**: 2257-2262.

Buchmeier, M.J., Welsh, R.M., Dutko, F.J. and Oldstone, M.B. (1980) The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Adv Immunol.* **30**: 275-331.

Buchmeier, M.J., Southern, P.J., Parekh, B.S., Wooddell, M.K. and Oldstone, M.B. (1987) Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenavirus GP-C glycoproteins. *J Virol.* **61**: 982-985.

Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M. and Willems, F. (1997) Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol.* **27**: 1848-1852.

Burns, J.W. and Buchmeier, M.J. (1991) Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology.* **183**: 620-629.

Burton, G.F., Conrad, D.H., Szakal, A.K. and Tew, J.G. (1993) Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J Immunol.* **150**: 31-38.

Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., *et al* (1998) Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science.* **282**: 2079-2081.

Carrasco, Y.R. and Batista, F.D. (2007) B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity.* **27**: 160-171.

Cartwright, B. and Brown, F. (1972) Serological relationships between different strains of vesicular stomatis virus. *J Gen Virol.* **16**: 391-398.

- Cascalho, M., Ma, A., Lee, S., Masat, L. and Wabl, M. (1996) A quasi-monoclonal mouse. *Science*. **272**: 1649-1652.
- Castet, V., Fournier, C., Soulier, A., Brillet, R., Coste, J., Larrey, D., *et al* (2002) Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol*. **76**: 8189-8199.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., *et al* (1996) CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med*. **184**: 695-706.
- Chai, J.G., Vendetti, S., Bartok, I., Schoendorf, D., Takacs, K., Elliott, J., *et al* (1999) Critical role of costimulation in the activation of naive antigen-specific TCR transgenic CD8+ T cells in vitro. *J Immunol*. **163**: 1298-1305.
- Chang, C.H., Fontes, J.D., Peterlin, M. and Flavell, R.A. (1994) Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J Exp Med*. **180**: 1367-1374.
- Chen, J., Trounstine, M., Alt, F.W., Young, F., Kurahara, C., Loring, J.F. and Huszar, D. (1993a) Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol*. **5**: 647-656.
- Chen, J., Trounstine, M., Kurahara, C., Young, F., Kuo, C.C., Xu, Y., *et al* (1993b) B cell development in mice that lack one or both immunoglobulin kappa light chain genes. *EMBO J*. **12**: 821-830.
- Chevaliez, S. and Pawlotsky, J.M. (2007) Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol*. **13**: 2461-2466.
- Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A. and Strominger, J.L. (1992) Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature*. **358**: 764-768.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. and Houghton, M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. **244**: 359-362.
- Choo, Q.L., Richman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., *et al* (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 2451-2455.
- Clarke, S.R. (2000) The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J Leukoc Biol*. **67**: 607-614.

Cole, G.A., Nathanson, N. and Prendergast, R.A. (1972) Requirement for theta-bearing cells in lymphocytic choriomeningitis virus-induced central nervous system disease. *Nature*. **238**: 335-337.

Cole, G.A., Gilden, D.H., Monjan, A.A. and Nathanson, N. (1971) Lymphocytic choriomeningitis virus: pathogenesis of acute central nervous system disease. *Fed Proc*. **30**: 1831-1841.

Cooper, N.R. (1985) The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol*. **37**: 151-216.

Cresswell, P., Ackerman, A.L., Giodini, A., Peaper, D.R. and Wearsch, P.A. (2005) Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev*. **207**: 145-157.

Daeron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*. **15**: 203-234.

Dauphinee, M., Tovar, Z. and Talal, N. (1988) B cells expressing CD5 are increased in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. **31**: 642-647.

Davies, D.R., Padlan, E.A. and Sheriff, S. (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem*. **59**: 439-473.

Davis, M.M. and Bjorkman, P.J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. **334**: 395-402.

De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., *et al* (1996) Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med*. **184**: 1413-1424.

Delamarre, L., Holcombe, H. and Mellman, I. (2003) Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med*. **198**: 111-122.

Di Simone, C., Zandonatti, M.A. and Buchmeier, M.J. (1994) Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology*. **198**: 455-465.

Diepolder, H.M., Zachoval, R., Hoffmann, R.M., Wierenga, E.A., Santantonio, T., Jung, M.C., *et al* (1995) Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet*. **346**: 1006-1007.

Donze, H.H., Lue, C., Julian, B.A., Kutteh, W.H., Kantele, A. and Mestecky, J. (1997) Human peritoneal B-1 cells and the influence of continuous ambulatory peritoneal dialysis on peritoneal and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) composition and immunoglobulin levels. *Clin Exp Immunol*. **109**: 356-361.

- Dorshkind, K. and Montecino-Rodriguez, E. (2007) Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol.* **7**: 213-219.
- Durrbach, A., Baple, E., Preece, A.F., Charpentier, B. and Gustafsson, K. (2007) Virus recognition by specific natural antibodies and complement results in MHC I cross-presentation. *Eur J Immunol.* **37**: 1254-1265.
- Dustin, L.B. and Rice, C.M. (2007) Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol.* **25**: 71-99.
- Edelman, G.M. (1991) Antibody structure and molecular immunology. *Scand J Immunol.* **34**: 1-22.
- Edelman, G.M. and Poulik, M.D. (1961) Studies on structural units of the gamma-globulins. *J Exp Med.* **113**: 861-884.
- Edelman, G.M., Benacerraf, B., Ovary, Z. and Poulik, M.D. (1961) Structural differences among antibodies of different specificities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **47**: 1751-1758.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wolk, B., *et al* (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature.* **446**: 801-805.
- Fagarasan, S., Watanabe, N. and Honjo, T. (2000a) Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol Rev.* **176**: 205-215.
- Fagarasan, S., Shinkura, R., Kamata, T., Nogaki, F., Ikuta, K., Tashiro, K. and Honjo, T. (2000b) A lymphoplasia (aly)-type nuclear factor kappaB-inducing kinase (NIK) causes defects in secondary lymphoid tissue chemokine receptor signaling and homing of peritoneal cells to the gut-associated lymphatic tissue system. *J Exp Med.* **191**: 1477-1486.
- Fang, M. and Sigal, L.J. (2006) Direct CD28 costimulation is required for CD8+ T cell-mediated resistance to an acute viral disease in a natural host. *J Immunol.* **177**: 8027-8036.
- Farci, P., Alter, H.J., Wong, D.C., Miller, R.H., Govindarajan, S., Engle, R., *et al* (1994) Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 7792-7796.
- Farci, P., Alter, H.J., Govindarajan, S., Wong, D.C., Engle, R., Lesniewski, R.R., *et al* (1992) Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science.* **258**: 135-140.
- Feeney, A.J. (1992a) Comparison of junctional diversity in the neonatal and adult immunoglobulin repertoires. *Int Rev Immunol.* **8**: 113-122.

- Feeney, A.J. (1992b) Predominance of VH-D-JH junctions occurring at sites of short sequence homology results in limited junctional diversity in neonatal antibodies. *J Immunol.* **149**: 222-229.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J. and Holland, P.V. (1975) Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* **292**: 767-770.
- Feinstone, S.M., Alter, H.J., Dienes, H.P., Shimizu, Y., Popper, H., Blackmore, D., *et al* (1981) Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees and marmosets. *J Infect Dis.* **144**: 588-598.
- Fleury, S.G., Croteau, G. and Sekaly, R.P. (1991) CD4 and CD8 recognition of class II and class I molecules of the major histocompatibility complex. *Semin Immunol.* **3**: 177-185.
- Flutter, B. and Gao, B. (2004) MHC class I antigen presentation--recently trimmed and well presented. *Cell Mol Immunol.* **1**: 22-30.
- Forster, I. and Rajewsky, K. (1987) Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur J Immunol.* **17**: 521-528.
- Forster, I., Gu, H. and Rajewsky, K. (1988) Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment. *Embo J.* **7**: 3693-3703.
- Fruman, D.A., Snapper, S.B., Yballe, C.M., Davidson, L., Yu, J.Y., Alt, F.W. and Cantley, L.C. (1999) Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science.* **283**: 393-397.
- Fu, Y.X. and Chaplin, D.D. (1999) Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol.* **17**: 399-433.
- Fung-Leung, W.P., Schilham, M.W., Rahemtulla, A., Kundig, T.M., Vollenweider, M., Potter, J., *et al* (1991) CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell.* **65**: 443-449.
- Gale, M., Jr. and Foy, E.M. (2005) Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature.* **436**: 939-945.
- Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T. and Olson, W.C. (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 4498-4503.
- Garrett, W.S., Chen, L.M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., *et al* (2000) Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell.* **102**: 325-334.

- Gauss, G.H. and Lieber, M.R. (1996) Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol.* **16**: 258-269.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S. and Weigert, M. (1993) Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med.* **177**: 999-1008.
- Glimcher, L.H. and Kara, C.J. (1992) Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol.* **10**: 13-49.
- Gobet, R., Cerny, A., Ruedi, E., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1988) The role of antibodies in natural and acquired resistance of mice to vesicular stomatitis virus. *Exp Cell Biol.* **56**: 175-180.
- Goutagny, N., Fatmi, A., De Ledinghen, V., Penin, F., Couzigou, P., Inchauspe, G. and Bain, C. (2003) Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* **187**: 1951-1958.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. and Dustin, M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science.* **285**: 221-227.
- Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., *et al* (2003) HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science.* **302**: 659-662.
- Gremion, C. and Cerny, A. (2005) Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Rev Med Virol.* **15**: 235-268.
- Gromme, M., Uytendaele, F.G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J., *et al* (1999) Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 10326-10331.
- Groothuis, T.A. and Neefjes, J. (2005) The many roads to cross-presentation. *J Exp Med.* **202**: 1313-1318.
- Grouard, G., Durand, I., Filgueira, L., Banchereau, J. and Liu, Y.J. (1996) Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature.* **384**: 364-367.
- Guermontprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. and Amigorena, S. (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* **425**: 397-402.
- Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A. and Tedder, T.F. (2005) B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity.* **23**: 7-18.

- Haberman, A.M. and Shlomchik, M.J. (2003) Reassessing the function of immune-complex retention by follicular dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* **3**: 757-764.
- Hamilton, A.M., Lehen, A. and Kearney, J.F. (1994) Immunofluorescence analysis of B-1 cell ontogeny in the mouse. *Int Immunol.* **6**: 355-361.
- Hangartner, L., Zinkernagel, R.M. and Hangartner, H. (2006) Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol.* **6**: 231-243.
- Hardy, R.R. (1992) Variable gene usage, physiology and development of Ly-1+ (CD5+) B cells. *Curr Opin Immunol.* **4**: 181-185.
- Hardy, R.R. and Hayakawa, K. (1994) CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol.* **55**: 297-339.
- Hattori, T., Uchiyama, T., Takatsuki, K. and Uchino, H. (1980) Fc gamma and Fc mu receptors in B cell neoplasms. Correlation to the developmental stages. *Acta Haematol.* **63**: 247-251.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R. and Herzenberg, L.A. (1983) The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med.* **157**: 202-218.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1985) Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med.* **161**: 1554-1568.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Stall, A.M., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1986) Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur J Immunol.* **16**: 1313-1316.
- Heise, E.R., Cook, D.J., Schepart, B.S., Manning, C.H., McMahan, M.R., Chedid, M. and Keever, C.A. (1987) The major histocompatibility complex of primates. *Genetica.* **73**: 53-68.
- Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1989) Toward a layered immune system. *Cell.* **59**: 953-954.
- Herzenberg, L.A. and Tung, J.W. (2006) B cell lineages: documented at last! *Nat Immunol.* **7**: 225-226.
- Herzenberg, L.A., Stall, A.M., Lalor, P.A., Sidman, C., Moore, W.A., Parks, D.R. and Herzenberg, L.A. (1986) The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev.* **93**: 81-102.
- Hippen, K.L., Tze, L.E. and Behrens, T.W. (2000) CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J Exp Med.* **191**: 883-890.

Hoofnagle, J.H. (2002) Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*. **36**: S21-29.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., *et al* (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*. **425**: 402-406.

Hunt, D.F., Michel, H., Dickinson, T.A., Shabanowitz, J., Cox, A.L., Sakaguchi, K., *et al* (1992) Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science*. **256**: 1817-1820.

Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I. and Kroczeck, R.A. (1999) ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. **397**: 263-266.

Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F. and Steinman, R.M. (1997) High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med*. **186**: 665-672.

Janssens, S. and Beyaert, R. (2003) Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*. **16**: 637-646.

Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (1996) Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol*. **14**: 207-232.

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

Kalinke, U., Krebber, A., Krebber, C., Bucher, E., Pluckthun, A., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (1996) Monovalent single-chain Fv fragments and bivalent miniantibodies bound to vesicular stomatitis virus protect against lethal infection. *Eur J Immunol*. **26**: 2801-2806.

Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Hagiwara, H., Mita, E., Naito, M., *et al* (1994) Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology*. **19**: 296-302.

Kantor, A.B. and Herzenberg, L.A. (1993) Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol*. **11**: 501-538.

Kantor, A.B., Merrill, C.E., Herzenberg, L.A. and Hillson, J.L. (1997) An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol*. **158**: 1175-1186.

- Kantor, A.B., Stall, A.M., Adams, S., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1992a) Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**: 3320-3324.
- Kantor, A.B., Stall, A.M., Adams, S., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1992b) Adoptive transfer of murine B-cell lineages. *Ann N Y Acad Sci*. **651**: 168-169.
- Kantor, A.B., Stall, A.M., Adams, S., Watanabe, K. and Herzenberg, L.A. (1995) De novo development and self-replenishment of B cells. *Int Immunol*. **7**: 55-68.
- Kapadia, S.B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J.A. and Chisari, F.V. (2007) Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol*. **81**: 374-383.
- Kasaian, M.T., Ikematsu, H. and Casali, P. (1992) Identification and analysis of a novel human surface CD5- B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J Immunol*. **148**: 2690-2702.
- Ke, Y. and Kapp, J.A. (1996) Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med*. **184**: 1179-1184.
- Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A. and Altevogt, P. (2006) Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*. **107**: 102-108.
- Kikuno, K., Kang, D.W., Tahara, K., Torii, I., Kubagawa, H.M., Ho, K.J., *et al* (2007) Unusual biochemical features and follicular dendritic cell expression of human Fc α /mu receptor. *Eur J Immunol*. **37**: 3540-3550.
- Knoops, L., Louahed, J. and Renauld, J.C. (2004) IL-9-induced expansion of B-1b cells restores numbers but not function of B-1 lymphocytes in xid mice. *J Immunol*. **172**: 6101-6106.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V. and Alt, F.W. (1993) Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science*. **261**: 1171-1175.
- Kosco-Vilbois, M.H., Gray, D., Scheidegger, D. and Julius, M. (1993) Follicular dendritic cells help resting B cells to become effective antigen-presenting cells: induction of B7/BB1 and upregulation of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med*. **178**: 2055-2066.
- Kremsdorf, D. and Brezillon, N. (2007) New animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies. *World J Gastroenterol*. **13**: 2427-2435.

- Kuhns, M.S., Davis, M.M. and Garcia, K.C. (2006) Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity*. **24**: 133-139.
- Kundig, T.M., Shahinian, A., Kawai, K., Mittrucker, H.W., Sebzda, E., Bachmann, M.F., *et al* (1996) Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity*. **5**: 41-52.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F. and Heath, W.R. (1997) Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med*. **186**: 239-245.
- Lai, M.E., Mazzoleni, A.P., Argioli, F., De Virgilis, S., Balestrieri, A., Purcell, R.H., *et al* (1994) Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet*. **343**: 388-390.
- Lalor, P.A. and Morahan, G. (1990) The peritoneal Ly-1 (CD5) B cell repertoire is unique among murine B cell repertoires. *Eur J Immunol*. **20**: 485-492.
- Lam, K.P. and Rajewsky, K. (1999) B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J Exp Med*. **190**: 471-477.
- Lanford, R.E., Guerra, B., Chavez, D., Bigger, C., Brasky, K.M., Wang, X.H., *et al* (2004) Cross-genotype immunity to hepatitis C virus. *J Virol*. **78**: 1575-1581.
- Lauer, G.M. and Walker, B.D. (2001) Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. **345**: 41-52.
- Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., *et al* (2000) Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*. **191**: 1499-1512.
- Lee, A., Desravines, S. and Hsu, E. (1993) IgH diversity in an individual with only one million B lymphocytes. *Dev Immunol*. **3**: 211-222.
- Lee, K.J., Novella, I.S., Teng, M.N., Oldstone, M.B. and de La Torre, J.C. (2000) NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol*. **74**: 3470-3477.
- Leist, T.P., Cobbold, S.P., Waldmann, H., Aguet, M. and Zinkernagel, R.M. (1987) Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J Immunol*. **138**: 2278-2281.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L. and Bluestone, J.A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. **14**: 233-258.

Leong, C.C., Chapman, T.L., Bjorkman, P.J., Formankova, D., Mocarski, E.S., Phillips, J.H. and Lanier, L.L. (1998) Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J Exp Med.* **187**: 1681-1687.

Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L. and Del cbarra, J. (1999) Vesicular stomatitis. *Vet J.* **157**: 239-260.

Li, Y.S., Hayakawa, K. and Hardy, R.R. (1993) The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med.* **178**: 951-960.

Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., *et al* (2000) Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med.* **6**: 1348-1354.

Lin, H.F., Maeda, N., Smithies, O., Straight, D.L. and Stafford, D.W. (1997) A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood.* **90**: 3962-3966.

Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., *et al* (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* **309**: 623-626.

Liu, Y.J., Grouard, G., de Bouteiller, O. and Banchereau, J. (1996) Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int Rev Cytol.* **166**: 139-179.

Liu, Y.J., Xu, J., de Bouteiller, O., Parham, C.L., Grouard, G., Djossou, O., *et al* (1997) Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform. *J Exp Med.* **185**: 165-170.

Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. and Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* **285**: 110-113.

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

Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foug, S., Amara, A., *et al* (2003) DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem.* **278**: 20358-20366.

Luo, Z., Ronai, D. and Scharff, M.D. (2004) The role of activation-induced cytidine deaminase in antibody diversification, immunodeficiency, and B-cell malignancies. *J Allergy Clin Immunol.* **114**: 726-735; quiz 736.

- Lydyard, P.M., Quartey-Papafio, R., Broker, B., Mackenzie, L., Jouquan, J., Blaschek, M.A., *et al* (1990) The antibody repertoire of early human B cells. I. High frequency of autoreactivity and polyreactivity. *Scand J Immunol.* **31**: 33-43.
- MacLennan, I.C., Gulbranson-Judge, A., Toellner, K.M., Casamayor-Palleja, M., Chan, E., Sze, D.M., *et al* (1997) The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev.* **156**: 53-66.
- MacPherson, G.G., Jenkins, C.D., Stein, M.J. and Edwards, C. (1995) Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *J Immunol.* **154**: 1317-1322.
- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M. and Steinman, R.M. (2000) The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol.* **151**: 673-684.
- Major, M.E. and Feinstone, S.M. (1997) The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology.* **25**: 1527-1538.
- Manca, F., Fenoglio, D., Li Pira, G., Kunkl, A. and Celada, F. (1991) Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies. *J Exp Med.* **173**: 37-48.
- Marcos, M.A., Huetz, F., Pereira, P., Andreu, J.L., Martinez, A.C. and Coutinho, A. (1989) Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. *Eur J Immunol.* **19**: 2031-2035.
- Martin, F. and Kearney, J.F. (2000) B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev.* **175**: 70-79.
- Martin, F., Oliver, A.M. and Kearney, J.F. (2001) Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity.* **14**: 617-629.
- Masucci, M.G., Torsteindottir, S., Colombani, J., Brautbar, C., Klein, E. and Klein, G. (1987) Down-regulation of class I HLA antigens and of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in Burkitt lymphoma lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**: 4567-4571.
- Mathur, A., Lynch, R.G. and Kohler, G. (1988) Expression, distribution and specificity of Fc receptors for IgM on murine B cells. *J Immunol.* **141**: 1855-1862.
- Matloubian, M., Kolhekar, S.R., Somasundaram, T. and Ahmed, R. (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**: 7340-7349.

McGavern, D.B., Homann, D. and Oldstone, M.B. (2002) T cells in the central nervous system: the delicate balance between viral clearance and disease. *J Infect Dis.* **186 Suppl 2**: S145-151.

McIntyre, K.W. and Welsh, R.M. (1986) Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection. *J Exp Med.* **164**: 1667-1681.

Mebius, R.E., Nolte, M.A. and Kraal, G. (2004) Development and function of the splenic marginal zone. *Crit Rev Immunol.* **24**: 449-464.

Mehta, S.H., Cox, A., Hoover, D.R., Wang, X.H., Mao, Q., Ray, S., *et al* (2002) Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet.* **359**: 1478-1483.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S. and Papaioannou, V.E. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell.* **68**: 869-877.

Mombaerts, P., Mizoguchi, E., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., Bhan, A.K. and Tonegawa, S. (1993) Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell.* **75**: 274-282.

Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S. and Thomssen, R. (1999) Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol.* **57**: 223-229.

Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. and Kupfer, A. (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* **395**: 82-86.

Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H. and Dorshkind, K. (2006) Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol.* **7**: 293-301.

Moore, M.W., Carbone, F.R. and Bevan, M.J. (1988) Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell.* **54**: 777-785.

Mori, M., Morris, S.C., Orekhova, T., Marinaro, M., Giannini, E. and Finkelman, F.D. (2000) IL-4 promotes the migration of circulating B cells to the spleen and increases splenic B cell survival. *J Immunol.* **164**: 5704-5712.

Mostov, K.E. (1994) Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol.* **12**: 63-84.

Mouthon, L., Nobrega, A., Nicolas, N., Kaveri, S.V., Barreau, C., Coutinho, A. and Kazatchkine, M.D. (1995) Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in

autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 3839-3843.

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

Nascimbeni, M., Mizukoshi, E., Bosmann, M., Major, M.E., Mihalik, K., Rice, C.M., *et al* (2003) Kinetics of CD4+ and CD8+ memory T-cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. *J Virol.* **77**: 4781-4793.

Navas, M.C., Fuchs, A., Schvoerer, E., Bohbot, A., Aubertin, A.M. and Stoll-Keller, F. (2002) Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol.* **67**: 152-161.

Navin, T.R., Krug, E.C. and Pearson, R.D. (1989) Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect Immun.* **57**: 1343-1346.

Negre, D., Mangeot, P.E., Duisit, G., Blanchard, S., Vidalain, P.O., Leissner, P., *et al* (2000) Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther.* **7**: 1613-1623.

Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J.W., Reits, E., Janssen, L. and Neefjes, J. (2005) Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature.* **434**: 83-88.

Nelson, C.A., Roof, R.W., McCourt, D.W. and Unanue, E.R. (1992) Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 7380-7383.

Neuberger, M.S., Ehrenstein, M.R., Klix, N., Jolly, C.J., Yelamos, J., Rada, C. and Milstein, C. (1998) Monitoring and interpreting the intrinsic features of somatic hypermutation. *Immunol Rev.* **162**: 107-116.

Nielsen, C.H. and Leslie, R.G. (2002) Complement's participation in acquired immunity. *J Leukoc Biol.* **72**: 249-261.

Nielsen, C.H., Fischer, E.M. and Leslie, R.G. (2000) The role of complement in the acquired immune response. *Immunology.* **100**: 4-12.

O'Garra, A. and Arai, N. (2000) The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* **10**: 542-550.

- Ochsenbein, A.F. and Zinkernagel, R.M. (2000) Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today*. **21**: 624-630.
- Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1999) Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*. **286**: 2156-2159.
- Odermatt, B., Eppler, M., Leist, T.P., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1991) Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 8252-8256.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C. and Baltimore, D. (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*. **248**: 1517-1523.
- Oldstone, M.B. and Dixon, F.J. (1969) Pathogenesis of chronic disease associated with persistent lymphocytic choriomeningitis viral infection. I. Relationship of antibody production to disease in neonatally infected mice. *J Exp Med*. **129**: 483-505.
- Oldstone, M.B. and Dixon, F.J. (1970) Pathogenesis of chronic disease associated with persistent lymphocytic choriomeningitis viral infection. II. Relationship of the anti-lymphocytic choriomeningitis immune response to tissue injury in chronic lymphocytic choriomeningitis disease. *J Exp Med*. **131**: 1-19.
- Op De Beeck, A., Cocquerel, L. and Dubuisson, J. (2001) Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol*. **82**: 2589-2595.
- Oxenius, A., Bachmann, M.F., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (1998) Virus-specific MHC-class II-restricted TCR-transgenic mice: effects on humoral and cellular immune responses after viral infection. *Eur J Immunol*. **28**: 390-400.
- Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R.M., Nemazee, D. and Rajewsky, K. (1997) Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity*. **7**: 765-775.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D. and Pawlotsky, J.M. (2004) Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. **39**: 5-19.
- Pessoa, M.G. and Wright, T.L. (1997) Hepatitis C infection in transplantation. *Clin Liver Dis*. **1**: 663-690.
- Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.L., et al (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**: 6025-6030.

- Phan, T.G., Grigorova, I., Okada, T. and Cyster, J.G. (2007) Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat Immunol.* **8**: 992-1000.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., *et al* (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 7408-7413.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., *et al* (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* **282**: 938-941.
- Pircher, H., Baenziger, J., Schilham, M., Sado, T., Kamisaku, H., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1987a) Characterization of virus-specific cytotoxic T cell clones from allogeneic bone marrow chimeras. *Eur J Immunol.* **17**: 159-166.
- Pircher, H., Michalopoulos, E.E., Iwamoto, A., Ohashi, P.S., Baenziger, J., Hengartner, H., *et al* (1987b) Molecular analysis of the antigen receptor of virus-specific cytotoxic T cells and identification of a new V alpha family. *Eur J Immunol.* **17**: 1843-1846.
- Potter, N.S. and Harding, C.V. (2001) Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J Immunol.* **167**: 2538-2546.
- Poynard, T., Yuen, M.F., Ratziu, V. and Lai, C.L. (2003) Viral hepatitis C. *Lancet.* **362**: 2095-2100.
- Prince, A.M., Huima-Byron, T., Parker, T.S. and Levine, D.M. (1996) Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat.* **3**: 11-17.
- Ranges, G.E., Figari, I.S., Espevik, T. and Palladino, M.A., Jr. (1987) Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* **166**: 991-998.
- Ravetch, J.V. (1997) Fc receptors. *Curr Opin Immunol.* **9**: 121-125.
- Ravetch, J.V. and Clynes, R.A. (1998) Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol.* **16**: 421-432.
- Ravetch, J.V. and Bolland, S. (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* **19**: 275-290.
- Riese, R.J. and Chapman, H.A. (2000) Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* **12**: 107-113.

- Roake, J.A., Rao, A.S., Morris, P.J., Larsen, C.P., Hankins, D.F. and Austyn, J.M. (1995) Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med.* **181**: 2237-2247.
- Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Bretin, T., Bukh, J., Gaschen, B., *et al* (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**: 2493-2503.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S. (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol.* **1**: 362-368.
- Rosenberg, S. (2001) Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol.* **313**: 451-464.
- Rosenthal, A.S. and Shevach, E.M. (1973) Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med.* **138**: 1194-1212.
- Rothstein, T.L., Kolber, D.L., Murphy, T.P. and Cohen, D.P. (1991) Induction of phorbol ester responsiveness in conventional B cells after activation via surface Ig. *J Immunol.* **147**: 3728-3735.
- Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A. and Janeway, C.A., Jr. (1991) Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature.* **353**: 622-627.
- Sakamoto, N., Shibuya, K., Shimizu, Y., Yotsumoto, K., Miyabayashi, T., Sakano, S., *et al* (2001) A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues. *Eur J Immunol.* **31**: 1310-1316.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* **179**: 1109-1118.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* **182**: 389-400.
- Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P. and Kohn, L.D. (2003) Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol.* **77**: 546-559.

- Savitsky, D. and Calame, K. (2006) B-1 B lymphocytes require Blimp-1 for immunoglobulin secretion. *J Exp Med.* **203**: 2305-2314.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., *et al* (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**: 5017-5025.
- Schlegel, R., Tralka, T.S., Willingham, M.C. and Pastan, I. (1983) Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell.* **32**: 639-646.
- Sevilla, N., Kunz, S., Holz, A., Lewicki, H., Homann, D., Yamada, H., *et al* (2000) Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J Exp Med.* **192**: 1249-1260.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., Savitsky, D., Liao, J. and Calame, K. (2005) Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *J Exp Med.* **202**: 1471-1476.
- Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroyama, T., *et al* (2000) Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol.* **1**: 441-446.
- Shimizu, Y.K., Feinstone, S.M., Kohara, M., Purcell, R.H. and Yoshikura, H. (1996) Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology.* **23**: 205-209.
- Shimonkevitz, R., Kappler, J., Marrack, P. and Grey, H. (1983) Antigen recognition by H-2-restricted T cells. I. Cell-free antigen processing. *J Exp Med.* **158**: 303-316.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., *et al* (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.* **68**: 855-867.
- Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A. and Walker, C.M. (2003) Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* **197**: 1645-1655.
- Sidman, C.L., Shultz, L.D., Hardy, R.R., Hayakawa, K. and Herzenberg, L.A. (1986) Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science.* **232**: 1423-1425.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., *et al* (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* **42**: 962-973.

- Snell, G.D. (1992) The Nobel Lectures in Immunology. Lecture for the Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1980: Studies in histocompatibility. *Scand J Immunol.* **36**: 513-526.
- Solvason, N. and Kearney, J.F. (1992) The human fetal omentum: a site of B cell generation. *J Exp Med.* **175**: 397-404.
- Stager, S., Alexander, J., Kirby, A.C., Botto, M., Rooijen, N.V., Smith, D.F., *et al* (2003) Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *Nat Med.* **9**: 1287-1292.
- Steinhauer, D.A., de la Torre, J.C. and Holland, J.J. (1989) High nucleotide substitution error frequencies in clonal pools of vesicular stomatitis virus. *J Virol.* **63**: 2063-2071.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. (2007) Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathog.* **3**: e103.
- Strunk, D., Egger, C., Leitner, G., Hanau, D. and Stingl, G. (1997) A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med.* **185**: 1131-1136.
- Su, A.I., Pezacki, J.P., Wodicka, L., Brideau, A.D., Supekova, L., Thimme, R., *et al* (2002) Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 15669-15674.
- Sung, V.M., Shimodaira, S., Doughty, A.L., Picchio, G.R., Can, H., Yen, T.S., *et al* (2003) Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol.* **77**: 2134-2146.
- Takai, T. (2002) Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* **2**: 580-592.
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., *et al* (2000) Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med.* **6**: 578-582.
- Tarakhovsky, A. (1997) Bar Mitzvah for B-1 cells: how will they grow up? *J Exp Med.* **185**: 981-984.
- Taylor, L.D., Carmack, C.E., Huszar, D., Higgins, K.M., Mashayekh, R., Sequer, G., *et al* (1994) Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *Int Immunol.* **6**: 579-591.

- Tew, J.G., Wu, J., Fakher, M., Szakal, A.K. and Qin, D. (2001) Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol.* **22**: 361-367.
- Tew, J.G., Wu, J., Qin, D., Helm, S., Burton, G.F. and Szakal, A.K. (1997) Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev.* **156**: 39-52.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., *et al* (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* **75**: 291-295.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C. and Chisari, F.V. (2001) Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* **194**: 1395-1406.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., *et al* (2002) Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 15661-15668.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M. and Nemazee, D. (1993) Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med.* **177**: 1009-1020.
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* **302**: 575-581.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R.E., Trombetta, S., Pypaert, M., *et al* (2005) Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell.* **123**: 157-170.
- Trombetta, E.S. and Mellman, I. (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* **23**: 975-1028.
- Unanue, E.R. (2002) Perspective on antigen processing and presentation. *Immunol Rev.* **185**: 86-102.
- van den Elsen, P.J., Gobin, S.J., van Eggermond, M.C. and Peijnenburg, A. (1998) Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. *Immunogenetics.* **48**: 208-221.
- van den Elsen, P.J., Holling, T.M., Kuipers, H.F. and van der Stoep, N. (2004) Transcriptional regulation of antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* **16**: 67-75.
- van Endert, P. (2006) [Processing of MHC class I presented antigens]. *Med Sci (Paris).* **22**: 727-732.
- Verslype, C., Nevens, F., Sinelli, N., Clarysse, C., Pirenne, J., Depla, E., *et al* (2003) Hepatic immunohistochemical staining with a monoclonal antibody

against HCV-E2 to evaluate antiviral therapy and reinfection of liver grafts in hepatitis C viral infection. *J Hepatol.* **38**: 208-214.

Villadangos, J.A. (2001) Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol.* **38**: 329-346.

Vosshenrich, C.A., Cumano, A., Muller, W., Di Santo, J.P. and Vieira, P. (2003) Thymic stromal-derived lymphopoietin distinguishes fetal from adult B cell development. *Nat Immunol.* **4**: 773-779.

Vosshenrich, C.A., Cumano, A., Muller, W., Di Santo, J.P. and Vieira, P. (2004) Pre-B cell receptor expression is necessary for thymic stromal lymphopoietin responsiveness in the bone marrow but not in the liver environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 11070-11075.

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., *et al* (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* **11**: 791-796.

Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D. and Branch, A.D. (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA.* **7**: 710-721.

Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J. and Hood, L. (1980) The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature.* **283**: 497-499.

West, M.A., Prescott, A.R., Eskelinen, E.L., Ridley, A.J. and Watts, C. (2000) Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol.* **10**: 839-848.

Wolff, H., Lange, J.V. and Webb, P.A. (1978) Interrelationships among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence. *Intervirology.* **9**: 344-350.

World Health Organization (1999) Hepatitis C--global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec.* **74**: 425-427.

Wortis, H.H. and Berland, R. (2001) Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J Immunol.* **166**: 2163-2166.

Wortis, H.H., Teutsch, M., Higer, M., Zheng, J. and Parker, D.C. (1995) B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 3348-3352.

- Xie, Z.C., Riezu-Boj, J.I., Lasarte, J.J., Guillen, J., Su, J.H., Civeira, M.P. and Prieto, J. (1998) Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology*. **244**: 513-520.
- Xu, J.L. and Davis, M.M. (2000) Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity*. **13**: 37-45.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T.S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., *et al* (2001) Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J*. **20**: 3840-3848.
- Yewdell, J.W., Bennink, J.R. and Hosaka, Y. (1988) Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science*. **239**: 637-640.
- Yi, M., Villanueva, R.A., Thomas, D.L., Wakita, T. and Lemon, S.M. (2006) Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 2310-2315.
- Youinou, P., Mackenzie, L., Katsikis, P., Merdrignac, G., Isenberg, D.A., Tuaillon, N., *et al* (1990) The relationship between CD5-expressing B lymphocytes and serologic abnormalities in rheumatoid arthritis patients and their relatives. *Arthritis Rheum*. **33**: 339-348.
- Zellweger, R.M., Hangartner, L., Weber, J., Zinkernagel, R.M. and Hangartner, H. (2006) Parameters governing exhaustion of rare T cell-independent neutralizing IgM-producing B cells after LCMV infection. *Eur J Immunol*. **36**: 3175-3185.
- Zhang, Z., Zemlin, M., Wang, Y.H., Munfus, D., Huye, L.E., Findley, H.W., *et al* (2003) Contribution of Vh gene replacement to the primary B cell repertoire. *Immunity*. **19**: 21-31.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., *et al* (2007) Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol*. **81**: 12465-12471.
- Zibert, A., Meisel, H., Kraas, W., Schulz, A., Jung, G. and Roggendorf, M. (1997) Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. *Hepatology*. **25**: 1245-1249.
- Ziegler, K. and Unanue, E.R. (1981) Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol*. **127**: 1869-1875.
- Zimmermann, C., Seiler, P., Lane, P. and Zinkernagel, R.M. (1997) Antiviral immune responses in CTLA4 transgenic mice. *J Virol*. **71**: 1802-1807.

Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. (1974) Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature*. **251**: 547-548.

Zinkernagel, R.M. and Welsh, R.M. (1976) H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated effector functions in vivo. I. Specificity of T cells conferring antiviral protection against lymphocytic choriomeningitis virus is associated with H-2K and H-2D. *J Immunol*. **117**: 1495-1502.

Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., *et al* (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci*. **9**: 268-275.