

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Contribution du répertoire primaire des lymphocytes B et
des mécanismes de maturation de l'affinité dans
l'induction d'une réponse antivirale protectrice**

Par

Marie-Hélène Côté

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 :
Louis Flamand, Centre de recherche CHUL, Université Laval

Directeur de recherche :
Alain Lamarre, INRS-Institut Armand-Frappier

©droits réservés de Marie-Hélène Côté, 2006

Résumé

Les anticorps, exprimés à la surface des lymphocytes B ou sécrétés dans le sérum, doivent offrir une énorme diversité afin de reconnaître et neutraliser un nombre important de pathogènes potentiels. Plusieurs facteurs contribuent à la diversité des anticorps, dont les multiples segments géniques de la lignée germinale, qui constituent le répertoire primaire. Lors d'une réponse immunitaire, certains mécanismes permettent d'augmenter la diversité et l'affinité à l'antigène, soit l'hypermutation somatique et les réarrangements secondaires. Le processus de permutation isotypique permet quant à lui aux anticorps de changer de fonction biologique tout en gardant leur spécificité pour l'antigène.

Afin d'évaluer l'importance que jouent ces facteurs dans une réponse antivirale protectrice, nous avons infecté, avec le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de l'hépatite murine (MHV) ou le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), trois types de souris transgéniques immunodéficientes, ayant chacune une lacune dans la capacité à diversifier leur répertoire de lymphocytes B. La souris HC1 est restreinte à utiliser un seul segment génique V_H pour former la chaîne lourde de ses anticorps, la souris $AID^{-/-}$ ne peut ni faire d'hypermutation somatique ni de permutation isotypique et finalement, la souris QM génère des anticorps théoriquement monospécifiques à l'haptène nitrophényl (NP).

Les titres en anticorps neutralisants anti-VSV et anti-MHV ont été déterminés chez les trois souris transgéniques et chez la souris de type sauvage C57BL/6 jusqu'au jour 40 post-infection, alors que les titres en anticorps neutralisants anti-LCMV ont été déterminés jusqu'au jour 120 post-infection. Les résultats montrent que : 1-la diversité de la troisième région hypervariable (CDR3) de la chaîne lourde à elle seule est suffisante pour produire des anticorps neutralisants contre VSV, 2-les réarrangements secondaires peuvent générer une réponse humorale neutralisante et protectrice contre VSV et MHV, 3-des anticorps neutralisants et

protecteurs contre VSV et MHV peuvent être produits en absence d'hypermutation somatique et de permutation isotypique et 4-une pleine diversité du répertoire est essentielle pour générer des anticorps neutralisants contre LCMV.

De plus, l'importance de la diversité des anticorps naturels dans le recrutement du VSV à la rate et dans sa dissémination en périphérie quelques heures après l'infection a été évaluée. Les souris C57BL/6, HC1, QM et AID^{-/-} ont été infectées avec une forte dose de virus puis le titre viral a été déterminé dans la rate, le sang, le foie et les reins de 1 heure à 48 heures post-infection. Les résultats laissent croire qu'une plus grande diversité des anticorps naturels est bénéfique pour un recrutement rapide du VSV à la rate.

Cette étude montre que la pleine diversité des anticorps n'est pas nécessaire pour induire le développement d'anticorps neutralisants et protéger la souris contre certains virus, en particulier les virus cytopathogènes, mais qu'elle est bénéfique pour une réponse immunitaire rapide et qu'elle semble nécessaire pour l'induction d'une réponse humorale contre les virus non-cytopathogènes comme LCMV.

Marie-Hélène Côté

Alain Lamarre

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Alain Lamarre, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son immense savoir et sa passion pour la recherche font de lui un excellent modèle pour les étudiants-chercheurs. Je suis reconnaissante à son égard pour m'avoir fait confiance. *Merci Alain pour le beau projet que tu m'as donné et pour ta contribution présente et future à l'avancement des connaissances en immunologie. Je suis honorée d'avoir été ta première étudiante!*

J'ai une pensée toute spéciale pour Esther Tarrab, notre associée de recherche. Elle a été d'une aide et d'un soutien incroyables. Ses connaissances des techniques de laboratoire ont été très précieuses et son dévouement très apprécié. *Merci beaucoup Esther (E.T.)!* Merci aussi à Francine Lambert et Hélène Jacomy qui ont eu la gentillesse de m'apprendre à manipuler les cellules et les souris, qui ont répondu à mes nombreuses questions et qui m'ont donné de judicieux conseils.

Je tiens aussi à remercier mes collègues du laboratoire, Patrick Lacasse, Maude Bigras, Isabelle Meunier, Véronique Bougie et Emmanuel Moreau, pour avoir fait de mon quotidien au laboratoire une agréable expérience. *Je crois que la chimie entre nous a été spéciale et j'ai beaucoup aimé travailler avec vous. J'espère que l'on restera amis longtemps et qu'on se remémorera le bon temps passé ensemble durant nos études!*

Finalement, je ne peux passer sous silence l'appui de mon amoureux Mathieu. Il m'a toujours encouragé à poursuivre mes études et à travailler fort. Il a toujours cru en moi pour tout ce que j'entreprends et je lui en suis très reconnaissante. *Merci Mathieu de partager ma vie!*

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iv
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xi
Introduction	1
1.0 Revue de la littérature	4
1.1 Vue d'ensemble des lymphocytes B	4
1.2 Structure des immunoglobulines	4
1.3 Organisation des gènes des immunoglobulines	10
1.4 Développement des lymphocytes B et réarrangement des segments géniques	11
1.5 Génération de la diversité du répertoire primaire	17
1.5.1 Flexibilité jonctionnelle	18
1.5.2 Addition de nucléotides P	19
1.5.3 Addition de nucléotides N	19
1.5.4 Modèle de souris HC1	20
1.6 Activation des lymphocytes B et maturation d'affinité	21
1.6.1 Hypermutations somatiques	24
1.6.2 Permutations isotypiques	24
1.6.3 Activation-induced cytidine deaminase (AID)	25
1.6.4 Modèle de souris AID ^{-/-}	25
1.6.5 Réarrangements secondaires	26
1.6.6 Modèle de souris QM	28
1.7 Lymphocytes B1 et anticorps naturels	29
1.8 Modèles viraux	31
1.8.1 Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)	32
1.8.2 Infection causée par le VSV	34
1.8.3 Réponse immunitaire au VSV	34
1.8.4 Virus de l'hépatite murine (MHV- <i>murine hepatitis virus</i>)	35

1.8.5	Infection causée par le MHV	37
1.8.6	Réponse immunitaire au MHV	37
1.8.7	Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV- <i>lymphocytic choriomeningitis virus</i>).....	38
1.8.8	Infection causée par le LCMV	40
1.8.9	Réponse immunitaire au LCMV	41
2.0	Matériel et méthodes	43
2.1	Lignées cellulaires.....	43
2.2	Production virale.....	43
2.2.1	Production du virus de la stomatite vésiculaire sérotype Indiana (VSV-IND).....	43
2.2.2	Production du virus de l'hépatite murine sérotype A59 (MHV-A59)	44
2.2.3	Production du virus de la chorioméningite lymphocytaire sérotype WE (LCMV-WE).....	44
2.3	Titration des virus	45
2.3.1	Titration de VSV-IND et MHV-A59.....	45
2.3.2	Titration de LCMV-WE.....	46
2.4	Production et purification d'un anticorps monoclonal anti-CD8 dépléteur	47
2.5	Infection des souris	48
2.5.1	Typage des souris HC1.....	48
2.5.2	Infection par VSV-IND	49
2.5.3	Infection par MHV-A59	50
2.5.3	Infection par LCMV-WE.....	50
2.6	Tests de neutralisation des anticorps.....	51
2.6.1	Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-VSV-IND et anti-MHV-A59 dans les sérums des souris infectées	51
2.6.2	Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-LCMV-WE dans le sérum des souris infectées.....	52
2.7	Test de spécificité des anticorps à MHV-A59 par ELISA	53
3.0	Résultats	55
3.1	Dissémination virale	55
3.1.1	Recrutement de VSV-IND à la rate.....	57
3.1.2	Charge virale dans le sang	58

3.1.3	Dissémination de VSV-IND dans les organes.....	59
3.2	Réponse humorale à VSV-IND	59
3.2.1	Survie des souris suite à l'infection avec VSV-IND.....	60
3.2.2	Production d'anticorps neutralisant contre VSV-IND	62
3.3	Réponse humorale à MHV-A59.....	67
3.3.1	Survie des souris suite à l'infection avec MHV-A59.....	67
3.3.2	Production d'anticorps spécifiques à MHV-A59.....	69
3.3.3	Production d'anticorps neutralisants contre MHV-A59.....	71
3.4	Réponse humorale à LCMV-WE.....	74
3.4.1	Survie des souris suite à l'infection avec LCMV-WE	74
3.4.2	Production d'anticorps neutralisants contre LCMV-WE	76
4.0	Discussion	78
4.1	Diversité du répertoire des lymphocytes B1	79
4.1.1	Recrutement du VSV à la rate chez la souris HC1	80
4.1.2	Recrutement du VSV à la rate chez la souris AID ^{-/-}	81
4.1.3	Recrutement du VSV à la rate chez la souris QM	82
4.1.4	Influence de la diversité des anticorps naturels sur la réponse adaptative et rôle possible des anticorps naturels dans la réponse anti-LCMV.....	83
4.2	Réponse antivirale humorale adaptative	85
4.2.1	Rôle du répertoire primaire des lymphocytes B dans l'induction d'une réponse humorale neutralisante et protectrice	87
4.2.2	Contribution des réarrangements secondaires dans l'induction d'anticorps neutralisants et protecteurs.....	90
4.2.3	Contribution de l'hypermutation somatique et de la permutation isotypique dans l'induction d'une réponse humorale neutralisante et protectrice.....	92
4.3	Influence du type d'infection virale dans l'induction de la réponse humorale	94
	Conclusion et perspectives	96
	Références.....	100

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline de type IgG	5
Figure 2 : Molécule d'IgM pentamérique (Adapté de Goldsby et al., 2001)	7
Figure 3 : Structure du récepteur des lymphocytes B (BCR) (Adapté de Goldsby et al., 2001).....	9
Figure 4 : Organisation des segments géniques chez la souris	11
Figure 5 : Séquence conservée des heptamères et de nonamères des RSS et localisation des RSS dans l'ADN de la lignée germinale.....	13
Figure 6 : Résumé du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse	13
Figure 7 : Réarrangements des gènes de la chaîne lourde.....	14
Figure 8 : Positions des régions hypervariables sur les chaînes légère et lourde	19
Figure 9 : Carte physique de la chaîne lourde transgénique (minilocus HC1) (Adapté de Xu and Davis, 2000).....	20
Figure 10 : Structure de la rate.....	21
Figure 11 : Représentation schématique d'un réarrangement secondaire.....	27
Figure 12 : Représentation schématique du VSV	32
Figure 13 : Microscopie électronique du VSV (Adapté de Rose and Whitt, 2001)	33
Figure 14 : Représentation schématique du MHV (Adapté de Luis ENJUANES)	36
Figure 15 : Représentation schématique du LCMV.....	39
Figure 16 : Titre viral post-infection.....	56
Figure 17 : Survie des souris suite à l'infection avec VSV-IND.....	61
Figure 18 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre VSV-IND chez la souris HC1	63
Figure 19 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre VSV-IND chez la souris QM.....	64
Figure 20 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre VSV-IND chez la souris AID ^{-/-}	66
Figure 21 : Survie des souris suite à l'infection avec MHV-A59.....	68
Figure 22 : Spécificité des anticorps à MHV-A59.....	70

Figure 23 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre MHV-A59	72
Figure 24 : Survie des souris infectées par LCMV-WE.....	75
Figure 25 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre LCMV-WE chez les souris C57BL/6	76

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés et activités biologiques des classes et des sous-classes des immunoglobulines humaines (Adapté de Goldsby et al., 2001)	8
Tableau 2: Localisation chromosomique des gènes des immunoglobulines chez l'homme et chez la souris	10
Tableau 3 : Résumé de la séquence des événements et caractéristiques des stades de la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse (Adapté de Goldsby et al., 2001).....	16
Tableau 4 : Estimation de la diversité combinatoire du répertoire primaire des anticorps chez la souris (Adapté de Goldsby et al., 2001).....	17

Liste des abréviations

°C : degré Celsius

µg : microgramme

µL : microlitre

aa : acide aminé

AcMo : anticorps monoclonal

ADE : *antibody-dependent enhancement of infection*

ADN : acide désoxyribonucléique

AID : *activated induce cytidine deaminase*

APOBEC-1 : *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1*

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATCC : American Type Culture Collection

BCR : *B-cell receptor*

BHK : *baby hamster kidney*

CDR : *complementarity determining region*

C_H : constant *heavy*

C_L : constant *light*

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

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSL : cellule souche lymphoïde

CSM : cellule souche myéloïde

CTL : lymphocyte T cytotoxique

D : diversité

DBT : *delayed brain tumor*

dNTP : désoxynucléotide tri-phosphate

ELISA : *enzyme-linked immunosorbant assay*

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

HBSS : *Hank's Balance Salt Solution*

HBV : virus de l' hépatite B
HCl : acide chlorhydrique
HCV : virus de l' hépatite C
HMS : hypermutation somatique
Ig: immunoglobuline
IgG : immunoglobuline G
IgM : immunoglobuline M
IL-3 : interleukine-3
IL-7 : interleukine 7
INF : interféron
ip : intrapéritonéale
iv : intraveineuse
J_H jonction *heavy*
J_L : jonction *light*
Kb : kilobase
kDa: kilodalton
LCMV : *lymphochoriomeningitis virus* (virus de la chorioméningite lymphocytaire)
LPS : lipopolysaccharides
MEM : *Modified Essential Medium*
MHV : *mouse hepatitis virus* (virus de l' hépatite murine)
mIg : immunoglobuline membranaire
mIgD : immunoglobuline D membranaire
mIgM : immunoglobuline M membranaire
mL : millilitre
mm : millimètre
mM : millimolaire
MOI : *multiplicity of infection* (multiplicité d' infection)
N : *nontemplated*
NK : *natural killer*
nm : nanomètre

NP : 4-hydroxy-3-nitrophényl acétyl

P : palindromique

p/v : poids/volume

PALS : *periarteriolar lymphoid sheath*

pb : paire de base

PBS : *Phosphate Balance Solution* (tampon phosphate)

PCR : *polymerase chain reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)

p-i : post-infection

Pré-B : lymphocyte précurseur B

Pro-B : lymphocyte progéniteur B

QM : quasimonoclonal

RAG : *recombination-activating gene*

RSS : *recombination signal sequence*

SCF : *stem-cell factor*

SG: segment génique

SPF: *specific pathogens free*

SR : *switch region*

SBF : sérum de bovin foetal

TdT : désoxynucléotidyle transférase terminale (*terminal deoxytransferase*)

T_H : lymphocyte T *helper*

TNF : *tumoral necrosis factor*

TP : température de la pièce

uff : unité formatrice de foyer infectieux

ufp : unité formatrice de plage

v/v : volume/volume

V_H: variable *heavy*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

V_L: variable *light*

VSV-IND : virus de la stomatite vésiculaire sérotype Indiana

Introduction

Au cours de notre vie, nous sommes continuellement en contact avec des micro-organismes dont certains ont le pouvoir de provoquer des infections et des maladies. Non seulement les micro-organismes, tel virus et bactéries, sont en nombre incroyablement élevé mais ils sont aussi en diversité infinie dans la nature. Dans la bataille contre les envahisseurs microbiens, les humains et les autres vertébrés sont protégés par un ensemble de mécanismes de défense nommés collectivement «système immunitaire». Le système immunitaire est un système adaptatif qui a évolué remarquablement pour combattre les agents pathogènes. La première ligne de défense, capable de reconnaître rapidement un agent infectieux, est appelée l'immunité naturelle (ou innée). L'immunité acquise (ou adaptative), avec ses branches humorale et cellulaire, est non seulement capable de combattre une infection mais aussi de mémoriser les pathogènes rencontrés. Les anticorps, glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines, sont des joueurs essentiels dans les deux types d'immunité. Ils sont exprimés à la surface des lymphocytes B ou sécrétés dans le sérum par ceux-ci. Avec leur grande diversité, ils reconnaissent et neutralisent les antigènes et, de concert avec la réponse cellulaire, contrôlent les infections.

La diversité des anticorps est le résultat de plusieurs facteurs distincts, dont, en premier lieu, l'organisation des gènes en multiples segments. Le réarrangement des segments géniques constitue le répertoire primaire des anticorps. Lorsque le lymphocyte B reconnaît et répond à un antigène, des mécanismes de maturation d'affinité (l'hypermutation somatique et les réarrangements secondaires) augmentent la diversité des anticorps.

Il est généralement présumé qu'une grande diversité des anticorps assure une meilleure réponse immunitaire contre un grand nombre de pathogènes potentiels. Cependant la contribution de la diversité des anticorps dans le développement d'une réponse antivirale protectrice n'a jamais été évaluée concrètement.

Afin d'évaluer la contribution du répertoire primaire des lymphocytes B et des mécanismes de maturation de l'affinité dans l'induction d'une réponse antivirale protectrice, des souris transgéniques limitées dans leur capacité à diversifier leur répertoire d'anticorps ont été infectées avec différents virus. La souris HC1 est restreinte à utiliser un seul segment génique V_H pour former la chaîne lourde de ses anticorps (Xu and Davis, 2000), la souris $AID^{-/-}$ ne peut faire d'hypermutation somatique ni de permutation isotypique (Muramatsu et al., 2000) et finalement, la souris QM génère des anticorps théoriquement monospécifiques à l'haptène nitrophényl (NP) (Cascalho et al., 1996).

Dans un premier temps, le recrutement du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) à la rate et sa dissémination dans les organes périphériques ont été mesurés quelques heures après l'infection. Les anticorps naturels, produits par les lymphocytes B1, sont reconnus pour recruter et retenir très efficacement des antigènes viraux à la rate et ainsi prévenir l'infection des organes périphériques (Lutz, 1999; Ochsenbein et al., 1999). L'objectif de cette expérience était d'évaluer l'importance de la diversité des anticorps naturels dans le recrutement de VSV à la rate. Les anticorps naturels, majoritairement de type IgM, présentent une moins grande diversité comparés aux anticorps générés par les lymphocytes B2, entre autres, parce qu'ils subissent moins d'hypermutations somatiques. Nos hypothèses étaient donc qu'il ne devrait pas y avoir de différence significative entre les titres viraux chez la souris $AID^{-/-}$ et chez la souris de type sauvage C57BL/6 et que, chez les souris HC1 et QM, les titres viraux devraient être moins élevés dans la rate et plus élevés dans les organes périphériques comparés à la souris C57BL/6.

Ensuite, les réponses humorales contre le VSV, le virus de l'hépatite murine (MHV) et le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) chez les trois souris immunodéficientes ont été testées. Avec la souris HC1, l'objectif était d'évaluer le rôle du répertoire primaire dans l'induction de la réponse antivirale. Comme le CDR3 de la chaîne lourde joue un rôle important dans la liaison à

l'antigène (Davis et al., 1997,1998), la souris HC1, bien que limitée dans son répertoire primaire, peut générer des anticorps spécifiques à certains antigènes, comme des protéines et des haptènes (Xu and Davis, 2000). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'elle pourrait faire de même avec des virus. La souris AID^{-/-} nous a permis d'évaluer la contribution des mécanismes d'hypermutation somatique et de permutation isotypique dans la génération d'anticorps neutralisants. Notre hypothèse prévoyait que des anticorps neutralisants et protecteurs de type IgM pourraient être générés en absence hypermutation contre VSV, MHV et LCMV, comme c'est le cas avec le virus influenza (Harada et al., 2003). Finalement, nous avons confirmé, chez la souris QM, que les réarrangements secondaires sont à eux seuls suffisants pour produire des anticorps neutralisants et protecteurs contre certains virus (Lopez-Macias et al., 1999).

1.0 Revue de la littérature

1.1 Vue d'ensemble des lymphocytes B

Les lymphocytes B sont des cellules du système immunitaire qui expriment à leur surface ou sécrètent dans le sérum des molécules d'immunoglobuline, ou anticorps. Il existe deux sous-groupes de lymphocytes B, soit les lymphocytes B1 et les lymphocytes B2. Le sous-groupe B1 apparaît dès la vie fœtale, avant le sous-groupe B2. On retrouve les lymphocytes B1 majoritairement dans le péritoine, alors que les lymphocytes B2 peuplent les organes lymphoïdes secondaires (ex : ganglions lymphatiques et rate). Les lymphocytes B2 matures, avec la collaboration des lymphocytes T, produisent des immunoglobulines de haute affinité, spécifiques d'un antigène, afin de contrôler et éliminer les infections microbiennes. Ces cellules jouent donc un rôle important dans l'immunité acquise. Les lymphocytes B1 constituent plutôt la première ligne de défense contre la plupart des infections. De manière indépendante de l'aide des lymphocytes T, ils sécrètent des anticorps de faible affinité ayant une large spécificité (Ochsenbein et al., 1999; Ochsenbein and Zinkernagel, 2000). Ils font le lien entre l'immunité naturelle et l'immunité acquise et plusieurs caractéristiques les mettent à part des lymphocytes B2. Les prochaines sections s'appliquent principalement aux lymphocytes B2, qui seront appelés simplement lymphocytes B afin d'alléger le texte. Il sera question des lymphocytes B1 plus en profondeur à la section 1.7.

1.2 Structure des immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines qui fixent les antigènes. Elles sont présentes à la surface des lymphocytes B ou en circulation dans le sang lorsque sécrétées. L'Ig membranaire (mIg) confère aux lymphocytes B leur spécificité antigénique tandis que les anticorps sécrétés sont des effecteurs de

l'immunité humorale. En circulant dans le sang, ils neutralisent les antigènes ou les marquent pour une élimination subséquente.

Toutes les molécules d'anticorps ont une structure de base commune formée par quatre chaînes d'acides aminés (aa): deux chaînes légères et deux chaînes lourdes, telle qu'illustrée à la **Figure 1**. Les chaînes légères de la molécule d'IgG ont un poids moléculaire d'environ 25 kilodaltons (kDa) alors que les chaînes lourdes ont un poids moléculaire d'environ 50 kDa. Chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde par un pont disulfure, ainsi que par des interactions non-covalentes (Edelman et al., 1961; Edelman and Poulik, 1961). Des liaisons de même type relient aussi entre elles les deux combinaisons identiques d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère afin de former un dimère.

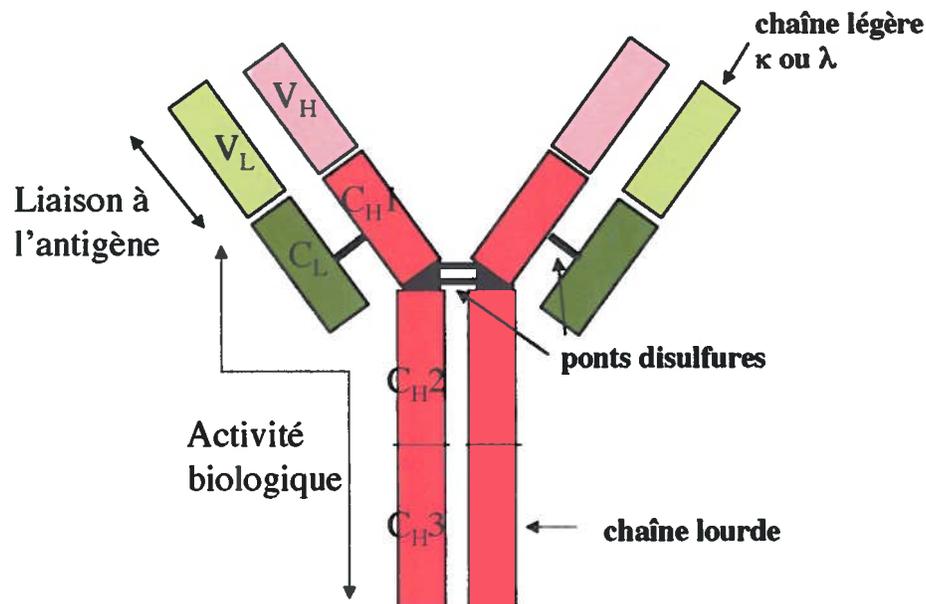


Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline de type IgG (V_L= région variable *light*, V_H= région variable *heavy*, C_L= région constante *light*, C_H= région constante *heavy*)

Les chaînes lourde et légère comprennent deux parties distinctes : une partie constante, qui confère le rôle biologique de l'anticorps, et une partie variable, qui donne aux anticorps leurs spécificités différentes. Les régions variables (V_L pour la chaîne légère et V_H pour la chaîne lourde) sont composées des 110 premiers acides aminés de la région amino-terminale des chaînes et offrent une grande diversité au niveau de la séquence des résidus. À l'intérieur même des régions V, la variation de séquence des résidus est encore plus élevée dans certaines régions que l'on appelle régions hypervariables ou régions de complémentarité (*CDR-complementarity determining region*). Les CDRs, au nombre de trois par chaîne, constituent le site de liaison aux antigènes et forment des boucles qui connectent entre eux les feuillets plissés β qui constituent l'armature (*framework region*) des régions V_L et V_H (Davies et al., 1990). Cependant, la diversité des séquences dans les six CDRs n'est pas distribuée également mais est plutôt concentrée dans le CDR3 de la chaîne lourde, qui englobe les acides aminés 92 à 103 (Davis and Bjorkman, 1988). En plus de sa position centrale dans le site de liaison à l'antigène, le CDR3 de la chaîne lourde offre la structure la plus diversifiée de l'anticorps, tant en séquence qu'en forme et qu'en longueur (Chothia and Lesk, 1987; Chothia et al., 1989; Xu and Davis, 2000).

Le séquençage des Ig a permis de constater qu'il y a cinq types de chaîne lourde, μ , γ , α , δ , et ϵ , appelés isotypes, et deux types de chaîne légère, κ et λ . Chez la souris, environ 95% des chaînes légères sont de types κ et seulement 5% sont de types λ , alors que chez l'homme, cette proportion est de 60% pour κ et 40% pour λ (Butler, 1997). L'isotype détermine la classe de l'anticorps : IgM (μ), IgG (γ), IgA (α), IgD (δ) ou IgE (ϵ). Chaque classe est distinguée par une séquence d'acides aminés spécifique dans la région constante de la chaîne lourde. La région constante confère à chacune des classes des propriétés structurales et fonctionnelles spécifiques, énumérées en partie dans le **Tableau 1**. Une classe peut être un multiple de la structure de base à quatre chaînes, comme par exemple la molécule d'IgM pentamérique, montrée à la **Figure 2**.

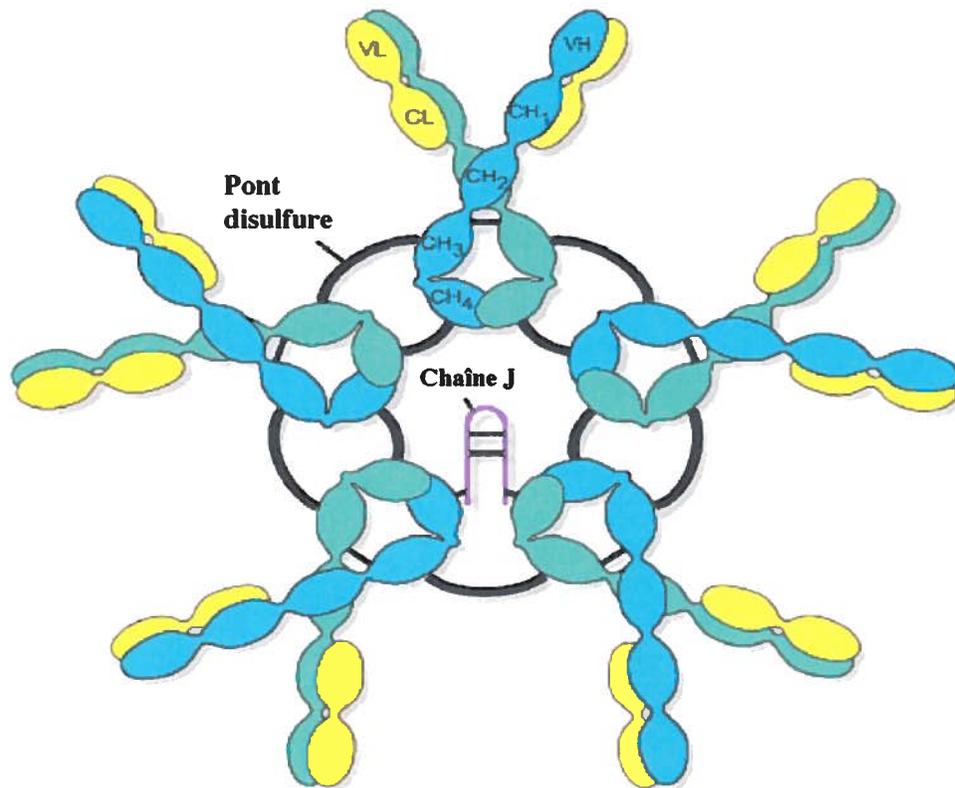


Figure 2 : Molécule d'IgM pentamérique (Adapté de Goldsby et al., 2001)

Tableau 1 : Propriétés et activités biologiques des classes et des sous-classes des immunoglobulines humaines (Adapté de Goldsby et al., 2001)

Propriétés/Activité	IgG1	IgG2	IgG3	α IgG4	IgA1	IgA2	IgM	IgE	IgD
Poids moléculaire (KDa)	150	150	150	150	150-600	150-600	900	190	150
Composant de la chaîne lourde	γ 1	γ 2	γ 3	γ 4	α 1	α 2	μ	ϵ	δ
Taux sérique normal (mg/mL)	9	3	1	0,5	3,0	0,5	1,5	0,003	0,03
Demi-vie dans le sérum <i>in vivo</i> (jours)	23	23	8	23	6	6	5	2,5	3
Active la voie du complément	+	+/-	++	-	-	-	+++	-	-
Passé à travers le placenta	+	+/-	+	+	-	-	-	-	-
Présent sur la membrane des lymphocytes B matures	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Se lie aux récepteurs du Fc des phagocytes	++	+/-	++	+	-	-	?	-	-
Transport à travers la muqueuse	-	-	-	-	++	++	+	-	-
Induit la dégranulation des mastocytes	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Les niveaux d'activité sont indiqués comme suit : ++ = élevé, + = modéré, +/- = faible, - = aucune, ? = douteuse

L'IgG, l'IgE et l'IgD existent sous forme de monomères, l'IgA existe sous forme de dimère, l'IgM membranaire est un monomère et l'IgM sécrétée dans le sérum est un pentamère.

L'Ig membranaire ne constitue pas à elle seule le récepteur des lymphocytes B. La queue cytoplasmique des Ig membranaires étant très courte, d'autres protéines membranaires sont essentielles pour la transmission d'un signal intracellulaire lors de l'activation des lymphocytes B. Le récepteur des lymphocytes B (*BCR- B-cell receptor*) est un complexe de protéines transmembranaires composé de l'Ig et d'hétérodimères unis par une liaison disulfure, appelés Ig- α et Ig- β . Les queues cytoplasmiques d'Ig- α et de d'Ig- β sont suffisamment longues pour entrer en interaction avec des molécules de signalisation intracellulaires (Reth, 1994; Wienands et al., 1996). Un BCR fonctionnel est aussi indispensable dans le développement des lymphocytes B de la phase immature à mature (Loder et al., 1999).

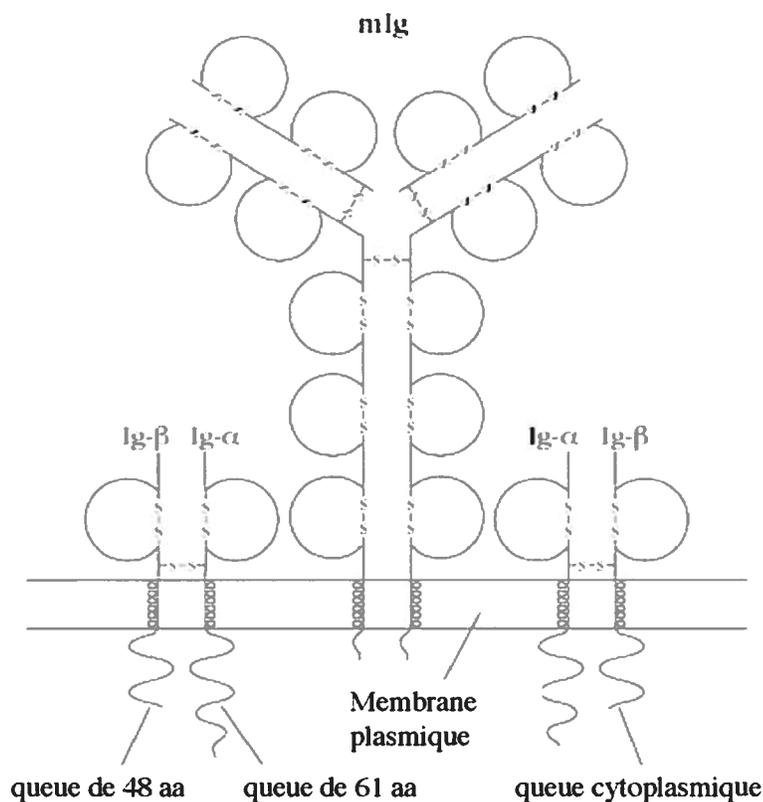


Figure 3 : Structure du récepteur des lymphocytes B (BCR) (Adapté de Goldsby et al., 2001)

1.3 Organisation des gènes des immunoglobulines

La caractéristique la plus remarquable du répertoire des anticorps est sa capacité à reconnaître un nombre apparemment illimité d'antigènes étrangers dû à son énorme diversité. La raison de cette diversité réside en partie dans l'organisation des gènes de la lignée germinale des lymphocytes B. De multiples séquences codantes appelées segments géniques (SG), codent les mêmes parties d'une chaîne lourde ou d'une chaîne légère. Ces familles multigéniques sont situées sur des chromosomes différents selon qu'ils codent pour la chaîne légère κ ou λ ou pour la chaîne lourde, comme le montre le **Tableau 2**.

Tableau 2: Localisation chromosomique des gènes des immunoglobulines chez l'homme et chez la souris

Gène	Chromosome	
	Homme	Souris
Chaîne légère λ	22	16
Chaîne légère κ	2	6
Chaîne lourde	14	12

La chaîne légère est codée par les segments géniques V_L (*variable-light*), J_L (*joining-light*) et C_L (*constant-light*) alors que les SG V_H (*variable-heavy*), D (*diversity*), J_H (*joining-heavy*) et C_H (*constant-heavy*) codent pour la chaîne lourde. Les SG C_L et C_H codent pour les régions constantes de l'anticorps, les SG V_H , D_H et J_H codent pour la région variable de la chaîne lourde et les SG V_L et J_L codent pour la région variable de la chaîne légère. Ces segments, dont l'organisation chez la souris est illustrée à la **Figure 4**, ne peuvent être transcrits et traduits en chaînes lourde et légère avant qu'ils n'aient été réarrangés en gènes fonctionnels durant la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse.

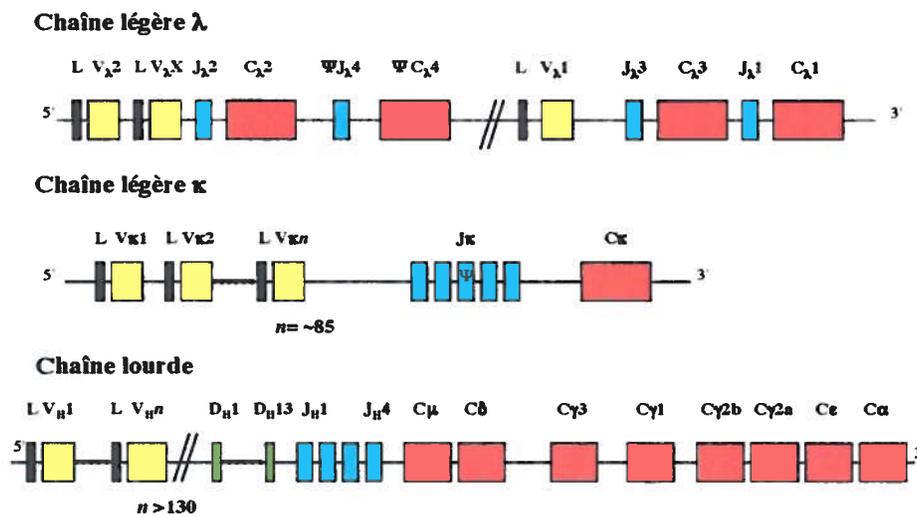


Figure 4 : Organisation des segments géniques chez la souris (L = séquence leader, V = segment variable, D = segment diversité, J = segment jonction, C = segment constant, ψ = pseudogène)

1.4 Développement des lymphocytes B et réarrangement des segments géniques

Avant la naissance, les sites de maturation des lymphocytes B sont le sac vitellin, le foie fœtal et la moelle fœtale, tandis qu'après la naissance, la maturation a lieu uniquement dans la moelle osseuse (Nunez et al., 1996). Comme toutes les cellules du sang, les lymphocytes B dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse. Les CSH, à caractère pluripotent, se différencient dans l'une ou l'autre de deux voies, donnant naissance soit à des cellules souches myéloïdes (CSM) ou des cellules souches lymphoïdes (CSL). Les facteurs de croissance et le micro-environnement de cellules stromales dictent la prolifération et la différenciation des cellules. Sous l'effet de l'interleukine-3 (IL-3) et de l'interleukine-7 (IL-7), les CSL se différencient en progéniteurs

lymphoïdes qui donneront éventuellement les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK (*natural killer*). Les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles, les mastocytes, les basophiles, les plaquettes ainsi que les érythrocytes proviennent, quant à eux, de la lignée myéloïde et dérivent aussi de progéniteurs.

En plus du contact avec les cellules stromales, de l'action de diverses cytokines (IL-7 en particulier) et du facteur de croissance des cellules souches (SCF-*stem-cell factor*), la maturation des lymphocytes B dépend du réarrangement des gènes des immunoglobulines, qui ont lieu à des moments spécifiques durant la lymphopoïèse B (Tonegawa, 1983). La régulation transcriptionnelle de marqueurs de surface et d'enzymes telles que la désoxynucléotidyle transférase terminale (TdT- *terminal deoxytransferase*), RAG-1 et RAG-2 (produits des gènes RAG-1 et RAG-2 -*recombination-activating gene*) est donc très importante (Henderson and Calame, 1998).

Les protéines RAG-1 et RAG-2 reconnaissent des séquences signales de recombinaison (RSS- *recombination signal sequences*) adjacentes aux séquences codantes des SG et orchestrent le clivage et la ligation de l'ADN durant le réarrangements des gènes (Sleckman et al., 1996). Chaque RSS consiste en un heptamère et un nonamère spécifiques séparés par un espace de 12 ou 23 paires de bases (pb) (Lewis, 1994).

Les réarrangements suivent la règle du «12/23», qui dit qu'un SG flanqué par un RSS ayant un espace de 12 pb se recombine seulement avec un SG flanqué d'un RSS ayant un espace de 23 pb, tel que montré à la **Figure 5**. Cette règle assure que les segments se joindront dans un ordre correct et que deux segments de même type ne s'uniront pas ensemble. La TdT, quant à elle, ajoute des nucléotides au niveau des extrémités coupées des séquences codantes V, D et J de la chaîne lourde.

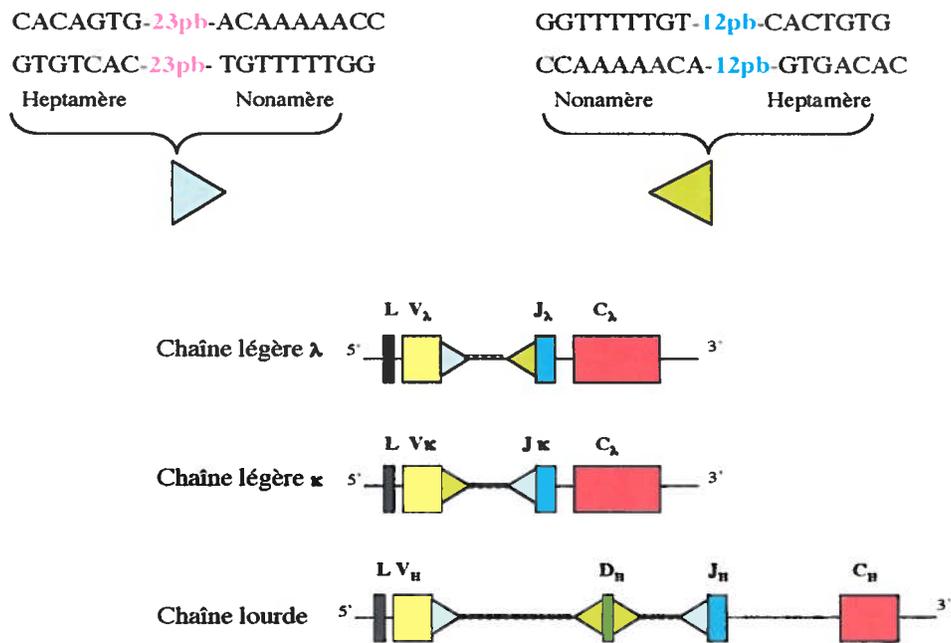


Figure 5 : Séquence conservée de l'heptamère et du nonamère des RSS et localisation des RSS dans l'ADN de la lignée germinale

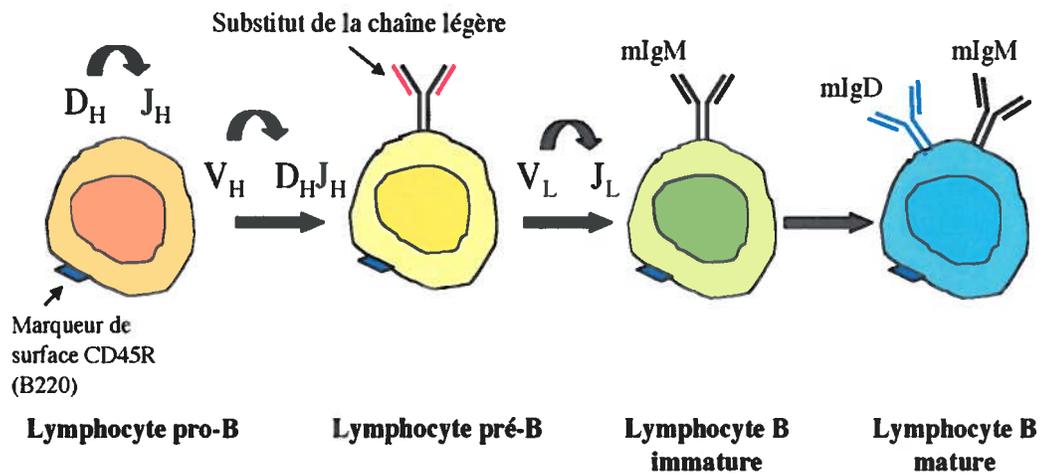


Figure 6 : Résumé du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse

Le développement des lymphocytes B (résumé à la **Figure 6**) commence lorsque les CSL se différencient en lymphocytes progéniteurs B (pro-B), le premier stade cellulaire qui possède les caractéristiques de la lignée B. Les lymphocytes pro-B expriment le marqueur de surface B220 (CD45R), comme toutes les cellules engagées dans la lymphopoïèse B, et le CD43. En progressant dans ce stade, le lymphocyte pro-B exprime la TdT, RAG-1, RAG-2, les gènes du substitut de la chaîne légère ($\lambda 5$ et Vpré-B), CD19, Ig- α et Ig- β et réarrange les gènes de la chaîne lourde (Hardy et al., 1991; Li et al., 1996a; Melchers et al., 1995; Reth and Alt, 1984). Un segment D de la lignée germinale est d'abord joint à un segment J_H puis un segment V_H se joint à la portion DJ_H assemblée, comme montré à la **Figure 7**. La séquence réarrangée est transcrite en ARN messager (ARNm) et traduite en chaîne lourde.

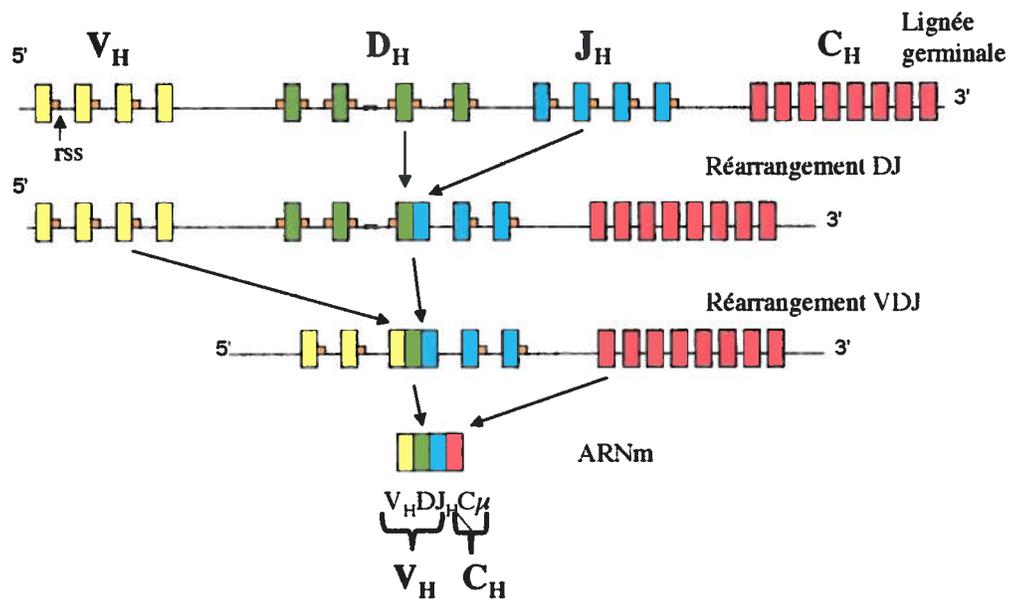


Figure 7 : Réarrangements des gènes de la chaîne lourde

Un réarrangement réussi résulte en l'expression du pré-BCR (chaîne lourde exprimée avec le substitut de la chaîne légère), caractéristique des lymphocytes précurseurs B (pré-B). Le stade pré-B est aussi caractérisé par une diminution de l'expression de CD43 et une perte de l'expression de la TdT. L'apparition du pré-

BCR est essentielle pour la progression du développement et l'exclusion allélique de la chaîne lourde (Karasuyama et al., 1994).

En entrant dans le stade pré-B large, le lymphocyte régule à la baisse l'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 (Grawunder et al., 1995; Li et al., 1996b). Mais en continuant à se différencier, le lymphocyte pré-B les réexprime afin de commencer le réarrangement de la chaîne légère. Les SG V_L et J_L sont réarrangés sur un des deux loci de la chaîne légère. Les deux loci κ et λ peuvent être potentiellement réarrangés mais les réarrangements ont lieu généralement sur le locus κ en premier. Si les deux allèles échouent dans l'assemblage d'une région VJ fonctionnelle, le locus λ subira alors un réarrangement.

La cellule deviendra ensuite un lymphocyte B immature exprimant une molécule membranaire d'immunoglobuline M (mIgM) puis un lymphocyte B mature, qui en plus de la mIgM, exprime une molécule membranaire d'immunoglobuline D (mIgD). Le lymphocyte B mature quitte la moelle osseuse via la circulation sanguine et est transporté aux organes lymphoïdes secondaires, soit à la rate ou aux ganglions lymphatiques (Jacobsen and Osmond, 1990). À ce stade, les lymphocytes B matures sont appelés lymphocytes B naïfs puisqu'ils n'ont jamais encore été en contact avec un antigène. Les stades du développement de pro-B à lymphocyte B mature naïf sont dits indépendants de l'antigène et sont résumés au **Tableau 3**. Les lymphocytes B matures naïfs, qui peuplent les organes lymphoïdes secondaires, constituent le répertoire primaire de lymphocytes B.

Au cours du développement, si le lymphocyte B exprime un BCR autoréactif, généré au hasard lors des réarrangements, il sera éliminé (Kouskoff and Nemazee, 2001; Nemazee and Burki, 1989) ou subira une édition du récepteur par un processus de réarrangements secondaires (Gay et al., 1993; Tiegs et al., 1993), mécanisme dont il sera question à la section 1.6.4.

Tableau 3 : Résumé de la séquence des événements et caractéristiques des stades de la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse (Adapté de Goldsby et al., 2001)

	Lymphocyte Pro-B	Lymphocyte Pré-B	Lymphocyte B immature	Lymphocyte B mature
Gènes de la chaîne lourde	D _H J _H	V _H D _H J _H	V _H D _H J _H	V _H D _H J _H
Gènes de la chaîne légère	-Substitut de la chaîne légère -V _{pré-B} et λ5 -Chaînes κ et λ de la lignée germinale	- Substitut de la chaîne légère -V _{pré-B} et λ5 -Chaînes κ et λ de la lignée germinale	V _L J _L	V _L J _L
Expression RAG-1/2	+	+	-	-
Expression de TdT	+	-	-	-
Ig membranaire	-	μ	μ	μ+δ
Chaîne lourde	Substitut de la chaîne légère	Substitut de la chaîne légère	κ ou λ	κ ou λ
Chaîne légère				
Marqueurs de surface	CD19, CD24, CD43, CD45R, cKit, Ig-α, Ig-β	CD19, CD24, CD25, CD45R, Ig-α, Ig-β, pré-BCR	CD19, CD24, CD45R, Ig-α, Ig-β, mIgM	CD19, CD23, CD24, CD45R, Ig-α, Ig-β, mIgM, mIgD

1.5 Génération de la diversité du répertoire primaire

Comme mentionné précédemment, le grand nombre de gènes d'immunoglobuline différents fourni une grande source de diversité. Comme il existe plusieurs segments géniques de chaque famille, l'association combinatoire des SG V(D)J génère plusieurs possibilités différentes.

Tableau 4 : Estimation de la diversité combinatoire du répertoire primaire des anticorps chez la souris (Adapté de Goldsby et al., 2001)

Familles multigéniques de la lignée germinale	Nombre estimé de segments géniques pour la chaîne lourde	Nombre estimé de segments géniques pour la chaîne légère κ	Nombre estimé de segments géniques pour la chaîne légère λ
V	134	85	2
D	13	-	-
J	4	4	3
Jonction combinatoire $V_H D J_H$ et $V_L J_L$	$134 \times 13 \times 4 = 6968$	$85 \times 4 = 340$	$2 \times 3 = 6$
Associations combinatoires des chaînes lourdes et des chaînes légères	$6968 \times (340 + 6) = 2,41 \times 10^6$ possibilités		

Au minimum, la diversité du répertoire primaire créée par les combinaisons V(D)J et l'association combinatoire des chaînes légères et des chaînes lourdes est évaluée à environ $2,41 \times 10^6$ possibilités différentes chez la souris (calculé dans le **Tableau 4**) mais cette diversité est considérablement augmentée par d'autres facteurs, soit la flexibilité jonctionnelle, l'addition de nucléotides P (palindromique) et de nucléotides N (*nontemplated*). Un répertoire estimé à 10^{10} récepteurs différents peut être en principe généré chez la souris (Berek and Milstein, 1988).

1.5.1 Flexibilité jonctionnelle

Lors des recombinaisons V(D)J, la jonction entre les séquences codantes ne se fait pas toujours au même endroit. Bien que la jonction des RSS se fait toujours de façon précise, celle des séquences codantes des segments géniques est souvent imprécise. C'est ce qu'on définit par la flexibilité jonctionnelle. Cette flexibilité crée diverses combinaisons de codons au niveau des jonctions codantes, ce qui amène une plus grande diversité des anticorps. Il a été dit précédemment que la diversité des séquences dans les régions variables n'est pas distribuée également dans les six CDRs (dont les positions sont montrées à la **Figure 8**) mais est plutôt concentrée dans le CDR3 de la chaîne lourde (Davis and Bjorkman, 1988). Ceci est explicable par le fait que la troisième région hypervariable de la chaîne lourde est située à la jonction $V_H D J_H$. Étant donné que le CDR3 de la chaîne lourde joue un rôle important dans la fixation de l'antigène, la diversité des séquences d'acides aminés créée par la jonction combinatoire des segments géniques et par la flexibilité jonctionnelle apporte une contribution majeure à l'étendue de la spécificité des anticorps.

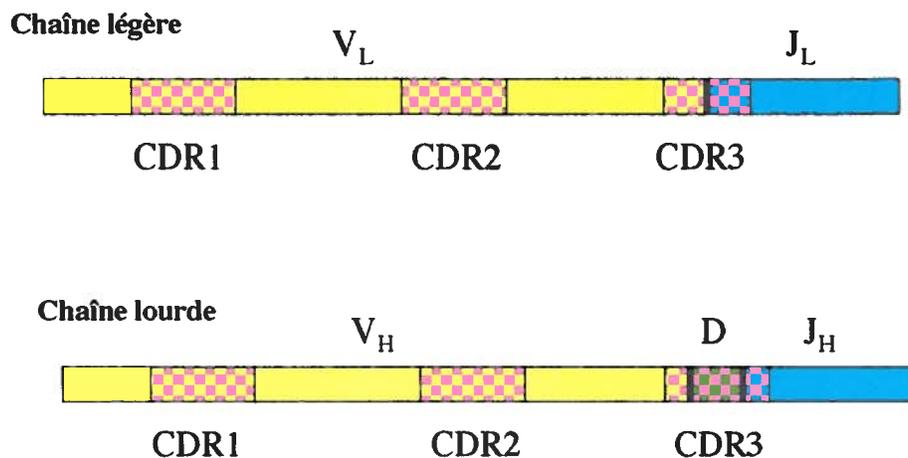


Figure 8 : Positions des régions hypervariables sur les chaînes légère et lourde

1.5.2 Addition de nucléotides P

L'addition de nucléotides P se fait lorsque le clivage de l'ADN laisse un court segment simple brin à l'extrémité de la séquence codante, lors du processus de recombinaison. L'addition de nucléotides par des enzymes de réparation de l'ADN crée une séquence palindromique dans la jonction codante, d'où le nom de nucléotides P. La variation de la position du clivage de l'ADN conduit à une diversité dans la séquence des jonctions codantes.

1.5.3 Addition de nucléotides N

L'addition de nucléotides N se fait lors du processus de jonction D-J_H et V_H-D-J_H par l'enzyme TdT (Desiderio et al., 1984). Jusqu'à 11 nucléotides peuvent être insérés aux jonctions, ce qui augmente de façon significative la diversité au niveau du CDR3 de la chaîne lourde et par le fait même, la diversité du répertoire primaire des anticorps. La chaîne légère ne comporte pas de nucléotide N puisque

l'expression de la TdT cesse avant le réarrangement V_L-J_L mais des exceptions ont été rapportées (Benedict et al., 2000; Bentolila et al., 1999).

1.5.4 Modèle de souris HC1

Le CDR3 de la chaîne lourde est le principal déterminant de la spécificité dans la reconnaissance des antigènes, du moins dans le répertoire primaire (Davis et al., 1998; Davis et al., 1997), et sa diversité est suffisante pour distinguer une variété d'haptènes et de protéines (Xu and Davis, 2000). Ceci a été démontré à l'aide d'une souris transgénique contrainte à utiliser un seul SG V_H pour générer son répertoire de lymphocytes B : la souris HC1. Comme le montre la **Figure 9**, le minilocus HC1 contient un seul segment génique V_H humain fonctionnel (V_{H5-51}), dix segments D, six segments J_H et les segments de la région constante C_μ et $C_{\gamma 1}$ (Taylor et al., 1994). La souris transgénique HC1 a été croisée sur un fond $IgH^{-/-}Ig\kappa^{-/-}$ (Chen et al., 1993). Avec ce génotype ($HC1^{+/0} IgH^{-/-}Ig\kappa^{-/-}$), les seules immunoglobulines fonctionnelles qui peuvent être générées combinent une chaîne lourde contenant le SG V_{H5-51} et une chaîne légère λ formée à partir d'un des trois SG V_λ endogènes de la souris. Le répertoire de la souris HC1 est donc très limité (environ 13 000 combinaisons différentes possibles) mais cette souris conserve la possibilité de générer une diversité très appréciable au niveau du CDR3 de la chaîne lourde.

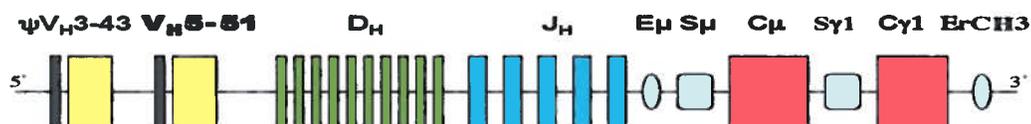


Figure 9 : Carte physique de la chaîne lourde transgénique (minilocus HC1) (Adapté de Xu and Davis, 2000) (V = segment variable, D = segment diversité, J = segment jonction, C = segment constant, E = *enhancer*, S = *switch region*, ψ = pseudogène)

Des IgM spécifiques contre une variété d'haptènes et de protéines sont générés chez la souris HC1 suite à une immunisation avec ces antigènes. Lors de la réponse primaire, la séquence des IgM spécifiques varie uniquement dans le CDR3 de la chaîne lourde. La souris HC1 ne produit cependant pas d'anticorps spécifiques contre des polysaccharides bactériens. Ces résultats démontrent qu'un large répertoire de SG V, tant V_H que V_L , n'est pas nécessaire dans l'induction d'anticorps spécifiques à un grand nombre d'antigènes (Xu and Davis, 2000).

1.6 Activation des lymphocytes B et maturation d'affinité

Contrairement aux étapes du développement, les étapes de l'activation, de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes B se produisent en périphérie, dans les organes lymphoïdes secondaires, et nécessitent la présence de l'antigène. L'activation déclenchée par l'antigène et la sélection clonale des lymphocytes B naïfs conduisent à la création de plasmocytes et de lymphocytes B mémoires (MacLennan, 1994).

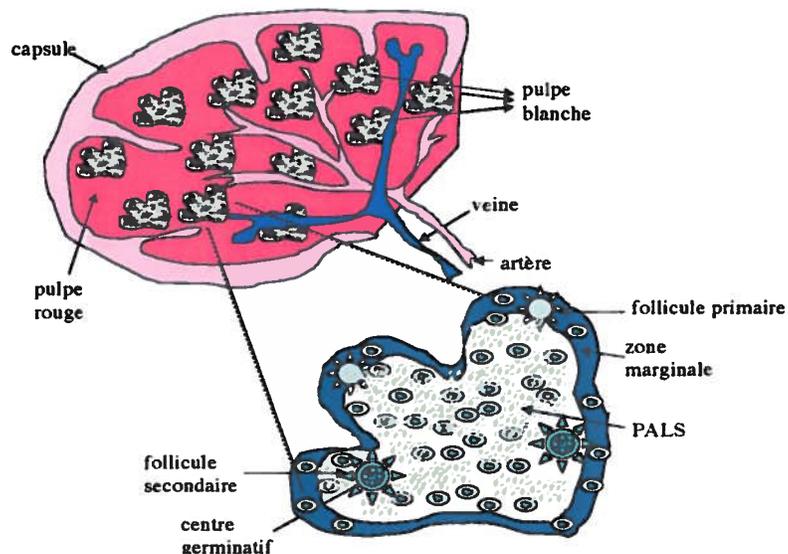


Figure 10 : Structure de la rate

Lorsqu'un antigène est introduit dans la circulation sanguine, il est filtré par la rate, dont la structure est illustrée à la **Figure 10**. Un antigène des espaces tissulaires drainés par le système lymphatique est, quant à lui, filtré par les ganglions lymphatiques régionaux. Les antigènes pénètrent dans la rate par l'artère splénique, qui se déverse dans la zone marginale. Dans cette zone, l'antigène est capté par des lymphocytes B matures naïfs ayant un BCR qui reconnaît l'antigène ou par des cellules dendritiques interdigitées. Ces deux types de cellules sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA). Elles internalisent l'antigène et migrent vers le manchon lymphoïde périartériolaire (PALS- *periarteriolar lymphoid sheath*) afin de le présenter sous forme de peptide, via une molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH de classe II), aux lymphocytes T auxiliaires CD4+ (T_H) qui peuplent cette région. Une fois activés, les lymphocytes T_H spécifiques au peptide antigénique activent à leur tour les lymphocytes B, qui prolifèrent et migrent vers les follicules primaires de la zone marginale. L'activation des lymphocytes B par les lymphocytes T nécessite l'interaction des marqueurs de surface CD40-CD40L et B7-CD28. Les follicules primaires se développent en follicules secondaires, où se forment les centres germinatifs. Les centres germinatifs apparaissent environ une semaine après l'immunisation. Au cours de la formation des centres germinatifs, les lymphocytes B activés subissent une intense prolifération. Ces lymphocytes sont connus sous le nom de centroblastes. Les centroblastes se distinguent entre autres par leur grande taille et l'absence d'Ig membranaire. En se divisant, les centroblastes donnent naissance aux centrocytes, plus petites cellules, qui expriment une Ig membranaire.

Les centrocytes qui portent une immunoglobuline membranaire spécifique entrent en interaction avec l'antigène présenté sur les longs prolongements des cellules dendritiques folliculaires et subissent une maturation d'affinité dans les centres germinatifs. Cette maturation d'affinité, qui augmente considérablement la diversité des anticorps, donnera lieu à des lymphocytes B exprimant un récepteur de haute affinité pour l'antigène. La maturation d'affinité est essentiellement le

résultat d'hypermutations somatiques (HMS) mais aussi de réarrangements secondaires (Han et al., 1997; Hertz et al., 1998; Meffre et al., 1998; Papavasiliou et al., 1997; Pelanda et al., 1997). Le processus de réarrangements secondaires durant la maturation d'affinité est appelé «révision du récepteur», par opposition à «édition du récepteur» qui est le processus de réarrangements secondaires ayant lieu dans la moelle osseuse lors du développement des lymphocytes B et qui sert à éliminer les cellules autoréactives.

Les centrocytes ayant un récepteur de haute affinité sont donc sélectionnés positivement, subissent une permutation isotypique, se différencient en plasmocytes ou en lymphocytes B mémoire et quittent le centre germinatif, tandis que les centrocytes doués d'une faible affinité (la majorité) subissent une sélection négative et meurent par apoptose dans le centre germinatif. (La permutation isotypique et la formation de plasmocytes peuvent aussi avoir lieu hors des centres germinatifs.) (Fukuda et al., 1997; Kelsoe, 1996; MacLennan, 1994; Rajewsky, 1996; Ye et al., 1997)

Les plasmocytes n'ont pas d'immunoglobuline membranaire mais sécrètent plutôt des taux élevés d'anticorps. Les lymphocytes B mémoires, quant à eux, sont des cellules qui expriment une immunoglobuline membranaire qui peut être de type IgM, IgG, IgA ou IgE et dont la durée de vie est beaucoup plus longue que celle des lymphocytes B naïfs. L'affinité du récepteur est aussi beaucoup plus élevée due à la maturation d'affinité. Les lymphocytes B mémoires peuvent rester dans les organes lymphoïdes secondaires mais aussi retourner dans la moelle osseuse. La capacité qu'a le système immunitaire à développer une réponse secondaire dépend de cette population de cellules.

1.6.1 Hypermutations somatiques

Chez l'humain et la souris, les HMS sont présentes à un taux de 10^{-5} à 10^{-3} mutations par paire de base par génération, ce qui représente un ratio d'environ 10 000 à 1 million de fois plus élevé que les mutations spontanées dans la plupart des autres gènes (Rajewsky et al., 1987). Ces mutations sont majoritairement des substitutions d'une seule base et occasionnellement des insertions ou des délétions. Elles sont ciblées dans les régions variables des chaînes lourde et légère, principalement dans les CDRs. Étant donné que les CDRs sont directement impliqués dans la reconnaissance et la liaison à l'antigène, une mutation au sein de ces régions peut influencer l'affinité de l'anticorps pour l'antigène.

1.6.2 Permutations isotypiques

Le processus de permutation isotypique est aussi appelé changement de classe d'immunoglobuline (*class switch recombination*). Lors d'une permutation isotypique, le segment génique $C\mu$ est remplacé par un autre segment génique C en aval, soit $C\gamma$, $C\epsilon$ ou $C\alpha$, pour générer des anticorps de type IgG, IgE ou IgA respectivement. Ceci permet à la spécificité de l'anticorps positivement sélectionné de rester constante alors que les activités biologiques effectrices de la molécule varient (ex : liaison au complément, liaison à différents récepteurs Fc, persistance dans la circulation sanguine pour des durées de temps variables, etc). Le changement de classe permet aussi aux anticorps d'être distribués partout dans le corps et à travers le placenta. Des séquences d'ADN appelées régions de commutations (*SR-Switch region*), localisées en amont de chaque segment C_H (à l'exception de $C\mu$), sont impliquées dans le processus de changement de classe d'immunoglobuline (Honjo et al., 2004). Il doit y avoir une recombinaison intrachromosomique entre le $SR\mu$ et un autre SR en aval pour que la permutation isotypique ait lieu. Celle-ci est déclenchée par l'engagement de récepteurs de surface comme CD40 et par des cytokines produites par les lymphocytes T_H

activés. Différentes cytokines activent les promoteurs des différents SRs afin d'induire un changement d'isotype en particulier (Luo et al., 2004).

1.6.3 Activation-induced cytidine deaminase (AID)

Bien que les hypermutations somatiques et les permutations isotypiques soient deux processus différents, ils nécessitent tous les deux l'activité de la même enzyme, l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*) (Muramatsu et al., 1999). L'enzyme AID, un homologue de l'enzyme APOBEC-1 (*apolipoprotein B (apoB) mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1*) (Navaratnam et al., 1993), convertit les déoxycytidines en déoxyuraciles sur l'ADN simple brin.

1.6.4 Modèle de souris AID^{-/-}

Les fonctions de l'enzyme AID ont clairement été démontrées avec des études physiologiques sur des souris déficientes en AID. Les souris AID^{-/-} montrent une perte complète des processus de HMS et de permutation isotypique et une accumulation de molécules d'IgM dans le sérum (Muramatsu et al., 2000). Ces souris présentent aussi une augmentation du nombre de bactéries anaérobiques non-pathogènes dans l'intestin grêle et une hypertrophie des structures lymphoïdes qui le longent (Fagarasan et al., 2002). Chez l'humain, un défaut génétique sur le gène codant pour AID résulte en syndrome d'hyper-IgM de type 2, une maladie héréditaire autosomale récessive (Revy et al., 2000).

Les souris AID^{-/-} sont relativement en bonne santé sous des conditions SPF (*specific pathogens free*). Il a été démontré qu'elles sont résistantes aux infections avec une souche virulente du virus influenza, bien qu'elles montrent des signes de morbidité plus élevés et un délai dans l'élimination du virus, comparées aux souris de type sauvage (Harada et al., 2003). Les souris

déficientes en AID sont aussi plus susceptibles aux infections secondaires avec des doses élevées de virus, ce qui laisse croire que des IgM non mutés procurent une bonne protection contre une faible dose de virus mais que des anticorps ayant subi des HMS et un changement de classe sont importants pour protéger contre des infections virales à forte dose.

1.6.5 Réarrangements secondaires

Étant essentiellement le fruit du hasard, les réarrangements des gènes des Ig créent parfois des récepteurs autoréactifs. Dans le but d'éviter de possibles réactions autoimmunes, les lymphocytes B immatures exprimant une immunoglobuline qui reconnaît un antigène du soi revoient leur spécificité par un processus appelé «édition du récepteur» (Gay et al., 1993; Tiegs et al., 1993). Ce processus se fait par des réarrangements secondaires tant sur le locus de la chaîne légère que sur celui de la chaîne lourde, illustrés à la **Figure 11**, grâce à une expression continue ou renouvelée des gènes RAG (Pelanda et al., 1997), mais selon des mécanismes différents. Sur le locus κ , il y a remplacement d'un segment entier $V\kappa J\kappa$ déjà existant par une recombinaison d'un segment $V\kappa$ en amont et d'un segment $J\kappa$ en aval. Cette recombinaison se fait soit par délétion ou inversion, selon l'orientation transcriptionnelle des gènes de recombinaison. Un tel mécanisme de réarrangement secondaire impliquant un segment génique V ne peut pas avoir lieu sur le locus de la chaîne lourde puisque plus aucun segment D n'est disponible sur l'ADN suite au premier réarrangement $V_H D J_H$. Les réarrangements secondaires impliquant un remplacement du segment V_H sont plutôt dépendant d'un heptamère cryptique, un RSS conservé présent à l'extrémité 3' de la plupart des segments V_H . Cet heptamère cryptique permet à un segment V_H en amont de se recombiner avec une région $V_H D J_H$ déjà existante (Kleinfield and Weigert, 1989; Reth et al., 1986). Au stade pré-B, lorsque le lymphocyte porte un réarrangement $D J_H$, un réarrangement secondaire peut aussi avoir lieu, générant une nouvelle combinaison $D J_H$ (Reth et al., 1986).

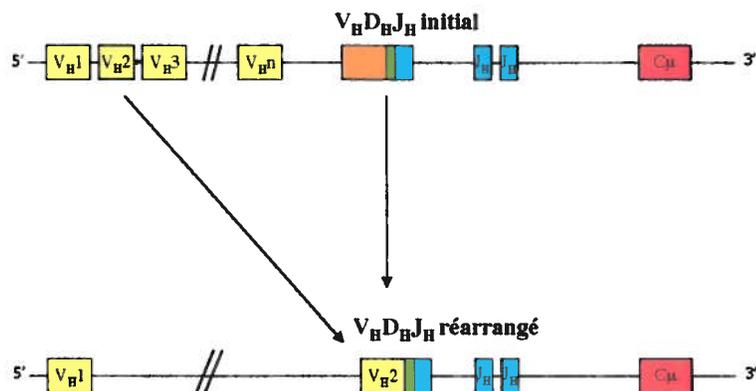


Figure 11 : Représentation schématique d'un réarrangement secondaire

Une autre possibilité, non exclusive, expliquant les réarrangements secondaires lors de la formation du pré-BCR est simplement la diversification du répertoire (Zhang et al., 2003). Cette idée est supportée par des remplacements de segments V_H observés chez des souris transgéniques dans un contexte de non-autoimmunité (Bertrand et al., 1998; Wilson et al., 2000). La formation de nouvelles combinaisons de régions V_HDJ_H suite au réarrangement secondaire a pour effet d'augmenter la diversité au niveau du CDR3 de la chaîne lourde.

En plus de leur rôle dans le développement des lymphocytes B, les réarrangements secondaires sont aussi impliqués dans la diversification du récepteur durant la réponse immunitaire, processus nommé «révision du récepteur». Ces réarrangements secondaires ont lieu dans les lymphocytes B immatures recrutés à partir de la moelle osseuse aux organes lymphoïdes secondaires durant la réponse immunitaire (Kuwata et al., 1999; Monroe et al., 1999; Yu et al., 1999), recrutement qui se fait de manière indépendante de l'antigène (Gartner et al., 2000; Nagaoka et al., 2000).

1.6.6 Modèle de souris QM

Le remplacement de segment génique V_H a été observé *in vivo* dans plusieurs modèles de souris transgéniques (Chen et al., 1995; Pelanda et al., 1997; Pewzner-Jung et al., 1998; Sonoda et al., 1997), dont la souris Quasi-monoclonale (QM) (Bertrand et al., 1998). La souris QM a été générée par une insertion ciblée de la région V_HDJ_H réarrangée 17.2.25, isolée à partir d'un hybridome spécifique pour l'haptène 4-hydroxy-3-nitrophényl acétyl (NP), dans le locus endogène J_H (Cascalho et al., 1996). L'autre allèle de la chaîne lourde a été rendu non fonctionnel par délétion de tous les segments J_H . De plus, la souris QM a été croisée avec une souris ayant un fond génétique $J\kappa^{-/-}$; donc la chaîne lourde transgénique peut seulement se coupler à une chaîne légère λ . Théoriquement, le répertoire primaire des lymphocytes B de la souris QM est monospécifique à l'haptène NP. Cependant, environ 20% des lymphocytes B périphériques des souris QM présentent une autre spécificité.

Une étude a montré que des hybridomes générés à partir de splénocytes de souris QM utilisaient un remplacement du segment V_H pour générer une spécificité autre qu'à l'haptène NP, après une immunisation avec différents antigènes (Madan et al., 2000). De plus, des souris QM infectées avec le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) ou le poliovirus ont généré des anticorps spécifiques neutralisants qui leur conféraient une protection, même si l'apparition des anticorps était retardée. Il a été démontré que ces anticorps antiviraux ont été générés par un remplacement du segment V_H de la région V_HDJ_H réarrangée 17.2.25 par un segment V_H endogène localisé en amont du transgène (Lopez-Macias et al., 1999). Les auteurs de cette étude concluent que les réarrangements secondaires et l'hypermutation somatique peuvent générer une diversité des lymphocytes B assez grande chez la souris QM pour induire une réponse humorale antivirale protectrice et que ces mécanismes pourraient aussi contribuer à la diversification du répertoire des lymphocytes B chez les souris normales.

1.7 Lymphocytes B1 et anticorps naturels

Les anticorps naturels sont définis comme étant les anticorps circulants dans le sérum en absence de stimulation antigénique exogène (Bos et al., 1988; Haury et al., 1997). Ce sont majoritairement des IgM mais des anticorps de type IgG et IgA peuvent aussi exister (Avrameas, 1991). Ces anticorps sont de faible affinité mais ont une large spécificité et peuvent être polyréactifs. Certaines spécificités des IgM naturels ont été identifiées, dont celles à la phosphorylcholine (Masmoudi et al., 1990), à la phosphatidylcholine (Hayakawa et al., 1984), aux lipopolysaccharides (LPS) (Su et al., 1991) et au virus influenza (Baumgarth et al., 1999).

Les lymphocytes B1 sont la source des anticorps naturels. Cette sous-population de lymphocytes peut être distinguée des lymphocytes B2 (lymphocytes B) par plusieurs marqueurs de surface. Les lymphocytes B1 sont $CD45^{bas}$, IgM^{haut} , $CD23^{-}$, $CD43^{+}$ et IgD^{bas} . Ils étaient originellement identifiés par leur expression de $CD5$ mais une population de lymphocytes B1 $CD5^{-}$ a par la suite été identifiée. Par consensus, les lymphocytes B1 $CD5^{+}$ sont appelés B1-a et les lymphocytes $CD5^{-}$, qui constituent environ 5-10% de la population de lymphocytes B1, sont nommés B1-b. L'ensemble des lymphocytes B1 constituent la grande majorité des lymphocytes B logés dans le péritoine et les cavités pleurales, représentent environ 5% des lymphocytes B de la rate et sont absents des ganglions lymphatiques (Kroese et al., 1992; Marcos et al., 1989). Les gènes des immunoglobulines des lymphocytes B1 proviennent de la même lignée germinale que ceux de la population B2, mais l'insertion de nucléotides N dans les régions V_{HD} et DJ_H se fait à une fréquence plus faible (Kantor et al., 1997) et ils ne présentent habituellement pas d'hypermutation somatique (Forster et al., 1988). La population de lymphocytes B1, contrairement à celle de lymphocytes B2, a la capacité de s'auto-renouveler et son développement est plus important durant la vie foetale et néonatale que durant la vie adulte (Kantor et al., 1995).

Les anticorps naturels, avec d'autres composantes de l'immunité innée, constituent la première ligne de défense contre les infections microbiennes (Baumgarth, 2000; Boes et al., 1998; Ochsenbein et al., 1999) et peuvent aussi conférer une protection contre des virus tels le virus influenza (Baumgarth et al., 2000), poliovirus, LCMV et VSV (Ochsenbein et al., 1999). Des expériences ont montré que la résistance à l'infection avec les virus influenza est dépendante autant des lymphocytes B1 que des lymphocytes B2. Chez des souris sans anticorps naturels de type IgM, la réponse en IgG_{2a} T-dépendante est retardée et la mortalité est accrue. Les auteurs concluent que les anticorps naturels de type IgM sont nécessaires pour une réponse adaptative au virus influenza (Baumgarth et al., 2000).

La protection antivirale des anticorps naturels peut se faire par différents mécanismes. Premièrement, certains anticorps de type IgM spécifiques peuvent directement neutraliser des virus comme VSV (Gobet et al., 1988; Ochsenbein et al., 1999). Deuxièmement, puisque la molécule d'IgM est pentamérique, elle peut former un large complexe antigène-anticorps (complexe immun), en fixant jusqu'à dix déterminants antigéniques par molécule, ce qui est très efficace pour retenir les antigènes à la rate (Lutz, 1999). Ce processus contrôle la dissémination des virus cytopathogènes comme VSV dans le sang, prévient l'infection des organes périphériques et induit plus rapidement la réponse humorale adaptative. Même les agents pathogènes qui sont reconnus comme n'étant pas contrôlés par des anticorps, tels LCMV et *Listeria monocytogenes* sont recrutés précocement aux organes lymphoïdes secondaires par les anticorps naturels (Ochsenbein et al., 1999). Finalement, les anticorps naturels de type IgM sont des activateurs potentiels du déclenchement de la cascade du complément (Carroll, 1998; Fearon and Locksley, 1996). En se fixant aux antigènes, les produits du clivage du complément les concentrent dans la zone marginale de la rate (Ochsenbein et al., 1999; Ochsenbein and Zinkernagel, 2000). Les anticorps naturels jouent donc un rôle important dans l'élimination des agents infectieux du sang et dans leur recrutement aux organes lymphoïdes secondaires, augmentant ainsi leur

présentation. Ils sont un lien important entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

1.8 Modèles viraux

Les virus peuvent être divisés arbitrairement en deux groupes : les virus cytopathogènes et les virus non ou peu cytopathogènes. Les virus cytopathogènes, comme le VSV, le virus influenza et le poliovirus, interfèrent avec les processus cellulaires, ce qui résulte ultimement à la mort de la cellule qu'ils infectent. Ces virus sont capables de tuer leur hôte si le système immunitaire de celui-ci ne contrôle pas la réplication virale rapidement. Le contrôle de l'infection est généralement assuré par une production rapide d'anticorps neutralisants. Les virus non ou peu cytopathogènes ont plutôt évolué de manière à se répliquer à l'intérieur de la cellule hôte sans interférer avec les processus essentiels à sa survie. Ces virus, comme le LCMV, le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de la dengue, induisent plutôt des maladies ou des dommages causés par le propre système immunitaire de l'hôte, notamment par une lyse des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ou par une activation immunitaire chronique. Les anticorps neutralisants sont habituellement détectés tard dans une infection avec un virus non ou peu cytopathogène.

Dans le cadre de ce projet de recherche, trois virus, qui constituent des modèles expérimentaux appropriés ont été utilisés: le VSV-Indiana, le MHV-A59 et le LCMV-WE. Les deux premiers sont cytopathogènes. Par contre, l'apparition des anticorps neutralisants est plus rapide dans le cas du VSV. Le dernier est non-cytopathogène et l'induction de la réponse humorale neutralisante se fait tardivement.

1.8.1 Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)

Le VSV fait partie de la famille *Rhabdoviridae* et du genre *Vesiculovirus*. Les virus de la famille *Rhabdoviridae* sont largement répandus dans la nature et sont connus pour infecter les vertébrés, les invertébrés de même que plusieurs espèces de plantes. Chaque virus de la famille a une large gamme d'hôtes, bien que plusieurs se soient adaptés à un hôte spécifique.

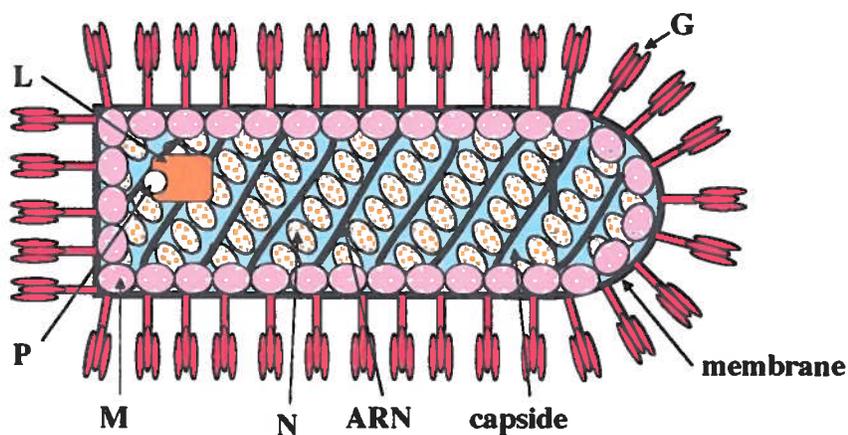


Figure 12 : Représentation schématique du VSV (M=matrice, N=nucléocapside, P=phosphoprotéine, L= protéine large, G=glycoprotéine)

Le VSV est un virus enveloppé à ARN simple brin négatif non-segmenté. Comme montré à la **Figure 12**, les virions sont composés d'une membrane externe, dérivée de la membrane cellulaire, et d'une capsid, qui contient le brin d'ARN génomique négatif de 11,2 kilobases (kb). L'espace entre la membrane et la capsid loge environ 1800 molécules de la protéine virale M (matrice) et environ 1200 molécules de la glycoprotéine G, qui forment un arrangement d'environ 400 spicules trimériques (Doms et al., 1987; Kreis and Lodish, 1986) autour de la membrane externe. Ces spicules sont visibles au microscope électronique (**Figure 13**) puisque la majeure partie des ~500 acides aminés de la glycoprotéine G est exposée à la surface du virion. Les particules virales ont la

forme d'une balle de fusil, caractéristique des rhabdovirus animaux (Jackson et al., 1987).

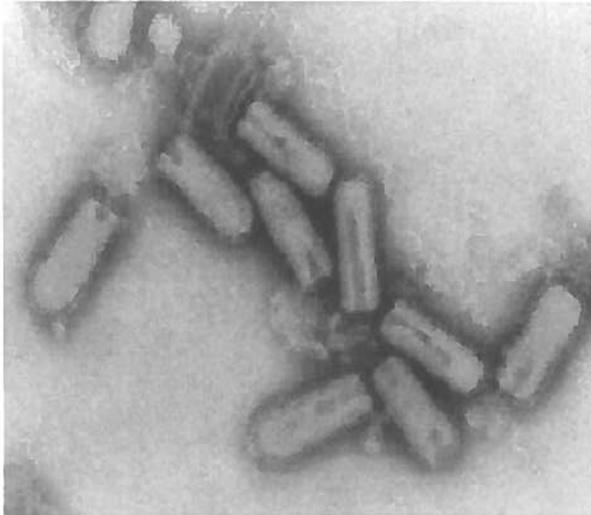


Figure 13 : Microscopie électronique du VSV (Adapté de Rose and Whitt, 2001)

L'ARN génomique de VSV forme un complexe serré avec environ 1200 molécules de la protéine N (nucléocapside), arrangées comme des billes le long de l'ARN. Ce complexe ribonucléoprotéique est enroulé et compacté en une hélice qui fait environ 35 tours à l'intérieur de la capsid. Les deux autres protéines non-structurales, L (*large protein*) et P (*phosphoprotein*), sont associées à la capsid et sont présentes en environ 50 et 500 copies par virion, respectivement. Ces protéines composent l'ARN-polymérase dépendante d'ARN, enzyme essentielle à la réplication virale puisque le génome est de polarité négative (non-codant). La composition des protéines de chaque particule est constante sauf pour la glycoprotéine G, dont la composition varie selon le moment du bourgeonnement des virions dans le cycle de réplication viral. Les particules de VSV produites tôt dans l'infection peuvent avoir trois fois moins de glycoprotéines G par virion que celles produites tard dans l'infection (Lodish and Porter, 1980).

1.8.2 Infection causée par le VSV

Le VSV-Indiana (VSV-IND) et le VSV-New Jersey (VSV-NJ) sont deux sérotypes du virus partageant environ 50% d'identité au niveau de la séquence des acides aminés de la glycoprotéine G (Gallione and Rose, 1983; Rose and Gallione, 1981). La souche Indiana fut la première à être isolée, en 1925 (Cotton, 1927). Ces souches, que l'on retrouve communément en Occident, causent des dommages économiques importants. Le VSV infecte le bétail, les chevaux et les porcs, qui développent la stomatite vésiculaire, maladie caractérisée par des lésions et des vésicules sur la langue, les gencives, les pies et les sabots. Le virus cause une infection aiguë mais il est éliminé rapidement par le système immunitaire de l'hôte et les animaux infectés récupèrent de la maladie en 2 semaines (Letchworth et al., 1999).

La pathogenèse de VSV est intimement liée à la réplication du virus. Une production rapide de nouveaux virions est cruciale dans la dissémination du virus avant que la réponse immunitaire ne se mette en branle et élimine le virus. Une infection avec VSV résulte en une inhibition substantielle de la synthèse des protéines cellulaires en 3 à 4 heures après l'infection (Knipe et al., 1975).

1.8.3 Réponse immunitaire au VSV

Très peu d'études ont été faites sur la réponse immunitaire anti-VSV chez l'hôte naturel. Le virus est éliminé complètement par le système immunitaire chez les animaux de la ferme mais le type de réponse menant à cette élimination n'a pas vraiment été étudié. Les recherches sur l'immunité contre VSV sont plutôt menées sur des modèles animaux, comme la souris, chez qui la pathogenèse est bien différente de celle chez l'hôte naturel. Mais, surtout, VSV a été utilisé abondamment comme modèle de virus cytopathogène pour étudier l'immunité chez la souris (Zinkemagel, 1997).

Lorsque inoculé intranasalement chez des souris comme les souches C57BL/6 ou Balb/c, le virus peut infecter le cerveau et causer une paralysie progressive (Bachmann et al., 1994; Lefrancois, 1984) jusqu'à une encéphalite létale (Huneycutt et al., 1993; Reiss et al., 1998). La réponse immunitaire contre VSV est rapide chez la souris (Bachmann et al., 1996). En effet, l'infection induit une production rapide (3 à 5 jours) d'anticorps neutralisants de type IgM indépendante de l'aide des lymphocytes T_H (Charan et al., 1987), suivie d'une production d'anticorps neutralisants de type IgG dépendante de l'aide des lymphocytes T_H (6 à 8 jours) (Leist et al., 1987). La réponse humorale est cruciale dans l'immunité contre VSV et les anticorps neutralisants peuvent rester présents plus de 6 mois chez l'animal (Leist et al., 1987). Tous les anticorps neutralisants sont spécifiques à la glycoprotéine G (Kalinke et al., 1996; Kelley et al., 1972; Roost et al., 1995; Roost et al., 1996). L'induction d'IgM indépendante de l'aide des lymphocytes T_H est reliée à l'arrangement dense et répétitif de l'épitope à la surface de l'enveloppe du virus (Bachmann et al., 1995).

1.8.4 Virus de l'hépatite murine (MHV- *murine hepatitis virus*)

Le MHV est un membre du genre coronavirus, appartenant à la famille *Coronaviridae* avec le genre torovirus. Les coronavirus sont de larges virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive qui causent de fréquentes affections chez l'humain et les animaux. Ils ont le plus grand génome de tous les virus à ARN (27 à 32 kilobases) et se répliquent par un mécanisme unique qui résulte en une grande fréquence de recombinaison (revu par Lai et Holmes, 1996).

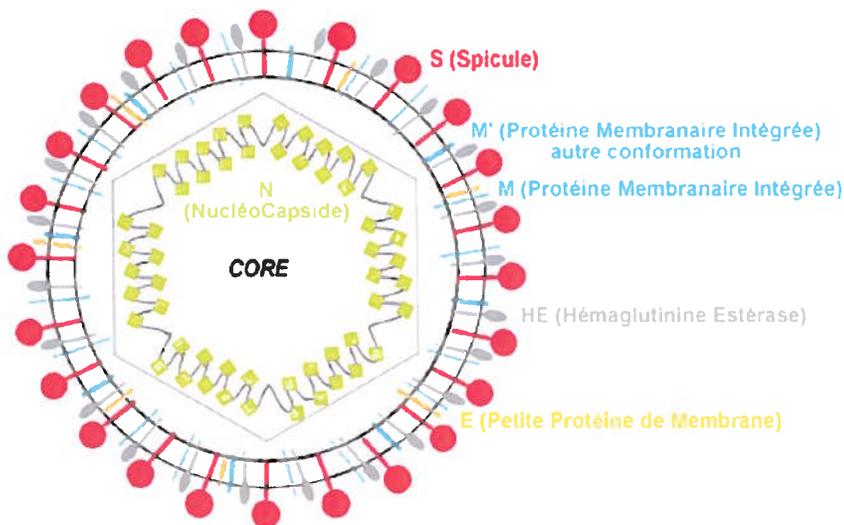


Figure 14 : Représentation schématique du MHV (Adapté de Luis ENJUANES, Departement of Molecular and Cell Biology, CNB, Campus Universidad Autonoma Cantoblanco, Madrid, Espagne <http://virologie.free.fr/34-Coronaviridae/coronaviridae.htm>)

Les virions de MHV, représentés schématiquement à la **Figure 14** sont des particules sphériques enveloppées d'environ 100 à 120 nanomètre (nm) parsemées de pointes qui donne au virus son apparence d'une couronne (d'où le nom *corona*, «couronne» en latin) (Lai and Cavanagh, 1997). Les molécules de la glycoprotéine S (spicule) forment les longues pointes alors que les pointes plus courtes sont formées par la glycoprotéine HE (héماغlutinine-estérase). L'enveloppe contient aussi la protéine E (enveloppe) et la glycoprotéine M (membrane), qui traverse la bicouche lipidique jusqu'à la capsidie (core) (Machamer and Rose, 1987). Le génome, associé à la phosphoprotéine N (nucléocapsidie), forme une longue hélice flexible à l'intérieure de la capsidie (Macneughton and Davies, 1978; Sturman et al., 1980).

La glycoprotéine S a plusieurs fonctions biologiques importantes. Durant l'infection, elle se lie aux récepteurs cellulaires, induit la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte, contrôle l'entrée du virus dans la cellule

et est responsable de l'effet cytopathogène (Lai and Cavanagh, 1997). Parfois, elle peut aussi induire des fusions entre cellules. Durant ou après la maturation virale, la protéine S est clivée par des protéases cellulaires en protéines S1 et S2. Ce clivage a pour effet d'augmenter l'activité de fusion cellulaire ou la pathogénicité du virus (Gombold et al., 1993; Sturman et al., 1985).

1.8.5 Infection causée par le MHV

La plupart des coronavirus infectent seulement une espèce animale ou un nombre limité d'espèces reliées. Les différentes souches de MHV infectent les cellules épithéliales thymiques, les oligodendrocytes, les astrocytes, les neurones, les hépatocytes, les macrophages et les cellules endothéliales (Matthews et al., 2002) et causent des affections respiratoires, entériques, hépatiques et neurologiques chez la souris (Barthold et al., 1993). Le déterminant majeur du tropisme cellulaire du virus est la protéine S (Navas et al., 2001; Phillips et al., 1999).

La souche MHV-JHM a été isolée en 1947 à l'école médicale de Harvard à partir de cerveaux de souris paralysées (Cheever et al., 1949). Plusieurs souches ont été isolées depuis, dont la souche MHV-A59, isolée à partir d'une souris atteinte d'une hépatite aiguë (Manaker et al., 1961). Cette souche cause à la fois des affections au foie et au cerveau et est souvent utilisée comme modèle de virus neuroinvasif (Talbot et al., 2001). Suite à une injection intracérébrale ou intranasale, le MHV-A59 pénètre dans le cerveau et cause une encéphalite alors que l'infection au foie survient quelque soit la voie d'injection (Lavi et al., 1986).

1.8.6 Réponse immunitaire au MHV

L'infection par MHV est d'abord contrôlée par les lymphocytes T cytotoxiques *via* différents mécanismes, soit par l'action lytique de la perforine, par l'apoptose induite par Fas-ligand ou par la sécrétion de cytokines comme l'interféron-gamma et le TNF-alpha (facteur de nécrose tumoral- *tumoral necrosis factor*) (Kajino et

al., 1998). Les CTL sont nécessaires dans le contrôle de l'infection du système nerveux central (Gombold et al., 1995; Stohlman et al., 1995; Sutherland et al., 1997). Le virus MHV induit une production d'anticorps neutralisants environ 7 jours post-infection et les titres en anticorps atteignent leurs maximaux entre 14 et 56 jours post-infection (Lavi et al., 1984). Ces anticorps, dont la cible est la protéine S, préviennent surtout une réémergence du virus (Marten et al., 2001) et contrôlèrent la réplication virale au niveau du système nerveux central (Matthews et al., 2001). Au niveau du foie, les anticorps ne sont pas essentiels à l'élimination du virus mais les anticorps préexistants peuvent protéger contre des infections létales et diminuer les dommages en contrôlant le titre viral (Buchmeier et al., 1984).

1.8.7 Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV-*lymphocytic choriomeningitis virus*)

Le LCMV, découvert en 1933, est le premier virus de la famille *Arenaviridae* à avoir été isolé (Armstrong and Lillie, 1934). Les arenavirus causent des infections chroniques, souvent asymptomatiques, chez les rongeurs d'Europe, d'Afrique et des Amériques. Les humains peuvent être infectés lorsqu'ils sont en contact avec des excréments de rongeurs infectés par des arenavirus et développer des symptômes associés à une encéphalite, à une méningite ou à une fièvre hémorragique (Buchmeier et al., 1980).

La famille *Arenaviridae* ne contient que le genre *Arenavirus*, qui peut être divisé en deux groupes antigéniques, soit celui de l'Ancien Monde, dont fait parti le LCMV, et celui du Nouveau Monde.

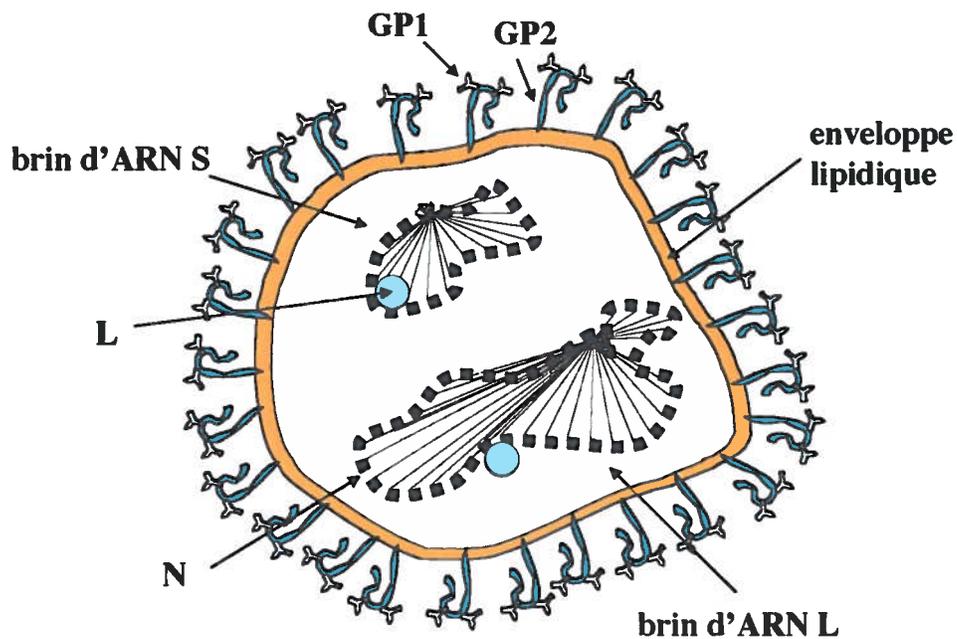


Figure 15 : Représentation schématique du LCMV (L= polymérase virale, N=nucléoprotéine, GP1= glycoprotéine 1, GP2= glycoprotéine 2, brin d'ARN S= brin *small*, brin d'ARN L= brin *large*)

Le LCMV est un virus non-cytopathogène pléomorphe enveloppé à ARN bisegmenté ambisens (Iapalucci et al., 1989), tel que représenté à la **Figure 15**. Il est relâché des cellules par bourgeonnement de la membrane plasmique. Le génome consiste en deux segments d'ARN simple brin désignés S (*small*) et L (*large*). Le ratio molaire de S par rapport à L est d'environ 2 pour 1. Le segment S contient deux gènes qui codent pour la nucléoprotéine NP et les glycoprotéines GP1 et GP2, qui sont d'abord exprimées en précurseur (GPC) avant le clivage post-traductionnel (Buchmeier et al., 1987). Le segment L, quant à lui, code pour deux protéines, la polymérase virale L et la protéine Z (*zinc motif finger*), dont la fonction semble être liée à la régulation de la transcription (Lee et al., 2000).

La surface des virions, qui font de 50 à 300 nm de diamètre, est parsemée de projections formées par des complexes tétramériques des glycoprotéines virales

GPI et GP2 (Burns and Buchmeier, 1991). Les deux glycoprotéines sont présentes en quantité équimolaire à la surface des virions. La protéine structurale majeure est la NP qui s'associe avec l'ARN viral pour former une structure en forme de perle.

1.8.8 Infection causée par le LCMV

L'infection causée par le LCMV et les autres arenavirus est persistante tant chez l'hôte naturel que *in vitro*. La persistance *in vivo* est due à une combinaison de mécanismes de biologie moléculaire et à une incapacité du système immunitaire de l'hôte à éliminer le virus tandis que la persistance *in vitro* est due à une réduction de l'expression des gènes viraux et de la réplication. Mais, tant chez la souris qu'en culture cellulaire, la persistance dépend d'une régulation à la baisse de l'expression des glycoprotéines virales (Bruns et al., 1990).

L'infection par LCMV chez la souris de laboratoire cause une infection chronique, une infection aiguë ou la mort. Les symptômes cliniques conduisent habituellement à une méningite. À l'occasion, des affections au système nerveux central plus sévères, comme une hydroencéphalite, peuvent survenir lors d'une infection aiguë (Armstrong and Lillie, 1934). Quelle que soit la route d'infection, les macrophages sont habituellement les cellules initialement infectées. Lorsque l'infection se répand, d'autres cellules deviennent infectées, comme les cellules épithéliales et les cellules de la zone marginale de la rate. Une nécrose des follicules lymphoïdes de la rate et des ganglions est souvent observée, ce qui induit la destruction des cellules présentatrices d'antigènes par les lymphocytes T cytotoxiques et empêche une réponse immunitaire efficace (Gonzalez et al., 1980; Mims and Tosolini, 1969; Odermatt et al., 1991; Walker et al., 1982).

1.8.9 Réponse immunitaire au LCMV

La réponse immunitaire murine contre le LCMV peut être à la fois protectrice et délétère; elle illustre bien la balance entre la protection immunitaire et l'immunopathologie. C'est l'action des CTL avec une libération de perforine qui est en jeu dans le contrôle de l'infection par LCMV (Kagi et al., 1994; Zinkernagel et al., 1985), mais les lymphocytes T sont aussi responsables de l'induction de dysfonction de la barrière hémato-encéphalique en attaquant les cellules infectées de cette région (Andersen et al., 1991; Buchmeier et al., 1980; Walker et al., 1975).

Une forte réponse d'anticorps spécifiques à la nucléoprotéine NP de LCMV apparaît environ 8 jours après l'infection (Battegay et al., 1993), mais ces anticorps ne semblent pas jouer un rôle dans le contrôle de l'infection aiguë puisqu'ils ne sont pas neutralisants (Cerny et al., 1988; Kimmig and Lehmann-Grube, 1979; Moskopididis et al., 1987). Ce n'est que plus tard, entre les jours 30 à 60 post-infection (Battegay et al., 1993; Bruns et al., 1983; Buchmeier et al., 1981), que des anticorps neutralisants spécifiques de la glycoprotéine GP1 apparaissent (Pinschewer et al., 2004). Ces anticorps semblent jouer un rôle dans la protection contre une réinfection (Baldrige and Buchmeier, 1992; Seiler et al., 1998a; Wright and Buchmeier, 1991). *In vitro*, les anticorps préviennent l'attachement du virus aux cellules hôtes (Borrow and Oldstone, 1992).

Même si les anticorps ne jouent pas un rôle significatif dans le contrôle de l'infection, leur importance dans la résistance au LCMV ne devrait pas être sous-estimée. En effet, un transfert passif d'anticorps monoclonaux anti-LCMV avant l'infection et jusqu'à deux jours post-infection protège les souris contre une chorioméningite létale en diminuant la charge virale dans les tissus, dont le cerveau, et en atténuant la réponse CTL (Ferrantelli et al., 2002; Seiler et al., 1998b; Wright and Buchmeier, 1991). De plus, une étude a montré qu'une souris transgénique (la souris H25) exprimant la chaîne lourde μ de l'anticorps

monoclonal KL25 anti-LCMV a développé une réponse humorale neutralisante en seulement 8 jours post-infection. Cette induction précoce d'IgM neutralisantes a significativement augmenté la capacité de la souris transgénique H25 à éliminer le virus et à être protégée contre l'immunopathologie suite à l'injection intracérébral du virus (Seiler et al., 1998b).

2.0 Matériel et méthodes

2.1 Lignées cellulaires

La lignée cellulaire Vero a été isolée à partir de reins de singes verts africains adultes (*Cercopithecus aethios*) en 1962 par Y. Yasumura et Y. Kawakita à l'Université Chiba au Japon. La lignée cellulaire MC57G est un fibrosarcome isolé d'une tumeur chez une souris C57BL/6 après traitement au méthylcholanthrène. D'autre part, la lignée BHK-21 (*baby hamster kidney*) a été isolée en 1961 à partir de reins de hamsters nouveau-nés par I.A Macpherson et M.G.P Stoker. La lignée L929 est dérivée de tissu connectif sous-cutané de souris C3H/An. Toutes ces lignées proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). La lignée cellulaire DBT (*delayed brain tumor*) a été établie à partir d'une tumeur cervicale d'une souris CD1 inoculée avec la souche Schmidt-Ruppin du virus du sarcome de Rous. Cette lignée a été obtenue du Dr. Michael Buchmeier du Scripps Research Institute de La Jolla (CA, USA) et fournie par le Dr. Pierre Talbot (INRS-Institut Armand-Frappier). Toutes les lignées ont été cultivées dans le milieu MEM (*Earle's Modified Essential Medium*) (Invitrogen, Burlington, Ontario) additionné de 5% (volume/volume, v/v) de sérum de bovin fœtal décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C (SBF) (Wysent, St-Bruno, Québec).

2.2 Production virale

2.2.1 Production du virus de la stomatite vésiculaire sérotype Indiana (VSV-IND)

Le virus VSV-IND a été produit sur des cellules BHK. Les cellules ont été cultivées jusqu'à une confluence de 50% dans le milieu MEM à 5% (v/v) de SBF. Les flacons ont été vidés du milieu jusqu'à ce qu'il ne reste que 5 millilitres (mL)

puis les cellules ont été infectées avec VSV-IND (fourni par le Dr. Rolf Zinkernagel, Institut of Experimental Immunology, Zurich, Suisse) à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 et laissées à température de la pièce (TP) pendant 2 heures. Les flacons ont ensuite été remplis de milieu MEM (environ 40 mL ont été ajoutés) et incubés 24 heures à 37 °C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de CO₂. Les surnageants ont été collectés, centrifugés à 2000 tours/minute pendant 30 minutes à 4°C (Sorvall Legend RT, Mandel, Guelph, Ontario), aliquotés et congelés à -80°C. Le dosage des particules infectieuses par test de plages est décrit à la section 2.3.1.

2.2.2 Production du virus de l'hépatite murine sérotype A59 (MHV-A59)

Le virus MHV-A59 a été produit sur des cellules DBT cultivées dans le milieu MEM à 5% (v/v) de SBF. Les cellules ont été infectées à une confluence de 90% avec MHV-A59 (passage 4, fourni par le Dr. Pierre Talbot, INRS-Institut Armand-Frappier) à une MOI de 0,0001. Les cellules ont été mises en contact avec le virus dans un volume minimal pendant 1 heure à 37 °C à une atmosphère de 5% (v/v) de CO₂, avec agitation manuelle aux 10 minutes. Ensuite, 12 mL de milieu MEM contenant 1% (v/v) de SBF ont été ajoutés à chaque flacon et l'incubation a été poursuivie durant 24 heures. Les surnageants ont été récoltés et centrifugés pendant 20 minutes à 2500 tours/minute. Le virus ainsi produit est issu du cinquième passage sur les cellules DBT. Il a été aliquoté et conservé à -80°C. Le dosage des particules infectieuses par un test de plages est décrit à la section 2.3.1.

2.2.3 Production du virus de la chorioméningite lymphocytaire sérotype WE (LCMV-WE)

Le virus LCMV-WE a été produit sur des cellules L929 cultivées jusqu'à une confluence de 80% dans le milieu MEM à 5% (v/v) de SBF. Les flacons ont été vidés du milieu et 5 mL de milieu MEM frais contenant le virus LCMV-WE (fourni par le Dr. Rolf Zinkernagel, Institut of Experimental Immunology, Zurich, Suisse) à une MOI de 0,01 ont été ajoutés. Les flacons ont été incubés 1 heure à température de la pièce avec agitation manuelle aux 10 minutes puis 20 mL de milieu MEM ont été ajoutés par flacon. L'incubation s'est poursuivie durant 48 heures dans l'incubateur à 37 °C contenant une atmosphère de 5% (v/v) de CO₂ puis les surnageants ont été récoltés et aliquotés. Du milieu MEM frais a de nouveau été ajouté et l'incubation a été prolongée de 24 heures. Les surnageants ont de nouveau été récoltés et aliquotés. Le dosage des particules infectieuses des deux fractions (48 heures et 72 heures) par un test de foyers infectieux est décrit à la section 2.3.2.

2.3 Titrage des virus

2.3.1 Titrage de VSV-IND et MHV-A59

Les dosages des titres infectieux de VSV-IND et de MHV-A59 ont été réalisés par la même méthode, soit par un test de plages de lyse. Le test est effectué sur des cellules Vero pour VSV-IND et sur des cellules DBT pour MHV-A59. Les cellules ont d'abord été cultivées jusqu'à confluence dans des plateaux de 24 puits (Corning, New York, USA). Les échantillons viraux ont été immergés dans un bain sonicateur durant 15 secondes, pour dissocier les agrégats, et dilués à différentes concentrations dans un plateau de 96 puits à fonds ronds (Corning) dans du MEM à 2% (v/v) de SBF. Le milieu des plateaux de 24 puits a été aspiré sous vide et 0,16 mL des dilutions préparées ont été ajoutés aux puits. Les plateaux ont été incubés 1 heure à 37°C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de CO₂ avec agitation manuelle aux 15 minutes. Puis, deux gouttes (environ 0,2

mL) d'une solution de méthylcellulose/MEM¹ ont été déposées par puit à l'aide d'une pipette de 10 mL (l'inoculum de MHV-A59 a d'abord été aspiré des puits). Les plateaux ont été à nouveau incubés à 37°C. Après 24 heures pour VSV-IND et 48 heures pour MHV-A59, la solution de méthylcellulose/MEM a été aspirée et les cellules infectées ont été fixées et colorées avec une solution fixateur/colorant² environ 3 heures avant d'être rincées à l'eau du robinet. Les plages de lyses ont été dénombrées afin de déterminer le titre infectieux.

2.3.2 Titrage de LCMV-WE

Le titrage de LCMV-WE a été fait par une méthode de titrage de foyers infectieux sur des cellules MC57G. L'échantillon viral a été dilué à différentes concentrations directement dans un plateau de 24 puits dans du MEM à 2% (v/v) de SBF. Des cellules MC57G, resuspendues dans du MEM à 5% (v/v) de SBF, 2% (v/v) de pénicilline/streptomycine (Invitrogen) et 1% (v/v) de glutamine 100X (Invitrogen), ont été déposées immédiatement après dans les puits. Les plateaux ont été incubés de 4 à 6 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de CO₂, puis 2 gouttes (environ 0,2 mL) de la solution de méthylcellulose/MEM ont été déposées par puit à l'aide d'une pipette de 10 mL. L'incubation s'est poursuivie durant 48 heures. La solution méthylcellulose/MEM a été aspirée et les cellules lavées 2 fois au HBSS (*Hank's Balance Salt Solution*) (Invitrogen) avant d'être fixées 30 minutes à la formaldéhyde 4% (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Toutes les étapes ont été réalisées à TP et les cellules ont été lavées de 3 à 5 fois au tampon phosphate (PBS) entre chaque étape subséquente. Une solution de HBSS contenant 0,5% (v/v) de Triton-X 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a été déposée dans les puits pendant 20 minutes pour perméabiliser les cellules. Afin de bloquer les liaisons non-spécifiques, une solution de PBS contenant 10% (v/v) de SBF a ensuite été ajoutée et laissée de 60 à 90 minutes.

¹ 1% poids/volume (p/v) de méthylcellulose (Sigma, Steinheim, Suisse), 10% v/v MEM 10X (Invitrogen), 5% v/v SBF, 1% Penicillin/Streptomycin 100X (Invitrogen), 0,5% v/v glutamine 100X (Invitrogen), 1,7% v/v bicarbonate de sodium 7,5% (Invitrogen), 35,8% v/v ddH₂O

² 50% v/v EtOH 96%, 0,5% p/v crystal violet, 0,8% p/v NaCl, 45% v/v ddH₂O, 5% formaldéhyde 37%

Puis un premier anticorps, celui de rat anti-LCMV présent dans le surnageant de l'hybridome VL4³, a été mis en contact avec les cellules. Un anticorps secondaire de chèvre anti-rat conjugué à la peroxydase (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) dilué 1:400 dans du HBSS a ensuite été déposé, suivi d'un anticorps tertiaire de porc anti-chèvre conjugué à la peroxydase (Biosource, Camarillo, CA, USA) dilué 1:400 dans du HBSS. Chaque anticorps est incubé individuellement de 60 à 90 minutes. Finalement, un substrat composé de 0,2 M Na₂HPO₄*2 H₂O (Sigma-Aldrich), de 0,1 M de C₆H₅O₇ (Sigma-Aldrich), de 50% de H₂O, de 0,04% (poids/volume, p/v) d'ortho-phenyldiamine (Sigma-Aldrich) et de 0,00004% (v/v) de H₂O₂ 30% (Sigma-Aldrich) est déposé sur les cellules et laissé jusqu'à ce que des foyers d'infection apparaissent sur le feuillet cellulaire, soit environ 30 minutes. Les foyers d'infection sont dénombrés afin de déterminer le titre infectieux.

2.4 Production et purification d'un anticorps monoclonal anti-CD8 dépléteur

L'hybridome de rat YTS 169⁴ a été cultivé dans du milieu RPMI (Invitrogen) à 10% (v/v) de SBF. Le surnageant des cellules a été récolté durant plusieurs semaines à intervalle de 4 à 5 jours. Le surnageant a été passé sur une colonne de protéine G (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) afin d'en purifier les anticorps monoclonaux (AcMo) anti-CD8 sécrétés par l'hybridome YTS 169. Les fractions contenant les AcMo ont ensuite été regroupées et dialysées trois fois contre un volume de 750X de PBS pour échanger le tampon.

L'efficacité de la déplétion des cellules T CD8+ par le AcMo anti-CD8 a été testée en cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) avec des anticorps anti-CD8 marqués à la fluorescéine (BD Biosciences)

³ fourni par le Dr. Rolf Zinkernagel, Institut of Experimental Immunology, Zurich, Suisse cultivé dans le milieu RPMI (Invitrogen) à 10% (v/v) de SBF

⁴ fourni par le Dr. Rolf Zinkernagel, Institut of Experimental Immunology, Zurich, Suisse

sur des cellules de rates de souris C57BL/6 ayant reçu 100 microgramme (μg) de AcMo anti-CD8 trois jours et un jour précédents le prélèvement.

2.5 Infection des souris

2.5.1 Typage des souris HC1

Entre 21 et 31 jours après la naissance, 2 millimètre (mm) de queue étaient coupés sur les souriceaux de la lignée HC1. Chaque échantillon de queue a été incubé durant toute une nuit à 55°C dans un tampon de digestion⁵ contenant la protéinase K (Roche, Mannheim, Allemagne), afin d'extraire l'ADN, puis 10 minutes à 95°C pour inactiver la protéinase K. Les échantillons ont été ensuite centrifugés 10 minutes à 13 000 tours/minute (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, Allemagne). Trois microlitres (μL) de chaque échantillon d'ADN de souris ont été ajoutés au mélange pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (2 μL de tampon PCR 10X, 1,2 μL de MgCl_2 25 millimolaire (mM), 0,5 μL de dNTPs 10 mM, 1 μL d'amorce *Forward* (5' GCCTCAGGAGATGAGCTAGAGC 3') 1:10, 1 μL d'amorce *Reverse* (5' TAGAGACAGCACTGTGCGTTGG 3') 1:10, 0,4 μL de polymérase Taq 5 unités/ μL (Invitrogen) et 11,9 μL de H_2O distillée). Toutes les réactions de PCR ont débuté par une période de 5 minutes à 94°C , ont subi 35 cycles d'élongation et se sont terminées par une période d'élongation de 4 minutes à 72°C . À l'intérieur d'un cycle d'élongation, les périodes de dénaturation, d'appariement et d'élongation étaient toutes de 40 secondes. La température de dénaturation était de 95°C , celle d'appariement de 60°C et celle d'élongation de 72°C .

Quatre microlitres de la réaction PCR ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose à 2% (p/v) et soumis à une électrophorèse de 100 volts pendant environ 45 minutes. Les produits amplifiés ont été détectés avec l'appareil AlphaImager

⁵ 100mM Tris-HCl pH 9, 500mM KCl, 5% NP40, 5% Tween 20 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)

3400 (AlphaInnovatech, San Leandro, CA, USA). L'apparition d'une unique bande représentant un fragment de 171 pb confirme que la souris analysée possède le transgène HC1 dans son génome.

2.5.2 Infection par VSV-IND

Dans un premier temps, des souris C57BL/6 (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec), QM⁶, HC1⁶ et AID^{-/-6} ont été infectées par voie intraveineuse (iv) avec une forte dose de VSV-IND, soit 2×10^8 unités formatrice de plages (u_{fp}) dans un volume de 0,2 mL. À 1 heure, 2 heures, 5 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures post-infection (p-i), des prélèvements sanguins ont été effectués dans le but de déterminer le titre viral dans le sang puis les souris ont été sacrifiées par inhalation de CO₂. Le grand lobe du foie, la rate et les reins ont été prélevés dans le même but. Les organes prélevés ont été conservés intacts à -80°C jusqu'au moment du titrage. Avant le titrage, les organes ont été homogénéisés sur glace au Polytron (Kinematica AG, Luzerne, Suisse) dans du milieu MEM (1 mL pour la rate, 2 mL pour le foie et les reins) puis centrifugés 2 fois pendant 10 minutes à 1500 tours/minute. Le titre de VSV-IND dans le surnageant des organes et dans le sang a été déterminé par un test de plages de lyse tel que décrit à la section 2.3.1.

Dans un deuxième temps, des souris C57BL/6, HC1, QM et AID^{-/-} ont été infectées par voie iv avec 0,2 mL de solution virale de VSV-IND à différentes doses infectieuses. L'état et la survie des souris ont été évalués quotidiennement, de même que toutes les souris dans les infections décrites plus bas. Les souris présentant les points limites suivants ont été euthanasiées : perte massive de poids et poils ébouriffés (souris moribonde), perte de mobilité des membres inférieurs et réflexe de retournement lent ou paralysie des membres inférieurs.

⁶ fournies par le Dr. Rolf Zinkernagel, Institut of Experimental Immunology, Zurich, Suisse

Afin d'évaluer l'apparition d'anticorps anti-VSV-IND neutralisants, des échantillons sanguins ont été récoltés aux jours 0, 4, 8, 12, 20 et 40 post-infection par le sinus rétro-orbital à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Les souris étaient préalablement anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Baxter, Mississauga, Ontario).

2.5.3 Infection par MHV-A59

Des souris C57BL/6, HC1, QM et AID^{-/-} et des souris C57BL/6 et QM déplétées en cellules T CD8⁺ ont été infectées par voie iv avec 0,2 mL de solution virale de MHV-A59 à différentes doses infectieuses. Pour dépler les souris C57BL/6 et QM, 100 µg de l'anticorps monoclonal anti-CD8 provenant de l'hybridome YTS 169 ont été injectés par voie intrapéritonéale (ip) trois jours et un jour précédents l'infection. Afin de détecter la présence d'anticorps anti-MHV-A59 neutralisants et spécifiques, des échantillons sanguins ont été récoltés aux jours 0, 4, 8, 12, 20 et 40 p-i.

2.5.3 Infection par LCMV-WE

Des souris C57BL/6, HC1, QM et AID^{-/-} ont été infectées par voie iv avec 0,2 mL de solution virale de LCMV-WE à 2×10^4 uff (unité formatrice de foyer infectieux). Des échantillons sanguins ont été récoltés aux jours 0, 30, 60, 90 et 120 post-infection dans le but de détecter des anticorps anti-LCMV neutralisants.

2.6 Tests de neutralisation des anticorps

2.6.1 Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-VSV-IND et anti-MHV-A59 dans les sérums des souris infectées

Des plateaux de 96 puits à fonds plats (Corning) de cellules Vero dans du MEM à 5% (v/v) de SBF ont été préparés 24 heures à l'avance pour le test de neutralisation de VSV-IND, alors que des plateaux de 24 puits de cellules DBT dans du milieu MEM à 10% (v/v) de SBF ont été préparés 48 heures à l'avance pour le test de neutralisation de MHV-A59. Les cellules étaient confluentes lors du test.

Les échantillons sanguins récoltés aux jours 0, 4, 8, 12, 20 et 40 p-i chez les différentes souris ont été centrifugés à 3000 tours/minute pendant 10 minutes immédiatement après les prélèvements. Les sérums, préservés à -20°C , ont été dilués 1:40 dans du MEM à 2% (v/v) de SBF. Pour les échantillons des jours 8, 12, 20 et 40 p-i, 20 μL du sérum ont préalablement été déplétés en IgM, en les mettant en contact avec 20 μL de β -Mercaptoéthanol 0.1M (Bio-Rad) pendant 1 heure à TP. Après la dilution 1:40, tous les échantillons (ceux contenant les immunoglobulines totales – non traités au β -Mercaptoéthanol - et ceux contenant que les IgG) ont été décomplémentés dans un bain à 56°C pendant 30 minutes.

Des dilutions successives d'un facteur 2 des échantillons ont été effectuées dans un plateau de 96 puits à fonds ronds dans du MEM à 2% (v/v) de SBF. Chaque dilution a ensuite été mise en contact dans une proportion de 1:1 avec une dilution de VSV-IND ou de MHV-A59 selon le cas. (Les échantillons viraux ont d'abord été immergés dans un bain sonicateur durant 15 secondes pour séparer les agrégats.) Les plateaux ont été incubés pendant 90 minutes (60 minutes pour MHV-A59) à 37°C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de CO_2 pour permettre la neutralisation du virus par les anticorps présents dans le sérum, puis les mélanges sérum-virus ont été déposés sur les tapis cellulaires. Après une

heure d'incubation dans les mêmes conditions que la neutralisation, deux gouttes (environ 0,2 mL) de solution de méthylcellulose/MEM ont été déposées par puit à l'aide d'une pipette de 10 mL (l'inoculum de sérum-MHV-A59 a d'abord été enlevé des puits). Les plateaux ont été à nouveau incubés. Après 24 heures pour VSV-IND et après 48 heures pour MHV-A59, la solution de méthylcellulose/MEM a été enlevée et les cellules infectées ont été fixées et colorées avec la solution fixateur/colorant environ 3 heures avant d'être rincées à l'eau. Les plages de lyses ont été dénombrées afin de déterminer le titre neutralisant des anticorps, qui se définit par la plus grande dilution de sérum qui réduit de 50% la quantité de plages dénombrées dans le témoin négatif (virus seul + MEM à 5% (v/v) de SBF).

2.6.2 Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-LCMV-WE dans le sérum des souris infectées

Le test de neutralisation de LCMV-WE se fait par la même méthode que le titrage mais dans des plateaux de 96 puits à fonds plats plutôt que dans des plateaux de 24 puits. Les échantillons de sérum ont été dilués 1:10 dans du MEM à 2% (v/v) de SBF dans la première rangée des plateaux puis directement dilués successivement d'un facteur 2 dans les autres rangées. Une dilution virale de LCMV-WE dans du MEM à 2% (v/v) de SBF a été mise en contact avec les échantillons de sérum et incubée 90 minutes à 37°C dans une atmosphère contenant 5% (v/v) de CO₂. Des cellules MC57G dans du MEM à 5% (v/v) de SFV, 2% de pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine 100X ont ensuite été déposées dans les puits. Après 3 à 4 heures d'incubation dans les mêmes conditions, une goutte (environ 0,05 mL) de la solution méthylcellulose/MEM a été déposée par puit à l'aide d'une pipette de 10 mL. L'incubation a été poursuivie durant 48 heures. Les étapes qui suivent sont identiques à celles décrites pour le titrage de LCMV-WE. Les volumes des solutions sont cependant réduits puisque le test s'effectue dans un plateau de 96 puits plutôt que dans un plateau de 24 puits. Le titre neutralisant est déterminé par la plus grande dilution

de sérum qui réduit de 50% le nombre de foyers infectieux du témoin négatif (virus seul+ MEM à 2% (v/v) de SBF).

2.7 Test de spécificité des anticorps à MHV-A59 par ELISA

Les antigènes de MHV-A59 ont été préparés sur des cellules L929 et fournis par le Dr. Pierre Talbot, INRS-Institut Armand-Frappier. Les échantillons d'antigènes positif (MHV-A59 + cellules L929) et négatif (cellules L929 seulement) ont été désagrégés 2x30 secondes dans le bain sonicateur et dilués dans du PBS 1X. Dans des plateaux ELISA (Corning) différents, 100 µL de l'une ou l'autre des solutions d'antigène ont été déposés par puit. Les plateaux avec la solution d'antigène positif, de même que ceux avec la solution d'antigène négatif ont été laissés à TP pour la nuit.

Le lendemain, les puits ont été vidés des solutions d'antigènes et le blocage a été réalisé en déposant du diluant ELISA (10% (v/v) de SBF, 0,2% (v/v) de Tween-20 (Bio-Rad), dans du PBS 1X) pour une heure à TP, à raison de 150 µL par puit. Les puits ont été vidés et les échantillons de sérums murins pré-dilués 1:40 ont été déposés dans les puits de la première rangée et dilués en série directement dans les autres rangées, dans du diluant ELISA. Après 90 minutes à TP, les échantillons ont été lavés 5 fois avec du tampon de lavage (Tween-20 à 0,1% (v/v) dans du PBS 1X).

L'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase (Jackson Immunoresearch) pour les souris C57BL/6, QM et AID^{-/-} et anticorps de chèvre anti-humain conjugué à la peroxydase (Jackson Immunoresearch) pour les souris HC1) a été pré-dilué selon les recommandations du manufacturier et déposé à raison de 100µL par puit. Après 90 minutes à TP, l'anticorps secondaire

a été lavé 5 fois avec le tampon de lavage et 100 µL de substrat⁷ ont été déposés par puit et incubés dans l'obscurité. La réaction a été inhibée 30 minutes plus tard par l'ajout de 100µl d'acide chlorhydrique (HCl) 1 normal par puit. L'absorbance de chacun des puits, à une longueur d'onde de 490 nm, a été mesurée avec le lecteur ELISA 680 (Bio-Rad). Le titre en anticorps spécifiques correspond à la plus grande dilution dont la densité optique lue sur l'antigène L929/MHV-A59 (positif) est supérieure ou égale à 3 fois celle lue sur l'antigène L929 (négatif).

⁷ 0,04% (p/v) d'ortho-phenyldiamine (Sigma), 0,000033% (v/v) de H₂O₂ 30% (Sigma) dans tampon citrate pH 5 (1% (p/v) C₆H₈O₇ (Fisher) 1,4 % (p/v) NaH₂PO₄ 2H₂O (USB) dans H₂O distillée

3.0 Résultats

La réponse innée des souris immunodéficientes QM, HC1 et AID^{-/-} a d'abord été analysée en suivant la dissémination de VSV-IND dans le sang et les organes périphériques jusqu'à 48 heures après l'infection (résultats présentés à la section 3.1). La réponse humorale de ces mêmes souris a ensuite été étudiée en déterminant la spécificité des anticorps anti-MHV-A59 (section 3.3.2) et le titre des anticorps neutralisants dans le sérum des souris infectées par VSV-IND (section 3.2.2), MHV-A59 (section 3.3.3) ou LCMV-WE (section 3.4.2). Pour chaque expérience, la souris C57BL/6 a servi de témoin, ce fond génétique étant celui de chacune des lignées de souris transgéniques utilisées dans cette étude.

3.1 Dissémination virale

Des souris C57BL/6, QM, HC1 et AID^{-/-} ont été infectées par voie intraveineuse avec 2×10^8 ufp de VSV-IND. Le recrutement du virus à la rate et sa dissémination dans les organes périphériques ont été mesurés à différents temps après l'infection, soit 1 heure, 2 heures, 5 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures. Le titre viral a été déterminé dans le sang, la rate, le foie et les reins. Ces cinétiques ont été réalisées dans le but de suivre le recrutement du virus à la rate par les anticorps naturels, pour chacune des souris immunodéficientes, et pour comparer la charge virale dans le sang et les organes périphériques entre chaque souris afin d'évaluer l'importance de la diversité du répertoire primaire des anticorps naturels dans ces processus.

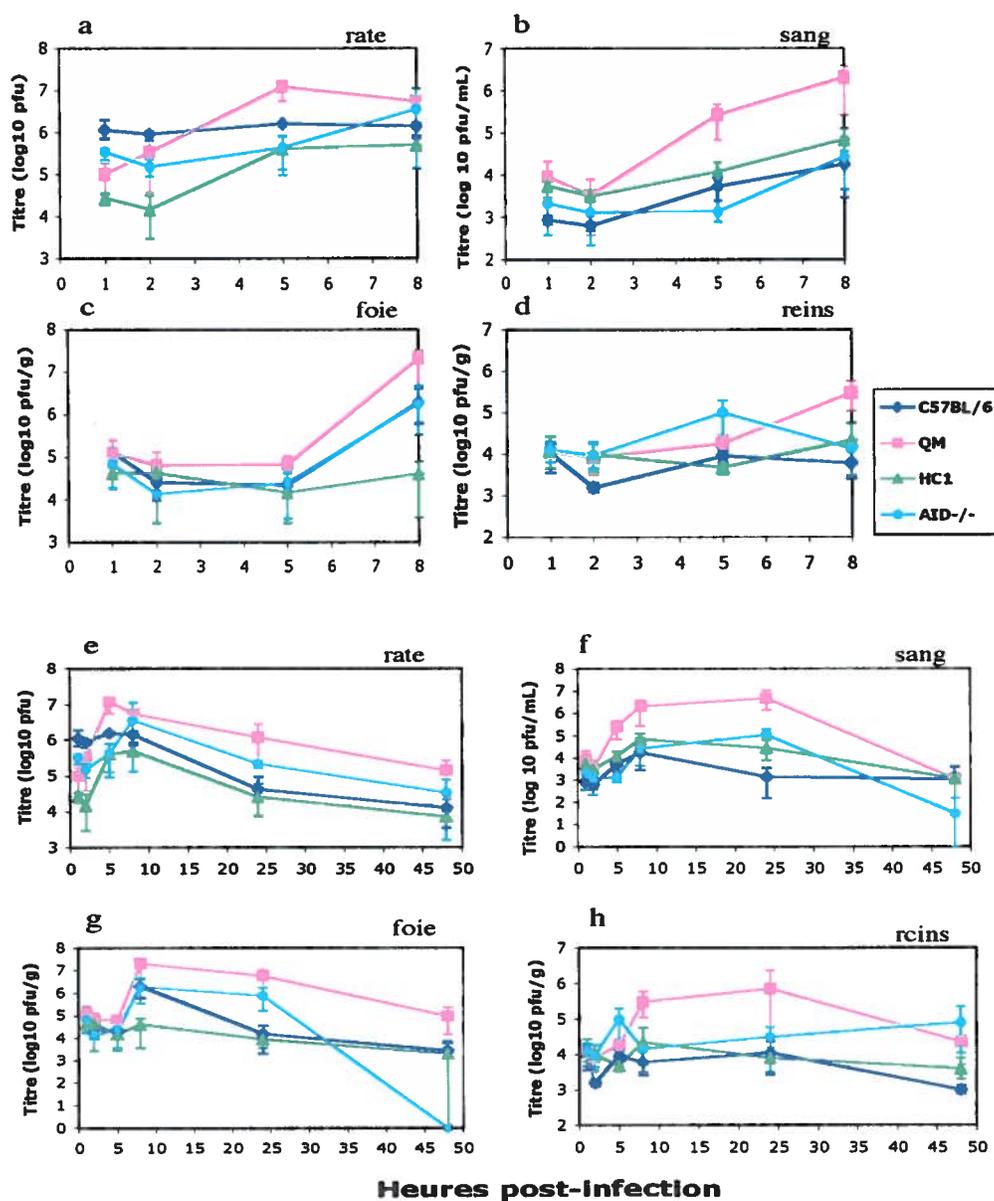


Figure 16 : Dissémination de VSV-IND dans la rate, le sang et les organes périphériques à différents temps post-infection.

Des souris C57BL/6, QM, HC1 et AID^{-/-} ont été infectées par voie intraveineuse avec 2×10^8 ufp de VSV-IND. À chaque temps, 3 souris de chaque groupe ont été sacrifiées et le titre viral a été déterminé par un test de plages de lyse dans a) la rate entre 1 heure et 8 heures; b) le sang entre 1 heure et 8 heures; c) le grand lobe du foie entre 1 heure et 8 heures; d) les reins entre 1 heure et 8 heures; e) la rate entre 1 heure et 48 heures; f) le sang entre 1 heure et 48 heures; g) le grand lobe du foie entre 1 heure et 48 heures; h) les reins entre 1 heure et 48 heures.

3.1.1 Recrutement de VSV-IND à la rate

Dans les huit premières heures suivant l'infection, le titre viral dans la rate des souris C57BL/6 est très stable, alors que les titres chez les souris QM, HC1 et AID^{-/-} varient avec le temps, tel qu'illustré à la **Figure 16a**. Aux toutes premières heures (jusqu'à environ 3 heures post-infection), c'est dans la rate de la souris C57BL/6 que le titre viral est le plus important, alors qu'à 5 heures post-infection, c'est dans la rate de la souris QM que l'on retrouve le plus grand titre. Le titre de la souris QM augmente considérablement entre 1 heure et 5 heures, passant d'environ 100X moins élevé à 100X plus élevé que le titre de la souris C57BL/6. Le titre viral dans la rate de la souris HC1 est nettement plus bas que celui de la souris témoin aux premières heures post-infection mais il s'en rapproche vers 8 heures post-infection sans toutefois l'égaliser. Le titre viral dans la rate de la souris AID^{-/-} est à peu près constant entre 1 heure et 5 heures et est clairement plus bas que celui de la souris C57BL/6, mais il augmente progressivement entre 5 heures et 8 heures pour finalement dépasser celui de la souris témoin. À 8 heures post-infection, les titres chez les quatre souris sont à peu près les mêmes et suivent une même diminution progressive jusqu'à 48 heures post-infection (**Figure 16e**). Le recrutement viral semble donc se faire en majorité dans les huit premières heures après une infection.

La diversité des anticorps naturels semble jouer un rôle dans le recrutement de VSV à la rate. La souris C57BL/6, qui a le répertoire primaire le plus diversifié, montre un titre viral supérieur à celui des souris immunodéficientes dans les premières heures post-infection. Le titre viral le plus bas est observé chez la souris HC1, qui est celle dont le répertoire primaire est le plus limité. La souris AID^{-/-}, qui n'est pas compromise au niveau de son répertoire primaire, mais qui produit uniquement des IgM, a un titre plus élevé que la souris HC1, de même que la souris QM, dont une proportion des lymphocytes B1 ne sont pas limités dans leur diversité. Le fait que la souris AID^{-/-} montre un titre viral plus bas que la souris C57BL/6 pourrait laisser supposer que des anticorps naturels de type IgG

entrent en jeu dans le recrutement de VSV à la rate et/ou que le faible taux d'hypermutations somatiques que subissent les lymphocytes B1 est important dans la réponse innée. L'augmentation du titre viral dans la rate entre 2 heures et 8 heures post-infection chez les souris immunodéficientes montre qu'il y a un recrutement progressif du virus, probablement capturé sous forme de complexes immuns avec les anticorps naturels. Cette augmentation n'est pas observée chez la souris C57BL/6, ce qui laisse croire que ses anticorps naturels circulants sont capables de neutraliser directement le virus.

3.1.2 Charge virale dans le sang

La courbe du titre viral dans le sang de 1 heure à 48 heures post-infection suit sensiblement la même cinétique pour toutes les souris (**Figure 16f**). Les titres viraux augmentent entre 2 heures et 8 heures p-i pour ensuite atteindre un plateau et redescendre entre 24 heures et 48 heures. Chez la souris C57BL/6 cependant, la diminution du titre viral se fait plutôt entre 8 heures et 24 heures p-i et le plateau est atteint entre 24 heures et 48 heures p-i. Les titres viraux dans le sang des souris QM et HC1 sont toujours plus élevés que ceux dans le sang de la souris C57BL/6, alors que ceux de la souris AID^{-/-} et de C57BL/6 sont comparables. L'augmentation observée des titres de VSV dans le sang durant les 5 premières heures n'est probablement pas due à la réplication virale car le virus ne se réplique pas dans ce court laps de temps (Konieczko et al., 1994). L'hypothèse que les virions soient séquestrés dans d'autres organes et redistribués graduellement dans le temps pourrait expliquer que le virus est moins détectable au début de l'infection.

Le fait que le titre viral soit plus faible dans le sang de la souris C57BL/6 et que sa diminution se fasse plus rapidement par rapport aux souris immunodéficientes confirme que la diversité des anticorps naturels a un rôle à jouer dans l'élimination du virus en circulation et dans son recrutement à la rate. Les anticorps naturels ayant un plus grand répertoire primaire neutralisent directement

le virus de manière plus efficace et ont probablement plus de facilité à former des complexes immuns qui seront mieux retenus à la rate, ce qui par conséquent, réduit la charge virale en circulation.

3.1.3 Dissémination de VSV-IND dans les organes

Jusqu'à 5 heures post-infection, les titres viraux dans le foie des souris C57BL/6, QM, HC1 et AID^{-/-} sont sensiblement les mêmes (**Figure 16c**). Entre 5 heures et 8 heures post-infection, il y a une augmentation marquée du titre viral dans le foie sauf chez la souris HC1. Entre 8 heures et 48 heures post-infection, les titres viraux dans le foie diminuent progressivement (**Figure 16g**). Tel que montré à la **Figure 16h**, les titres viraux dans les reins des souris C57BL/6, QM, AID^{-/-} et HC1 subissent quelques variations dans le temps mais sont quand même assez constants entre 1 heure et 48 heures post-infection. L'augmentation observée dans le foie et les reins, après 5 heures post-infection, est probablement due au fait que ces organes filtrent le sang et accumulent le virus qui n'a pas été neutralisé ni recruté à la rate.

En général, c'est chez la souris C57BL/6 que le titre viral dans les reins est le plus faible mais la différence n'est pas très marquée. Aucune corrélation entre la diversité des anticorps naturels et la dissémination virale dans les organes périphériques comme le foie et les reins, n'est évidente lorsqu'on observe les titres chez les souris immunodéficientes et chez la souris de type sauvage puisque les titres viraux sont comparables.

3.2 Réponse humorale à VSV-IND

Les souris C57BL/6, QM, HC1 et AID^{-/-} ont été infectées avec différentes doses de VSV-IND. Le titre en anticorps neutralisants aux jours 4, 8, 12, 20 et 40 post-infection a été déterminé par un test de neutralisation (décrit à la section 2.6.1).

Le but de cette expérience était de comparer la production d'anticorps contre un virus cytopathogène qui induit une réponse rapide d'anticorps neutralisants, et dont la protection est conférée uniquement par les anticorps, entre les souris immunodéficientes et la souris témoin C57BL/6. Nous avons aussi évalué l'influence de la dose virale sur la production d'anticorps neutralisants.

3.2.1 Survie des souris suite à l'infection avec VSV-IND

La mortalité des souris a été rapportée pour comparer la susceptibilité des différentes souris immunodéficientes au virus mais aussi pour évaluer l'influence de la dose virale sur la survie.

À part une seule souris morte⁸ au jour 15 à la dose de 1×10^3 ufp, les souris C57BL/6 ont toutes survécu à l'infection avec VSV-IND (**Figure 17a**). Les souris immunodéficientes sont par contre beaucoup plus susceptibles à cette infection. La mortalité des souris QM et HC1 est directement proportionnelle à la dose virale et la phase critique apparaît entre les jours 6 et 14 (**Figures 17b et 17c**). Les souris HC1 présentent la plus grande susceptibilité au virus car, à forte dose (2×10^6 ufp), aucune souris n'a survécu au delà du jour 12. À 1×10^4 ufp, une seule souris a survécu jusqu'à la fin des 40 jours, de même que pour l'infection avec 1×10^3 ufp (résultat non-montré). Les souris AID^{-/-} sont aussi sensibles à l'infection avec VSV-IND mais le taux de mortalité est moins important que chez la souris QM ou HC1 (**Figure 17d**).

⁸ La «mort des souris» désigne autant l'euthanasie lorsque les souris atteignent les points limites (décrits à la section 2.5.2) que la constatation du décès lorsque celui-ci se produisait entre les périodes d'observation.

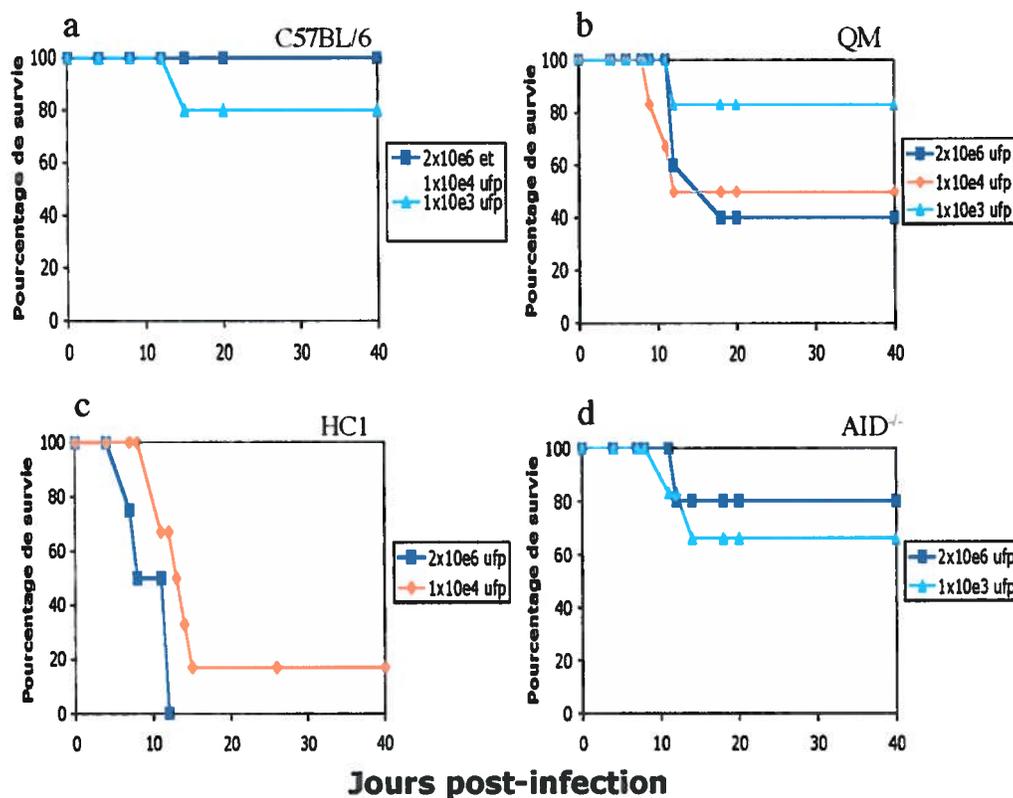


Figure 17 : Survie des souris suite à l'infection avec VSV-IND

Les souris C57BL/6, QM, HC1 et AID^{-/-} ont été infectées par voie intraveineuse avec différentes doses de VSV-IND. Dans chaque groupe, le nombre de souris infectées était de 5 ou de 6. Les points limites et la survie ont été évalués quotidiennement chez a) les souris C57BL/6; b) les souris QM; c) les souris HC1; d) les souris AID^{-/-}.

Une grande diversité du répertoire primaire semble donc être plus importante que l'hypermutation somatique et la permutation isotypique pour une protection contre VSV. Bien qu'avant l'immunisation, la souris QM possède des lymphocytes B qui ont une spécificité autre qu'à l'haptène nitrophényl, la proportion de ces lymphocytes ne semble pas suffisante pour conférer une bonne protection. Durant la réponse immunitaire, les lymphocytes B spécifiques au NP peuvent changer de diversité par des réarrangements secondaires mais ce mécanisme, qui prend un certains temps avant de générer des nouvelles spécificités, n'est pas efficace au point de protéger toutes les souris à des doses

fortes de virus. Donc ces résultats suggèrent que la pleine capacité de diversification du répertoire des lymphocytes B est bénéfique pour une protection complète contre un virus cytopathogène.

3.2.2 Production d'anticorps neutralisant contre VSV-IND

Comme le montre la **Figure 18**, l'apparition d'anticorps neutralisants chez la souris HC1 est retardée de quelques jours par rapport à l'apparition d'anticorps neutralisants chez la souris C57BL/6. Le titre en IgM de la souris HC1 (valeur des Ig totales moins celle des IgG) atteint une valeur maximale au jour 12 et diminue par la suite, mais cette valeur est moins grande que celle du titre des anticorps neutralisants de C57BL/6. Chez la souris HC1, les IgG sont à peine détectables et ce, pas avant le jour 40, alors que chez la souris C57BL/6, la commutation de classe de IgM à IgG est observable dès le jour 8. Le titre en IgM de la souris C57BL/6 diminue à partir du jour 8 alors que celui en IgG augmente entre les jours 8 et 20 pour ensuite atteindre un plateau entre les jours 20 et 40.

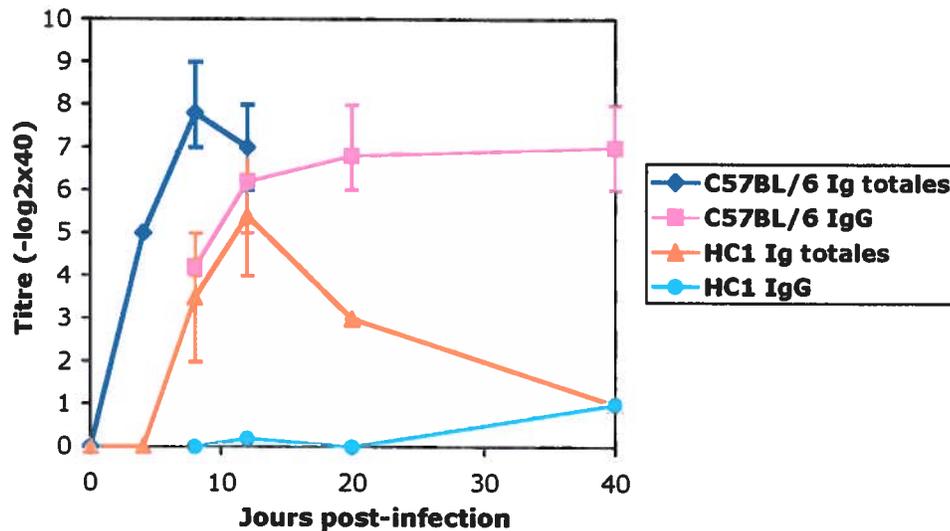


Figure 18 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre VSV-IND chez la souris HC1

Les souris HC1 et C57BL/6 ont été infectées avec 1×10^4 ufp de VSV-IND par voie intraveineuse. Des échantillons sanguins ont été récoltés à différents temps post-infection et les anticorps neutralisants anti-VSV ont été titrés par un test de neutralisation. Les immunoglobulines totales ont été titrées aux jours 0, 4 et 8 alors que les IgG ont été titrées aux jours 8, 12, 20 et 40. Ces résultats sont la moyenne des titres des anticorps anti-VSV-IND neutralisants des souris survivantes dans chaque groupe en fonction du temps.

La souris HC1, malgré son répertoire primaire limité génère donc des IgM neutralisants contre VSV. La diversité de ses anticorps est conférée majoritairement par la région CDR3 de la chaîne lourde, dû au fait qu'elle ne possède qu'une seule région V_H fonctionnelle. De plus, la diversité de la chaîne légère est assez restreinte en raison du nombre limité de segments géniques $V\lambda$ et $J\lambda$. Donc la diversité de la région CDR3 de la chaîne lourde à elle seule est suffisante pour générer des anticorps neutralisants contre VSV. Ces anticorps, bien que neutralisants, n'ont cependant pas une très forte capacité protectrice, probablement en raison du délai de leur apparition. En effet, 80% des souris infectées avec VSV-IND à 1×10^4 ufp sont mortes entre les jours 8 et 15 malgré la présence des anticorps neutralisants anti-VSV.

Chez la souris QM, l'apparition d'anticorps neutralisants est retardée de quelques jours par rapport à la souris C57BL/6 et ce, peu importe la dose virale (Figure 19).

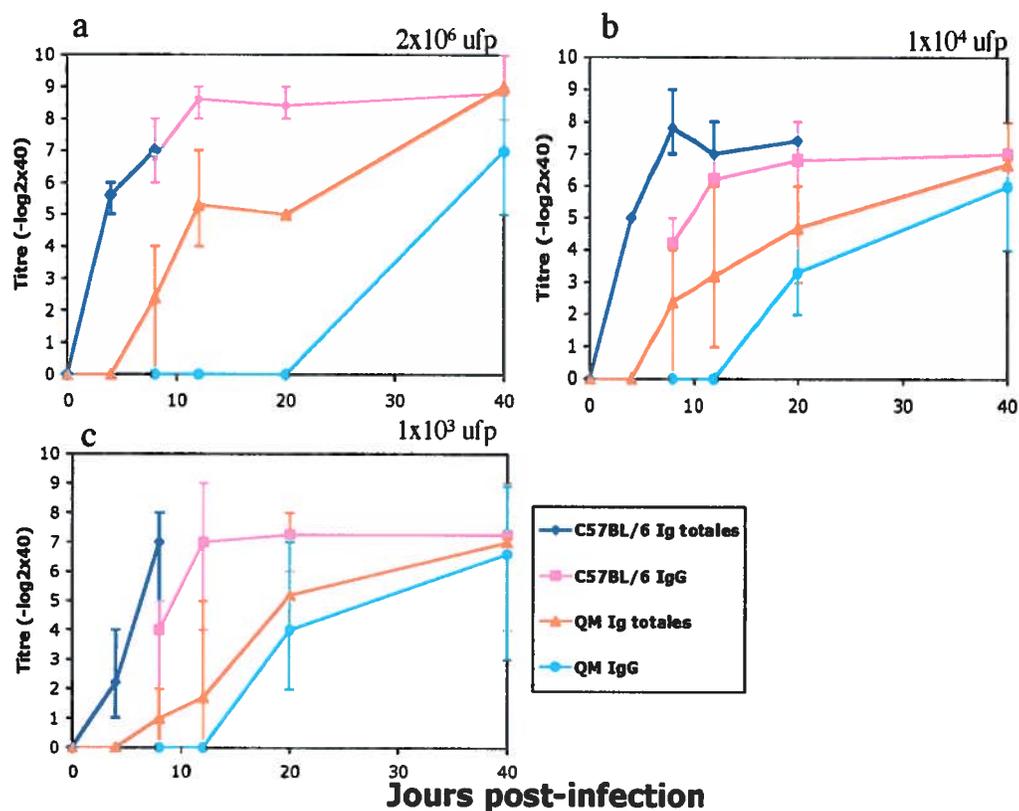


Figure 19 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre VSV-IND chez la souris QM

Les souris QM et C57BL/6 ont été infectées avec a) 2×10^6 ufp; b) 1×10^4 ufp; c) 1×10^3 ufp de VSV-IND par voie intraveineuse. Des échantillons sanguins ont été récoltés à différents temps post-infection et les anticorps neutralisants anti-VSV ont été titrés par un test de neutralisation. Les immunoglobulines totales ont été titrées aux jours 0, 4 et 8 alors que les IgG ont été titrées aux jours 8, 12, 20 et 40. Ces résultats sont la moyenne des titres des anticorps anti-VSV-IND neutralisants des souris survivantes dans chaque groupe en fonction du temps.

Les anticorps neutralisants de la souris QM prennent jusqu'à 40 jours pour atteindre le titre de ceux de la souris C57BL/6. La commutation de classe se fait

aussi plus tardivement comparée à la souris C57BL/6. À 2×10^6 ufp, la commutation de classe n'est pas encore observable au jour 20 chez la souris QM, cependant, elle l'est aux doses plus faibles, soit 1×10^4 et 1×10^3 ufp. La dose virale a donc un effet sur la commutation de classe, probablement à cause d'une plus grande pression sélective, ce qui a directement un effet sur la survie des souris. En effet, il est intéressant de noter que la commutation de classe corrèle avec la survie des souris puisque dès que la commutation de classe survient, les souris survivent. Finalement, la cinétique du titre en anticorps neutralisants des deux types de souris est très similaire peu importe la dose virale et il y a une légère diminution du titre en fonction de la dose virale et ce, autant chez la souris C57BL/6 que chez la souris QM.

La souris QM, qui a été modifiée génétiquement pour que ses lymphocytes B soient spécifiques au nitrophényl, génère des anticorps neutralisants contre VSV-IND. Une proportion des lymphocytes spécifiques au virus provient possiblement des 20% des lymphocytes B qui présentent une spécificité autre qu'au NP avant immunisation mais la majorité des anticorps neutralisants sont sûrement générés suite à une révision du récepteur lors de la réponse immunitaire, tel qu'observé précédemment (Lopez-Macias et al., 1999). Comme ce processus prend un certain temps avant de générer une nouvelle spécificité, il est normal qu'on observe ce décalage dans l'apparition des anticorps entre les deux souris. Mais on peut tout de même constater que les réarrangements secondaires sont suffisants pour générer des anticorps neutralisants et protecteurs.

Tel qu'illustré par la **Figure 20**, les anticorps neutralisants de type IgM de la souris $AID^{-/-}$ apparaissent en même temps que les anticorps neutralisants de la souris C57BL/6. La dose virale est cependant très déterminante dans le titre neutralisant. Alors que chez la souris C57BL/6, une légère diminution du titre en fonction de la dose virale est observable, c'est une diminution très marquée qui survient chez la souris $AID^{-/-}$ lorsqu'on passe de l'infection avec 2×10^6 ufp à celle avec 1×10^3 ufp. À la plus forte dose, la valeur du titre en IgM neutralisantes de la

souris $AID^{-/-}$ atteint celle des IgG de la souris C57BL/6 et diminue quelque peu à partir du jour 8 pour atteindre un plateau entre les jours 20 et 40. On observe le même plateau lors de l'infection avec 1×10^3 ufp.

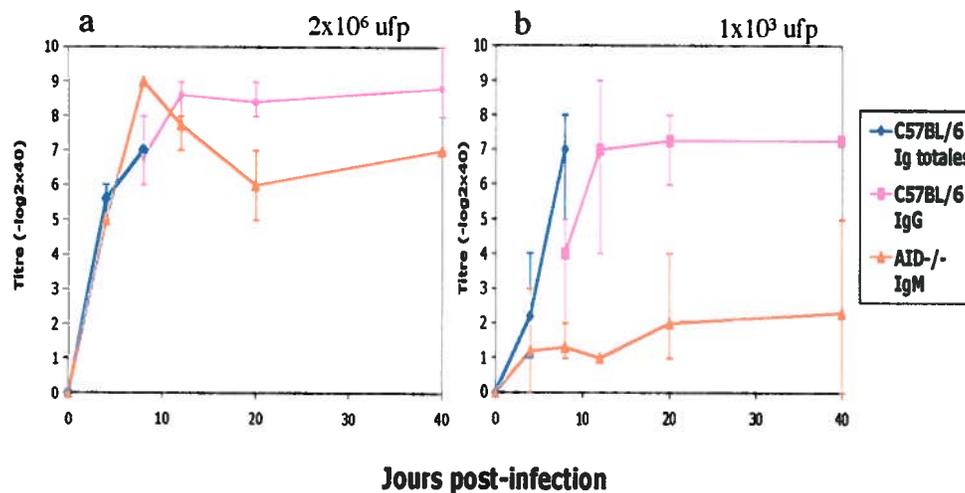


Figure 20 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre VSV-IND chez la souris $AID^{-/-}$

Les souris $AID^{-/-}$ et C57BL/6 ont été infectées avec a) 2×10^6 ufp; b) 1×10^3 ufp de VSV-IND par voie intraveineuse. Des échantillons sanguins ont été récoltés à différents temps post-infection et les anticorps neutralisants anti-VSV ont été titrés par un test de neutralisation. Les immunoglobulines totales ont été titrées aux jours 0, 4 et 8 alors que les IgG ont été titrées aux jours 8, 12, 20 et 40. Ces résultats sont la moyenne des titres des anticorps anti-VSV-IND neutralisants des souris survivantes dans chaque groupe en fonction du temps.

La souris $AID^{-/-}$ produit des anticorps neutralisants et protecteurs contre VSV-IND, malgré le fait que ses lymphocytes B ne subissent pas d'hypermutation somatique ni de permutation isotypique.

3.3 Réponse humorale à MHV-A59

Les souris C57BL/6, QM, HC1 et AID^{-/-} ont été infectées avec différentes doses de MHV-A59. La spécificité à MHV-A59 des anticorps présents dans le sérum des souris a d'abord été analysée par ELISA (*Enzyme like immunosorbent assay*) (décrit à la section 2.7). Le titre en anticorps neutralisants aux jours 4, 8, 12, 20 et 40 post-infection a été déterminé par un test de neutralisation (décrit à la section 2.6.1). Le but de cette expérience était de comparer la production d'anticorps neutralisants contre un virus cythopathogène dont l'infection n'est pas contrôlée directement par des anticorps neutralisants, entre les souris immunodéficientes et la souris témoin C57BL/6. L'infection du virus MHV-A59 est contrôlée par les lymphocytes T cytotoxiques et l'induction d'anticorps neutralisants se fait quelques jours plus tard que dans le cas de VSV-IND. Des souris C57BL/6 et QM déplétées en lymphocytes T CD8⁺ ont aussi été infectées avec MHV-A59 à 1×10^3 ufp afin de déterminer l'influence de l'absence des lymphocytes T cytotoxiques sur l'induction des anticorps neutralisants. Nous avons formulé l'hypothèse que les anticorps neutralisants pourraient être induits plus précocement chez les souris déplétées en lymphocytes T CD8⁺ infectées avec MHV-A59.

3.3.1 Survie des souris suite à l'infection avec MHV-A59

Les souris C57BL/6, QM, HC1 et AID^{-/-} ont été infectées avec une ou différentes doses de MHV-A59. La mortalité des souris a été rapportée pour comparer la susceptibilité des différentes souris immunodéficientes au virus (**Figure 21**). Nous avons aussi évalué l'influence de la dose virale sur la survie et sur la production d'anticorps.

À 5×10^3 ufp, toutes les souris C57BL/6 ont survécu à l'infection. À une dose légèrement supérieure, soit 1×10^4 ufp, 3 souris C57BL/6 sur 5 étaient mortes au

jour 17, ce qui étonne puisque les souris QM et $AID^{-/-}$ montrent un taux de survie supérieur à cette dose. En effet, les souris QM, infectées avec 1×10^4 ufp ont toutes survécu et une seule souris $AID^{-/-}$ est morte. Il est possible que des différences dans le nombre ou l'activité des CTL existent entre ces souches et comme le contrôle de l'infection est d'abord assumé par les CTL et non par les anticorps neutralisants, il est probable que les souris n'aient pas le même taux de survie. Les souris HC1 sont les plus susceptibles à l'infection par MHV-A59 car elles sont toutes mortes à cette dose. Certaines souris HC1 ont cependant survécu à des doses plus faibles comme 5×10^3 ufp et 1×10^3 ufp.

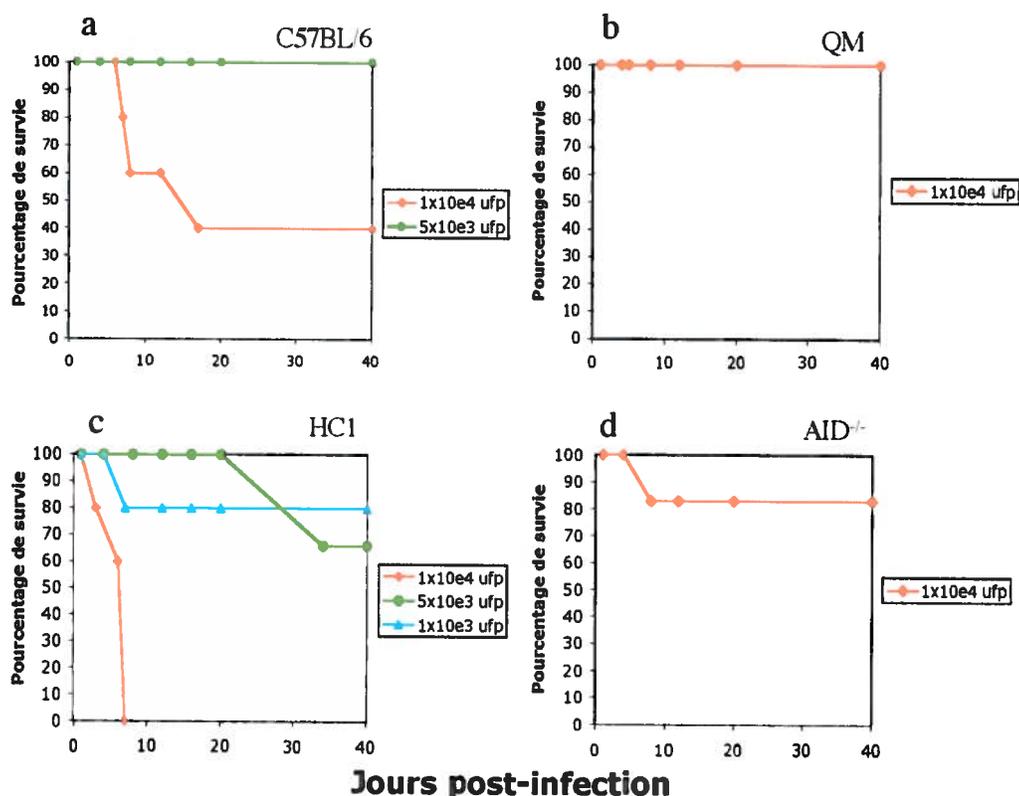


Figure 21 : Survie des souris suite à l'infection avec MHV-A59

Les souris C57BL/6, QM, HC1 et $AID^{-/-}$ ont été infectées par voie intraveineuse avec différentes doses de MHV-A59. Dans chaque groupe, le nombre de souris infectées était de 5. Les points limites et la survie ont été évalués quotidiennement chez a) les souris C57BL/6 b) les souris QM c) les souris HC1 d) les souris $AID^{-/-}$.

3.3.2 Production d'anticorps spécifiques à MHV-A59

Des anticorps spécifiques au virus MHV-A59 sont détectables chez la souris C57BL/6, la souris QM et la souris AID^{-/-}, tel que montré à la **Figure 22**. Chez la souris C57BL/6 on observe le changement graduel d'isotype des anticorps spécifiques à MHV-A59 : la spécificité des IgM diminue à partir du jour 8 p-i alors que celle des IgG reste constante et élevée du jour 8 au jour 40. Chez la souris AID^{-/-}, les IgM détectées entre les jours 4 et 40 sont spécifiques à l'antigène de MHV-A59, avec un titre maximum autour du jour 12 p-i. Seuls les anticorps de type IgG produits à partir du 12^e jour post-infection reconnaissent les antigènes de MHV-A59 chez la souris QM. Finalement, aucun anticorps spécifique à MHV-A59 n'a été détecté chez la souris HC1.

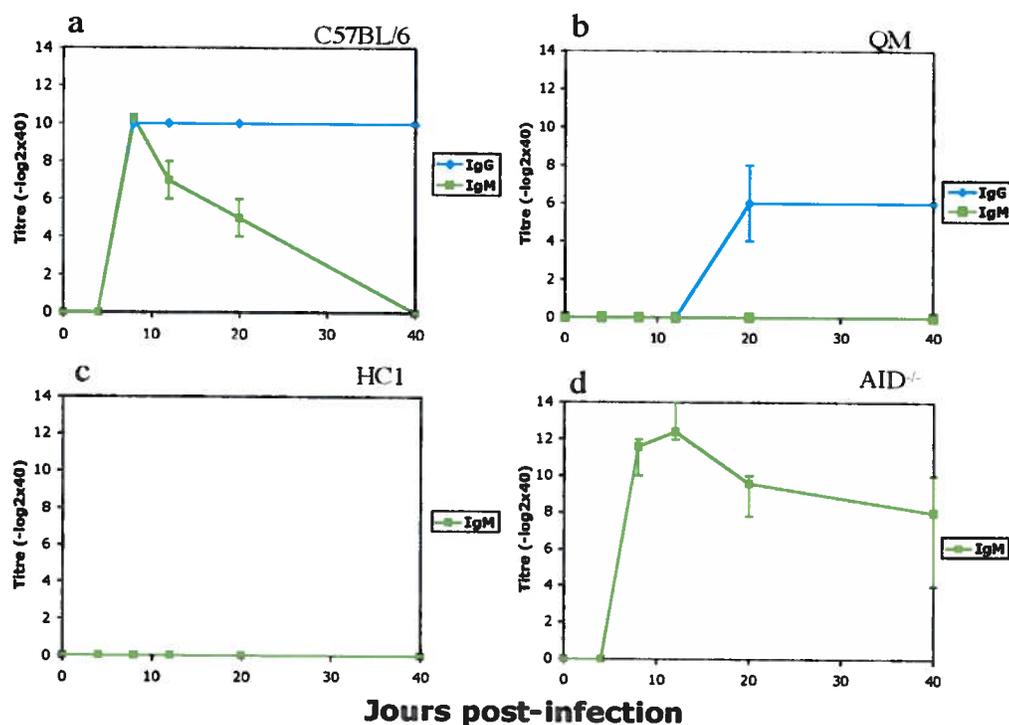


Figure 22 : Spécificité des anticorps à MHV-A59

Les souris HC1, AID^{-/-}, QM et C57BL/6 ont été infectées avec 1×10^4 ufp de MHV-A59 par voie intraveineuse. Des échantillons sanguins ont été récoltés à différents temps post-infection et la spécificité des anticorps pour MHV-A59 a été testée par ELISA. Les IgM ont été analysées aux jours 0, 4, 8, 12, 20 et 40 alors que les IgG ont été analysées à partir du jour 8. Ces résultats sont la moyenne des titres des anticorps spécifiques à MHV-A59 chez a) les souris C57BL/6; b) les souris QM; c) les souris HC1; d) les souris AID^{-/-} en fonction du temps.

Puisque la souris HC1 n'a produit aucun anticorps spécifique à MHV-A59, il apparaît que la pleine diversité du répertoire primaire des anticorps est nécessaire pour reconnaître le virus. Les résultats obtenus avec QM montrent que les réarrangements secondaires prennent un certain temps avant de générer des lymphocytes B avec une nouvelle spécificité. En effet, chez la souris QM des anticorps spécifiques apparaissent seulement entre les jours 12 et 20 alors que les souris C57BL/6 et AID^{-/-} génèrent des anticorps spécifiques entre les jours 4 et 8. Avec les résultats de la souris AID^{-/-}, on constate que des anticorps spécifiques à MHV-A59 de type IgM peuvent être induits sans l'apport d'hypermutations somatiques.

3.3.3 Production d'anticorps neutralisants contre MHV-A59

À la dose infectieuse de 1×10^4 ufp, il y a eu induction d'anticorps neutralisants de type IgM et IgG chez la souris C57BL/6 (**Figure 23**). La commutation de classe est observable dès le jour 8 et le titre en IgG reste relativement constant jusqu'au jour 40. L'apparition des anticorps neutralisants concorde parfaitement avec la présence des anticorps spécifiques.

Chez la souris HC1, aucun anticorps neutralisant n'est détectable à 1×10^4 ufp et ce, durant les 40 jours qu'a duré l'expérience (**Figure 23a**). Ceci n'est pas du tout surprenant puisque aucun anticorps spécifique n'avait été détecté dans le sérum. Par contre, à 1×10^3 ufp, des anticorps neutralisants de type IgM ont pu être détectés chez certaines souris HC1, mais à des titres très faibles (**Figure 23b**). La diversité du répertoire primaire des anticorps semble donc être primordiale pour induire une réponse humorale efficace contre MHV-A59.

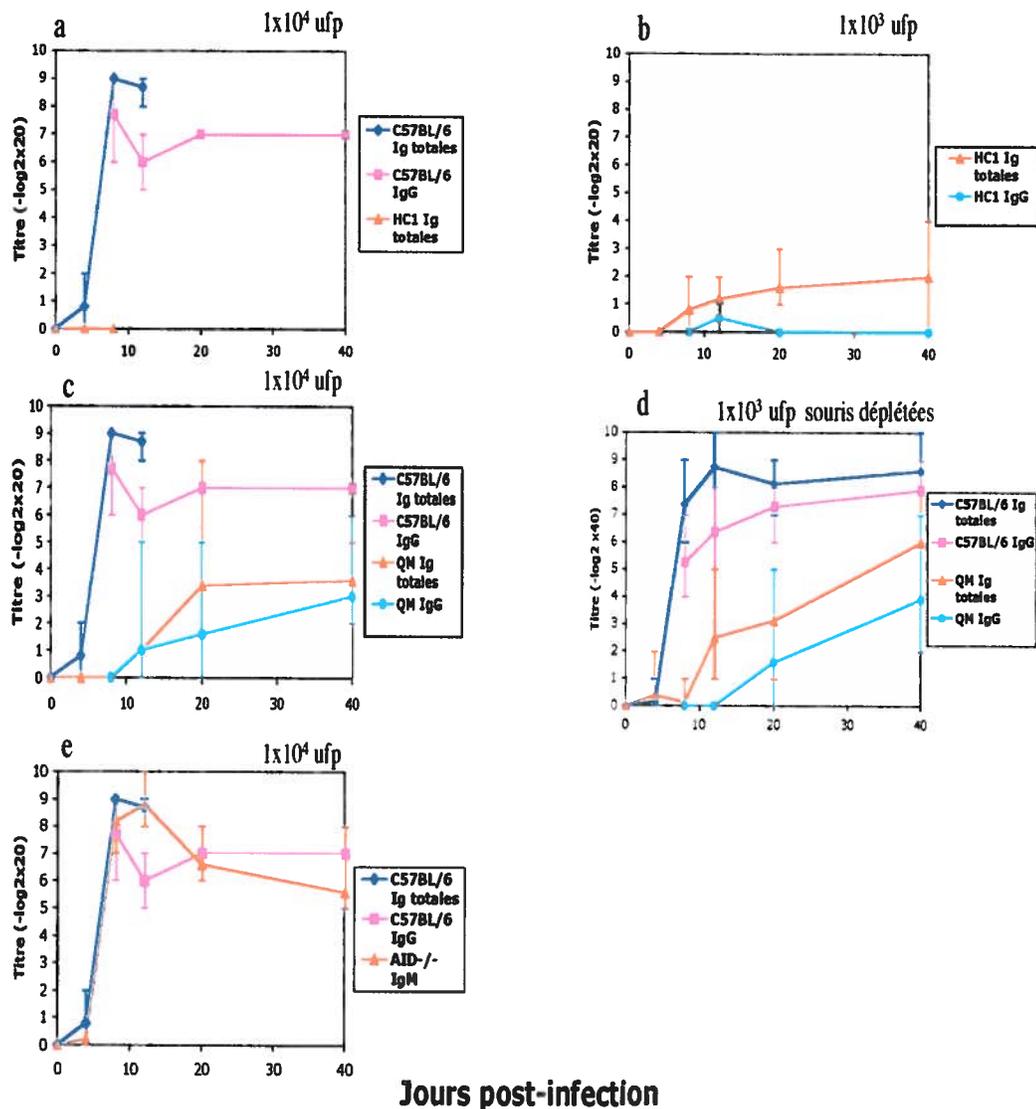


Figure 23 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre MHV-A59

Les souris HC1, $AID^{-/-}$, QM et C57BL/6 ont été infectées avec MHV-A59 par voie intraveineuse. Des échantillons sanguins ont été récoltés à différents temps post-infection et les anticorps neutralisants anti-MHV-59 ont été titrés par un test de neutralisation. Les immunoglobulines totales ont été titrées aux jours 0, 4 et 8 alors que les IgG ont été titrées aux jours 8, 12, 20 et 40. Ces résultats sont la moyenne des titres des anticorps anti-MHV-A59 neutralisants chez a) les souris HC1 infectées avec 1×10^4 ufp; b) les souris HC1 infectées avec 1×10^3 ufp; c) les souris QM infectées avec 1×10^4 ufp; d) les souris QM déplétées en lymphocytes T CD8⁺ infectées avec 1×10^4 ufp; e) les souris $AID^{-/-}$ infectées avec 1×10^4 ufp en fonction du temps.

La cinétique de neutralisation de MHV-A59 par les anticorps de type IgM de la souris AID^{-/-} est très similaire à celle des anticorps de la souris C57BL/6 (**Figure 23e**). Il n'y a pas de délai dans l'apparition des IgM neutralisantes chez la souris AID^{-/-} et celles-ci atteignent un titre aussi élevé que celles de la souris C57BL/6. Le maximum est atteint autour du jour 12 puis le titre redescend et reste relativement constant et élevé jusqu'au jour 40, comme les IgG de la souris C57BL/6. De plus, les courbes de spécificité et de neutralisation suivent exactement la même cinétique. Donc des anticorps spécifiques, neutralisants et protecteurs peuvent être générés contre MHV-A59 en absence d'hypermutation somatique et de permutation isotypique, et ce, avec la même cinétique.

Contrairement à la souris AID^{-/-}, l'apparition des anticorps neutralisants chez la souris QM suite à l'infection avec MHV-A59 à 1×10^4 ufp est retardée de quelques jours par rapport à celle chez la souris C57BL/6 (**Figure 23c**). Ce retard est aussi observé chez la souris QM déplétée en lymphocytes T CD8+ (**Figure 23d**). Les IgG sont détectables sensiblement en même temps que les IgM chez la souris QM et leurs titres sont plus faibles que ceux des anticorps de la souris C57BL/6 alors que, chez la souris QM déplétée, les IgG apparaissent quelques jours après les IgM. Les titres de ces deux immunoglobulines augmentent continuellement jusqu'au jour 40 sans toutefois atteindre celui des anticorps neutralisants de la souris C57BL/6 déplétée. Il apparaît, en observant les résultats de la souris QM, que des anticorps spécifiques, neutralisants et protecteurs peuvent être générés suite à des réarrangements secondaires. La déplétion des CTL n'a pas accéléré l'induction des anticorps neutralisants, contrairement à ce qu'il avait été pensé, mais ceux-ci atteignent un titre plus élevé à 40 jours tant chez la souris C57BL/6 déplétée que chez la souris QM déplétée. Cependant, à une dose virale de 1×10^4 ufp, aucune souris déplétée n'a survécu à l'infection (résultat non montré).

3.4 Réponse humorale à LCMV-WE

Les souris C57BL/6, QM, HC1 et AID^{-/-} ont été infectées avec 2×10^4 ufc de LCMV-WE. Le titre en anticorps neutralisants aux jours 30, 60, 90 et 120 post-infection a été déterminé par un test de foyers infectieux (décrit à la section 2.6.2). Le but de cette expérience était de comparer la production d'anticorps neutralisants contre un virus non-cytopathogène qui induit une réponse tardive et peu efficace d'anticorps neutralisants, entre les souris immunodéficientes et la souris témoin C57BL/6.

3.4.1 Survie des souris suite à l'infection avec LCMV-WE

La mortalité des souris a été rapportée pour comparer la susceptibilité des différentes souris immunodéficientes au virus (**Figure 24**). Les souris AID^{-/-} sont les plus sensibles à l'infection par LCMV-WE avec un taux de survie qui atteint 25% au jour 133. De plus, seules les souris AID^{-/-} présentent une courbe de survie qui diminue en fonction du temps alors que, chez les autres souris, le taux de survie reste stable après le jour 10. Toutes les souris QM ont survécu au virus, les souris C57BL/6 présentent un taux de survie de 90% et les souris HC1 de 70%.

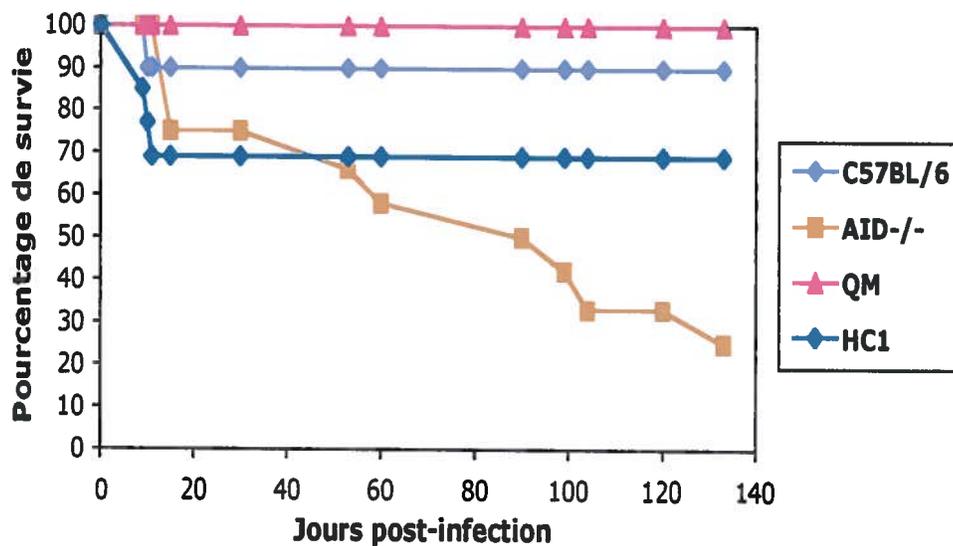


Figure 24 : Survie des souris infectées par LCMV-WE

Les souris C57BL/6, HC1, QM et AID^{-/-} ont été infectées par voie intraveineuse avec 2×10^4 uff de LCMV-WE. Dans chaque groupe, le nombre de souris variait entre 10 et 13. Les points limites et la survie des souris ont été évalués régulièrement jusqu'à 133 jours post-infection.

Bien que l'infection par le LCMV ne soit pas contrôlée par les anticorps, on observe des différences majeures dans le taux de survie aux premiers jours post-infection entre les différentes souris immunodéficientes. Comme les anticorps neutralisants apparaissent entre les jours 30 et 60 post-infection (Battagay et al., 1993) et que la phase critique de survie se situe entre les jours 10 et 18 p-i, les résultats obtenus laisse croire que la diversité du répertoire des anticorps naturels est importante dans la protection contre LCMV. En effet, la mortalité de la souris HC1, qui a un répertoire primaire d'anticorps naturels limité, est nettement plus élevée que celle des souris C57BL/6 et QM. Des études supplémentaires seront requises pour valider cette hypothèse. Après la phase critique, seules les souris AID^{-/-} présentent un taux de survie qui diminue avec le temps, ce qui suggère fortement que les hypermutations somatiques et la permutation isotypique sont

des mécanismes importants pour générer des anticorps neutralisants contre LCMV et que ces anticorps neutralisants pourraient avoir un effet protecteur.

3.4.2 Production d'anticorps neutralisants contre LCMV-WE

Aucun signe de neutralisation du virus n'a été détecté lors des tests de neutralisation avec les sérums des souris transgéniques. Seules les souris C57BL/6 ont produit des anticorps neutralisants contre LCMV-WE, qui sont détectables autour du jour 30 et dont le titre, très faible, augmente progressivement jusqu'au jour 120 (Figure 25).

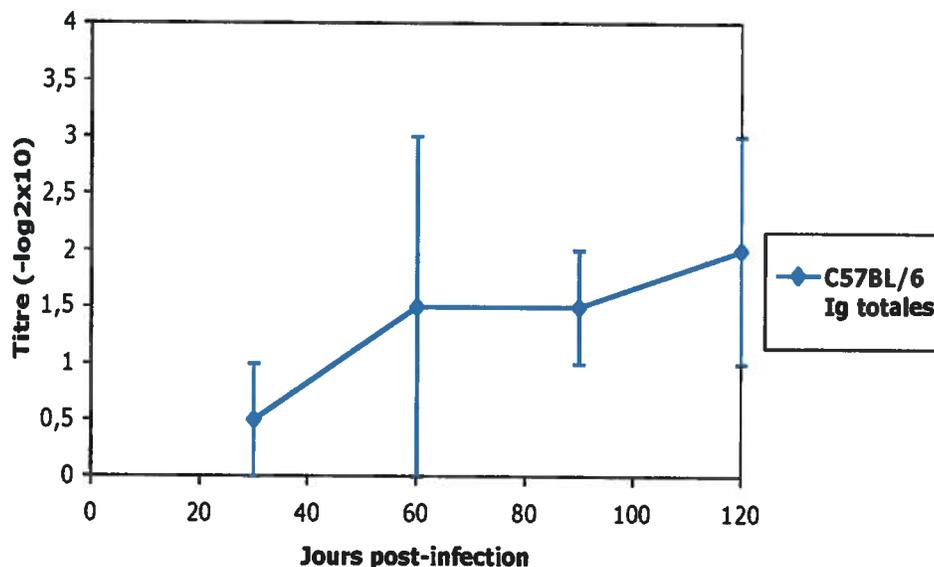


Figure 25 : Cinétique du développement d'anticorps neutralisants contre LCMV-WE chez les souris C57BL/6

Les souris HC1, AID^{-/-}, QM et C57BL/6 ont été infectées avec LCMV-WE à 2×10^4 uff par voie intraveineuse. Des échantillons sanguins ont été récoltés aux jours 0, 30, 60, 90 et 120 post-infection et les anticorps neutralisants anti-LCMV-WE ont été titrés par test de foyers infectieux. Seules quatre souris du groupe C57BL/6 (10 souris) ont produit des anticorps neutralisants contre LCMV-WE. Le résultat présenté est la moyenne des titres des anticorps anti-LCMV-WE neutralisants de ces quatre souris C57BL/6.

Contrairement aux résultats du taux de survie, ces résultats montrent que les anticorps neutralisants ont un rôle mineur à jouer dans la protection de l'animal contre LCMV. Aucun anticorps neutralisants n'a été détecté chez les souris QM (qui sont pourtant toutes restées en vie) ni chez les souris HC1 et AID^{-/-} survivantes. De plus, le titre des anticorps neutralisants chez la souris C57BL/6 est très faible, comparé au titre neutralisant des anticorps anti-VSV ou anti-MHV, par exemple. Cependant, on peut tout de même affirmer que l'induction efficace d'anticorps neutralisants contre LCMV nécessite une pleine capacité de diversification des lymphocytes B.

4.0 Discussion

La diversité des anticorps est le résultat de plusieurs facteurs distincts, dont, en premier lieu, l'organisation des gènes codant pour les immunoglobulines en multiples segments. Le réarrangement des segments géniques génère le répertoire primaire des anticorps. Lorsque le lymphocyte B reconnaît et répond à un antigène, des mécanismes de maturation d'affinité (l'hypermutation somatique et les réarrangements secondaires) augmentent la diversité des anticorps. Il est généralement assumé qu'une pleine diversité des anticorps assure une meilleure réponse humorale antivirale. Cette affirmation n'avait cependant jamais été évaluée expérimentalement.

Le but de ce projet de maîtrise était d'évaluer les fondements de cette affirmation, notre hypothèse étant que la pleine diversité des lymphocytes B n'est pas nécessaire dans l'induction d'anticorps neutralisants et protecteurs lors de certaines réponses immunitaires antivirales. Cette étude a évalué la contribution du répertoire primaire des lymphocytes B1 et des lymphocytes B2, des mécanismes de maturation de l'affinité et de la permutation isotypique dans l'induction d'une réponse antivirale neutralisante et protectrice.

Plusieurs études dans la littérature ont montré que des souris transgéniques immunodéficientes limitées dans leur capacité à diversifier leur répertoire de lymphocytes B sont capables de générer des anticorps spécifiques à certains antigènes. La souris HC1, contrainte à utiliser un seul segment V_H fonctionnel pour générer son répertoire primaire de lymphocytes B, reconnaît une variété d'haptènes et de protéines (Xu and Davis, 2000). La souris QM, dont le répertoire primaire est quasimonospécifique à l'haptène NP, génère des anticorps spécifiques et neutralisants contre le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) et le poliovirus grâce à des réarrangements secondaires au niveau du transgène (Lopez-Macias et al., 1999). Finalement, la souris AID^{-/-}, qui ne peut faire ni d'hypermutation somatique ni de

permutation isotypique, résiste à une infection avec une souche virulente du virus influenza. Le titre en IgM neutralisantes de la souris AID^{-/-} est même légèrement supérieur à celui de la souris AID^{+/-} à partir du jour 7 p-i, moment où les lymphocytes B de cette dernière commencent à subir des permutations isotypiques (Harada et al., 2003). Nous avons donc, à partir de ces études, formulé quatre objectifs qui sont : 1- Évaluer le rôle de la diversité des anticorps naturels dans le recrutement d'un antigène viral à la rate et dans sa dissémination vers les organes périphériques, 2- Évaluer le rôle du répertoire primaire des lymphocytes B dans l'induction d'une réponse humorale antivirale neutralisante et protectrice, 3- Confirmer l'importance des réarrangements secondaires dans l'induction d'anticorps neutralisants et protecteurs contre certains virus et 4- Évaluer la contribution des hypermutations somatiques et de la permutation isotypique dans la génération d'anticorps antiviraux neutralisants et protecteurs.

4.1 Diversité du répertoire des lymphocytes B1

Il a été montré que le recrutement du VSV à la rate quelques heures après l'infection est beaucoup plus efficace chez une souris possédant des anticorps, la souris de type sauvage C57BL/6, que chez des souris déficientes en immunoglobulines, comme les souris μ MT et RAG-1^{-/-} (Ochsenbein et al., 1999). De plus, le titre viral dans les organes périphériques était plus important chez les souris sans anticorps que chez la souris de type sauvage. Cette étude a démontré que les anticorps naturels contrôlent la dissémination des virus cytopathogènes comme VSV dans le sang, préviennent l'infection des organes périphériques et induisent plus rapidement la réponse humorale adaptative en retenant l'antigène au niveau de la rate sous forme de complexes immuns.

Nous avons poussé plus loin l'étude d'Ochsenbein en reprenant les mêmes manipulations mais avec des souris limitées dans leurs capacités à diversifier leur répertoire d'anticorps afin d'évaluer l'importance de la diversité des anticorps naturels dans le recrutement viral à la rate et dans la dissémination vers les

organes. Les souris C57BL/6, QM, HC1 et AID^{-/-} ont été infectées par voie intraveineuse avec 2×10^8 ufp de VSV-IND. Le recrutement du virus à la rate et sa dissémination vers les organes ont été mesurés à différents temps après l'infection en déterminant le titre viral dans le sang, la rate, le foie et les reins.

4.1.1 Recrutement du VSV à la rate chez la souris HC1

Les résultats obtenus montrent que la diversité des anticorps naturels a un rôle à jouer dans le recrutement du VSV à la rate et dans sa dissémination dans le sang. Elle n'influence cependant pas l'infection des organes périphériques comme le foie et les reins (**Figure 16**), possiblement parce que la dose infectieuse était trop élevée pour voir des différences. Les titres viraux obtenus dans la rate et le sang des souris laissent croire que la pleine diversité du répertoire des anticorps naturels est effectivement bénéfique pour un recrutement rapide à la rate et pour diminuer la charge virale dans le sang (Ochsenbein et al., 1999). En effet, dans les trois premières heures post-infection, c'est dans la rate de la souris C57BL/6 que le titre viral est le plus important (environ 100X plus important que chez les autres souris) et dans le sang de cette même souris que la charge virale est la plus faible (environ 100X plus faible que chez les autres souris) (**Figures 16a et 16b**). Afin d'affirmer avec plus d'assurance la relation entre le recrutement de VSV à la rate et le titre viral dans le sang, il serait intéressant d'effectuer cette expérience chez des souris C57BL/6 splénectomisées, chez lesquelles le titre viral dans le sang devrait être très élevé.

La souris HC1 présente le titre viral le plus bas dans la rate parmi toutes les souris et son titre viral dans le sang est beaucoup plus élevé que celui de la souris C57BL/6, ce qui concorde avec le fait que la souris HC1 est la souris la plus limitée dans son répertoire d'anticorps naturels parmi les souris transgéniques. En effet, le minilocus HC1 ne contient qu'un seul segment génique V_H fonctionnel et les deux allèles de la chaîne lourde des immunoglobulines ont été rendus non fonctionnels. La diversité limitée (CDR3 de la chaîne lourde et chaîne légère λ)

de ses anticorps naturels résulte donc en un recrutement du VSV moins efficace à la rate et à une charge virale plus importante dans le sang.

Un pool d'anticorps naturels avec un plein potentiel de diversification serait donc plus apte à reconnaître le virus et à former des complexes immuns rapidement et en nombre plus important. Il a effectivement été montré que les antigènes viraux recrutés à la rate sont trappés en complexes immuns, majoritairement dans la zone marginale (Hangartner et al., 2003). Bien que les anticorps naturels soient généralement des IgM de faible affinité, il semble qu'une certaine proportion des anticorps naturels circulants chez la souris C57BL/6 soient plus spécifiques et neutralisent directement le virus, comme il a été montré auparavant dans la littérature (Gobet et al., 1988; Ochsenbein et al., 1999), en plus de former des complexes immuns. Cette affirmation est appuyée par le fait que le titre viral dans la rate de cette souris reste constant entre 1 heure et 8 heures post-infection alors qu'il augmente graduellement chez les autres souris. Les anticorps naturels de la souris HC1, comme ceux de la souris QM et AID^{-/-}, formeraient donc principalement des complexes immuns avec le virus, qui sont retenus à la rate lorsque la circulation sanguine les y amène, plutôt que de le neutraliser. Mais comme le titre viral est nettement plus bas dans la rate de la souris HC1, la formation de complexes immuns est moins efficace chez cette souris que chez les autres souris immunodéficientes.

4.1.2 Recrutement du VSV à la rate chez la souris AID^{-/-}

Comme les lymphocytes B1 ne subissent pas de maturation d'affinité, le répertoire primaire potentiel des lymphocytes B1 de la souris C57BL/6 et de la souris AID^{-/-} devrait théoriquement être le même puisque la souris AID^{-/-} est limitée uniquement dans des mécanismes qui ont lieu lors de la maturation d'affinité. On s'attendait donc à voir, dans la rate et dans le sang, des titres viraux semblables entre la souris AID^{-/-} et la souris témoin. Or, dans le sang, les titres viraux entre les deux souris sont très proches mais dans la rate, jusqu'à environ 7

heures p-i, le titre viral est plus faible chez la souris $AID^{-/-}$ (**Figures 16a et 16b**). Le fait que la souris $AID^{-/-}$ montre un titre viral dans la rate plus bas que celui de la souris C57BL/6 laisse supposer que des anticorps naturels de type IgG pourraient être en jeu dans le recrutement du VSV à la rate et/ou que le faible taux d'hypermutations somatiques que subissent les lymphocytes B1 apporte une diversité supplémentaire importante dans la reconnaissance du VSV.

4.1.3 Recrutement du VSV à la rate chez la souris QM

Contrairement à la souris $AID^{-/-}$, la souris QM est théoriquement limitée dans son répertoire primaire de lymphocytes B. En effet, sa lignée germinale est programmée pour générer des anticorps spécifiques à l'haptène NP. Cependant, environ 20% des lymphocytes B périphériques ne sont pas spécifiques au NP suite à un remplacement du segment génique V_H au niveau du transgène. Dans la population de lymphocytes B1 péritonéaux, on retrouve un nombre élevé de lymphocytes ayant subi un réarrangement secondaire (remplacement V_H) par rapport aux lymphocytes en périphérie (Casalho et al., 1997). Ces lymphocytes seraient majoritairement des lymphocytes B1-a. La monoclonalité et la pression environnementale (antigènes environnementaux et auto-antigènes) de la cavité péritonéale induiraient les lymphocytes B1 à changer de spécificité. La sélection est si forte que chez les souris QM non-immunisées, environ 90% des anticorps circulants ne se lient pas au NP. Les nouvelles spécificités acquises par les lymphocytes B1 permettent aux anticorps naturels d'être assez diversifiés pour reconnaître VSV et former des complexes immuns, qui sont retenus à la rate. En effet, on voit que le titre viral dans la rate de la souris QM est plus bas que celui de la souris C57BL/6 au tout début de l'infection mais que par la suite, il augmente progressivement pour enfin le dépasser (**Figure 16a**). De plus, la diversité des anticorps naturels acquise chez la souris QM semble très importante puisque le recrutement viral est plus important, à partir de 2 heures post-infection, dans la rate de cette souris que dans la rate de la souris $AID^{-/-}$ et HC1. Comme une certaine proportion des lymphocytes B1 reste quand même spécifique au NP,

le nombre de molécules d'immunoglobuline qui peuvent potentiellement reconnaître le virus est plus bas que chez une souris de type sauvage. Il est donc normal que le recrutement se fasse moins rapidement chez la souris QM que chez la souris C57BL/6.

4.1.4 Influence de la diversité des anticorps naturels sur la réponse adaptative et rôle possible des anticorps naturels dans la réponse anti-LCMV

La diversité des anticorps naturels semble donc avoir uniquement une importance sur le titre viral au niveau de la rate et du sang, puisque dans le foie et les reins, les titres de VSV chez les 3 souris transgéniques et chez la souris témoin sont comparables. Une proportion de virus qui n'a pas été neutralisé ni complexé avec les anticorps naturels s'accumule progressivement dans ces organes qui filtrent le sang.

Afin de conclure avec plus d'assurance sur l'influence de la diversité des anticorps naturels dans le recrutement viral à la rate, des tests d'immunohistochimie pourraient être faits sur des cryosections de rate. Ceci permettrait de confirmer et comparer la présence de dépôts antigéniques du VSV dans la zone marginale. De plus, la neutralisation par les anticorps naturels pourraient être directement démontrée avec du sérum non dilué de souris C57BL/6 non immunisée. Il y aurait aussi lieu de répéter les expériences d'infection des souris. Un plus grand nombre de données expérimentales sur le titre viral dans les quatre organes ciblés entre 1 heure et 48 heures post-infection pour chaque souris permettraient de tirer des conclusions plus facilement. En effet, les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire de maîtrise sont parfois difficile à interpréter, comme par exemple le fait que le titre de VSV augmente entre 2 heures et 8 heures post-infection dans le sang (**figure 16b**) et entre 5 heures et 8 heures post-infection dans le foie (**figure 16c**), chez la souris QM

principalement. L'hypothèse retenue pour expliquer que le virus est moins détectable au début de l'infection dans ces organes est que les virions soient séquestrés dans d'autres organes puis redistribués graduellement dans le temps. L'hypothèse d'un début de réplication virale pour expliquer l'augmentation du titre à partir de 5 heures post-infection pourrait être proposée, puisqu'une étude a montré que deux lignées cellulaires (BHK₂₁ et *rat embryo fibroblasts* (REF)) produisent une quantité maximale de virons 12 heures post-infection avec VSV-IND (Konieczko et al. 1994), mais il faudrait des données expérimentales *in vivo* pour avancer cette hypothèse.

Donc, en dépit du fait qu'il serait idéal de répéter les expériences concernant les anticorps naturels, on peut quand même dire que les organes lymphoïdes secondaires, lieu de la réponse adaptative, semblent accumuler plus rapidement les antigènes viraux lorsque la diversité des anticorps naturels de l'animal est complète. Ceci aurait comme effet d'induire plus rapidement et plus efficacement la réponse humorale adaptative, ce qui a été observé dans les expériences de cette présente étude (**Figures 18, 19 et 20**). Effectivement, l'induction des anticorps neutralisants suite à l'infection avec VSV a généralement été plus rapide et plus forte chez la souris C57BL/6 que chez les souris immunodéficientes.

En observant les résultats obtenus suite à l'infection avec le virus LCMV (**Figure 24**), il y a lieu de croire que les anticorps naturels auraient un rôle à jouer dans la survie des souris dans les premiers jours post-infection. Les anticorps naturels, en se liant au virus sous forme de complexes immuns, diminueraient la charge virale, ce qui a une influence sur la survie des souris. À une dose de 200 uff toutes les souris immunodéficientes comme les souris C57BL/6 ont survécu à l'infection (résultat non-montré) alors qu'à une dose de 2×10^4 uff, il y a eu mortalité, principalement chez les souris HC1 et AID^{-/-}. Nous avons vu que les anticorps naturels de ces deux souris semblent être moins efficaces pour recruter VSV à la rate en raison de leur moins grande diversité. Il se pourrait donc que la diversité des anticorps naturels soit aussi importante pour protéger les souris contre LCMV.

Il avait d'ailleurs été montré qu'un transfert passif d'anticorps monoclonaux anti-LCMV, avant l'infection et jusqu'à deux jours post-infection, protège les souris contre un chorioméningite létale en diminuant la charge virale (Ferrantelli et al., 2002; Seiler et al., 1998b; Wright and Buchmeier, 1991). Les anticorps naturels pourraient donc agir au même titre. Le mécanisme proposé est celui d'une meilleure induction de la réponse CTL, responsable du contrôle de l'infection avec LCMV, suite à l'internalisation des complexes immuns *via* les récepteurs Fc et les récepteurs du complément par les cellules présentatrices d'antigènes. Il est connu que les CPA internalisent mieux les antigènes sous cette forme que lorsqu'ils sont libres (Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Shibuya et al., 2000; Thornton et al., 1994; Youd et al., 2002). Un apprêtement et une présentation plus efficaces de l'antigène auraient donc comme effet d'induire une réponse cellulaire plus efficace, sur laquelle la survie des souris dépend. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse en examinant la cinétique d'induction de la réponse CTL chez les différentes souris immunodéficientes suite à l'infection par LCMV.

4.2 Réponse antivirale humorale adaptative

Afin d'évaluer l'importance du répertoire primaire, des mécanismes de maturation d'affinité (hypermutations somatiques et réarrangements secondaires) et de la permutation isotypique dans l'induction d'une réponse antivirale protectrice, nous avons infecté les souris C57BL/6, HC1, QM et AID^{-/-} avec différentes doses de VSV, de MHV ou de LCMV.

Chez la souris C57BL/6, le VSV induit une production d'anticorps de type IgM indépendante des lymphocytes T environ 3 à 5 jours post-infection (Charan et al., 1987), suivie d'une production d'IgG dépendante des lymphocytes T vers les jours 6 à 8 post-infection (Leist et al., 1987), ce qui a été observé lors de nos expérimentations (**Figures 18, 19 et 20**).

Le MHV, quant à lui, induit aussi une réponse humorale rapide mais qui apparaît quelques jours plus tard comparée à la réponse induite par VSV. L'activation des lymphocytes B se fait de manière T-dépendante et les anticorps apparaissent après le contrôle de l'infection par les CTL (Kajino et al., 1998; Lavi et al., 1984). Les résultats obtenus avec les sérums de la souris C57BL/6 montrent que les anticorps spécifiques et neutralisants de type IgM apparaissent entre les jours 4 et 8 post-infection et que les IgG spécifiques et neutralisants présentent un titre élevé déjà au jour 8 post-infection (**Figures 22 et 23**).

Le suivi de la survie des souris suite à l'infection avec MHV a montré des résultats surprenants. À 5×10^3 ufp, toutes les souris C57BL/6 ont survécu à l'infection alors qu'à une dose légèrement supérieure, soit 1×10^4 ufp, 3 souris C57BL/6 sur 5 étaient mortes au jour 17. À la même dose, les souris QM ont toutes survécu et une seule souris AID^{-/-} est morte. Il est possible que des différences dans le nombre ou l'activité des CTL existent entre ces souches et comme le contrôle de l'infection est d'abord assumé par les CTL et non par les anticorps neutralisants, il est probable que les souris n'aient pas le même taux de survie. À titre d'exemple, aucune des souris C57BL/6 déplétées en lymphocytes T CD8⁺ ou QM déplétées en lymphocytes T CD8⁺ infectées avec 1×10^4 ufp de MHV-A59 n'a survécu au challenge infectieux (résultats non-montrés). Une autre hypothèse retenue pour expliquer ce résultat chez est le phénomène du *Antibody-dependent enhancement of infection* (ADE). Ce phénomène, dans lequel la réplication virale est augmentée plutôt que diminuée par les anticorps, a été observé *in vitro* pour un nombre important de virus, dont certains coronavirus (Cummins et al., 2005; Hohdatsu et al., 1998). Une augmentation de l'infectivité virale pourrait donc avoir influencé la survie des souris C57BL/6, dont les anticorps anti-MHV ont été induits plus efficacement que chez les souris immunodéficientes.

Finalement, le LCMV, un virus non-cytopathogène, induit une réponse faible et tardive d'anticorps neutralisants. En effet, c'est entre les jours 30 à 60 post-

infection (Battegay et al., 1993; Bruns et al., 1983; Buchmeier et al., 1981), que des anticorps neutralisants spécifiques de la glycoprotéine GPI du virus apparaissent (Pinschewer et al., 2004). Nous avons obtenu un titre neutralisant dans le sérum des souris C57BL/6 au jour 30, et ce titre a augmenté progressivement jusqu'au jour 120 (**Figure 25**). Cependant, ce titre est très faible comparé à la littérature et nous avons détecté des anticorps anti-LCMV chez seulement quatre des dix souris infectées. Bien que le LCMV soit connu pour être un virus peu efficace pour induire des anticorps neutralisants, ce qui aurait une influence sur la persistance de l'infection, les résultats obtenus laissent croire que nous avons eu des difficultés techniques indéterminées à détecter les anticorps neutralisants durant le test de neutralisation.

4.2.1 Rôle du répertoire primaire des lymphocytes B dans l'induction d'une réponse humorale neutralisante et protectrice

Dans l'induction d'une réponse adaptative précoce, forte et protectrice contre les virus qui induisent des anticorps neutralisants rapidement (VSV et MHV), la pleine diversité du répertoire primaire des anticorps semble être un facteur plus important que la maturation d'affinité. En effet, la souris HC1 était la plus susceptible aux virus VSV et MHV comparée aux souris QM et AID^{-/-} (**Figures 17 et 21**). Toutefois, des anticorps neutralisants contre VSV et dans une moindre mesure contre MHV, ont été générés chez la souris HC1. La diversité de la région CDR3 de la chaîne lourde à elle seule est donc suffisante pour induire la production d'anticorps neutralisants.

L'apparition des anticorps neutralisants anti-VSV chez la souris HC1 est retardée de 4 jours par rapport à la souris C57BL/6 (**Figure 18**). La diversité du répertoire primaire du BCR et un plus faible recrutement de l'antigène à la rate durant les 8 premières heures post-infection (**Figure 16a**) ont donc une influence sur la rapidité d'induction de l'activation et de la prolifération des lymphocytes B par un

antigène T-indépendant. Comme la protection de la souris contre VSV est conférée uniquement par les anticorps, le retard dans l'induction de la réponse humorale influence grandement la survie des souris HC1 (**Figure 17c**).

Les résultats obtenus suite à l'infection avec VSV chez la souris HC1 pourraient laisser croire que l'induction d'anticorps neutralisants chez cette souris est seulement efficace de manière indépendante des lymphocytes T. En effet, les anticorps neutralisants détectés sont de type IgM et leur titre commence à descendre environ 8 jours après leur apparition. Toutefois, les lymphocytes T_H de la souris HC1 sont tout à fait fonctionnels (A. Lamarre, résultats non-publiés; Xu and Davis, 2000). Lors de l'infection avec MHV, des anticorps neutralisants de type IgM ont été détectés et le virus MHV n'est pas connu pour induire une production d'anticorps indépendante des lymphocytes T. La difficulté qu'a la souris HC1 à procéder à la permutation isotypique provient probablement d'un effet du transgène plutôt que d'un manque de stimulation par les lymphocytes T.

Les anticorps anti-MHV ont été détectés à un très faible titre neutralisant chez la souris HC1 (**Figure 23**) et leur spécificité n'a pas été détectée par test ELISA (**Figure 22**). La dose virale utilisée était cependant faible, soit 1×10^3 ufp. Nous avons dû utiliser cette dose car à 1×10^4 ufp, aucune souris ne survivait après le jour 8 (**Figure 21c**). Contrairement aux souris infectées avec 1×10^4 ufp de VSV mortes au jour 8, aucun anticorps neutralisant n'a été détecté chez les souris infectées avec 1×10^4 ufp de MHV. Ceci est conforme au fait que les anticorps apparaissent après le contrôle de l'infection par les CTL, entre les jours 4 et 8 (résultats de la souris C57BL/6). N'empêche que les souris HC1 étaient plus susceptibles, à dose virale égale, que les souris C57BL/6; les anticorps neutralisants pourraient donc aussi avoir un rôle à jouer dans la protection contre MHV.

La diversité du répertoire primaire des anticorps semble donc être importante dans la protection contre des virus cytopathogènes qui induisent une réponse rapide

d'anticorps neutralisants comme VSV. Dans l'infection avec LCMV, qui est un virus non-cytopathogène qui induit une production tardive d'anticorps neutralisants, la souris HC1 est beaucoup moins compromise. Son taux de survie suite à l'infection avec LCMV (**Figure 24**) est relativement élevé comparé au taux de survie suite à l'infection avec VSV ou MHV. Cependant, la mortalité des souris HC1 est beaucoup plus importante dans les premiers jours post-infection comparée à la mortalité des autres souris immunodéficientes. Comme discuté auparavant, la diversité des anticorps naturels auraient un rôle à jouer dans la protection contre LCMV lors des premiers jours post-infection, en induisant une réponse cellulaire plus efficace, puisque la souris HC1 est limitée à ce niveau par rapport aux autres souris. Comme aucun anticorps neutralisant n'a été détecté chez la souris HC1, une diversité complète du répertoire primaire des lymphocytes B est donc essentielle dans pour induire réponse humorale contre LCMV.

En résumé, la région CDR3 de la chaîne lourde est déterminante dans la reconnaissance de l'antigène, mais une diversité appréciable uniquement dans cette région par rapport aux autres CDRs n'assure pas nécessairement une protection complète contre les virus VSV, MHV et LCMV. Il a été montré que la souris HC1 est capable de produire des anticorps spécifiques de types IgM et IgG contre des protéines et des haptènes (Xu and Davis, 2000) mais les virus représentent des antigènes beaucoup plus complexes qui nécessitent une pleine diversité du répertoire primaire pour être efficacement reconnus. Malgré tout, la diversité de la région CDR3 de la chaîne lourde à elle seule est suffisante pour générer, à un titre appréciable, des anticorps neutralisants de type IgM contre le virus VSV.

4.2.2 Contribution des réarrangements secondaires dans l'induction d'anticorps neutralisants et protecteurs

Lors du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse, les réarrangements secondaires servent à éliminer les lymphocytes auto-réactifs en donnant une nouvelle spécificité au récepteur (Gay et al., 1993; Tiegs et al., 1993). Lors d'une réponse immunitaire, des réarrangements secondaires peuvent aussi survenir, ce qui contribue à augmenter considérablement la diversité des anticorps. En effet dans la présente étude, nous avons constaté que la souris QM, dont le répertoire primaire des lymphocytes B est spécifique à l'haptène NP, génère des anticorps contre les virus VSV et MHV. Toutefois, aucun anticorps contre LCMV n'a pu être détecté chez la souris QM, contrairement à une précédente étude qui montrait que la souris QM pouvait générer des anticorps neutralisants contre VSV, LCMV et poliovirus (Lopez-Macias et al., 1999).

Les IgM et les IgG qui neutralisent VSV sont induites plus tardivement (environ quatre jours plus tard) chez la souris QM que chez la souris C57BL/6 (**Figure 19**), ce qui avait été aussi observé précédemment (Lopez-Macias et al., 1999). Ce retard est explicable par le fait que le pool de lymphocytes précurseurs B qui ont le potentiel de reconnaître l'antigène, chez la souris QM naïve, est limité (80% des lymphocytes B de la souris QM sont spécifiques au NP). L'activation, la prolifération et la production d'anticorps neutralisants en quantité suffisante pour être détectés nécessitent donc plus de temps. Les anticorps anti-VSV de la souris QM atteignent le même titre neutralisant que ceux de la souris C57BL/6 seulement au jour 40 (aussi observé dans l'étude de Lopez-Macias), ce qui est explicable par le fait que la prolifération des lymphocytes B hautement spécifiques et leur différenciation en plasmocytes sont décalées chez la souris QM. Néanmoins on voit que la maturation d'affinité (combinaison de réarrangements secondaires et d'hypermutations somatiques) est assez efficace pour générer des lymphocytes B avec un récepteur de haute affinité, puisque seuls

les lymphocytes présentant une Ig membranaire de haute affinité deviennent des lymphocytes sécréteurs d'anticorps (revu par Mac Lennan, 1994).

Toutefois, comme la protection de la souris contre VSV est conférée uniquement par les anticorps, la souris QM est plus susceptible au virus, probablement à cause du délai dans l'apparition des anticorps. En effet, à forte dose, environ la moitié des souris QM sont mortes vers le jour 10 (**Figure 17**). En observant les courbes de neutralisation des immunoglobulines des souris QM (**Figure 19**), on remarque que, au jour 10, il n'y a pas encore d'IgG dans le sérum, alors que chez la souris C57BL/6, le titre neutralisant des IgG atteint à peu près son maximum. On observait aussi la même chose chez la souris HC1, soit que la phase critique se situe autour du jour 10 et qu'aucun IgG n'est présent dans son sérum à ce temps. Les anticorps de type IgG seraient donc important dans la protection contre VSV.

Contrairement à l'infection avec VSV, aucune souris QM n'est morte suite à l'infection avec MHV (**Figure 21**). Comme le virus est d'abord contrôlé par les CTL, la pleine diversité des anticorps est moins essentielle pour la protection (bien que les anticorps neutralisants puissent avoir un rôle à jouer, comme observé précédemment avec la souris HC1). Le fait que certaines souris C57BL/6 et que les souris déplétées en lymphocytes T CD8⁺, tant QM que C57BL/6, soient toutes mortes avec 1×10^4 ufp de MHV (résultat non-montré) confirme que la protection est d'abord assurée par les CTL.

Comme dans le cas de VSV, les anticorps anti-MHV apparaissent plus tardivement chez la souris QM que chez la souris C57BL/6 (**Figure 23**). Ils n'atteignent toutefois pas les mêmes titres neutralisants. Les seuls anticorps spécifiques à MHV qui ont été détectés chez la souris QM sont de type IgG (**Figure 22**), ce qui est surprenant puisque dans le test de neutralisation, on observe des anticorps de type IgM. L'hypothèse suggérée pour expliquer ce résultat est un manque de sensibilité du test ELISA puisque le titre neutralisant des IgM anti-MHV était faible. Le titre des anticorps neutralisants anti-MHV de

la souris HC1 était aussi très faible et la spécificité n'a non plus été détectée en ELISA.

La déplétion des lymphocytes T CD8+ n'accélère pas l'induction d'anticorps neutralisants, tant chez la souris C57BL/6 que chez la souris QM, mais elle a augmenté leurs titres. Ces observations confirment que la charge virale, normalement diminuée par les CTL au début de l'infection, influence la force de la réponse humorale induite.

En bref, les réarrangements secondaires sont suffisants pour générer des anticorps neutralisants et protecteurs contre des virus cytopathogènes comme VSV et MHV. Dans la littérature, il a été montré qu'ils sont aussi efficaces pour générer des anticorps contre LCMV (Lopez-Macias et al., 1999). Le fait que nous n'avons pas observé d'anticorps neutralisant anti-LCMV chez la souris QM est probablement dû à un problème technique dans le test de neutralisation de LCMV, comme mentionné précédemment. En effet, les anticorps anti-LCMV détectés chez la souris C57BL/6 atteignent un faible titre neutralisant, à la limite de la détection, ce qui n'est pas conforme à la littérature.

4.2.3 Contribution de l'hypermutation somatique et de la permutation isotypique dans l'induction d'une réponse humorale neutralisante et protectrice

L'hypermutation somatique, ciblée principalement dans les régions hypervariables, influence grandement l'affinité d'un récepteur pour un antigène et, avec les réarrangements secondaires, peut donner lieu à des récepteurs hautement spécifiques. Malgré tout, les souris AID^{-/-}, qui ne peuvent faire d'hypermutation somatique, sont capables de générer des anticorps neutralisants et protecteurs contre VSV et MHV.

Chez la souris $AID^{-/-}$, une forte dose de VSV (2×10^6 ufp) induit une production d'anticorps neutralisants qui atteint le titre de la souris C57BL/6 alors qu'à plus faible dose (1×10^3 ufp), le titre neutralisant des anticorps anti-VSV est plus bas que celui de la souris témoin (**Figure 20**). Ceci est explicable par le fait que les IgM sont d'abord induit de manière indépendante des lymphocytes T et que cette induction est dépendante de la quantité d'antigène.

Comme le répertoire primaire des anticorps des souris C57BL/6 et $AID^{-/-}$ est le même, il n'y a pas de délai dans l'apparition des anticorps. Cependant, ces anticorps sont de type IgM uniquement puisque la souris $AID^{-/-}$ ne peut faire de permutation isotypique. En observant la courbe de survie des souris $AID^{-/-}$ suite à l'infection avec VSV (**Figure 17**), on remarque que c'est vers le jour 10 que survient la phase critique, comme dans le cas des souris QM et HC1. Le fait que la souris $AID^{-/-}$ ne produit pas d'IgG pourrait expliquer la mortalité observée chez quelques souris. À plus forte dose virale, les souris seraient mieux protégées à cause d'un haut titre en IgM (Harada et al., 2003), qui compense pour l'absence d'IgG, ce qui expliquerait aussi que le taux de survie est plus élevé suite à l'infection avec 2×10^6 ufp versus 1×10^3 ufp de VSV.

Dans le cas de MHV, l'hypermutation somatique et la permutation isotypique ne semblent aucunement essentielles dans la génération d'anticorps spécifiques et neutralisants car les anticorps de la souris $AID^{-/-}$ apparaissent exactement en même temps que ceux de la souris C57BL/6 et leurs titres atteignent sensiblement le même maximum. À l'opposé, ils semblent primordiaux dans l'induction d'anticorps neutralisants et dans la protection des souris contre LCMV. En effet, seules les souris $AID^{-/-}$ sont très susceptibles au virus et présentent une courbe de survie qui diminue en fonction du temps au delà de la phase critique du jour 10. Il est donc logique de croire que des anticorps de type IgG pleinement diversifiés confèrent une protection contre LCMV même si ces anticorps apparaissent tardivement. Pourtant, aucun anticorps neutralisant n'a été détecté chez les souris QM et HC1 et ces souris présentent un taux de survie élevé (100% dans le

cas de QM et 66% dans le cas de HC1). Comme mentionné précédemment, la technique de détection des anticorps neutralisants n'est pas très sensible. Un test de spécificité ELISA serait sûrement plus approprié pour détecter des anticorps anti-LCMV chez les souris immunodéficientes. Ceci permettrait aussi de déterminer l'isotype des anticorps et de conclure si la protection est assurée par les IgG.

À la lumière des résultats obtenus, des anticorps neutralisants et protecteurs peuvent être générés en absence d'hypermutation somatique et de permutation isotypique contre les virus VSV et MHV mais pas contre LCMV. Le fait que l'antigène soit T-dépendant, comme MHV, ou T-indépendant, comme VSV et le virus de l'influenza (Mozdzanowska et al., 2000; Szomolanyi-Tsuda and Welsh, 2004), ne semble pas influencer grandement cette réponse.

4.3 Influence du type d'infection virale dans l'induction de la réponse humorale

En comparant les résultats de la réponse humorale contre chaque virus chez les souris transgéniques, on se rend compte que le type d'infection produite par le virus influence la présence ou l'absence d'anticorps mais surtout le titre de ceux-ci. Plus l'induction de la réponse humorale est rapide chez la souris de type sauvage, moins la diversité du répertoire primaire semble importante pour générer des anticorps à haut titre neutralisant et plus les réarrangements secondaires sont efficaces. L'absence d'hypermutation somatique et de permutation isotypique ne semble néanmoins pas influencer grandement le titre des anticorps neutralisants en réponse à VSV ou MHV.

Les raisons influençant l'apparition tardive des anticorps neutralisants anti-LCMV sont mal comprises mais il apparaît évident que la pleine capacité de diversification des lymphocytes B est essentielle pour leur induction efficace. Il

semble que la glycoprotéine GP-1 de LCMV ait coévolué de manière à être peu reconnue par le répertoire naïf des lymphocytes B de la souris. Chez des hôtes non naturels, comme le cochon d'Inde et l'Homme, des anticorps neutralisants contre LCMV peuvent être générés plus efficacement (Seiler et al., 1998b; Hangartner et al., 2003). Il semble que la fréquence de lymphocytes B spécifiques à LCMV soit très rare ou bien que ces lymphocytes sont générés par une maturation d'affinité impliquant des hypermutations somatiques substantielles. Chose certaine, le répertoire des lymphocytes B est primordial dans la reconnaissance du virus (Mozdzanowska et al., 2000; Szomolanyi-Tsuda and Welsh, 2004) et, contrairement à VSV et MHV, la pleine capacité de diversification des anticorps semble essentielle pour induire la production d'anticorps neutralisants contre LCMV.

Conclusion et perspectives

Cette étude a évalué l'importance de la diversité des anticorps dans l'induction d'une réponse antivirale protectrice. Il était généralement présumé qu'une grande diversité des anticorps assure une meilleure réponse immunitaire contre un grand nombre de pathogènes potentiels, mais cette affirmation n'avait jamais été vérifiée concrètement.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'importance de la diversité des anticorps naturels dans le recrutement du virus de la stomatite vésiculaire à la rate et dans sa distribution quelques heures après l'infection. Par la suite nous avons estimé l'importance de la diversité du répertoire primaire des anticorps dans l'induction d'une réponse antivirale, en vérifiant l'influence de la diversité de la troisième région hypervariable de la chaîne lourde (CDR3). Nous avons aussi évalué la contribution des mécanismes d'hypermutation somatique et de permutation isotypique dans la génération d'une réponse humorale neutralisante et protectrice. Finalement, l'efficacité des réarrangements secondaires dans l'induction d'une réponse antivirale humorale a été confirmée.

Tout d'abord, les résultats obtenus montrent que les anticorps naturels ayant un plus grand répertoire primaire neutralisent le VSV de manière plus efficace et ont probablement plus de facilité à former des complexes immuns qui sont mieux retenus à la rate, ce qui par conséquent réduit la charge virale en circulation. Cependant la diversité des anticorps naturels ne semble pas influencer grandement l'infection des organes périphériques comme le foie et les reins, du moins, à la dose infectieuse utilisée. Les anticorps naturels contrôlent donc la dissémination des virus cytopathogènes comme VSV dans le sang et induisent plus rapidement la réponse humorale adaptative en retenant l'antigène sous forme de complexes immuns au niveau des organes lymphoïdes secondaires, lieu de la réponse adaptative. L'accumulation des antigènes viraux se fait plus rapidement lorsque la diversité des anticorps naturels de l'animal est complète et l'induction des

anticorps neutralisants a généralement été plus rapide et plus forte chez la souris C57BL/6 que chez les souris immunodéficientes. Ces observations confirment que les anticorps naturels constituent un lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise.

Nous avons par la suite observé que la pleine capacité de diversification du répertoire des lymphocytes B est bénéfique pour une protection complète contre un virus cytopathogène comme VSV. La diversité du répertoire primaire en particulier, semble être plus importante que l'hypermutation somatique et la permutation isotypique pour conférer cette protection. Malgré tout, la diversité de la région CDR3 de la chaîne lourde à elle seule est quand même suffisante pour générer des anticorps neutralisants de type IgM contre VSV.

Nous avons confirmé que les réarrangements secondaires sont suffisants pour générer des anticorps neutralisants et protecteurs contre VSV-IND et MHV-A59, bien que l'apparition de ces anticorps ainsi que la commutation de classe chez la souris QM soient retardées de quelques jours par rapport à la souris C57BL/6.

Subséquemment, nous avons constaté que la souris $AID^{-/-}$ produit des anticorps spécifiques, neutralisants et protecteurs contre VSV-IND et MHV-A59, avec sensiblement la même cinétique que la souris de type sauvage, malgré le fait que ses lymphocytes B ne subissent pas d'hypermutation somatique ni de permutation isotypique.

Finalement, les résultats obtenus suggèrent que la diversité du répertoire des anticorps naturels semble importante dans la protection contre LCMV durant les premiers jours post-infection. Les anticorps naturels, en se liant au virus et en formant des complexes immuns, diminueraient la charge virale, influençant ainsi la survie des souris. Les résultats suggèrent aussi que l'induction efficace d'anticorps neutralisants contre LCMV nécessite une pleine capacité de diversification des lymphocytes B. Cependant, les expériences pourraient être

reprises pour confirmer cette affirmation, en raison des difficultés techniques indéterminées rencontrées lors du test de neutralisation de LCMV.

En résumé, cette étude a montré que la pleine diversité des anticorps n'est pas nécessaire pour produire des anticorps neutralisants et protéger la souris contre certains virus, en particulier les virus cytopathogènes, mais qu'elle est bénéfique pour une réponse immunitaire rapide contre ceux-ci. De plus, elle semble nécessaire pour l'induction d'une réponse humorale contre les virus non-cytopathogènes.

Ces conclusions constituent des prémices importantes pour nombre de recherches en immunologie car les virus VSV, MHV et LCMV constituent d'excellents modèles pour des virus causant d'importants problèmes de santé publique. Les virus cytopathogènes comme le poliovirus, l'influenza et le virus de la rage sont tous des virus qui induisent une production rapide d'anticorps neutralisants et peuvent facilement être comparés à VSV (revue par Seiler et al., 1998b). L'infection causée par le LCMV, qui induit tardivement et faiblement des anticorps neutralisants et persiste chez l'hôte naturel, ressemble à celles causées par les virus de l'hépatite B (HBV) (Chisari and Ferrari, 1995; Rehmann et al., 1996) et de l'hépatite C (HCV) (Hoofnagle, 1997), par le VIH (Fauci, 1996) mais aussi à des infections bactériennes, telles que la tuberculose (Mackness, 1968) et la lèpre (Britton, 1993). Le LCMV est d'ailleurs fréquemment utilisé comme modèle pratique pour étudier l'infection avec le HCV chez l'humain. Maintenant qu'il semble clair que la diversité des lymphocytes B1 est importante dans le contrôle de l'infection avec LCMV et que la diversité des lymphocytes B2 est importante dans l'induction d'une réponse humorale efficace, une étude plus poussée avec ce virus pourrait permettre de comprendre la réponse immunitaire contre HCV. Les personnes infectées avec HCV deviennent dans 75% à 85% infectés chroniquement alors que moins de 25% des patients résolvent l'infection aiguë (Cooper et al., 1999; Grakoui et al., 2003; Lechner et al., 2000; Thimme et al., 2002; Thimme et al., 2001). L'évaluation du rôle de la diversité des anticorps

naturels dans le recrutement de LCMV à la rate et dans sa distribution aux organes périphériques, de même que sur l'initiation de la réponse cellulaire pourrait donner des indices sur les causes de l'incapacité qu'on la majorité des patients à développer une réponse contre HCV, ce qui mène à la persistance du virus chez la majorité des individus.

Références

Andersen, I. H., Marker, O., and Thomsen, A. R. (1991). Breakdown of blood-brain barrier function in the murine lymphocytic choriomeningitis virus infection mediated by virus-specific CD8+ T cells. *J Neuroimmunol* *31*, 155-163.

Avrameas, S. (1991). Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* *12*, 154-159.

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.

Bachmann, M. F., Odermatt, B., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1996). Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* *183*, 2259-2269.

Baldrige, J. R., and Buchmeier, M. J. (1992). Mechanisms of antibody-mediated protection against lymphocytic choriomeningitis virus infection: mother-to-baby transfer of humoral protection. *J Virol* *66*, 4252-4257.

Barthold, S. W., Beck, D. S., and Smith, A. L. (1993). Enterotropic coronavirus (mouse hepatitis virus) in mice: influence of host age and strain on infection and disease. *Lab Anim Sci* *43*, 276-284.

Battegay, M., Moskophidis, D., Waldner, H., Brundler, M. A., Fung-Leung, W. P., Mak, T. W., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1993). Impairment and delay of neutralizing antiviral antibody responses by virus-specific cytotoxic T cells. *J Immunol* *151*, 5408-5415.

Baumgarth, N. (2000). A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev* *176*, 171-180.

Baumgarth, N., Herman, O. C., Jager, G. C., Brown, L., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. (1999). Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2250-2255.

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.

Benedict, C. L., Gilfillan, S., Thai, T. H., and Kearney, J. F. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunol Rev* *175*, 150-157.

- Bentolila, L. A., Olson, S., Marshall, A., Rougeon, F., Paige, C. J., Doyen, N., and Wu, G. E. (1999). Extensive junctional diversity in Ig light chain genes from early B cell progenitors of mu MT mice. *J Immunol* *162*, 2123-2128.
- Berek, C., and Milstein, C. (1988). The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev* *105*, 5-26.
- Bertrand, F. E., Golub, R., and Wu, G. E. (1998). V(H) gene replacement occurs in the spleen and bone marrow of non-autoimmune quasi-monoclonal mice. *Eur J Immunol* *28*, 3362-3370.
- Boes, M., Prodeus, A. P., Schmidt, T., Carroll, M. C., and Chen, J. (1998). A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med* *188*, 2381-2386.
- Borrow, P., and Oldstone, M. B. (1992). Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus. *J Virol* *66*, 7270-7281.
- Bos, N. A., Meeuwssen, C. G., Westmann, 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.
- Britton, W. J. (1993). Immunology of leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* *87*, 508-514.
- Bruns, M., Cihak, J., Muller, G., and Lehmann-Grube, F. (1983). Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization. *Virology* *130*, 247-251.
- Bruns, M., Kratzberg, T., Zeller, W., and Lehmann-Grube, F. (1990). Mode of replication of lymphocytic choriomeningitis virus in persistently infected cultivated mouse L cells. *Virology* *177*, 615-624.
- Buchmeier, M. J., Lewicki, H. A., Talbot, P. J., and Knobler, R. L. (1984). Murine hepatitis virus-4 (strain JHM)-induced neurologic disease is modulated in vivo by monoclonal antibody. *Virology* *132*, 261-270.
- Buchmeier, M. J., Lewicki, H. A., Tomori, O., and Oldstone, M. B. (1981). Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and pichinde viruses: generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology* *113*, 73-85.
- 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.
- 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.

- Burns, J. W., and Buchmeier, M. J. (1991). Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* *183*, 620-629.
- Butler, J. E. (1997). Immunoglobulin gene organization and the mechanism of repertoire development. *Scand J Immunol* *45*, 455-462.
- Carroll, M. C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* *16*, 545-568.
- Cascalho, M., Ma, A., Lee, S., Masat, L., and Wabl, M. (1996). A quasi-monoclonal mouse. *Science* *272*, 1649-1652.
- Cerny, A., Sutter, S., Bazin, H., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1988). Clearance of lymphocytic choriomeningitis virus in antibody- and B-cell-deprived mice. *J Virol* *62*, 1803-1807.
- Charan, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1987). Antibodies against the two serotypes of vesicular stomatitis virus measured by enzyme-linked immunosorbent assay: immunodominance of serotype-specific determinants and induction of asymmetrically cross-reactive antibodies. *J Virol* *61*, 2509-2514.
- Chen, C., Nagy, Z., Prak, E. L., and Weigert, M. (1995). Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity* *3*, 747-755.
- Chen, J., Trounstein, M., Alt, F. W., Young, F., Kurahara, C., Loring, J. F., and Huszar, D. (1993). Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol* *5*, 647-656.
- Chisari, F. V., and Ferrari, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* *13*, 29-60.
- Chothia, C., and Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* *196*, 901-917.
- Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., and et al. (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* *342*, 877-883.
- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., Houghton, M., Parham, P., and Walker, C. M. (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* *10*, 439-449.
- Cummings, D. A., Schwartz, I. B., Billings, L., Shaw, L. B., and Burke, D. S. (2005). Dynamic effects of antibody-dependent enhancement on the fitness of viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15259-15264.
- 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.

- Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y. (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 523-544.
- Davis, M. M., Lyons, D. S., Altman, J. D., McHeyzer-Williams, M., Hampl, J., Boniface, J. J., and Chien, Y. (1997). T cell receptor biochemistry, repertoire selection and general features of TCR and Ig structure. *Ciba Found Symp* 204, 94-100; discussion 100-104.
- Desiderio, S. V., Yancopoulos, G. D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M. A., Landau, N., Alt, F. W., and Baltimore, D. (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* 311, 752-755.
- Doms, R. W., Keller, D. S., Helenius, A., and Balch, W. E. (1987). Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *J Cell Biol* 105, 1957-1969.
- 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.
- Edelman, G. M., and Poulik, M. D. (1961). Studies on structural units of the gamma-globulins. *J Exp Med* 113, 861-884.
- Fagarasan, S., Muramatsu, M., Suzuki, K., Nagaoka, H., Hiai, H., and Honjo, T. (2002). Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 298, 1424-1427.
- Fauci, A. S. (1996). Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384, 529-534.
- Fearon, D. T., and Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-53.
- Ferrantelli, F., Rasmussen, R. A., Hofmann-Lehmann, R., Xu, W., McClure, H. M., and Ruprecht, R. M. (2002). Do not underestimate the power of antibodies--lessons from adoptive transfer of antibodies against HIV. *Vaccine* 20 Suppl 4, A61-65.
- 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.
- Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirose, S., Taniguchi, M., *et al.* (1997). Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med* 186, 439-448.
- Gallione, C. J., and Rose, J. K. (1983). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the entire glycoprotein from the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 46, 162-169.

- Gartner, F., Alt, F. W., Monroe, R. J., and Seidl, K. J. (2000). Antigen-independent appearance of recombination activating gene (RAG)-positive bone marrow B cells in the spleens of immunized mice. *J Exp Med* *192*, 1745-1754.
- 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.
- 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.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby*. Dunod, Paris, 2001.
- Gombold, J. L., Hingley, S. T., and Weiss, S. R. (1993). Fusion-defective mutants of mouse hepatitis virus A59 contain a mutation in the spike protein cleavage signal. *J Virol* *67*, 4504-4512.
- Gombold, J. L., Sutherland, R. M., Lavi, E., Paterson, Y., and Weiss, S. R. (1995). Mouse hepatitis virus A59-induced demyelination can occur in the absence of CD8⁺ T cells. *Microb Pathog* *18*, 211-221.
- Gonzalez, P. H., Cossio, P. M., Arana, R., Maiztegui, J. I., and Laguens, R. P. (1980). Lymphatic tissue in Argentine hemorrhagic fever. Pathologic features. *Arch Pathol Lab Med* *104*, 250-254.
- Grakoui, A., Shoukry, N. H., Woollard, D. J., Han, J. H., Hanson, H. L., Ghayeb, J., Murthy, K. K., Rice, C. M., and Walker, C. M. (2003). HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* *302*, 659-662.
- Grawunder, U., Leu, T. M., Schatz, D. G., Werner, A., Rolink, A. G., Melchers, F., and Winkler, T. H. (1995). Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* *3*, 601-608.
- Han, S., Dillon, S. R., Zheng, B., Shimoda, M., Schlissel, M. S., and Kelsoe, G. (1997). V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science* *278*, 301-305.
- Hangartner, L., Senn, B. M., Ledermann, B., Kalinke, U., Seiler, P., Bucher, E., Zellweger, R. M., Fink, K., Odermatt, B., Burki, K., *et al.* (2003). Antiviral immune responses in gene-targeted mice expressing the immunoglobulin heavy chain of virus-neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 12883-12888.
- Harada, Y., Muramatsu, M., Shibata, T., Honjo, T., and Kuroda, K. (2003). Unmutated immunoglobulin M can protect mice from death by influenza virus infection. *J Exp Med* *197*, 1779-1785.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* *173*, 1213-1225.

- Haury, M., Sundblad, A., Grandien, A., Barreau, C., Coutinho, A., and Nobrega, A. (1997). The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol* 27, 1557-1563.
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Honda, M., Herzenberg, L. A., Steinberg, A. D., and Herzenberg, L. A. (1984). Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2494-2498.
- Henderson, A., and Calame, K. (1998). Transcriptional regulation during B cell development. *Annu Rev Immunol* 16, 163-200.
- Hertz, M., Kouskoff, V., Nakamura, T., and Nemazee, D. (1998). V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling. *Nature* 394, 292-295.
- Hohdatsu, T., Yamada, M., Tominaga, R., Makino, K., Kida, K., and Koyama, H. (1998). Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline alveolar macrophages and human monocyte cell line U937 by serum of cats experimentally or naturally infected with feline coronavirus. *J Vet Med Sci* 60, 49-55.
- Honjo, T., Muramatsu, M., and Fagarasan, S. (2004). AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity* 20, 659-668.
- Hoofnagle, J. H. (1997). Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26, 15S-20S.
- Huneycutt, B. S., Bi, Z., Aoki, C. J., and Reiss, C. S. (1993). Central neuropathogenesis of vesicular stomatitis virus infection of immunodeficient mice. *J Virol* 67, 6698-6706.
- Iapalucci, S., Lopez, N., Rey, O., Zakin, M. M., Cohen, G. N., and Franze-Fernandez, M. T. (1989). The 5' region of Tacaribe virus L RNA encodes a protein with a potential metal binding domain. *Virology* 173, 357-361.
- Jacobsen, K., and Osmond, D. G. (1990). Microenvironmental organization and stromal cell associations of B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow. *Eur J Immunol* 20, 2395-2404.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-37.
- Kajino, K., Kajino, Y., and Greene, M. I. (1998). Fas- and perforin-independent mechanism of cytotoxic T lymphocyte. *Immunol Res* 17, 89-93.
- 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.

- 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., Watanabe, K., and Herzenberg, L. A. (1995). De novo development and self-replenishment of B cells. *Int Immunol* *7*, 55-68.
- Karasuyama, H., Rolink, A., Shinkai, Y., Young, F., Alt, F. W., and Melchers, F. (1994). The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell* *77*, 133-143.
- Kelley, J. M., Emerson, S. U., and Wagner, R. R. (1972). The glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibody. *J Virol* *10*, 1231-1235.
- Kelsoe, G. (1996). The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. *Semin Immunol* *8*, 179-184.
- Kimmig, B., and Lehmann-Grube, F. (1979). The immune response of the mouse to lymphocytic choriomeningitis virus. I. Circulating antibodies. *J Gen Virol* *45*, 703-710.
- Kleinfeld, R. W., and Weigert, M. G. (1989). Analysis of VH gene replacement events in a B cell lymphoma. *J Immunol* *142*, 4475-4482.
- Knipe, D., Rose, J. K., and Lodish, H. F. (1975). Translation of individual species of vesicular stomatitis viral mRNA. *J Virol* *15*, 1004-1011.
- Konieczko, E. M., Whitaker-Dowling, P. A., and Widnell, C. C. (1994). Membrane fusion as a determinant of the infectibility of cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* *199*, 200-211.
- Kouskoff, V., and Nemazee, D. (2001). Role of receptor editing and revision in shaping the B and T lymphocyte repertoire. *Life Sci* *69*, 1105-1113.
- Kreis, T. E., and Lodish, H. F. (1986). Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. *Cell* *46*, 929-937.
- Kroese, F. G., Ammerlaan, W. A., and Deenen, G. J. (1992). Location and function of B-cell lineages. *Ann N Y Acad Sci* *651*, 44-58.
- Kuwata, N., Igarashi, H., Ohmura, T., Aizawa, S., and Sakaguchi, N. (1999). Cutting edge: absence of expression of RAG1 in peritoneal B-1 cells detected by knocking into RAG1 locus with green fluorescent protein gene. *J Immunol* *163*, 6355-6359.
- Lai, M. M., and Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* *48*, 1-100.

- Lavi, E., Gilden, D. H., Highkin, M. K., and Weiss, S. R. (1986). The organ tropism of mouse hepatitis virus A59 in mice is dependent on dose and route of inoculation. *Lab Anim Sci* 36, 130-135.
- Lavi, E., Gilden, D. H., Wroblewska, Z., Rorke, L. B., and Weiss, S. R. (1984). Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus. *Neurology* 34, 597-603.
- Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., and Walker, B. D. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191, 1499-1512.
- 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.
- Lefrancois, L. (1984). Protection against lethal viral infection by neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies: distinct mechanisms of action in vivo. *J Virol* 51, 208-214.
- 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.
- Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L., and Del carrera, J. (1999). Vesicular stomatitis. *Vet J* 157, 239-260.
- Lewis, S. M. (1994). The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 56, 27-150.
- Li, Y. S., Wasserman, R., Hayakawa, K., and Hardy, R. R. (1996a). Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 5, 527-535.
- Li, Z., Dordai, D. I., Lee, J., and Desiderio, S. (1996b). A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle. *Immunity* 5, 575-589.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C., and Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* 190, 75-89.
- Lodish, H. F., and Porter, M. (1980). Heterogeneity of vesicular stomatitis virus particles: implications for virion assembly. *J Virol* 33, 52-58.
- 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.

- 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.
- Lutz, H. U. (1999). How pre-existing, germline-derived antibodies and complement may help induce a primary immune response to nonself. *Scand J Immunol* *49*, 224-228.
- Machamer, C. E., and Rose, J. K. (1987). A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J Cell Biol* *105*, 1205-1214.
- Mackness, G. B. (1968). The immunology of antituberculous immunity. *Am Rev Respir Dis* *97*, 337-344.
- MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* *12*, 117-139.
- Macneughton, M. R., and Davies, H. A. (1978). Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. *J Gen Virol* *39*, 545-549.
- Madan, M. K., Golub, R., Wabl, M., and Wu, G. E. (2000). Specific antibody production by V(H)-gene replacement. *Eur J Immunol* *30*, 2404-2411.
- Manaker, R. A., Piczak, C. V., Miller, A. A., and Stanton, M. F. (1961). A hepatitis virus complicating studies with mouse leukemia. *J Natl Cancer Inst* *27*, 29-51.
- 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.
- Masmoudi, H., Mota-Santos, T., Huetz, F., Coutinho, A., and Cazenave, P. A. (1990). All T15 Id-positive antibodies (but not the majority of VHT15+ antibodies) are produced by peritoneal CD5+ B lymphocytes. *Int Immunol* *2*, 515-520.
- Matthews, A. E., Weiss, S. R., and Paterson, Y. (2002). Murine hepatitis virus--a model for virus-induced CNS demyelination. *J Neurovirol* *8*, 76-85.
- Meffre, E., Papavasiliou, F., Cohen, P., de Bouteiller, O., Bell, D., Karasuyama, H., Schiff, C., Banchereau, J., Liu, Y. J., and Nussenzweig, M. C. (1998). Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells. *J Exp Med* *188*, 765-772.
- Melchers, F., Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T. H., Karasuyama, H., Ghia, P., and Andersson, J. (1995). Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* *7*, 214-227.
- Mims, C. A., and Tosolini, F. A. (1969). Pathogenesis of lesions in lymphoid tissue of mice infected with lymphocytic choriomeningitis (LCM) virus. *Br J Exp Pathol* *50*, 584-592.

- Monroe, R. J., Seidl, K. J., Gaertner, F., Han, S., Chen, F., Sekiguchi, J., Wang, J., Ferrini, R., Davidson, L., Kelsoe, G., and Alt, F. W. (1999). RAG2:GFP knockin mice reveal novel aspects of RAG2 expression in primary and peripheral lymphoid tissues. *Immunity* *11*, 201-212.
- Moskophidis, D., Cobbold, S. P., Waldmann, H., and Lehmann-Grube, F. (1987). Mechanism of recovery from acute virus infection: treatment of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice with monoclonal antibodies reveals that Lyt-2+ T lymphocytes mediate clearance of virus and regulate the antiviral antibody response. *J Virol* *61*, 1867-1874.
- Mozdzanowska, K., Maiese, K., and Gerhard, W. (2000). Th cell-deficient mice control influenza virus infection more effectively than Th- and B cell-deficient mice: evidence for a Th-independent contribution by B cells to virus clearance. *J Immunol* *164*, 2635-2643.
- 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.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* *274*, 18470-18476.
- Nagaoka, H., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Tsuji, M., and Nussenzweig, M. C. (2000). Immunization and infection change the number of recombination activating gene (RAG)-expressing B cells in the periphery by altering immature lymphocyte production. *J Exp Med* *191*, 2113-2120.
- Navaratnam, N., Morrison, J. R., Bhattacharya, S., Patel, D., Funahashi, T., Giannoni, F., Teng, B. B., Davidson, N. O., and Scott, J. (1993). The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase. *J Biol Chem* *268*, 20709-20712.
- Navas, S., Seo, S. H., Chua, M. M., Sarma, J. D., Lavi, E., Hingley, S. T., and Weiss, S. R. (2001). Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in the liver and cause hepatitis. *J Virol* *75*, 2452-2457.
- Nemazee, D. A., and Burki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* *337*, 562-566.
- Nunez, C., Nishimoto, N., Gartland, G. L., Billips, L. G., Burrows, P. D., Kubagawa, H., and Cooper, M. D. (1996). B cells are generated throughout life in humans. *J Immunol* *156*, 866-872.
- 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.

- Ochsenbein, A. F., and Zinkernagel, R. M. (2000). Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 21, 624-630.
- 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.
- Papavasiliou, F., Casellas, R., Suh, H., Qin, X. F., Besmer, E., Pelanda, R., Nemazee, D., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M. C. (1997). V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science* 278, 298-301.
- 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.
- Pewzner-Jung, Y., Friedmann, D., Sonoda, E., Jung, S., Rajewsky, K., and Eilat, D. (1998). B cell deletion, anergy, and receptor editing in "knock in" mice targeted with a germline-encoded or somatically mutated anti-DNA heavy chain. *J Immunol* 161, 4634-4645.
- Phillips, J. J., Chua, M. M., Lavi, E., and Weiss, S. R. (1999). Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence. *J Virol* 73, 7752-7760.
- Pinschewer, D. D., Perez, M., Jeetendra, E., Bachi, T., Horvath, E., Hengartner, H., Whitt, M. A., de la Torre, J. C., and Zinkernagel, R. M. (2004). Kinetics of protective antibodies are determined by the viral surface antigen. *J Clin Invest* 114, 988-993.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Rajewsky, K., Forster, I., and Cumano, A. (1987). Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 238, 1088-1094.
- Rehermann, B., Ferrari, C., Pasquinelli, C., and Chisari, F. V. (1996). The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 2, 1104-1108.
- Reiss, C. S., Plakhov, I. V., and Komatsu, T. (1998). Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain. *Ann N Y Acad Sci* 855, 751-761.
- Reth, M. (1994). B cell antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 6, 3-8.
- Reth, M. G., and Alt, F. W. (1984). Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJH gene segment rearrangements in lymphoid cells. *Nature* 312, 418-423.

- Reth, M. G., Jackson, S., and Alt, F. W. (1986). VHDJH formation and DJH replacement during pre-B differentiation: non-random usage of gene segments. *Embo J* 5, 2131-2138.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., *et al.* (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565-575.
- Roost, H. P., Bachmann, M. F., Haag, A., Kalinke, U., Pliska, V., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1995). Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1257-1261.
- Roost, H. P., Haag, A., Burkhart, C., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1996). Mapping of the dominant neutralizing antigenic site of a virus using infected cells. *J Immunol Methods* 189, 233-242.
- Rose, J. K., and Gallione, C. J. (1981). Nucleotide sequences of the mRNA's encoding the vesicular stomatitis virus G and M proteins determined from cDNA clones containing the complete coding regions. *J Virol* 39, 519-528.
- 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.
- Seiler, P., Brundler, M. A., Zimmermann, C., Weibel, D., Bruns, M., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1998a). Induction of protective cytotoxic T cell responses in the presence of high titers of virus-neutralizing antibodies: implications for passive and active immunization. *J Exp Med* 187, 649-654.
- Seiler, P., Kalinke, U., Rulicke, T., Bucher, E. M., Bose, C., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1998b). Enhanced virus clearance by early inducible lymphocytic choriomeningitis virus-neutralizing antibodies in immunoglobulin-transgenic mice. *J Virol* 72, 2253-2258.
- Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroshima, T., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., Endo, Y., Fujita, T., *et al.* (2000). Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol* 1, 441-446.
- Sleckman, B. P., Gorman, J. R., and Alt, F. W. (1996). Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu Rev Immunol* 14, 459-481.
- Sonoda, E., Pewzner-Jung, Y., Schwers, S., Taki, S., Jung, S., Eilat, D., and Rajewsky, K. (1997). B cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity* 6, 225-233.
- Stohlman, S. A., Hinton, D. R., Cua, D., Dimacali, E., Sensintaffar, J., Hofman, F. M., Tahara, S. M., and Yao, Q. (1995). Tumor necrosis factor expression during

- mouse hepatitis virus-induced demyelinating encephalomyelitis. *J Virol* *69*, 5898-5903.
- Sturman, L. S., Holmes, K. V., and Behnke, J. (1980). Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol* *33*, 449-462.
- Sturman, L. S., Ricard, C. S., and Holmes, K. V. (1985). Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. *J Virol* *56*, 904-911.
- Su, S. D., Ward, M. M., Apicella, M. A., and Ward, R. E. (1991). The primary B cell response to the O/core region of bacterial lipopolysaccharide is restricted to the Ly-1 lineage. *J Immunol* *146*, 327-331.
- Sutherland, R. M., Chua, M. M., Lavi, E., Weiss, S. R., and Paterson, Y. (1997). CD4+ and CD8+ T cells are not major effectors of mouse hepatitis virus A59-induced demyelinating disease. *J Neurovirol* *3*, 225-228.
- Szomolanyi-Tsuda, E., and Welsh, R. M. (2004). Judging a virus by its cover. *J Clin Invest* *114*, 895-897.
- Talbot, P. J., Arnold, D., and Antel, J. P. (2001). Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. *Curr Top Microbiol Immunol* *253*, 247-271.
- Taylor, L. D., Carmack, C. E., Huszar, D., Higgins, K. M., Mashayekh, R., Sequer, G., Schramm, S. R., Kuo, C. C., O'Donnell, S. L., Kay, R. M., and et al. (1994). Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *Int Immunol* *6*, 579-591.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H., and Chisari, F. V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15661-15668.
- 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.
- Thornton, B. P., Vetvicka, V., and Ross, G. D. (1994). Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. *J Immunol* *152*, 1727-1737.
- 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.

- Walker, D. H., McCormick, J. B., Johnson, K. M., Webb, P. A., Komba-Kono, G., Elliott, L. H., and Gardner, J. J. (1982). Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man. *Am J Pathol* *107*, 349-356.
- Walker, D. H., Murphy, F. A., Whitfield, S. G., and Bauer, S. P. (1975). Lymphocytic choriomeningitis: ultrastructural pathology. *Exp Mol Pathol* *23*, 245-265.
- Wienands, J., Larbolette, O., and Reth, M. (1996). Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 7865-7870.
- Wilson, P. C., Wilson, K., Liu, Y. J., Banchereau, J., Pascual, V., and Capra, J. D. (2000). Receptor revision of immunoglobulin heavy chain variable region genes in normal human B lymphocytes. *J Exp Med* *191*, 1881-1894.
- Wright, K. E., and Buchmeier, M. J. (1991). Antiviral antibodies attenuate T-cell-mediated immunopathology following acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol* *65*, 3001-3006.
- 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.
- Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., *et al.* (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* *16*, 161-170.
- Youd, M. E., Ferguson, A. R., and Corley, R. B. (2002). Synergistic roles of IgM and complement in antigen trapping and follicular localization. *Eur J Immunol* *32*, 2328-2337.
- Yu, W., Nagaoka, H., Jankovic, M., Misulovin, Z., Suh, H., Rolink, A., Melchers, F., Meffre, E., and Nussenzweig, M. C. (1999). Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature* *400*, 682-687.
- Zhang, Z., Zemlin, M., Wang, Y. H., Munfus, D., Huye, L. E., Findley, H. W., Bridges, S. L., Roth, D. B., Burrows, P. D., and Cooper, M. D. (2003). Contribution of Vh gene replacement to the primary B cell repertoire. *Immunity* *19*, 21-31.
- Zinkernagel, R. M. (1997). Felix Hoppe-Seyler Lecture 1997. Protective antibody responses against viruses. *Biol Chem* *378*, 725-729.
- Zinkernagel, R. M., Leist, T., Hengartner, H., and Althage, A. (1985). Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T cell activity, as well as with footpad swelling reaction, and all three are regulated by H-2D. *J Exp Med* *162*, 2125-2141.

