

Université du Québec

INRS-Institut Armand-Frappier

**Immunosuppression transitoire induite par un coronavirus murin dans un modèle
animal de la sclérose en plaques**

Par

Gabriel Marceau

Thèse présentée comme exigence partielle pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor
(Ph.D.) en virologie et immunologie

Directeur de recherche	Pierre Talbot, INRS – Institut Armand-Frappier
Président du jury de thèse	Alain Lamarre, INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Serge Rivest, Centre hospitalier de l'Université Laval
Examineur externe	Alexandre Prat, Centre hospitalier de l'Université de Montréal

RÉSUMÉ

Les coronavirus forment une famille très répandue de virus enveloppés au génome d'ARN et ils sont associés à une variété d'infections respiratoires, hépatiques, entériques et neurologiques chez plusieurs espèces animales. Chez les souris susceptibles, le coronavirus murin (MHV) déclenche une maladie inflammatoire démyélinisante partageant plusieurs caractéristiques avec la sclérose en plaques (SP). Cette maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC) est caractérisée par l'apparition de plaques de démyélinisation qui chez les souris du moins, requiert l'établissement d'une infection persistante du SNC. Il a été occasionnellement rapporté que plusieurs souches du MHV, dont MHV-A59, peuvent initier une immunosuppression qui en retour pourrait bien être importante dans l'établissement de cette infection persistante. Malheureusement, bien peu de détails ont été publiés sur l'immunosuppression induite par le MHV, particulièrement de la souche A59. Nous avons donc entrepris l'étude des mécanismes sous-jacents à ce processus.

Des souris C57BL/6 ont été inoculées par voie intracérébrale (i.c.) avec MHV-A59. La dose de 450 unités formatrices de plages cytopathique (UFP) a été sélectionnée pour sa capacité à induire des lésions de démyélinisation du SNC accompagnées d'infiltrations cellulaires et d'activation de cellules gliales (macrophages et microglies). L'infection aiguë s'est accompagnée d'une diminution marquée de la prolifération dès 4 jpi avec un minimum à 7 jpi et un retour progressif à la normale en phase chronique dès 14 jpi. Au moment de cette immunosuppression les lymphocytes T (marquage CD3, CD4 et CD8) et B (CD19) étaient en nombre réduits, mais représentaient un pourcentage normal des splénocytes, indiquant une diminution du nombre des autres splénocytes. La réaction proliférative des splénocytes de souris infectées a été diminuée ou faible lorsque ces cellules étaient stimulées par des antigènes viraux, la concanavaleine A (ConA) ou l'anticorps anti-CD3 (α CD3) conjointement avec l'anticorps anti-CD28 (α CD28). Seule la stimulation par l' α CD3 conjointement avec l'IL-2rh, ou la combinaison phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et ionomycine (Iono) ont produit une prolifération normale.

La diminution de prolifération est plus importante pour les splénocytes et les lymphocytes T, provenant de la rate ou infiltrant le SNC, chez les souris infectées avec 450 UFP que celles infectées avec 100 UFP. La stimulation en présence d'un nombre croissant de cellules dendritiques ne rétablit pas non plus une prolifération normale. La stimulation de splénocytes de souris transgéniques au niveau de leur récepteur T (souris 2.102tg), infectées n'a pas non plus produit une prolifération normale. Pris dans leur ensemble ces résultats suggèrent que l'infection induite une anergie transitoire.

L'absence d'infection des lymphocytes T par MHV-A59 a été vérifiée *in vitro* par la quantification de la transcription d'un gène viral (N) et l'anergie transitoire suggérée pourrait donc être le fait des cellules T régulatrices qui augmentent relativement peu, à l'exception de dans les ganglions lymphatiques cervicaux et dans le SNC, alors qu'une lymphopénie a été détectée en parallèle. La quantification de l'ARNm par RT-qPCR et des cytokines par « protein array » à la rate exclut une augmentation de l'IL-10 comme mécanisme. Par contre, la transcription accrue du TGF- β_1 offre un mécanisme probable de l'immunosuppression. Cependant, aucun accroissement de sécrétion du TGF- β_1 n'a été détecté ni à la rate, ni dans le sérum, ni dans le surnageant de cellules stimulées *in vitro*. Par contre des cellules T et d'autres splénocytes provenant des souris infectées contiennent plus de TGF- β_1 que les cellules de souris témoins.

Ces résultats sont compatibles avec un défaut de production de l'IL-2 par les cellules T activées suite à l'infection. Le récepteur viral, CEACAM1a, capable, du moins chez l'humain, d'inhiber la sécrétion d'IL-2 et la prolifération cellulaire, pourrait être impliqué. La cible de ce récepteur, la protéine kinase de 70 kilodaltons associée à la chaîne zêta (Zap70), est impliquée dans la maturation des lymphocytes T et le signal du TCR. Cette immunosuppression transitoire, mais efficace pourrait permettre au virus d'établir une infection persistante qui est en retour importante dans l'établissement d'un processus immunitaire menant à la démyélinisation du SNC.

Gabriel Marceau
Étudiant

Pierre Talbot
Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xxiii
Avant-propos.....	xxv
Introduction.....	1
1 Analyse bibliographique.....	4
1.1 La réponse immunitaire.....	5
1.1.1 La réponse innée.....	5
1.1.2 La réponse acquise à médiation cellulaire.....	7
1.1.3 La réponse acquise à médiation humorale.....	13
1.1.4 La tolérance.....	14
1.2 La sclérose en plaques.....	30
1.2.1 Épidémiologie.....	30
1.2.2 Pathologie.....	33
1.2.3 Étiologie.....	34
1.2.4 Modèles animaux de la sclérose en plaques.....	46
1.3 Les infections virales persistantes.....	58
1.3.1 Évasion virale à la réponse immunitaire.....	64
1.4 Les Coronavirus.....	71
1.4.1 Classification.....	78

1.4.2 Propriétés virales	80
1.4.3 Les coronavirus humains.....	84
1.4.4 Les coronavirus murins.....	86
1.5 Hypothèse.....	94
1.5.1 Objectifs.....	94
2 Matériel et méthodes.....	95
2.1 Lignées cellulaires.....	96
2.2 Virus.....	96
2.2.1 Production.....	96
2.2.2 Titrage des particules infectieuses.....	97
2.3 Souris.....	98
2.3.1 Souches.....	98
2.3.2 Infections.....	100
2.3.3 Traitements in vivo.....	100
2.3.4 Évaluation clinique.....	101
2.4 Histologie.....	103
2.4.1 Tissus.....	103
2.4.2 Colorations.....	104
2.4.3 Immunohistochimie.....	105
2.5 Acides nucléiques.....	106
2.5.1 Extraction de l'ARN.....	106
2.5.2 Détection de séquences d'acides nucléiques.....	107
2.6 Évaluation de la réponse immunitaire.....	114
2.6.1 Dosage immunoenzymologique des anticorps.....	114

2.6.2 Cultures primaires de cellules.....	115
2.6.3 Activité des lymphocytes.....	119
2.6.4 Cytokines.....	127
2.7 Cytométrie en flux.....	129
2.7.1 Cellularité.....	130
2.7.2 Lymphocytes T régulateurs.....	132
2.7.3 Marquage intracellulaire.....	132
2.8 Manipulations ex vivo.....	133
2.8.1 Infection ex vivo.....	133
2.8.2 Lymphoprolifération et virus.....	133
2.9 Statistiques.....	133
3 Paramètres de l'infection virale persistante avec maladie de démyélinisation du SNC	134
3.1 Brève introduction.....	135
3.2 Procédure expérimentale.....	136
3.3 Résultats.....	137
3.3.1 Dose infectieuse et survie.....	137
3.3.2 Cinétique virale.....	141
3.3.3 Persistance virale.....	143
3.3.4 Démyélinisation du SNC.....	146
3.3.5 Cinétique d'immunosuppression.....	149
3.3.6 Histopathologie.....	151
3.3.7 Cellularité.....	154
3.4 Discussion.....	157

3.4.1 Infection virale et démyélinisation.....	157
3.4.2 L'infection virale et le système immunitaire.....	159
3.4.3 Synthèse.....	163
4 Réponse immunitaire contre l'infection virale.....	164
4.1 Brève introduction.....	165
4.2 Procédure expérimentale.....	168
4.3 Résultats.....	169
4.3.1 Réactivité antivirale.....	169
4.3.2 Activation.....	171
4.3.3 Dose virale.....	173
4.3.4 Immunosuppression au sein du système nerveux central.....	175
4.3.5 Effet dose-réponse.....	177
4.3.6 Stimulations générales (ConA, α CD3, α CD28, IL-2, PMA/Iono).....	180
4.3.7 Corécepteur des lymphocytes T.....	182
4.3.8 Présentation antigénique.....	188
4.3.9 Divisions cellulaires.....	191
4.3.10 Commutation de classe.....	194
4.4 Discussion.....	196
4.4.1 Réactivité antivirale.....	196
4.4.2 Processus d'activation.....	198
4.4.3 Divisions cellulaires.....	200
4.4.4 Fonctions auxiliaires.....	201
4.4.5 Synthèse.....	204

5 Mécanismes de l'immunosuppression par le coronavirus murin de souche A59.....	205
5.1 Brève introduction.....	206
5.2 Procédure expérimentale.....	206
5.3 Résultats.....	207
5.3.1 Infection des splénocytes.....	207
5.3.2 Lymphocytes T régulateurs.....	209
5.3.3 Dysfonctionnement immunitaire.....	211
5.3.4 Cytokines immunosuppressives.....	213
5.3.5 Le facteur de croissance transformant.....	217
5.4 Discussion.....	222
5.4.1 Infection des cellules du système immunitaire.....	222
5.4.2 Lymphocytes T régulateurs.....	226
5.4.3 Lymphoprolifération croisée.....	228
5.4.4 Cytokines et immunosuppression.....	229
5.4.5 Synthèse.....	231
6 Modèle proposé de l'immunosuppression induite par le coronavirus murin de souche	233
.....
6.1 Brève introduction.....	234
6.2 Procédure expérimentale.....	235
6.3 Résultats.....	235
6.4 Discussion.....	240
6.4.1 Immunosuppression par MHV-A59.....	240
6.4.2 Le récepteur cellulaire de MHV-A59.....	240
6.4.3 Prolifération et virus.....	243

6.4.4 Modèle proposé.....	243
7 Conclusion.....	246
7.1 Conclusions principales.....	247
7.2 Sommaire des contributions.....	250
7.3 Futures recherches.....	252
Liste des références.....	254
Annexe.....	321
Liste des communications.....	322
Présentations orales.....	322
Affiches.....	322

Liste des tableaux

Tableau I: Maladies infectieuses du système nerveux central ou associées avec l'induction ou l'exacerbation de la sclérose en plaques.....	41
Tableau II: Thérapies développées dans le modèle animal d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et éventuellement certifiées pour le traitement de la sclérose en plaques (SP).....	49
Tableau III: Comparaison des pathologies associées à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et à la sclérose en plaques (SP).....	50
Tableau IV: Modèles animaux de démyélinisation chronique induite par les virus.....	52
Tableau V: Comparaison des pathologies associées à l'infection chronique par le virus de l'encéphalomyélite de Theiler et de la sclérose en plaques.....	55
Tableau VI: Comparaison des pathologies associées à l'infection par les souches neurovirulentes du coronavirus murin et de la sclérose en plaques.....	57
Tableau VII: Liste de virus employant les différents types de persistance.....	60
Tableau VIII: Virus capables d'échapper à la détection et l'élimination par le système immunitaire.....	65
Tableau IX: Les coronavirus identifiés à ce jour et leur propriétés.....	72
Tableau X: Critères d'évaluation neurologique des souris infectées par MHV-A59.....	102
Tableau XI: Description des amorces employées pour la détection de MHV-A59 lors de l'infection persistante.....	110
Tableau XII: Description des amorces employées dans la quantification relative des ARNm de cytokines par RT-qPCR.....	112
Tableau XIII: Description des amorces employées dans la quantification relative des ARNm des produits affectés par le récepteur du TGF- β 1 par RT-qPCR.....	113
Tableau XIV: Liste des anticorps sélectionnés pour l'analyse en cytométrie en flux.....	131
Tableau XV: Cinétique d'apparition des lésions au sein du système nerveux central suite à l'infection par MHV-A59.....	148
Tableau XVI: Cytokines et commutation de classe.....	203

Liste des figures

Figure 1: Différentiation des lymphocytes T et mécanismes de régulation.....	29
Figure 2: Progression des épisodes de rémissions et rechutes, lésions inflammatoires et dommages permanents du système nerveux central.....	32
Figure 3: Prévalences géographiques de la sclérose en plaques et migrations.....	37
Figure 4: Méta-analyse des naissances des patients atteints de sclérose en plaques.....	38
Figure 5: Mécanismes postulés de génération de l'auto-immunité anti-myéline déclenchée ou exacerbée par une infection virale transitoire.....	43
Figure 6: Modèle comparatif théorique des maladies monogéniques et multifactorielles....	45
Figure 7: Production infectieuse, antigénique et génomique selon les types de persistance virale.....	63
Figure 8: Arbre phylogénétique des coronavirus.....	79
Figure 9: Structure des coronavirus et propriétés des protéines structurales.....	81
Figure 10: Organisation génomique et stratégie de réplication des coronavirus.....	83
Figure 11: Souris transgéniques 2.102 TCR tg.....	99
Figure 12: Schéma expérimental de lymphoprolifération.....	124
Figure 13: Schéma expérimental de lymphoprolifération croisée.....	126
Figure 14: Survie de souris C57BL/6 à l'infection par MHV-A59.....	139
Figure 15: Poids corporel suite à l'infection de souris C57BL/6 par MHV de souches JHM et A59.....	140
Figure 16: Titres viraux dans certains organes lors de la phase aiguë de l'infection de souris C57BL/6 par MHV-A59.....	142
Figure 17: Persistance de l'ARNm viral et réplication génomique au sein du système nerveux central et de la rate de souris C57BL/6 infectées par MHV-A59.....	144
Figure 18: Lésions de démyélinisation avec infiltrations cellulaires et activation des macrophages et microglies dans la moelle épinière de souris C57BL/6 suite à l'infection par MHV-A59.....	147
Figure 19: Cinétique de l'immunosuppression suite à l'infection par MHV-A59.....	150

Figure 20: Involutions thymiques et spléniques à 7 jpi suite à l'infection du système nerveux central par MHV-A59.....	152
Figure 21: Coupes histologiques de la rate et du thymus.....	153
Figure 22: Cellularité à 7 jpi des lymphocytes T dans le système nerveux central, dans les ganglions lymphatiques cervicaux, dans la rate et dans le thymus suite à l'infection intracérébrale par MHV-A59.....	155
Figure 23: Cellularité à 7 jpi des lymphocytes dans la rate suite à l'infection par MHV-A59.	156
Figure 24: Ratio des poids de la rate et des poids corporels suite à l'infection du système nerveux central par MHV-A59.....	162
Figure 25: Voie de signalisation de l'activation des lymphocytes T.....	167
Figure 26: Proliférations spécifiques des splénocytes contre les antigènes viraux suite à l'infection par MHV-A59.....	170
Figure 27: Marqueurs d'activation des lymphocytes T à la rate suite à l'infection par MHV-A59.....	172
Figure 28: Immunosuppression des splénocytes et des lymphocytes T à différentes doses virales lors de l'infection par MHV-A59.....	174
Figure 29: Immunosuppression des lymphocytes T au sein du système nerveux central suite à l'infection par MHV-A59.....	176
Figure 30: Immunosuppression des splénocytes sous diverses stimulations suite à l'infection par MHV-A59.....	179
Figure 31: Stimulations alternatives et leurs effets sur l'immunosuppression suite à l'infection par MHV-A59.....	181
Figure 32: Expression du corécepteur CD28 à la surface des lymphocytes T de la rate suite à l'infection par MHV-A59.....	183
Figure 33: Traitement à l'interleukine 2 et scores cliniques neurologiques de souris suite à l'infection par MHV-A59.....	185
Figure 34: Prolifération de lymphocytes T en présence de divers ratios de cellules dendritiques.....	187
Figure 35: Survie des souris possédant un récepteur des lymphocytes T transgénique et spécifique du peptide Hb64-76 lors de l'infection par MHV-A59.....	189

Figure 36: Prolifération dans un contexte de présentation antigénique spécifique et immunosuppression suite à l'infection par MHV-A59.....	190
Figure 37: Prolifération de splénocytes marqués au CFSE et stimulés, suite à l'infection par MHV-A59.....	193
Figure 38: Titres d'anticorps spécifique de MHV-A59 pendant la phase aiguë de l'infection.	195
Figure 39: Susceptibilité à l'infection par MHV-A59 des splénocytes et des lymphocytes T.	208
Figure 40: Lymphocytes T régulateurs FOXP3+ suite à l'infection par MHV-A59.....	210
Figure 41: Test de lymphoprolifération croisée avec des lymphocytes T et des cellules présentatrices d'antigènes suite à l'infection par MHV-A59.....	212
Figure 42: Modulation du niveau d'expression de gènes de cytokines à la rate suite à l'infection par MHV-A59.....	214
Figure 43: Dosages de cytokines sur des extraits totaux de rate suite à l'infection par MHV-A59.....	215
Figure 44: Lymphoprolifération de splénocytes de souris traitées par injection d'anticorps bloquant le récepteur de l'interleukine 10 suite à l'infection par MHV-A59.....	216
Figure 45: Dosages immunoenzymologique du facteur de croissance transformant dans le sérum suite à l'infection par MHV-A59.....	218
Figure 46: Dosage immunoenzymologique du facteur de croissance transformant dans le surnageant de cultures de splénocytes de souris suite à l'infection par MHV-A59.....	219
Figure 47: Induction de la transcription de gènes ciblés du facteur de croissance transformant à la rate suite à l'infection par MHV-A59.....	220
Figure 48: Expression du facteur de croissance transformant par les splénocytes suite à l'infection par MHV-A59.....	221
Figure 49: Prolifération de splénocytes en présence de lysats de cultures de cellules susceptibles infectées par MHV-A59.....	237
Figure 50: Prolifération de splénocytes et de lymphocytes T en présence de MHV-A59 concentré.....	238
Figure 51: Prolifération de splénocytes et de lymphocytes T en présence de MHV-A59 et d'anticorps neutralisants.....	239

Figure 52: Modèle proposé de mécanisme d'immunosuppression suite à l'infection par
MHV-A59.....245

Liste des abréviations

°C	Degrés Celsius
α CD3	Anticorps anti-CD3
α CD28	Anticorps anti-CD28
A59	Souche A59 du MHV
a.a.	Acide aminé
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (<i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i> ; DNA)
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique (<i>RiboNucleic Acid</i> , RNA)
ARNm	ARN messenger
ATCC	« <i>American Type Tissue Collection</i> »
BCoV	Coronavirus bovin (<i>Bovine CoronaVirus</i>)
BCR	Récepteur des lymphocytes B (<i>B-Cell Receptor</i>)
BFA	Bréfeldine A
BHE	Barrière hématoencéphalique (<i>Blood-Brain Barrier</i> ; BBB)
BtCoV	Coronavirus des chauve-souris (<i>Bat CoronaVirus</i>)
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CCoV	Coronavirus canin (<i>Canine CoronaVirus</i>)
CD	Classe de différenciation (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CDV	Virus de la maladie de Carré (<i>Canine Distemper Virus</i>)
CEACAM	Molécule d'adhésion cellulaire apparenté aux antigènes carcinoembryonnaires (<i>CarcinoEmbryonic Antigen-related Cellular Adhesion Molecule</i>)
CFSE	Ester de 5-(6)-carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl (<i>5-(6)-CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester</i>)
Ci	Curie; Unité d'activité égale à $3,7 \times 10^{10}$ désintégrations par seconde exactement
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité (<i>Major Histocompatibility Complex</i> ; MHC)

CMV	Cytomégalovirus
CO₂	Dioxyde de carbone
ConA	Concanavaline A
CoV	Coronavirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigène (<i>Antigen Presenting Cell</i> ; APC)
cpm	Coups par minute
Cy-5	Cychrome 5
Ct	Cycle seuil (<i>Cycle Treshold</i>)
CTL	Lymphocyte T CD8 ⁺ ou cytotoxique (<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
CTLA-4	Antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (<i>Cytotoxic T Cell Antigen 4</i>)
DAB	3,3'-diaminobenzidène
DAPI	4',6-diamidine-2'-phénylindole dihydrochloride
dATP	Désoxyadénosine tri-phosphate
DBT	Astrocytome de souris (<i>Delayed Brain Tumor</i>)
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DICT₅₀	Dose infectieuse en culture de tissu pour 50 % des cellules (<i>Tissue Culture Infectious Dose 50 %</i> ; TCID ₅₀)
DL₅₀	Dose létale pour 50 % des individus (<i>Lethal Dose 50 %</i> ; LD ₅₀)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSP	Déterminant moléculaire spécifique des pathogènes (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> ; PAMP)
dNTP	Désoxynucléotides tri-phosphates
DO₂₆₀	Densité optique à 260 nm
DTT	1,4-Dithiothréitol
E	Protéine de l'enveloppe
EAE	Encéphalomyélite allergique/auto-immune expérimentale (<i>Experimental Allergic/Autoimmune Encephalomyelitis</i>)
EBV	Virus d'Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr Virus</i> ; EBV)
ECoV	Coronavirus équin (<i>Equine CoronaVirus</i>)
ECP	Effet cytopathique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique (<i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)

EIAV	Virus de l'anémie infectieuse équine (<i>Equine Infectious Anemia Virus</i>)
ELISA	Méthode de détection immunoenzymologique (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay</i>)
ERK	Kinases régulées par des signaux extracellulaires (<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>)
FECoV	Coronavirus entérique des félins (<i>Feline Enteric CoronaVirus</i>)
FIPV	Virus de la péritonite infectieuse des félins (<i>Feline Infectious Peritonitis Virus</i>)
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FLV	Virus de la leucémie de Friend (<i>Friend Leukemia Virus</i>)
FPV	Parvovirus des félins (<i>Feline Parvovirus</i>)
FOXP3	Facteur de transcription des lymphocytes régulateurs (<i>Forkhead Box Protein 3</i>)
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GATA3	Facteur de transcription GATA 3 (<i>GATA binding protein 3</i>)
GiCoV	Coronavirus de la giraffe (<i>Giraffe CoronaVirus</i>)
GITR	Récepteur du facteur de nécrose tumorale induit par les glucocorticoïdes (<i>Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor</i>)
³H	Tritium
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂SO₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chloridrique
HCoV	Coronavirus humain (<i>Human CoronaVirus</i>)
HIS	Sérum hyperimmun (<i>HyperImmune Serum</i>)
HE	Hémagglutinine estérase
H&E	Hématoxyline et éosine
HECoV	Coronavirus entérique humain (<i>Human Enteric CoronaVirus</i>)
HEPES	Acide 4-(2-Hydroxyéthyle)-1-piperazineéthanesulfonique
HHV	Virus de l'herpès humain (<i>Human Herpes Virus</i>)
HRP	Peroxydase de raifort (<i>HorseRadish Peroxydase</i>)
HSK	Ulcère herpétique de la cornée (<i>Herpes Stromal Keratitis</i>)
HSV	Virus herpès simplex (<i>Herpes Simplex Virus</i>)

HTLV	Virus des lymphocytes T humains (<i>Human T cell Lymphotropic/Lymphoma Virus</i>)
IBV	Coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire (<i>Infectious Bronchitis Virus</i>)
i.c.	Intracérébral
Ig	Immunoglobuline
IHC	Immunohistochimie
IFN	Interféron
IFNAR	Récepteur des interférons de type I (<i>IFN alpha Receptor</i>)
IIF	Immunofluorescence indirecte (<i>Indirect Immunofluorescence</i>)
i.g.	Intragastrique
IL	Interleukine
IL-2rh	IL-2 recombinante humaine
IL-xR	Récepteur d'interleukine
i.n.	Intranasal
Iono	Ionomycine
i.p.	Intrapéritonéal
IP-10	(<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; CXCL10</i>)
IPEX	Dérèglement immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie, liés au chromosome X (<i>Immunodysregulation Polyendocrinopathy Pnteropathy X-linked syndrom</i>)
IS	Indice de stimulation
ITAM	Motifs d'activation tyrosine des immunorécepteurs (<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>)
ITIM	Motifs d'inhibition tyrosine des immunorécepteurs (<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i>)
JC	Virus « John Cunningham »
JHM	Souche JHM (John Howard Mueller) du MHV
JNK	Kinases amino-terminale de c-Jun (<i>c-Jun N-terminal Kinases</i>)
jpi	Jours post-infection
kb	Kilobases nucléiques (10 ³ bases)
KCl	Chlorure de potassium

kDa	Kilodalton (10^3 dalton)
KH₂PO₄	Phosphate de potassium
kpb	Kilopaires de bases nucléiques (10^3 paires de bases)
LAT	Adapteur des cellules T activées (<i>Linker of Activated T cells</i>)
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire (<i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i>)
LFB	Bleu luxol rapide (<i>Luxol Fast Blue</i>)
M	Protéine de la membrane
M	Molaire
MAG	Glycoprotéine associée à la myéline (<i>Myelin Associated Glycoprotein</i>)
MBP	Protéine basique de la myéline (<i>Myelin Basic Protein</i>)
MCAO	Occlusion de l'artère sylvienne (<i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>)
MCP	Protéine chimioattractrice des macrophages (<i>Macrophage Chemoattractant Protein</i>)
MEM	Milieu de culture essentiel minimal (<i>Minimum Essential Media</i>)
MgCl₂	Dichlorure de magnésium
MHV	Coronavirus de l'hépatite murine (<i>Murine Hepatitis Virus</i>)
MIP	Protéine inflammatoire des protéines (<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>)
M-MLV	Virus de la leucémie murine de Moloney (<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>)
MMP	Métalloprotéinase matricielle (<i>Matrix MetalloProteinase</i>)
MOI	Multiplicité d'infection (<i>Multiplicity of Infection</i>)
MOG	Glycoprotéine des oligodendrocytes de la myéline (<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>)
N	Protéine de la nucléocapside
NaCl	Chlorure de sodium
NCBI	« <i>National Center for Biotechnology Information</i> »
NF-κb	Facteur nucléaire de la chaîne légère kappa des cellules B activées (<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NFAT	Facteur nucléaire des cellules T activées (<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>)
NK	Cellules tueuses naturelles (<i>Natural Killer</i>)
Oligo(dT)	Acide oligodésoxythymidylrique

OPD	o-phénylène diamine
pb	Paires de bases nucléiques
PBS	Solution saline avec tampon phosphate (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCoV	Coronavirus du Puffin des Anglais (<i>Puffinosis CoronaVirus</i>)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Phycoérythrine
PEDV	Coronavirus de la diarrhée épidémique du porc (<i>Porcine Epidemic Diarrhea Virus</i>)
PFA	Paraformaldéhyde
pH	Potentiel hydrogène
PhCoV	Coronavirus des Faisans (<i>Pheasant CoronaVirus</i>)
PHA	Phytohémagglutinine (<i>Phytohaemagglutinin</i>)
PHEV	Virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine (<i>Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus</i>)
pi	Post-infection
PLP	Protéine protéolipidique (<i>ProteoLipid Protein</i>)
PM	Poids moléculaire
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PRCoV	Coronavirus respiratoire porcin (<i>Porcine Respiratory CoronaVirus</i>)
p/v	Poids pour volume
qPCR	PCR quantitatif (<i>Quantitative PCR</i>)
RAG	Gène activateur de la recombinaison (<i>Recombination Activating Gene</i>)
RbCoV	Coronavirus des lapins (<i>Rabbit CoronaVirus</i>)
RNase	Ribonucléase
ROR	Récepteurs nucléaires orphelins relatifs à RAR (<i>RAR-related Orphan Receptors</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RtCoV	Coronavirus des rats (<i>Rat CoronaVirus</i>)
RT	Transcriptase inverse (<i>Reverse Transcriptase</i>)
RV	Virus de la peste bovine (<i>Rinderpest virus</i>)
S	Protéine de spicule (<i>Spike protein</i>)

SARS-CoV	Coronavirus associé au SRAS (<i>SARS-Associated CoronaVirus</i>)
SCID	Déficit immunitaire combiné sévère (<i>Severe Combined Immunodeficiency Disease</i>)
SDAV	Coronavirus de la sialodacyoadénite du rat (<i>Rat SialoDacryoAdenitis Virus</i>)
SDS	Dodécylsulfate de sodium (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SFV	Virus de la forêt de Semliki (<i>Semliki Forest Virus</i>)
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise (<i>Acquired ImmunoDeficiency Syndrome; AIDS</i>)
SNC	Système nerveux central (<i>Central Nervous System; CNS</i>)
SP	Sclérose en plaques (<i>Multiple Sclerosis; MS</i>)
SRAS	Syndrome respiratoire aigu sévère (<i>Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS</i>)
STAT	Transducteur de signal et activateur de la transcription (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
SV40	Virus simien 40 (<i>Simian Virus 40</i>)
SVF	Sérum de veau foetal
SW1	Coronavirus des bélugas (<i>Beluga whale Coronavirus</i>)
TAE	Tris-acétate-EDTA
Taq	Polymérase d'ADN de <i>Thermus aquaticus</i>
T-bet	Facteur de transcription T-box exprimé dans les cellules T; TBX21 (<i>T-box expressed in T cell</i>)
TBST	Salin tamponné au Tris avec Tween (<i>Tris-Buffered Saline with Tween</i>)
TBX21	voir T-bet
TCoV	Coronavirus du dindon (<i>Turkey CoronaVirus</i>)
TCR	Récepteur des lymphocytes T (<i>T-Cell Receptor; TCR</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TGEV	Coronavirus de gastroentérite transmissible (<i>Transmissible GastroEnteritis Virus</i>)
TGF	Facteur de croissance transformant (<i>Transforming Growth Factor</i>)
T_H	Lymphocyte T auxiliaire ou CD4 ⁺ (<i>T Helper</i>)
TLR	Récepteur homologue de Toll (<i>Toll-Like Receptor</i>)

TMEV	Virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (<i>Theiler's Murine Encephalitis Virus</i>)
TNF	Facteur onconécrosant (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
T_{Reg}	Lymphocyte T régulateur
Tris	Tris((hydroxyméthyl)-amino-méthane
TUNEL	Marquage des extrémités 3' libres des fragments d'ADN génomique par la terminase transférase (<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling</i>)
UI	Unité enzymatique internationale
UFP	Unité formatrice de plages (<i>Plaque-Forming Unit</i> ; PFU)
UV	Ultraviolet
V	Volts
VHB	Virus de l'hépatite B (<i>Hepatitis B Virus</i> ; HBV)
VHC	Virus de l'hépatite C (<i>Hepatitis C Virus</i> ; HCV)
VHD	Virus de l'hépatite D (<i>Hepatitis D Virus</i> ; HDV)
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine (<i>Human Immunodeficiency Virus</i> ; HIV)
VLA-4	Antigène très tardif de l'activation (<i>Very Late Activation</i>)
VMV	Virus Maedi-Visna (<i>Maedi-Visna Virus</i>)
VMVA	Virus du vison aléoutien (<i>Aleutian Disease Virus</i> ; ADV)
VPH	Virus du papillome humain (<i>Human Papilloma Virus</i> ; HPV)
VZV	Virus de la varicelle et du zona (<i>Varicella-Zoster Virus</i>)
v/v	Volume pour volume
wt	Type sauvage (<i>wild type</i>)
Zap70	Protéine kinase de 70 kilodalton associée à la chaîne zeta (<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>)

REMERCIEMENTS

Je voudrais profiter de l'occasion pour remercier tous ceux, en espérant n'en oublier aucun, qui ont tenu une part dans cette aventure du doctorat.

Je tiens d'abord à témoigner de ma reconnaissance envers le docteur Pierre Talbot qui m'a offert ce projet et une place dans son équipe. Je le remercie aussi d'avoir permis ma participation lors de divers congrès nationaux et internationaux. Le docteur Pierre Talbot est le récipiendaire de la Chaire de recherche du Canada en neuro-immunovirologie et d'une subvention des Instituts de recherche en santé du Canada qui financent les travaux du laboratoire et incidemment ceux présentés ici.

J'adresse mes remerciements aux organismes qui m'ont soutenu financièrement. La Fondation Armand-Frappier pour les trois bourses RBC-Groupe Financier. Le Programme de formation en neuro-inflammation pour la bourse d'étude et les trois bourses de voyage pour congrès. La Société canadienne de la sclérose en plaques pour la bourse d'étude et une excellente opportunité d'échanger avec d'excellents chercheurs en neuro-immunologie lors de leur congrès « *endMS* » à Banff.

Je remercie aussi tous ceux qui m'ont conseillé pendant ces années: Marcel Desrosiers en cytométrie et en microscopie, Yvon Lamontagne avec les souris transgéniques, Jennifer Bérard pour les coupes au cryostat et les colorations de démyélinisation et docteur Nathalie Arbour pour le protocole de marquage au CFSE. Merci aux docteurs Claude Daniel, Samuel David, Ciriaco Piccirillo et Alain Lamarre pour leur apport scientifique et critique.

Un merci particulier à Francine Lambert, parce que rien n'égale 30 ans d'expérience! Merci à Marc Desforges et Hélène Jacomy pour les, très nombreuses, discussions, suggestions et encouragements. Je n'ai pas toujours suivi vos conseils, j'avoue que j'ai la tête dure, mais j'ai toujours accordé une grande valeur à votre opinion. Merci à tous les Talbotins et Lamarriens de ces 5 dernières années. Merci aussi à Edith Gruslin, pour le

matériel que j'ai pu récupérer et l'information clairement inscrite dans ses cahiers de laboratoire, il m'est impossible d'évaluer tout le temps que j'ai pu ainsi sauver.

Merci finalement à mes parents, Laurence et Aimé, pour tout le soutien. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour les encouragements, les conseils et l'assistance. Cette thèse est en fait l'aboutissement de 25 années d'études, que vous avez appuyé. Merci particulièrement pour m'avoir aidé à garder un peu de santé mentale pendant ces semaines de rédaction.

Bonne lecture,

Gabriel

AVANT-PROPOS

Ce document porte sur la question de l'immunosuppression lors d'infections persistantes du système nerveux central. Une telle immunosuppression est observée lors de diverses infections virales comme mécanisme menant à la persistance. Le modèle présenté se veut une contribution personnelle à la compréhension des mécanismes permettant l'établissement d'une infection persistante.

Le premier chapitre de cette thèse présente un résumé de l'état des connaissances dans des domaines aussi variés que l'immunité antivirale, la sclérose en plaques, les infections persistantes, et les coronavirus. Le chapitre 2 présente l'ensemble du matériel et des méthodes employées lors de mes travaux. Les chapitres 3 à 5 ont trait au travail réalisé ces 6 années de mon doctorat et divisent en thèmes les résultats obtenus. Le chapitre 6 présente un modèle de mécanisme d'induction de l'immunosuppression par MHV-A59 et le chapitre 7 les conclusions à tirer de ce travail.

INTRODUCTION

Les coronavirus forment une famille de virus enveloppés possédant un génome d'ARN monocaténaire de polarité positive. Ceux-ci se retrouvent dans toutes les régions du monde et infectent une grande variété de mammifères (porc, chat, souris, bovins, chiens, lapins, humains, etc.) et d'oiseaux. Ils causent diverses maladies respiratoires, entériques, hépatiques et neurologiques. Chez l'humain, ils sont responsables des infections respiratoires causant un tiers des rhumes et sont parfois associés à l'exacerbation de l'asthme et de pneumonies. Plus récemment le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) a aussi été décrit et son agent étiologique est le coronavirus probablement le plus connu (SARS-CoV). Même si aucune association claire et directe n'a été faite entre les coronavirus et d'autres types de pathologies, des études épidémiologiques ont suggérées une association probable de ce virus ubiquitaire chez l'humain avec l'établissement ou l'exacerbation de maladies entériques et neurologiques, notamment la sclérose en plaques (SP). La SP est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC) caractérisée par la destruction en plaques de la gaine de myéline entourant les cellules nerveuses et par l'infiltration de cellules et molécules inflammatoires. Ces différentes plaques de démyélinisation autour des axones des neurones et leur localisation expliquent la variété des symptômes ressentis par les malades: troubles de la vue, troubles moteurs, etc. Cette maladie, qui touche 1 personne sur 500 au Québec, est une cause majeure d'infirmité neurologique chez les jeunes et se présente sous différentes formes: bénigne, cyclique, progressive. Même si une susceptibilité génétique a été identifiée, la ou les causes de la SP demeurent inconnues. Il est reconnu cependant que la réponse immunitaire est impliquée dans les dommages à la myéline ou aux oligodendrocytes qui sont responsables de sa synthèse et de son maintien. D'ailleurs, les thérapies actuellement employées ont toutes comme effet principal la modulation de la réponse immunitaire et inflammatoire. Plusieurs autres maladies démyélinisantes ont une étiologie virale et divers indices suggèrent une telle association entre le coronavirus et la SP. Par exemple, des infections des voies respiratoires supérieures sont associées à l'exacerbation de la SP. De plus, certains coronavirus humain (HCoV) ont été trouvés dans le cerveau de patients atteints de la SP et il

a été montré que les cellules humaines d'origines neurales immortalisées et primaires sont susceptibles à l'infection aiguë et persistante par le HCoV. Donc, le HCoV apparaît être capable de neurotropisme, de neuroinvasion et de neurovirulence à l'instar de son proche parent murin.

Effectivement, le coronavirus murin (MHV) peut infecter le SNC de primates non humains et de rongeurs et se propager de la périphérie vers le SNC. Tout comme pour la SP, l'infection par le MHV dépend d'une susceptibilité génétique (la souche SJL est protégée alors que la souche C57BL/6 est susceptible). L'observation de lymphocytes T capables de réactions croisées entre la myéline, en l'occurrence la protéine basique de la myéline (MBP) et la protéine protéolipidique (PLP), et le HCoV, chez les patients atteints de SP fut confirmée au niveau clonal pour les deux souches du HCoV (OC43 et 229E), suggérant la présence d'un mimétisme antigénique. De tels clones autoréactifs ont été occasionnellement identifiés chez les souris suite à l'infection par MHV-JHM et MHV-A59. Malgré cela, il a été rapporté que plusieurs souches du MHV, incluant MHV-A59, peuvent initier une immunosuppression transitoire. Plusieurs observations anecdotiques sur des altérations de l'immunité s'ajoutent à quelques études plus précises sur les effets immunosuppresseurs de l'infection aiguë par MHV-A59. En bref, la taille des rates et thymus des souris infectées subit une réduction importante avec altération du nombre de cellules immunitaires. Le potentiel prolifératif des cellules de thymus et rates de souris infectées est largement réduit malgré l'utilisation de stimulants très efficaces. Toutefois jusqu'à ce jour, aucun mécanisme n'a encore été proposé et seule une réduction de production de l'IL-2 suite à la stimulation peut expliquer l'absence de prolifération observée. Cette immunosuppression est cependant transitoire et disparaît peu de temps après la fin de la phase aiguë de l'infection. Plusieurs virus induisant une infection persistante utilisent divers mécanismes afin d'échapper à la réponse immunitaire dans le but d'infecter la population cellulaire qui permet une telle persistance. L'infection lytique ou paralysante des lymphocytes T ou encore l'induction de cytokines immunomodulatrices peuvent être des mécanismes employés par les virus pour induire une infection persistante. Il a, jusqu'à présent, été établi que l'infection persistante du SNC est requise pour l'induction de la démyélinisation par les MHV neurovirulents. Cependant, aucun lien n'a été

établi entre cette persistance et l'immunosuppression qui est aujourd'hui encore trop mal connue. Nous avons donc caractérisé plus à fond la nature et les mécanismes sous-jacents à ce processus immunosuppresseur.

L'étude expérimentale qui suit vise à mieux comprendre les phénomènes ayant cours dans les souris infectées avec la souche A59 du MHV. Le premier chapitre fait un survol, de divers sujets d'intérêts pour la discussion des résultats, présentés en quatre chapitres.

Suite au second chapitre listant le matériel et la méthodologie employée le troisième chapitre présente les paramètres de l'infection. Cette section vise à établir la dose minimale de virus permettant une infection persistante avec démyélinisation du SNC et les changements subis par les organes et cellules du système immunitaire. Des techniques de coupe et de coloration histologiques ainsi que de marquages en surface pour la cytométrie en flux ont été principalement employées. Le quatrième chapitre présente les paramètres de l'immunité suite à l'infection. Cette section a pour objectif d'étudier et de caractériser la réaction immunitaire en présence de diverses stimulations. Pour ce faire, l'incorporation de [³H] thymidine et les marquages en cytométrie ont été les méthodes privilégiées. Le cinquième chapitre présente divers mécanismes potentiels de l'induction de l'immunosuppression par MHV-A59. Pour cette section s'ajoute aux techniques précédentes les quantifications de l'ARNm par transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne quantitative (RT-qPCR) et des dosages immunoenzymologique (ELISA) et « protein array » de cytokines. Le sixième chapitre présente un modèle expliquant l'immunosuppression par MHV-A59 et quelques expérimentations tentant d'en démontrer la validité. De plus amples études devront par contre être accomplies pour confirmer, le modèle proposé de mécanisme d'immunosuppression ainsi que son importance dans la maladie de démyélinisation induite par MHV-A59.

1 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 La réponse immunitaire

D'abord née de la discipline alors récemment établie de la microbiologie, l'étude de l'immunité n'a initialement été envisagée que comme une mesure de traitement des maladies infectieuses (Kaufmann, 2008). Ce sont les travaux d'Ilya Mechnikov (Mechnikov, 1908), sur la phagocytose, et de Paul Ehrlich (Ehrlich, 1908), sur la formation et les mécanismes de neutralisation et de lyse par les anticorps, qui ont propulsé l'immunité au rang de discipline à part entière. Avant les travaux de ces chercheurs la présence de pathogènes à l'intérieur de macrophages ou encore l'infiltration de cellules dans les tissus lésés étaient considérés comme les effets d'une infection de ces cellules ou de la perméabilisation indésirable des vaisseaux sanguins suite à l'infection. Ceux-ci ont montré qu'il s'agissait bien de mécanismes établis et ordonnés de lutte contre les agents pathogènes, issus de l'évolution décrite par Charles Darwin (Kaufmann, 2008). Le système immunitaire est cet ensemble de molécules et de cellules qui ont un rôle à jouer dans la protection de l'organisme contre les agents infectieux. Bien qu'ils soient couramment classifiés en inné ou acquis, les éléments de la réponse immunitaire forment un tout ou chaque partie est en étroite relation avec les autres.

1.1.1 La réponse innée

La première ligne de cette défense est la réponse innée, que tout organisme possède à la naissance. Cette réponse est dite non spécifique car elle ne requière pas de réarrangement dans les récepteurs de reconnaissance, ni de contact préliminaire avec l'antigène (Cerwenka et Lanier, 2001; Delves *et al.*, 2006; Espinosa et Chillet, 2006; Moretta *et al.*, 2001; Paul, 2008). Par contre, cette réponse est la plus rapide à être mobilisée et permet de maintenir l'intrus en nombre raisonnable pendant que tous les autres acteurs de la réponse acquise se mettent en place. Il est toutefois rare que l'agent étranger soit totalement éliminé par la réponse innée.

Lors de son entrée dans l'organisme, l'agent étranger rencontre des cellules phagocytaires, les macrophages qui résident dans les tissus, et les neutrophiles

normalement en circulation, qui migrent dans les tissus en réponse à des chimiokines. Ces cellules phagocytaires parviennent à reconnaître des molécules particulières partagées par les agents étrangers par l'entremise de certains récepteurs « toll-like » (TLR). Une fois l'agent infectieux reconnu, les cellules phagocytaires vont l'internaliser, lorsque possible, pour le dégrader. Si celui-ci est de taille trop importante, les phagocytes vont plutôt relâcher des enzymes de dégradation dans le milieu entourant l'intrus. Ces cellules de première ligne sécrètent aussi des cytokines provoquant la réaction inflammatoire et l'induction de la réponse acquise.

La réaction inflammatoire permet le recrutement de cellules effectrices diverses au siège de l'infection mais elle limite aussi la dispersion de l'agent dans l'organisme et initie le processus de réparation des tissus endommagés. L'inflammation produit, dans les vaisseaux sanguins adjacents, une dilatation et une perméabilité accrue accompagnée, au niveau cellulaire, de l'expression de molécules d'adhésion. Ces changements augmentent le flux sanguin local tout en réduisant la vitesse de la circulation sanguine qui, combinée à une plus grande adhérence des cellules épithéliales, permet aux cellules immunitaires circulantes de s'immobiliser pour ensuite traverser la paroi, plus perméable, des vaisseaux vers le tissu infecté.

En plus de leur action locale, les cytokines peuvent agir plus globalement sur l'organisme. Les interleukines (IL) 1 et 6 et le facteur de nécrose des tumeurs (*Tumor Necrosis Factor*: TNF- α), synthétisés par les cellules phagocytaires, représentent bien cette action globale. Dans l'hypothalamus, elles provoquent l'augmentation de la température corporelle, ce qui ralentit la multiplication des organismes infectieux, intensifie la réponse adaptative et protège les cellules de l'hôte contre le TNF- α . Les cytokines permettent aussi la migration, vers les ganglions lymphatiques, et la maturation des cellules dendritiques qui activeront la réponse immunitaire acquise contre l'intrus. Si, en général, les cytokines sont classées selon leur potentiel immunostimulant ou immunosuppresseur, il n'est pas rare que certaines cytokines soient capables d'agir positivement ou négativement sur la réponse immunitaire selon le contexte où elles sont présentes (Delves *et al.*, 2006; Espinosa et Chillet, 2006; Green et Flavell, 1999; Horak *et al.*, 1995; Ioannou et Isenberg, 2000;

Kollias *et al.*, 1999; O'Shea *et al.*, 2002; Owens *et al.*, 2001; Paul, 2008; Refaeli *et al.*, 1999). Les cytokines incluent aussi les interférons (IFN), des molécules synthétisées par les cellules infectées et nommées ainsi pour leur propriété d'interférer avec la réplication virale. Ces molécules ont pour fonction principale de prévenir la dispersion de l'infection aux cellules non infectées. La production et les signaux induits par ces IFN mènent à un état de résistance à la réplication virale, entre autre par la dégradation de l'ARN et l'inhibition de la synthèse protéique. Ces molécules induisent aussi la réponse immunitaire via l'augmentation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) à la surface des cellules infectées et avoisinantes et l'activation des cellules tueuses naturelles (*natural killer*, NK) en circulation (Delves *et al.*, 2006; Espinosa et Chillet, 2006; Paul, 2008).

Au cours de l'évolution des organismes pluricellulaires, est apparu un nouveau besoin, un mécanisme de défense systémique capable de distinguer entre les cellules formant l'individu, le soi, et les étrangers, le non-soi. Ainsi après environ 400 millions d'années d'évolution est apparu le premier rudiment de ce système immunitaire (Paul, 2008).

1.1.2 La réponse acquise à médiation cellulaire

Alors que l'immunité innée repose sur la reconnaissance de déterminants moléculaires spécifiques des pathogènes (DMSP) par des récepteurs ne nécessitant aucun réarrangement ni contact préliminaire avec l'antigène, il en est tout autrement de l'immunité acquise. Cette dernière nécessite non seulement un réarrangement des récepteurs principaux impliqués mais aussi la présentation par différentes cellules de déterminants antigéniques. Cette présentation et toute la réponse acquise, ont pour point central les molécules du CMH et l'appareillage nécessaire à leur expression et leur reconnaissance. Comme toutes les protéines membranaires, les molécules du CMH sont assemblées à l'intérieur de vésicules du réticulum endoplasmique ou de la voie endosomale. C'est à l'intérieur de ces compartiments que chaque molécule du CMH reçoit un peptide à exposer à la surface cellulaire.

Si le CMH est le point central de l'immunité acquise, la famille fortement hétérogène des lymphocytes dépendants du thymus (lymphocytes T) n'en est pas moins l'actrice principale. Ces cellules, qui originent chez les mammifères des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, migrent rapidement vers le thymus où elles accomplissent leur développement. Cet organe se divise en diverses régions dans lesquelles les thymocytes évoluent au cours de leur différenciation. Les cellules progénitrices arrivent dans la région sous capsulaire et n'expriment pas les marqueurs CD4 et CD8, d'où leur appellation de « doubles négatives ». Le stroma thymique constitue un environnement unique, un réseau de cellules épithéliales, au contact duquel sont induites les premières étapes de prolifération et de modification. Le processus de réarrangement des gènes du récepteur spécifique des lymphocytes T (TCR) est enclenché. Lorsque les thymocytes expriment le TCR, ils se déplacent vers le cortex thymique. A ce point, les cellules T expriment les deux molécules CD4 et CD8 et sont donc désignées « doubles positives ». Les interactions du TCR avec le CMH-peptide (Goldrath et Bevan, 1999) exposé par les cellules épithéliales du cortex à ce moment vont permettre une première étape de sélection. Cette sélection est dite positive car la reconnaissance du CMH fournit un signal de survie nécessaire à la maturation subséquente (Kappler *et al.*, 1987; Sha *et al.*, 1988). De plus, un signal de différenciation est donné selon que le lymphocyte ait reconnu une molécule du CMH-I ou du CMH-II induisant la production préférentielle des molécules CD4 ou CD8 respectivement (Germain, 2002). Des gènes caractéristiques des deux états d'expression sont activés et les thymocytes, maintenant « simples positifs », migrent vers la médulla. Les cellules ne reconnaissant pas ou peu les molécules du CMH, mourront par « négligence », c'est-à-dire qu'elles ne reçoivent pas le signal nécessaire à leur survie. Les cellules qui, au contraire, reconnaissent les molécules du CMH avec une trop forte affinité recevront en contrepartie un signal moléculaire aussi fort qui aura pour effet d'initier le programme de mort cellulaire. Ces cellules, risqueraient en périphérie de s'activer simplement en présence de molécules du CMH présentant des épitopes du soi (Kappler *et al.*, 1987; Kisielow *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1990). Dans la médulla, les cellules T « simples positives » rencontrent des cellules spécialisées (Farr et Rudensky, 1998), telles les cellules dendritiques et les macrophages, leur présentant des peptides du soi. Cette étape constitue la sélection négative et les lymphocytes T capables de reconnaître le couple CMH-peptide

du soi reçoivent un signal de mort par apoptose. Les cellules restantes, moins de 5 % des cellules originales, quittent le thymus vers la circulation sanguine ou le système lymphatique (Lavi *et al.*, 1984c; Nossal, 1994). Malgré le fait que le thymus rétrécisse dès la puberté chez l'humain et que la production de nouveaux thymocytes s'en trouve ralentie chez l'adulte, la population de lymphocytes T est maintenue en périphérie par la division des lymphocytes T matures.

Les cellules T matures mais naïves passent de la circulation aux tissus lymphoïdes périphériques et inversement jusqu'à la rencontre d'un antigène pour lequel elles sont spécifiques (Nemazee et Bürki, 1989). Cet antigène est présenté par une cellule via le CMH accompagné d'un signal de costimulation (Frauwirth et Thompson, 2002). Deux signaux sont ainsi nécessaires à l'activation des lymphocytes T (Parker, 1993). Le premier signal se produit par le contact du couple CMH-peptide sur la CPA avec le complexe TCR-CD3 et CD4 ou CD8 sur le lymphocyte T. Le second signal se produit via le contact entre les molécules CD80 ou CD86 sur la CPA et le récepteur CD28 sur le lymphocyte T. Le complexe TCR-CD3 est en fait un groupement de l'hétérodimère TCR responsable de la reconnaissance du peptide présenté et des chaînes gamma, delta, epsilon et zeta du CD3 possédant différents motifs motifs d'activation tyrosine des immunorécepteurs (ITAM) (Irving *et al.*, 1993; Letourneur et Klausner, 1992). Puisque les chaînes du TCR à proprement parlé possèdent des portions intracytoplasmiques plutôt courtes, les signaux sont principalement médiés via les molécules CD3 (Haks *et al.*, 2002). La liaison du TCR par un antigène initie la phosphorylation des résidus tyrosine des ITAM présents dans les chaînes CD3 (Wange et Samelson, 1996; Weiss et Littman, 1994). Ces ITAM phosphorylés participent au recrutement de la protéine kinase de 70 kilodalton associée à la chaîne zeta (Zap70) qui sera elle-même phosphorylée et activée par la kinase LCK (Mustelin, 1994) associée au corécepteur CD4 ou CD8 (Mustelin et Taskén, 2003; van Oers *et al.*, 1996). Zap70 activée phosphorylera diverses cibles dont l'adaptateur des cellules T activées (LAT) et subséquentment initiera diverses cascades de signalisation telles que celle des kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK), les kinases amino-terminale de c-Jun (JNK), le facteur nucléaire de la chaîne légère kappa des cellules B activées (NF- κ B) et du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT) menant à l'induction de fonctions

effectrices. Un des effets de cette activation est de conférer au lymphocyte activé, une protection contre l'apoptose et lui permettre d'entreprendre un cycle cellulaire (Carreno et Collins, 2002; Chambers *et al.*, 2001) et donc la prolifération du clone. De cette façon, un lymphocyte mature et spécifique pour un antigène qui représente normalement 1 cellule T sur 10^6 sera amplifié lors de la réponse immunitaire en une semaine pour en venir à représenter 1 cellule T sur 1000. Les lymphocytes T ainsi armés n'ont plus la nécessité d'un signal de costimulation pour agir.

Les molécules du CMH-I, présentes sur toutes les cellules, exhibent les peptides des pathogènes intracellulaires comme les virus. Les lymphocytes T $CD8^+$, aussi surnommés cytotoxiques (cytotoxic T lymphocyte, CTL), une fois activés, vont rapidement induire l'apoptose des cellules infectées. De cette façon, le pathogène s'en trouve dégradé alors que la nécrose aurait favorisé sa dispersion. Les perforines, créant des pores dans la membrane et induisent la lyse de la cellule cible (du moins *in vitro*) et les granzymes, pénétrant par les pores pour induire l'apoptose, sont larguées par le CTL. Cette libération est toutefois très localisée, ce qui permet de n'éliminer que la cellule infectée, épargnant les cellules saines voisines. Notons qu'un CTL activé peut successivement éliminer plusieurs cellules infectées.

Les molécules du CMH-II, retrouvées sur les CPA, exhibent quant à elles les antigènes captés dans le milieu extracellulaire, incluant les virus libres. Les CPA les plus efficaces sont les cellules dendritiques qui, activées par l'ingestion d'un pathogène, vont migrer vers le tissu lymphoïde et produire des molécules costimulatrices des lymphocytes T. Les macrophages (Unanue et Askonas, 1968a; Unanue et Askonas, 1968b) et les lymphocytes B (Chesnut *et al.*, 1982a; Chesnut *et al.*, 1982b) ont aussi la propriété de CPA quoiqu'ils soient moins efficaces dans l'activation des lymphocytes T (Mahnke *et al.*, 2007). Les lymphocytes $CD4^+$, sont aussi dits auxiliaires car ils participent à la réponse immunitaire par l'activation et la stimulation d'autres cellules effectrices comme les lymphocytes B et les CTL. Les lymphocytes T $CD4^+$ se différencient en plusieurs types différents selon les cytokines accompagnant cette activation. À ce jour les types T_H1 , T_H2 , T_H17 sont bien connus mais s'ajoutent aussi des types nouvellement identifiés et moins bien

caractérisés soit T_H9 , T_H22 et T_{FH} (Figure 1). Les lymphocytes T $CD4^+$ produisent aussi les différents types de lymphocytes T régulateurs (Figure 1), qui sont exposés plus loin dans la section sur la régulation.

T_H1 . Le plus anciennement connu des sous-types de lymphocytes $CD4^+$, avec les T_H2 , les lymphocytes T_H1 participent à la réponse immunitaire acquise à médiation cellulaire. Ces cellules sont produites sous l'influence de diverses cytokines (Figure 1) dont principalement l'IL-12 (Magrath *et al.*, 1996). Ces cytokines et le cosignal d'activation fourni par une CPA induisent entre autre chose le facteur de transcription t-bet (TBX21) qui initie un programme spécifique de différenciation et de production de cytokines. Les cytokines phares de ce sous-type de lymphocytes T (Figure 1) sont le TNF- β , l'IFN- γ et l'IL-2. Ces cytokines et les cellules $CD4^+ T_H1$ stimulent les macrophages et activent les lymphocytes T $CD8^+$ responsable de la destruction des cellules infectées par les parasites et les virus .

T_H2 . Offrant un pendant aux cellules T_H1 , les cellules différenciées de type T_H2 participent à la réponse immunitaire acquise à médiation humorale (Figure 1). Ces cellules sont produites principalement sous l'influence de la cytokine IL-4, qui induit le facteur de transcription GATA-3 et la production de nombreuses cytokines dont l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Figure 1). Ces cytokines stimulent la différenciation des lymphocytes B activés en plasmocytes, la sécrétion d'anticorps et la commutation de classe des anticorps produits. Ce type de réponse est typique de l'infection par des parasites extracellulaires (Figure 1).

T_H17 . Les cellules dites T_H17 ont été relativement récemment identifiées comme un sous-type de cellules T $CD4^+$, et sont impliquées dans l'inflammation et ont été associées avec les maladies auto-immunes (Figure 1). Ces cellules ont initialement été décrites comme un embranchement des T_H1 mais sont maintenant considérées comme le troisième type des cellules T auxiliaires avec un programme transcriptionnel qui lui est propre (Figure 1). La différenciation en T_H17 est initiée par les cytokines IL-6, IL-21 et TGF- β_1 et l'activation du facteur de transcription ROR γ t. Les cytokines IL-17 A et F sont les produits caractéristiques de ce type de cellules et sont accompagnées de façon variable des cytokines IL-21 et 22.

T_{FH}. Ce type tout récemment identifié de cellules T auxiliaires (Figure 1) est principalement impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire humorale. Les cellules de ce type se retrouvent dans les follicules, ces zones riches en lymphocytes B, des organes lymphoïdes. C'est au contact de ces cellules et selon les cytokines présentes que les lymphocytes B vont se multiplier et former les centres germinatifs ou alors se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps (Bryant *et al.*, 2007). Dans les deux cas la commutation de classe des anticorps de ces lymphocytes B suivra une voie dictée par les cytokines présentes. Ces cellules sont produites sous l'influence des cytokines IL-6 (Nurieva *et al.*, 2009) et IL-21 (Nurieva *et al.*, 2008), ce qui induit un facteur de transcription nommé BCL-6 (Yu *et al.*, 2009) et la production des cytokines IL-17 et IL-21 (Park *et al.*, 2005).

T_{H9}/T_{H22}. Ces deux derniers types de lymphocytes T sont plus ou moins reconnus dans la littérature et pourraient être à prime abord des cellules T_{H2} et T_{H17} qui expriment différemment certaines cytokines soit l'IL-9 et l'IL-22 respectivement . (Figure 1).

Suite à l'activation des cellules de l'immunité acquise, les agents pathogènes sont normalement éliminés et un retour à un état non actif du système immunitaire est souhaitable. Lentement, sur 4-12 semaines les lymphocytes activés sont éliminés, ils meurent par « négligence » c'est-à-dire que faute de stimulations par des cytokines et des antigènes, ils perdent leur protection contre l'apoptose (Van Parijs et Abbas, 1998). La réponse primaire se termine par la génération d'une mémoire immunologique (Van Parijs et Abbas, 1998). Des lymphocytes T « mémoires » demeurent et possèdent les marqueurs des lymphocytes T activés et une plus grande longévité (Van Parijs et Abbas, 1998). L'expression des récepteurs de costimulation est réduite et les cellules mémoires résistent mieux à l'apoptose (Van Parijs et Abbas, 1998). Une réponse à une seconde exposition à l'agent étranger entraîne une mobilisation plus rapide de l'immunité acquise à médiation cellulaire et l'élimination plus rapide de l'intrus (Van Parijs et Abbas, 1998).

1.1.3 La réponse acquise à médiation humorale

L'immunité cellulaire est efficace dans l'élimination des cellules infectées mais beaucoup de pathogènes se multiplient dans le milieu extracellulaire ou y transitent entre les hôtes cellulaires. Cet espace extracellulaire est protégé par l'immunité humorale, sous la responsabilité des lymphocytes B, identifiés pour la première fois dans la bourse de Fabricius des oiseaux. Chez les mammifères, ces cellules sont générées et se développent dans le foie des fœtus et dans la moelle osseuse durant toute l'existence de l'organisme. Elles accomplissent leur maturation dans les organes lymphoïdes périphériques. La production de ces cellules est donc continue. Tout comme les lymphocytes T, qui réarrangent leurs gènes du TCR afin d'obtenir une spécificité distincte pour chaque clone, les cellules B font de même dans leurs gènes du récepteur des cellules B (*B-cell receptor*: BCR). Les cellules B naïves expriment des IgM en surface comme BCR (Nemazee et Bürki, 1989). Les cellules subissent une étape de sélection négative ou celles reconnaissant un antigène du soi, probablement présenté par une cellule du stroma, génèrent d'autres réarrangements (Tiegs *et al.*, 1993) ou sont éliminées par apoptose. Les cellules survivantes expriment des IgD et passent dans la circulation sanguine à la recherche d'un contact avec un antigène et d'une stimulation.

Le stimulus menant à l'activation d'un lymphocytes B est fourni dans la zone T d'un organe lymphoïde secondaire, par une cellule T CD4⁺ activée et spécifique pour le même antigène, qui active à son tour la cellule B. Celle-ci forme alors dans cette zone, un foyer primaire de prolifération. Les lymphocytes B quittent lentement ce foyer pour le follicule sous capsulaire pour y former une zone de prolifération rapide ou centre germinatif. En ce lieu, les cellules subissent des mutations dans les gènes du BCR, permettant de développer des anticorps à plus grande affinité pour l'antigène. Ces cellules sont ensuite sélectionnées et celles ne liant plus l'antigène meurent. Des réarrangements sont aussi produits pour obtenir une commutation de classe des Ig sécrétées. Les cellules B se différencient finalement en deux types, les plasmocytes sécréteurs d'anticorps et les cellules mémoires. Les plasmocytes deviennent des usines de production d'anticorps, qui représentent 10 à 20 % des protéines synthétisées. Les plasmocytes perdent toutefois l'expression du CMH-II et donc leur capacité d'agir comme CPA. Ils migrent vers la pulpe rouge de la rate et les

cordons médullaires des nodules lymphoïdes pour finir dans la moelle osseuse. Les anticorps sécrétés accomplissent trois fonctions: la neutralisation des pathogènes, l'opsonisation ou facilitation de l'internalisation et l'activation du complément.

Les cellules B « mémoire » quant à elles ne produisent pas d'anticorps mais ont hérité de la spécificité des cellules dont elles originent et sont dotées d'une longévité accrue. Complémentaire à leur fonction de production d'anticorps, les lymphocytes B sont aussi des cellules sécrétrices de cytokines et influencent donc la réponse immune. Les lymphocytes B produisent l'IL-6 et 10 et le TNF- α et, lorsque activés, acquièrent la capacité de produire les IL-2 (Kindler *et al.*, 1995), 4 (Ohnishi *et al.*, 1997), 12 (Sartori *et al.*, 1997; Schultze *et al.*, 1999) et l'IFN- γ (Harris *et al.*, 2005). Une polarisation de la réponse B (Harris *et al.*, 2000; Porakishvili *et al.*, 2001) existerait aussi et influencerait la réponse des autres types cellulaires (Fujinami et Oldstone, 1985). Ainsi, les lymphocytes B de type B_{E1}, par la production d'IFN- γ (Harris *et al.*, 2000) et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T de profil T_{H1}, favoriseraient l'activation de cette voie (Porakishvili *et al.*, 2001). Les cellules de type B_{E2} produiraient l'IL-4 (Harris *et al.*, 2000) suppresseur de réponse T_{H1} (Porakishvili *et al.*, 2001). Les lymphocytes B, via l'IL-10, inhibent la production d'IL-12 par les cellules dendritiques et lèvent donc la suppression du développement de la réponse T_{H2} (Porakishvili *et al.*, 2001).

Ces connaissances des liens entre les divers types cellulaires composant le système immunitaire et leurs réponses via contact et molécules messagères existent surtout sous forme d'étude d'un faible nombre de facteurs à la fois. Pour bien comprendre la complexité du système immunitaire il faut garder bien en vue que toutes ces voies et ces mécanismes agissent de concert. La réponse des cellules individuelles sera dictée par un concours de circonstances, de probabilités et de prédispositions.

1.1.4 La tolérance

Dans le développement des lymphocytes T et B, de nombreuses spécificités de récepteur sont générées, dont plus de 25 millions pour le TCR (Arstila *et al.*, 1999). Toutefois, plusieurs de ces récepteurs ont la capacité de reconnaître les combinaisons

d'acides aminés composant les protéines nécessaires à la structure et au fonctionnement de l'organisme auquel ils appartiennent. La présence de ces clones potentiellement autoréactifs, constitue donc un terrible risque de catastrophe. Parallèlement à l'apparition de l'immunité acquise, divers mécanismes d'élimination et de contrôle de ces clones sont donc apparus afin d'induire une tolérance. La tolérance est donc un état de non-réponse d'un individu à ses propres antigènes.

La tolérance centrale s'opère dans les organes lymphopoïétiques que sont la moelle osseuse et le thymus. Elle s'effectue par la sélection négative des lymphocytes T et B, reconnaissant les molécules du soi présentées dans ces milieux particuliers de développement. Dans cette sélection, tous les clones interagissant avec les cellules présentatrices avec une haute affinité reçoivent un signal qui les entraîne dans la mort par apoptose. Malgré cela, il est impossible que tous les clones rencontrent tous les antigènes du soi dans ce contexte (Mackay, 2000). En fait, ils ne rencontrent bien souvent que les antigènes ubiquitaires tandis que d'autres antigènes du soi, spécifiques à certains organes ou tissus, seront absents du milieu de développement. De plus, une trop forte sélection négative aurait pour effet de restreindre le répertoire et risquerait de diminuer la reconnaissance des agents infectieux. Il y aurait donc un avantage à laisser s'échapper des lymphocytes T faiblement autoréactifs et de les réguler en périphérie (Bouneaud *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1996; Semana *et al.*, 1999). La dégénérescence de la reconnaissance favorise aussi la sélection positive de ces cellules autoréactives (Ignatowicz *et al.*, 1996; Ignatowicz *et al.*, 1997; Surh *et al.*, 1997; Tourne *et al.*, 1997) dans le thymus ou la moelle osseuse. Quelques clones autoréactifs réussiront donc à échapper au mécanisme de sélection négative de la tolérance centrale et pourront survivre pour devenir matures. Il a en fait été montré que des individus sains possèdent en circulation des clones de lymphocytes T (Filion *et al.*, 1995; Lohmann *et al.*, 1996; Semana *et al.*, 1999) et B (Coutinho *et al.*, 1995; Fesel et Coutinho, 1998; Hayakawa *et al.*, 1999) autoréactifs. Un mécanisme de tolérance est donc nécessaire en périphérie pour contrôler ces cellules spécifiques d'un antigène du soi. Plusieurs mécanismes sont à l'oeuvre pour ce faire et incluent l'ignorance, la délétion, l'anergie et la régulation.

1.1.4.1 L'ignorance

L'ignorance est en fait la prévention du contact entre l'antigène et le lymphocyte spécifique naïf (Kita *et al.*, 2001; Mackay, 2000). Ce mécanisme s'observe de diverses façons. L'antigène peut être exprimé spécifiquement dans certains sites dits immunoprivilégiés tels le cerveau, les yeux, les testicules, l'utérus (foetus), etc. (Alferink *et al.*, 1998; Zinkernagel, 1996). Ces sites ont trois grandes particularités les distinguant des autres sites de l'organisme. La communication entre ces sites et le reste de l'organisme s'opère différemment. Les liquides extracellulaires ne circulent pas par les canaux lymphatiques conventionnels même si les protéines de ces sites peuvent les quitter et créer des réactions immunitaires. Les lymphocytes naïfs sont toutefois exclus de ces sites par les barrières tissulaires et vasculaires (Mackay, 2000).

Le cas du système nerveux central

Un des sites qui a longtemps été considéré comme immunoprivilégié est le SNC (Barker et Billingham, 1977; Medawar, 1948), qui regroupe le cerveau et la moelle épinière et se compose principalement de quatre types de cellules spécialisées qui en assurent le fonctionnement.

Les **neurones** présents en grand nombre et sous diverses formes communiquent entre eux et propagent l'information à l'aide de récepteurs chimiques, de potentiels de membrane et de neurotransmetteurs sécrétés. Afin de permettre à l'influx nerveux de parcourir de longues distances mais aussi afin d'optimiser cette transmission et protéger les axones contre les stimulations importunes, une gaine composée de myéline les entoure. Cette myéline est la composante principale de la membrane des cellules appelées **oligodendrocytes**. Ces cellules produisent des prolongements de cette membrane qui entourent les axones des neurones de multiples tours serrés créant une gaine isolante et protectrice. Un seul oligodendrocyte peut à lui seul myéliniser jusqu'à 40 axones (Compston et Coles, 2008). C'est la présence de cette myéline qui est responsable de l'apparence de la « matière blanche » du SNC. Les **astrocytes**, qui forment eux aussi des prolongements, se sont pendant longtemps vu attribués le rôle de simple « colle », assurant

un support physique. Néanmoins, les études récentes tendent à montrer des fonctions plus diversifiées de garde-frontière de la barrière hématoencéphalique (BHE) (Brunet *et al.*, 2004; Pellerin et Magistretti, 2004), de recycleurs des neurotransmetteurs (Schousboe *et al.*, 2004) et d'effecteurs capables d'influer sur l'efficacité de la transmission synaptique (Angulo *et al.*, 2004; Jourdain *et al.*, 2007; Panatier *et al.*, 2006). Les cellules **microgliales**, par leur origine commune avec les macrophages (Ritter *et al.*, 2006), semblent assurer le rôle de surveillance immunitaire mais aussi d'élimination des débris, essentiel à la réparation du SNC suite à une lésion (Eugenín *et al.*, 2001).

La réponse immunitaire au sein du système nerveux central

La notion de privilège immunologique a débuté avec diverses observations sur l'acceptation de tumeurs transplantées dans l'œil et le cerveau (Greene, 1947; Medawar, 1948). Toutefois, cette absence de réponse ne vient pas du fait que les cellules T ne peuvent pas détecter les cibles antigéniques localisées au SNC (Tsai *et al.*, 1997). En effet, des greffes tolérées au SNC (Head et Griffin, 1985) sont rapidement rejetées après une seconde greffe de tissu de même origine, sous la peau (Barker et Billingham, 1977; Medawar, 1948). Par contre, une réponse immunitaire suffisante à l'élimination d'un pathogène en périphérie n'est pas toujours suffisante à l'induction d'une réponse destructrice contre le même épitope exposé au SNC (Evans *et al.*, 1996). De plus, la plupart des cellules T et B infiltrantes sont d'un phénotype non activé ou mémoire et l'environnement du SNC est cytotoxique pour les cellules T (Bechmann *et al.*, 2002; Ransohoff *et al.*, 2003) et certains neuropeptides sont immunosuppresseurs (Reinke et Fabry, 2006).

Cette apparente inaptitude à initier une réponse immunitaire normale était alors expliquée par: 1) la présence de la BHE (Barker et Billingham, 1977); 2) l'absence d'un réseau de drainage lymphatique (Barker et Billingham, 1977); 3) la faible – voire rare – expression de molécules du CMH (Vass et Lassmann, 1990); 4) et finalement l'absence de CPA (Wekerle *et al.*, 1994). Tous ces facteurs contribuant à prévenir l'entrée des lymphocytes T et leur contact avec les antigènes du SNC sur place ou dans les organes lymphoïdes. Cependant des données récentes mettent quelque peu à mal cette vision de l'immunité au SNC.

1) Barrière hématoencéphalique

La présence d'une barrière (BHE) entre la circulation sanguine et le SNC a d'abord été suggérée par Paul Ehrlich dès 1885 avec ses travaux employant des « encres » qui n'arrivaient pas à pénétrer le SNC contrairement aux autres tissus (Carson *et al.*, 2006). Effectivement la vascularisation du SNC est composée de cellules endothéliales sans fenestration transendothéliale, avec une faible activité pinocytaire, de nombreuses mitochondries, et fermement liées aux cellules adjacentes par des jonctions serrées (Carson *et al.*, 2006). La BHE a pour fonction principale de limiter l'entrée de métabolites et toxines au SNC (Han et Suk, 2005; Ohtsuki, 2004) et même de réguler activement le mouvement de certaines classes de nutriments vers le SNC (Zlokovic, 2005). L'intégrité de la BHE est insuffisante pour prévenir l'entrée de leucocytes au SNC. Des macrophages périvasculaires sont continuellement renouvelés dans le SNC sain via la circulation, du moins chez la souris et le rat (Bechmann *et al.*, 2001; Hickey et Kimura, 1988; Matsumoto et Fujiwara, 1987). Les rares cellules T détectées dans le SNC d'individus sains tendent à rester dans les régions périvasculaires (Boztug *et al.*, 2002; Carson *et al.*, 1999; Pagenstecher *et al.*, 2000), la plupart étant de phénotype CD4⁺ mémoire. Finalement, les cellules T peuvent aussi employer des voies d'entrée alternatives comme les plexus choroïdes menant au liquide céphalorachidien (Ransohoff *et al.*, 2003). Les cellules T activées expriment de hauts niveaux de molécules facilitant leur migration au travers de la BHE (Lo *et al.*, 1999; Medzhitov et Janeway, 1998; Stoll *et al.*, 2002). De plus, l'activation de la réponse immunitaire mène à la production de médiateurs inflammatoires créant une plus grande perméabilité de la BHE et aussi la migration de macrophages et de cellules dendritiques vers le SNC (Carson et Lo, 2001; Deli *et al.*, 2005; Stoll *et al.*, 2002). Dans ce cadre, une activation robuste du système immunitaire en périphérie du SNC peut contourner la BHE (Carson *et al.*, 2006; Hickey, 1991; Wekerle *et al.*, 1986).

2) Drainage lymphatique atypique

Bien qu'il soit indisputable que le SNC ne possède pas de système lymphatique traditionnel (Ransohoff *et al.*, 2003) des antigènes du SNC ont été détectés aux ganglions lymphatiques cervicaux (de Vos *et al.*, 2002). Ainsi dans un animal sain et en absence

d'inflammation altérant la perméabilité de la BHE, les antigènes spécifiques du SNC parviennent aux ganglions lymphatiques cervicaux. Les antigènes du SNC peuvent être drainés via le LCR le long de l'espace périvasculaire et sous-arachnoïde au travers de la lame criblée dans la lymphe de la sous-muqueuse nasale (Cserr *et al.*, 1992; Cserr et Knopf, 1992; Kida *et al.*, 1995; Weller *et al.*, 1992).

3) Complexe majeur d'histocompatibilité

L'expression des molécules du CMH et de costimulation est très faible dans le parenchyme du SNC d'animaux sains élevés en conditions stériles. Toutefois, l'expression du CMH de classe II est rapidement induite en réponse aux dommages dans le SNC (Neumann, 2001). Malgré cela, lorsque l'expression du CMH-II est limitée expérimentalement au SNC, il n'est plus possible d'y induire une réaction inflammatoire pathologique (Hickey et Kimura, 1988). L'expression du CMH est donc une condition nécessaire mais insuffisante au développement d'une réaction immunitaire au SNC.

4) Cellules présentatrices d'antigène

La capacité à induire les cellules T à proliférer, se différencier et produire des cytokines est hautement dépendante de l'état d'activation des CPA et de l'éventail de molécules costimulatrices exprimées. Comme tout autre organe, le SNC possède des cellules pouvant être identifiées avec des marqueurs des macrophages (Melchior *et al.*, 2006). Cependant, le SNC semble réguler l'état d'activation des cellules recrutées (Carson *et al.*, 1999). Les lymphocytes T sont rarement activés dans le SNC même en contact direct avec des cellules dendritiques matures et les CPA locales semblent plutôt impliquées dans la résolution de la réponse immunitaire (Carson *et al.*, 1999).

Il est plus difficile d'initier une réponse immunitaire par les cellules T dans le SNC que dans tout autre site de l'organisme (Barker et Billingham, 1977; Medawar, 1948; Perry, 1998). De plus, la neuroimmunologie posséderait des aspects neuroprotecteurs (Byram *et al.*, 2004; Minghetti *et al.*, 1999; Stoll *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2002; Ziv *et al.*, 2006). Le SNC n'est plus considéré comme un espace immunitairement isolé mais plutôt comme un système possédant des mécanismes propres afin de balancer la réponse immunitaire

bénéfique en cas d'infection et la réponse destructrice dans un espace tolérant mal les dommages. Ainsi, il serait plus approprié de parler du SNC comme ayant une immunité spécialisée plutôt que d'un site immunoprivilégié (Ransohoff *et al.*, 2003). En temps normal, l'environnement local limite l'accès ou la survie des cellules du système immunitaire au SNC tandis qu'en cas d'infection virale, les mécanismes de réponse sont activés afin de mobiliser l'immunité innée et acquise. Quelque que soit la terminologie empruntée, une chose est certaine, le SNC n'est pas exempt des dérèglements de la réponse immunitaire qui sont la cause des maladies auto-immunitaires. Une de ces maladies, et probablement parmi les plus connues, affecte en fait le SNC, il s'agit de la sclérose en plaques (SP). Cette maladie sera décrite plus en détail à la section « 1.2 ».

1.1.4.2 Déléition et anergie

Si, malgré tout, le contact s'établit entre un antigène du soi et une cellule effectrice et le signal d'activation est suffisant, des mécanismes de déléition peuvent encore éliminer les clones autoréactifs. Si un antigène est en trop grande quantité, un signal trop prononcé en affinité et en fréquence via le TCR entraîne l'activation des voies apoptotiques. L'absence de signal de costimulation lors de la présentation peut aussi mener à l'apoptose ou à l'état d'équilibre instable nommé anergie (Jenkins et Schwartz, 1987; Kita *et al.*, 2001; Ramsdell *et al.*, 1989).

Le terme anergie a d'abord été employé pour décrire la perte de l'hypersensibilité de type retardée à la tuberculine chez des individus infectés par le virus de la rougeole ((von Pirquet, 1908) dans (Casali *et al.*, 1984)). Le terme fut plus tard emprunté pour qualifier l'inactivation des cellules B observée chez les souris ayant reçues des doses d'antigènes induisant la tolérance. Parce qu'elle était spécifique à un antigène, cette anergie fut dite clonale (Nossal et Pike, 1980). L'anergie clonale des cellules T a d'abord été caractérisée dans les cellules CD4⁺ stimulées par le TCR, avec des anticorps anti-CD3 (α CD3), mais sans un cosignal via CD28 (Jenkins *et al.*, 1990; Jenkins *et al.*, 1987; Quill et Schwartz, 1987). Les lymphocytes T anergiques se présentent comme des cellules non apoptotiques, caractérisées par une prolifération et une production de cytokines réduites, particulièrement l'IL-2, suite à la restimulation (Hargreaves *et al.*, 1997). Cet état n'est pas terminal car

l'ajout de l'IL-2 exogène (Beverly *et al.*, 1992) ou de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)/Ionomycine (Iono) (Choi et Schwartz, 2007) pendant la restimulation permet de renverser le phénotype anergique. L'anergie n'a par contre pas d'effet sur le facteur NFAT qui est activé par l'influx de calcium et agit en aval du TCR dans l'activation des lymphocytes T (Lyakh *et al.*, 1997). Il est important de noter que l'anergie n'est inductible *in vitro* qu'avec des cellules précédemment stimulées (Chai et Lechler, 1997; Hayashi *et al.*, 1998) et se distingue de l'état anergique observé *in vivo* et plutôt nommée tolérance adaptative. Suite à l'injection de cellules T avec des TCR manipulés génétiquement à des souris contenant des antigènes solubles reconnus par ces TCR la tolérance adaptative a pu être étudiée (Pape *et al.*, 1998). Dans ce modèle une grande proportion des cellules T meurent mais laissent derrière elles une petite population de cellules T anergiques. Ces cellules ne prolifèrent pas, ne produisent pas d'IL-2 ni même d'aucune autre cytokine et surtout ne changent pas de phénotype même avec l'ajout d'IL-2 exogène (Lanoue *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1993). Cependant avec le temps, lorsque les injections d'antigènes cessent, ces cellules sortent lentement de leur anergie, elles nécessitent la présence constante de l'antigène pour maintenir leur phénotype anergique (Pape *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 1995; Rocha *et al.*, 1993). Sans étaler tous les détails des voies moléculaires impliquées dans l'anergie, il est intéressant de noter que celle-ci présente un problème de recrutement et d'activation et non de production de LAT par le TCR (Hundt *et al.*, 2006).

Des CPA, particulièrement les cellules dendritiques peuvent aussi induire la tolérance chez les lymphocytes T. En effet, des cellules dendritiques immatures, qui n'ont pas été activées par des cytokines, vont présenter des antigènes aux lymphocytes T des organes lymphoïdes sans toutefois fournir le cosignal d'activation. Cela aura pour conséquence d'induire soit la déletion du lymphocyte T ou son anergie (Gallucci *et al.*, 1999; Sauter *et al.*, 2000). Ce mécanisme produit généralement la tolérance pour des antigènes du soi qui sont libérés par exemple par des cellules apoptotiques dans un contexte sans inflammation et donc en absence de cytokines (Marelli-Berg et Lechler, 1999). L'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) serait nécessaire *in vivo* pour induire cet anergie (Perez *et al.*, 1997; Walunas et Bluestone, 1998). L'échec de l'activation par le soi pourrait aussi être l'effet du manque de réponse innée antérieure (Walker et Abbas, 2002). Cette

théorie expliquerait l'absence de réaction face à certains antigènes étrangers en absence d'adjuvants (Cohen, 2001) ou de cellules NK dans le cas de la myasthénie gravis de la souris (Shi *et al.*, 2000). Si le lymphocyte anergique n'est pas secouru par des signaux appropriés, il disparaîtra par apoptose (Kita *et al.*, 2001). Cette délétion retardée observée surtout *in vitro* (Jenkins et Schwartz, 1987) n'est pas nécessairement le reflet de ce qui se produit *in vivo*.

1.1.4.3 La régulation

Dans les années 1970, est apparue pour la première fois la notion de cellules T capables de limiter la réponse immunitaire (Gershon et Kondo, 1971). Cette population s'appelait alors T suppresseur et fut très activement étudiée dans la décennie suivante (Sakaguchi *et al.*, 2007) avant d'être non seulement abandonnée mais aussi de devenir un sujet quelque peu tabou (Bloom *et al.*, 1992). Toutefois, les lymphocytes T capables d'inhiber la réponse immunitaire firent leur retour sur la scène et sont aujourd'hui nommés T régulateurs (T_{Reg}). Sans marqueur spécifique, les populations de cellules T inhibitrices furent d'abord associées principalement aux lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ même si une faible proportion des $CD4^+CD25^-$ possédaient aussi cette capacité inhibitrice (Annacker *et al.*, 2001; Graca *et al.*, 2002; Stephens et Mason, 2000). Il est aujourd'hui plus facile d'identifier les cellules T_{Reg} par l'expression de marqueurs dont CD25 (McNeill *et al.*, 2007; Sakaguchi *et al.*, 1995), CTLA-4 (Read *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000), GITR (McHugh *et al.*, 2002) et le facteur de transcription « *forkhead box protein 3* » (FOXP3) (Fontenot *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2005c; Hori *et al.*, 2003b; Khattri *et al.*, 2003b; Sakaguchi, 2005; Schwartz, 2005). Cependant aucun de ces marqueurs n'est entièrement spécifique des T_{Reg} et en fait suite à l'activation tous les lymphocytes T expriment CD25 (Allan *et al.*, 2007; Robb *et al.*, 1981; Yamazaki *et al.*, 2003), suivi de CTLA-4 (Allan *et al.*, 2007; Walunas *et al.*, 1994; Yamazaki *et al.*, 2003) et du récepteur du facteur de nécrose tumorale induit par les glucocorticoïdes (GITR) (Allan *et al.*, 2007; Nocentini *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 2003). Même le facteur de transcription FOXP3 est exprimé de façon transitoire suite à l'activation par les lymphocytes T humains (Allan *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2007; Roncador *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Cependant les

lymphocytes T naïfs de souris n'expriment pas FOXP3 suite à l'activation (Fontenot *et al.*, 2005b; Hori *et al.*, 2003b; Khattri *et al.*, 2003b) et la synthèse par transgénèse de ce facteur est suffisante pour induire un phénotype régulateur à des lymphocytes T naïfs (Lee *et al.*, 2008). Il est à noter que FOXP3 a été d'abord identifié grâce à un défaut génétique chez la souris et qui mène à l'auto-immunité systémique chez la souris « scurfy » et à une maladie nommée IPEX (*X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome*) chez l'humain (Bennett *et al.*, 2001; Brunkow *et al.*, 2001; Hori *et al.*, 2003a; Khattri *et al.*, 2003a; Wildin *et al.*, 2001). Deux types de T_{Reg} ont été identifiés (Figure 1) selon leur origine. Il y a d'abord des lymphocytes différenciés de façon constitutive au thymus et dits lymphocytes T régulateurs « naturels » (nT_{Reg}) et d'autres qui sont induits via différents autres signaux provenant des CPA et des T_{Reg} naturels et nommés lymphocytes T régulateurs « induits » (iT_{Reg}).

Les lymphocytes régulateurs naturels

Le cellules nT_{Reg} sont issues de la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs du thymus (Figure 1) et représentent environ 5-10 % des cellules $CD4^+$ en circulation (Maloy et Powrie, 2001; Mills, 2004; Wan et Flavell, 2006). Ces cellules nT_{Reg} sont capables de supprimer la réponse immunitaire d'une façon indépendante des antigènes (Sakaguchi, 2004; Sakaguchi *et al.*, 1995; Shevach, 2002). Les souris athymiques dont la population de lymphocytes T a été reconstitué après déplétion de la sous population $CD25^+$, souffrent de maladies auto-immunitaires multiples (Asano *et al.*, 1996). *In vitro*, les nT_{Reg} suppriment la prolifération (Thornton et Shevach, 2000) par contact direct (Kuniyasu *et al.*, 2000; Thornton et Shevach, 1998). Le récepteur inhibiteur CTLA-4 serait aussi parmi les molécules exprimées (Maloy et Powrie, 2001; Salomon *et al.*, 2000) par ces cellules régulatrices, les anticorps anti-CTLA-4 ou la déficience en ce marqueur, élimine cette fonction régulatrice (Read *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000). Cependant les lymphocytes régulateurs peuvent aussi agir indépendamment de CTLA-4 (Thornton et Shevach, 1998). L'altération du développement de ces cellules ou de leur maintien conduit invariablement à l'auto-immunité (Wan et Flavell, 2006). Il n'est pas encore certain si ces nT_{Reg} sont issus de clones qui possèdent une affinité intermédiaire pour les antigènes du soi (Pacholczyk *et al.*,

2006) ou encore représentent un répertoire de spécificité plus large (Pacholczyk *et al.*, 2007).

Les lymphocytes régulateurs induits

Les cellules T non régulatrices peuvent acquérir une fonction régulatrice suite à certains signaux (Figure 1). Les cellules dendritiques immatures auraient la capacité d'induire la transformation des CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs (Jonuleit *et al.*, 2001). Après activation, les lymphocytes T expriment CTLA-4 qui a la propriété de lier CD80/86 en surface des CPA 20 fois mieux que CD28 (Collins *et al.*, 2002). Par contre, CTLA-4 produit un signal inhibiteur de la transcription de l'IL-2 et arrête le cycle cellulaire. La régulation se ferait de façon non spécifique de l'antigène, du moins *in vitro* (Thornton et Shevach, 2000). Les iT_{Reg} sont de deux types (Figure 1) selon qu'ils aient été induits par la présence de l'IL-10 (T_{R1}) (Groux *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2004) ou par le TGF-β₁ (T_{H3}) (Weiner, 2001). Les T_{R1} sont souvent retrouvés dans les muqueuses intestinales (Groux *et al.*, 1997) et les cellules T_{H3} sont quant à elles induites suite à la présentation d'un antigène ingéré par voie orale (Faria et Weiner, 2005; Weiner, 2001). Les T_{R1} (Roncarolo *et al.*, 2001) et T_{H3} (Weiner, 2001) produisent toutes deux du TGF-β mais seules les cellules T_{R1} produisent en plus de l'IL-10 (Vieira *et al.*, 2004).

Les mécanismes d'action

Les cellules T régulatrices sont capables de supprimer la prolifération ou la production de cytokines par les cellules T effectrices (Figure 1), T_{H1} et T_{H2} (Mills, 2004; Tang et Bluestone, 2006). De plus les nT_{Reg} affectent les CD8⁺ qui, sans perdre leur capacité de prolifération et de sécrétion de l'IFN-γ, ne peuvent devenir des cellules effectrices cytolytiques (Mempel *et al.*, 2006). Les nT_{Reg} peuvent aussi affecter les cellules T en différenciation et les transformer en iT_{Reg} (Dieckmann *et al.*, 2002; Jonuleit *et al.*, 2002; Kearley *et al.*, 2005). Quatre mécanismes sont généralement proposés dans l'immunosuppression médiée par les T_{Reg}, soit 1) la production de cytokines inhibitrices, 2) la compétition pour l'IL-2, 3) la cytolyse suite à un contact direct et 4) l'inhibition de maturation des cellules dendritiques.

1) Cytokines inhibitrices

Bien que la fonction inhibitrice de l'IL-10 et du TGF- β_1 ne soit pas contestée la perception générale est à l'effet que les T_{Reg} agissent par contact direct et non pas via la sécrétion de ces cytokines. Les études *in vitro* employant des anticorps neutralisants ou des cellules T incapables de sécréter ou de répondre à ces cytokines montrent effectivement que celles-ci ne sont pas essentielles (Takahashi *et al.*, 1998; Thornton et Shevach, 1998). Les données *in vivo* tendent cependant à contredire ces données (Annacker *et al.*, 2003; Hawrylowicz et O'Garra, 2005). Sans contact direct, les T_{Reg} peuvent ainsi agir de façon non spécifique sur la population des lymphocytes T via la sécrétion de cytokines dites immunosuppressives (Figure 1). Les plus connues de ces cytokines sont l'IL-10 et le TGF- β_1 qui sont largement produites par les T_{Reg} de tous types. La neutralisation de l'IL-10 ou de TGF- β_1 abolit l'inhibition des nT_{Reg} dans les modèles murins d'affection abdominale inflammatoire (Asseman *et al.*, 1999; Fahlén *et al.*, 2005), de diabète de type 1 (Green *et al.*, 2003), de leishmaniose (Bhattacharyya *et al.*, 2001) et de transplantation (Tang et Bluestone, 2006). De façon inattendue il semblerait que le mode de fonctionnement de TGF- β_1 soit surtout par contact direct. C'est-à-dire que la cytokine serait présente, ancrée, dans la membrane cytoplasmique du T_{Reg} et agirait sur les cellules cibles lors de leur rencontre avec le T_{Reg} en question (Green *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2001). Cependant la source de ces cytokines est très variée (Figure 1), en plus des lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages sont capable de produire de l'IL-10 (Fuse *et al.*, 2008; Kearley *et al.*, 2005; Kullberg *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005). Très récemment une troisième cytokine immunosuppressive à été identifiée, il s'agit de l'IL-35. Cette cytokine est sécrétée préférentiellement par les T_{Reg} et serait requise pour un effet maximal de ceux-ci (Collison *et al.*, 2007; Gavin *et al.*, 2007). L'IL-35 est en fait une cytokine de la famille des IL-12 qui se compose de l'appariement du gene 3 induit par Epstein-Barr (ebi3, normalement apparié avec p28 pour former l'IL-27 (Pflanz *et al.*, 2002)) et p35 (il12a normalement appariée avec p40 pour former l'IL-12 (Gately *et al.*, 1991)) (Collison *et al.*, 2007). Les cellules n'exprimant pas l'une ou l'autre des chaînes composant l'IL-35 sont effectivement réduite en activité inhibitrice *in vitro* (Collison *et al.*, 2007) et ne peuvent contrôler les maladies inflammatoires chroniques intestinales *in vivo* (Collison et

Vignali, 2008). Finalement l'expression ectopique de l'IL-35 est suffisante pour conférer un phénotype régulateur à ces lymphocytes T naïfs (Collison *et al.*, 2007). D'autres études sont nécessaire afin d'élucider le rôle de l'IL-35 dans la régulation de la réponse immunitaire et les sa signification en regard de l'IL-10 et du TGF- β_1 .

2) Consommation d'IL-2

La forte expression de CD25, la chaîne α du récepteur de l'IL-2 en surface des cellules T_{Reg} a d'abord suggéré que celles-ci puissent consommer avidement cette cytokine dans le milieu, laissant les cellules T activées incapable de se multiplier faute de ce facteur jugé essentiel (de la Rosa *et al.*, 2004; Thornton et Shevach, 1998). Cette théorie est entre autre supportée par le fait que les cellules nT_{Reg} elles-mêmes ne produisent pas d'IL-2 contrairement aux cellules T activées (Thornton et Shevach, 1998). Les premières études ont par contre suggéré qu'il ne s'agissait pas réellement d'un mécanisme employé par les T_{Reg} (Duthoit *et al.*, 2005; Fontenot *et al.*, 2005a) puisque l'IL-2 n'est indispensable que pour la prolifération des T_{Reg} et facultative pour les autres lymphocytes T (Fontenot *et al.*, 2005a). D'autres études encore semblent contradictoires et beaucoup de travaux restent à faire afin d'éclairer ce phénomène (Oberle *et al.*, 2007; Pandiyan *et al.*, 2007).

3) Cytolyse

Contrairement au cellules NK et aux lymphocytes T CD8+ les lymphocytes T CD4+ ne sont pas cytolytiques. Par contre, les nT_{Reg} sont capables d'activité cytolytique et produisent les médiateurs granzyme A et B et perforines (Grossman *et al.*, 2004; Herman *et al.*, 2004; McHugh *et al.*, 2002) couramment employées par les CTL dans leur action cytolytique. Les souris déficientes en granzymes B exercent une inhibition moindre (Gondek *et al.*, 2005). Bien que le granzyme B ait été le centre de l'attention de plusieurs études sur les T_{Reg} d'autres molécules pourraient aussi être impliquées dans la cytolyse par ces cellules mais ne seront pas présentés ici.

4) Altération des cellules dendritiques

Les nT_{Reg} affectent aussi les CPA en les rendant inaptes à activer adéquatement les cellules T effectrices (Figure 1). Les échanges entre nT_{Reg} et cellules dendritiques permettent en fait de rendre ces dernières silencieuses tout en augmentant le bassin de nT_{Reg} via la sécrétion de $TGF-\beta_1$ par les cellules dendritiques (Tang et Bluestone, 2006). Les T_{Reg} pourraient aussi pousser les cellules dendritiques à produire certaines molécules immunosuppressives ou encore diminuer leur taux de molécules CD80/86, les rendant moins aptes à activer et stimuler les cellules T effectrices (Cederbom *et al.*, 2000; Fallarino *et al.*, 2003; Mellor et Munn, 2004). La maturation des cellules dendritiques pourrait elle-même être affectée suite à l'intervention d'un T_{Reg} sur celles-ci (Baecher-Allan *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008). Mais il s'agit pour l'instant plus de suggestions que de mécanismes démontrés.

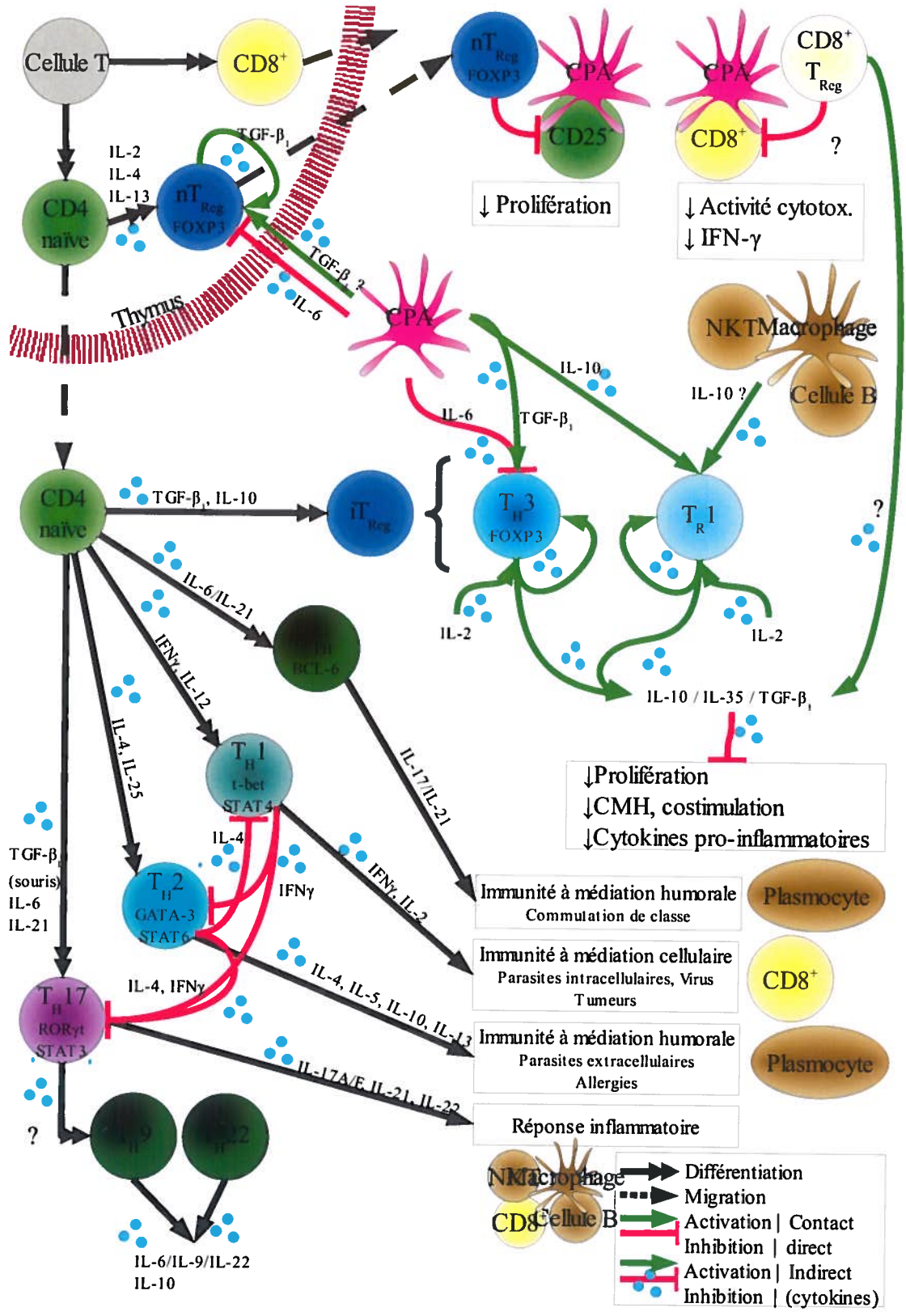


Figure 1: Différentiation des lymphocytes T et mécanismes de régulation.

Lors de leur maturation dans le thymus, les lymphocytes T se différencient en cellules CD8⁺ ou cytotoxiques (CTL), cellules effectrices de l'immunité acquise à médiation cellulaire, et en cellules CD4⁺ ou auxiliaires, cellules induisant l'activité d'autres cellules effectrices de l'immunité. Les cellules T CD4⁺ naïves migrent hors du thymus où elles se différencient encore en divers sous-types selon les cytokines présentes lors de leur activation par des cellules présentatrices. Les cytokines interleukine (IL)-10 et le facteur de croissance transformant (TGF)-β₁ induisent le facteur de transcription T-box exprimé dans les cellules T (t-bet) et la production de l'interféron gamma (IFN-γ) par le type T_H1. Les cytokines IL-4 et IL-23 induisent le facteur de transcription GATA-3 et la production des cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 par le type T_H2. Les cytokines IL-6, IL-21 et TGF-β₁ induisent le récepteurs nucléaires orphelins relatifs à RAR (RORγ) et la production des cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 par le type T_H17.

Les lymphocytes T régulateurs naturels (nT_{Reg}) sont aussi issus des lymphocytes T CD4⁺ dans le thymus et expriment le facteur de régulation « Forkhead Box Protein 3 » (FOXP3) et agissent principalement via contact direct. En périphérie des lymphocytes T naïfs sont convertis en T régulateurs (iT_{Reg}, T_H3 et T_R1) sous l'action de cytokines comme l'IL-10 et le TGF-β₁ et de signaux inadéquats de stimulation délivrés par les CPA. L'action des iT_{Reg} et des T_{Reg} CD8⁺ est principalement médiée par la sécrétion des cytokines IL-10, IL-35 et le TGF-β₁ qui inhibent la prolifération, réduisent la présentation antigénique et la production de cytokines inflammatoires.

Adapté de (Akbar *et al.*, 2007; Bettini et Vignali, 2009; Chatenoud et Bach, 2006; Di Cesare *et al.*, 2009; Dong, 2008; Espinosa et Chillet, 2006; Fazilleau *et al.*, 2009; King, 2009; Mills, 2004; Miyara et Sakaguchi, 2007; O'Garra et Vieira, 2007; O'Shea *et al.*, 2002; Sakaguchi, 2005; Sakaguchi *et al.*, 2008; Sempere *et al.*, 2007; Soroosh et Doherty, 2009; Tang et Bluestone, 2008; Vignali *et al.*, 2008; von Herrath et Harrison, 2003; Wan et Flavell, 2006; Workman *et al.*, 2009).

1.2 La sclérose en plaques

La « découverte » ou plutôt la description des aspects cliniques, des variations et de la pathologie différenciant la sclérose en plaques des autres troubles nerveux est généralement créditée à Jean-Martin Charcot ((Charcot, 1880) dans (Lassmann *et al.*, 2007)) (Murray, 2005). Toutefois, il est clair que celui-ci a puisé dans les descriptions et observations de pathologistes qui l'ont précédé (Murray, 2005). Cette caractérisation a rapidement mené à la reconnaissance de cette maladie par les médecins partout dans le monde et incidemment à un accroissement des cas observés et décrits (Compston et Coles, 2008) de cette maladie dont on reconnaît des caractéristiques dans certaines descriptions remontant au moyen-âge (Murray, 2005).

La SP est une maladie chronique du SNC caractérisée par des régions multifocales d'inflammation et de destruction de la myéline avec remyélinisation subséquente (Compston et Coles, 2008). La maladie est présente sous au moins quatre formes, mais 80 % des patients présentent la forme de rechute avec rémission, qui peut évoluer vers la forme progressive secondaire, et près de 20 % souffrent de la forme progressive primaire (Compston et Coles, 2008). La forme progressive avec rechute est quant à elle plutôt rare (Frohman, 2003). La maladie varie selon le degré d'inflammation présent et les épisodes peuvent demeurer d'intensité infraclinique. La démyélinisation est suivie ou non de remyélinisation et peut s'accompagner de pertes neurologiques qui, par accumulation, entraînent les désordres observés chez les patients. La nature de ces désordres est directement liée à la zone du SNC atteinte (Compston et Coles, 2008).

1.2.1 Épidémiologie

Bien que la SP soit généralement diagnostiquée entre l'âge de 20 à 40 ans (Confavreux *et al.*, 1980; Confavreux *et al.*, 2003; Confavreux *et al.*, 2000; Leibowitz *et al.*, 1964a; Leibowitz *et al.*, 1964b; McAlpine et Compston, 1952; Muller, 1951; Panelius, 1969; Poser *et al.*, 1982), il est fort probable que les mécanismes pathologiques débutent de nombreuses années auparavant. Si la SP n'est pas considérée comme mortelle, elle résulte après un certain nombre d'années en de sérieuses atteintes à la qualité de vie des patients

(Compston et Coles, 2008; Sospedra et Martin, 2005). Une forte prédominance de la maladie chez les femmes est aussi observée avec un ratio de 2:1 versus les hommes (Compston et Coles, 2008; Sospedra et Martin, 2005) en accord avec les observations sur les diverses maladies auto-immunes révélant une susceptibilité liée au sexe (Whitacre, 2001). En général (80 % des patients), la SP se présente sous la forme de rémissions et rechutes, caractérisée par une alternance de crises suivies de récupération complète ou des crises avec déficits permanents et éventuellement d'une progression dite secondaire (Figure 2) (Sospedra et Martin, 2005). Chez moins de 20 % des patients la SP est progressive dès l'initiation de la maladie, elle est dite progressive primaire (Compston et Coles, 2008; Sospedra et Martin, 2005). D'autres formes moins fréquentes sont aussi reconnues (Courtney, 2003).

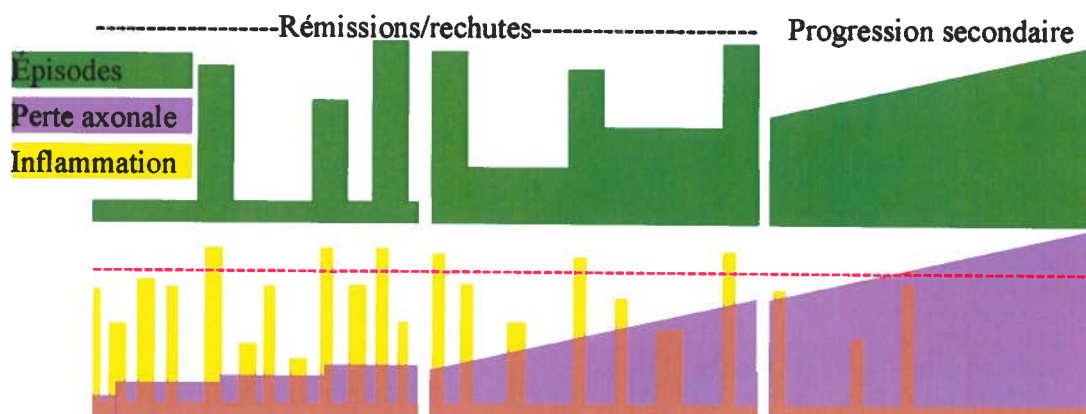


Figure 2: Progression des épisodes de rémissions et rechutes, lésions inflammatoires et dommages permanents du système nerveux central.

La forme la plus fréquente de la sclérose en plaques se caractérise par l'alternance d'épisodes d'inflammation ou rechutes et de rémission (avec inflammation sous-clinique). Les épisodes de rechutes sont suivis de récupération complète. Après un certain nombre d'années des lésions deviennent de plus en plus permanentes et la maladie devient progressive secondaire. Adapté de (Compston et Coles, 2008).

1.2.2 Pathologie

Une vaste étude multicentres (Lucchinetti *et al.*, 2000) a permis d'observer les lésions présentes dans des biopsies et des autopsies de patients atteints de SP. Quatre types de lésions ont été définies suite à cette étude, chaque patient présentant des lésions aux caractéristiques hétérogènes, suggérant l'implication de mécanismes pathogéniques différents ('t Hart et Amor, 2003). Il a d'ailleurs déjà été suggéré que la forme progressive primaire puisse être une maladie différente puisqu'elle affecte une population plus âgée, à prédominance mâle, avec un pronostic nettement moins favorable, et des signes radiologiques et une inflammation moindres (Revesz *et al.*, 1994). Dans la lésion de démyélinisation, la perte de la gaine de myéline peut entraîner un ralentissement, voire même la dégradation et la perte de l'influx nerveux dans l'axone. À l'opposé elle peut aussi causer une excitation spontanée ou une sensibilité accrue menant à l'excitation éphaptique (interactions non synaptiques) entre neurones voisins (Compston et Coles, 2008). Les signes et symptômes ressentis par les patients sont très variés et reflètent le site et l'étendue des lésions (Compston et Coles, 2008).

Pathologiquement, la SP a été originellement définie comme un processus inflammatoire avec le développement de plaques de démyélinisation au SNC (Charcot, 1880). De récents développements semblent indiquer que la destruction de la myéline précède l'inflammation (Barnett et Prineas, 2004). La démyélinisation des axones s'accompagne d'un degré variable de dommages et de pertes neuronales (Ferguson *et al.*, 1997; Trapp *et al.*, 1998) avec un degré variable de remyélinisation (Kornek *et al.*, 2000). Dans la maladie progressive, la pathologie est nettement différente. Les nouvelles plaques de démyélinisation se font rares mais celles déjà existantes prennent lentement de l'expansion (Prineas *et al.*, 2001). Les infiltrations inflammatoires, surtout des cellules T, sont modérées. Le cerveau y est globalement atteint, tant dans la matière blanche que dans la matière grise (Allen et McKeown, 1979; Allen *et al.*, 2001; Bø *et al.*, 2003a; Kutzelnigg et Lassmann, 2005) et on y détecte une activation généralisée des microglies et une perte axonale diffuse (Kutzelnigg *et al.*, 2005).

La présence de cellules T anti-myéline n'est pas un phénomène extraordinaire et unique aux patients atteints de la SP puisque des personnes saines peuvent aussi en posséder. Toutefois, les cellules anti-myéline retrouvées chez les personnes saines semblent être d'un phénotype naïfs, à la différence de celles présentes chez les patients atteints de la SP qui ont un phénotype activé ou mémoire (Lovett-Racke *et al.*, 1998; Scholz *et al.*, 1998). Les lymphocytes T CD8⁺ quant à eux, sont plus abondants chez les patients en rechute que chez les personnes saines ou chez les patients atteints d'une maladie progressive (Bø *et al.*, 2003a; Bø *et al.*, 2003b).

1.2.3 Étiologie

L'étiologie exacte de la SP est toujours inconnue mais différents facteurs associés ont été identifiées. L'identification d'un facteur causal unique serait peu probable; en fait il semblerait que la SP soit causée par une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (Compston et Coles, 2008; Sospedra et Martin, 2005).

1.2.3.1 Facteurs de susceptibilité génétique

La nature génétique de la SP est suggérée par la forte prévalence chez les populations d'origines nord européennes (incluant Canada, É-UA) et une quasi absence du sud-est asiatique (Dyment *et al.*, 2004). Dans les populations les plus touchées, la récurrence familiale peut atteindre 15 % (Compston et Coles, 2008; Dyment *et al.*, 2004), c'est-à-dire qu'un membre de la famille d'un patient atteint de la SP a une « chance » plus élevée de développer la maladie qu'une personne n'ayant aucun membre de sa famille atteint. Ce risque augmente avec la proximité génétique, cependant même des jumeaux identiques n'ont qu'un risque à vie de 25 à 35 % (Compston et Coles, 2008; Dyment *et al.*, 2004; Sospedra et Martin, 2005). En ce qui concerne l'identité du ou des gènes impliqués, de nombreuses études impliquant un nombre élevé de familles ont généré une longue liste de gènes candidats, incluant des HLA, certaines cytokines et chimiokines (Sospedra et Martin, 2005).

1.2.3.2 Facteurs de susceptibilité environnementaux

En présence d'une maladie à contribution purement génétique, le risque calculé d'un jumeau identique de développer la maladie lorsque l'autre jumeau de la paire en est atteint, est théoriquement de 100 %. Dans le cas de la SP, ce risque pour les jumeaux est relativement assez peu élevé pour suggérer la présence d'un ou de plusieurs facteurs non génétiques. De plus un gradient géographique apparent (Compston et Confavreux, 2006), de l'équateur vers les pôles, semble appuyer encore plus la contribution de facteurs environnementaux. Ces facteurs environnementaux possibles sont très nombreux; le texte qui suit n'en cite que quelques uns.

Le gradient ou la distribution géographique du risque lié à une maladie n'est pas nécessairement un signe de cause environnementale et peut tout simplement refléter la distribution géographique des populations, donc de facteurs purement génétiques. Dans le cas de la SP par contre, cette distribution géographique n'est pas expliquée par la génétique des populations. En effet les premières études sur le sujet montraient bien que dans les régions de faible risque (p.ex. en Afrique du Sud), les personnes d'ascendance mixte possédaient un risque intermédiaire (Compston et Confavreux, 2006). De plus, une diminution du risque a été observée dans la population blanche, si leur arrivée en zone à faible risque se produisait avant l'âge de 15 ans ou encore mieux s'ils étaient nés dans ces zones (Compston et Confavreux, 2006). Les études plus récentes suggèrent que ce risque survient en fait sur plusieurs années et n'est pas restreint à l'enfance (Hammond *et al.*, 2000; Kurtzke *et al.*, 1998). Par contre, ce lien avec le lieu de résidence a été confirmé par d'autres études sur des populations indigènes et migrantes (Figure 3) (Kurtzke *et al.*, 1970).

Pour certains auteurs, cette relation entre la géographie et la SP est liée à la vitamine D (Hayes, 2000) ou la mélatonine (Sospedra et Martin, 2005). Cette association est proposée suite à l'observation de la variation dans la fréquence de la maladie avec les heures d'ensoleillement (Acheson *et al.*, 1960), la variation saisonnière des symptômes (Casetta et Granieri, 2000; Compston et Confavreux, 2006) et les nouveaux épisodes de démyélinisation plus fréquents au printemps (Compston et Confavreux, 2006). La

mélatonine expliquerait cette variation par ses effets immunosuppresseurs (Dumas et Jauberteau-Marchan, 2000; Hutter et Laing, 1996).

D'autres facteurs sont avancés pour expliquer la prévalence de la SP. Le ratio femmes/hommes suggère une influence hormonale supportée par les plus bas taux de rechute pendant la grossesse et le rebond de la maladie après l'accouchement (Runmarker et Andersen, 1995), la détérioration pendant la période menstruelle (Sospedra et Martin, 2005), l'effet protecteur de la testostérone et de l'estriol (Sicotte *et al.*, 2002). Les mécanismes sont inconnus mais un effet stimulant des œstrogènes sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire a été observé (Sospedra et Martin, 2005). Il est toutefois à noter que la grossesse n'affecte pas le risque de développer la maladie (Confavreux et Compston, 2006). Une méta-analyse des naissances des patients atteints de la SP met en évidence une corrélation (Figure 4), ou un risque plus élevé pour les naissances au mois de mai et moindre pour celles au mois de novembre (Willer *et al.*, 2005). Certains y voient un effet maternel (Hammond *et al.*, 2000) sur le fœtus pendant les mois de son développement, soit à partir de septembre dans le cas des naissances en mai. Encore une fois la vitamine D et la mélatonine sont avancées et pourraient collaborer avec les hormones maternelles et ainsi affecter le risque de l'enfant de développer la SP (Willer *et al.*, 2005).

Dans les années qui suivirent la seconde guerre mondiale les « épidémies » de SP se multiplièrent dans les Iles Féroé, l'Islande, les Iles Oskney et Shetland ainsi que Key West et furent attribuées à l'introduction dans ces territoires isolés de nouveaux agents pathogènes par les troupes occidentales d'occupation (p.ex. américaines et britanniques). Cependant, il est aussi probable que cet accroissement soit en tout ou en grande partie attribuable à l'arrivée de personnel médical spécialisé et informé sur le diagnostic de la SP (Compston et Confavreux, 2006).

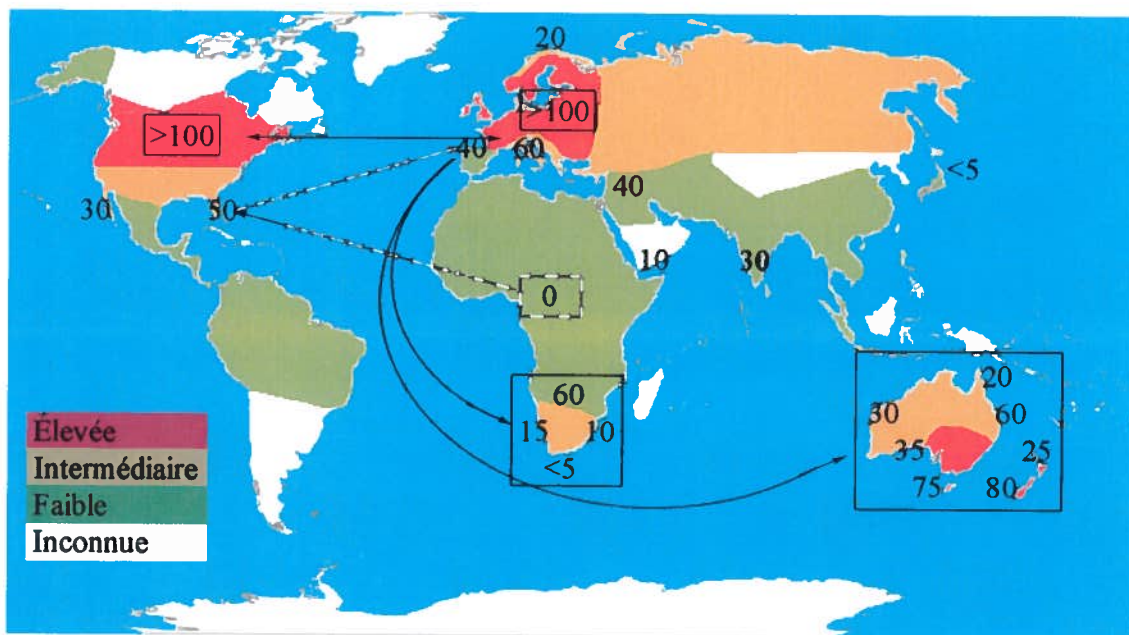


Figure 3: Prévalences géographiques de la sclérose en plaques et migrations.

Estimations des prévalences. Les lignes pleines représentent les migrations des populations européennes, les lignes ouvertes représentent les migrations des populations africaines. En Afrique du sud les nombres font références aux blancs ayant migré à l'âge adulte (60), à l'enfance (15), afrikaners (10) et les individus mulâtres (<5) tels qu'estimés dans les années 1980. Adapté de (Compston et Confavreux, 2006; Confavreux et Compston, 2006).

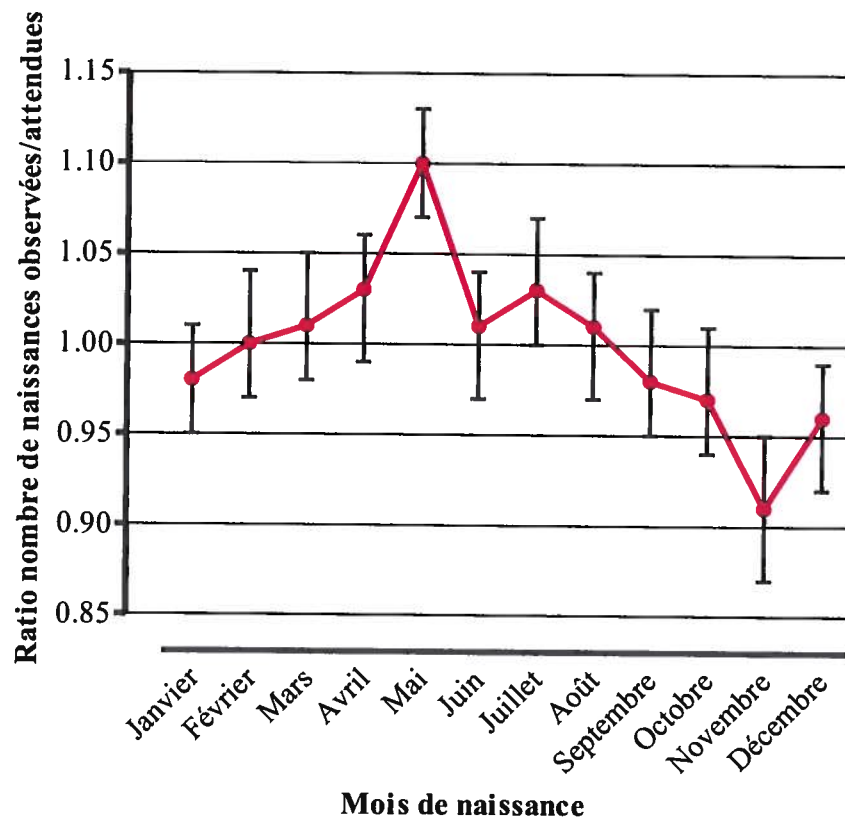


Figure 4: Méta-analyse des naissances des patients atteints de sclérose en plaques.

Analyses combinées des naissances observées et attendues des patients atteints de la sclérose en plaques dans les populations canadienne, britannique, danoise et suédoise (n=42 045) avec un intervalle de confiance de 95 %. Adapté de (Willer *et al.*, 2005).

1.2.3.3 *Les infections dans la sclérose en plaques*

Les infections microbiennes sont le plus souvent citées comme événement déclencheur associé à la SP (Pette *et al.*, 1990). Les virus (Tableau I) ont été désignés comme les agents microbiens les plus probables de cette activation (Cook *et al.*, 1995; Kurtzke, 1993). L'infection virale transitoire est une des hypothèses avancées (Atkins *et al.*, 2000), elle a l'avantage d'expliquer l'absence d'infection active au moment du diagnostic (Figure 5). Cette association est encore plus valable, lorsque l'on considère que des souris possédant un TCR transgénique spécifique de la MBP demeurent saines en milieu stérile, alors que celles en conditions non-stériles développent une maladie similaire à la SP (Goverman *et al.*, 1993). Donc même en présence de cellules autoréactives, une infection serait nécessaire au déclenchement des mécanismes pathologiques.

Les virus capables d'infections chroniques lentes ou latentes ont aussi été mis en cause (Lipton *et al.*, 2007). Les modèles animaux infectieux de démyélinisation les plus étudiés sont d'ailleurs associés à des virus tous capables d'infections persistantes. Ceux-ci peuvent causer une maladie neurologique par des mécanismes directs, comme la mort des neurones infectés ou la perte de fonction, ou indirects, via les dommages causés par la réponse immunitaire (Talbot *et al.*, 2001). Il a été suggéré que la réponse immunitaire (Figure 5) contre un microbe puisse briser la tolérance à la myéline chez les individus génétiquement prédisposés (Steinman, 1996). Il s'en suivrait une infiltration du SNC par des cellules inflammatoires et la pathologie avec ou sans infection persistante du SNC (Steinman, 1996). Les infections respiratoires et entériques sont depuis longtemps associées à l'exacerbation de la SP (Andersen *et al.*, 1993; Compston et Coles, 2008; Cook *et al.*, 1995; Johnson-Lussenburg et Zheng, 1987; Kurtzke, 1993; Marrie *et al.*, 2000; Panitch, 1994; Sibley *et al.*, 1985; Talbot, 1995; Waksman, 1995). Toutefois, comme pour les facteurs génétiques, aucun agent unique (Tableau I) n'a été solidement associé avec la SP (Johnson, 1994; Soldan et Jacobson, 2001).

Les observations faites en imagerie médicale confirment que l'activité inflammatoire est bien plus importante que ce à quoi l'on pourrait s'attendre à l'observation des patients, suggérant un processus continu, consistant avec une infection chronique plutôt que latente

(Barkhof *et al.*, 1992). Deux visions du type d'infection virale en cause dans la SP sont à départager. Le modèle dit de « prévalence », suppose que plus le virus est commun dans une région et plus il y a de cas de SP (Gilden, 2005). Le modèle dit « polio », est basé sur l'observation de pathologies rares associées à des infections plus fréquentes comme les neuropathologies associées à la poliomyélite et à la rougeole (1 sur 500-2000 infections) (Gibbons *et al.*, 1956; Gilden, 2005; Nathanson et Martin, 1979) ou à la rubéole (1 sur 5000 infections) (Margolis *et al.*, 1943). Dans ce second modèle une infection tôt dans la vie réduit le risque que le virus n'atteigne le SNC alors que l'infection primaire après la puberté résulterait en une faible incidence d'infection du SNC menant à la SP (Nathanson et Miller, 1978).

Tableau I: Maladies infectieuses du système nerveux central ou associées avec l'induction ou l'exacerbation de la sclérose en plaques.

Adapté de (Atkins *et al.*, 2000; Lipton *et al.*, 2007).

<i>Famille</i> Espèce	Hôte	Type d'infection	Maladie induite	Démyélinisation / Associé à la SP
<i>Coronaviridae</i>				
HCoV	Humain	Transitoire Persistante?	Rhume ?	N.D. / Oui
MHV	Souris	Persistante	Encéphalomyélite	Oui / N.A.
	Rat	Persistante	Encéphalomyélite	Oui / N.A.
<i>Flaviviridae</i>				
Virus de l'encéphalite à tique (sous-type <i>eastern</i>)	Humain	Persistante	Encéphalite de la taïga	Oui / Oui
<i>Herpesviridae</i>				
HSV	Humain	Latente	Gingivostomatite	Non / Oui
HHV6	Humain	Persistante	Encéphalite	Non / Oui
EBV	Humain	Latente	Mononucléose infectieuse, encéphalite, méningite	Non / Oui
CMV	Humain		Asymptomatique	Non / Oui
<i>Papovaviridae</i>				
JC	Humain	Persistante	Leucoencéphalite multifocale progressive	Oui / Oui
<i>Parainfluenza</i>				
Oreillons	Humain	Transitoire	Parotidite, encéphalite (rare), méningite (rare)	Non / Oui
<i>Paramyxoviridae</i>				
Rougeole	Humain	Transitoire Persistante	Encéphalite Panencéphalite subaiguë sclérosante	Oui / Oui
	Rat	Persistante	Encéphalomyélite	Oui / N.A.
Maladie de carré	Chien	Persistante	Encéphalite	Oui / Oui
SV40	Singe	Persistante	Leucoencéphalopathie	Oui / Oui

Tableau I: suite...

<i>Picornaviridae</i>				
Theiler	Souris	Persistante	Encéphalomyélite	Oui / N.A.
<i>Myxoviridae</i>				
Influenza	Humain	Transitoire	Grippe	Non / Oui
<i>Retroviridae</i>				
HTLV-1	Humain	Persistante	Myélopathie	Oui / Oui
Visna	Mouton	Persistante	Encéphalomyélite	Oui / N.A.
<i>Togaviridae</i>				
Rubéole	Humain	Persistante	Panencéphalite progressive de la rubéole	Oui / Oui
Fôret de Semliki	Souris	Persistante	Encéphalite	Oui / N.A.
N.D.: Non disponible/Inconnu		N.A.: Non applicable		

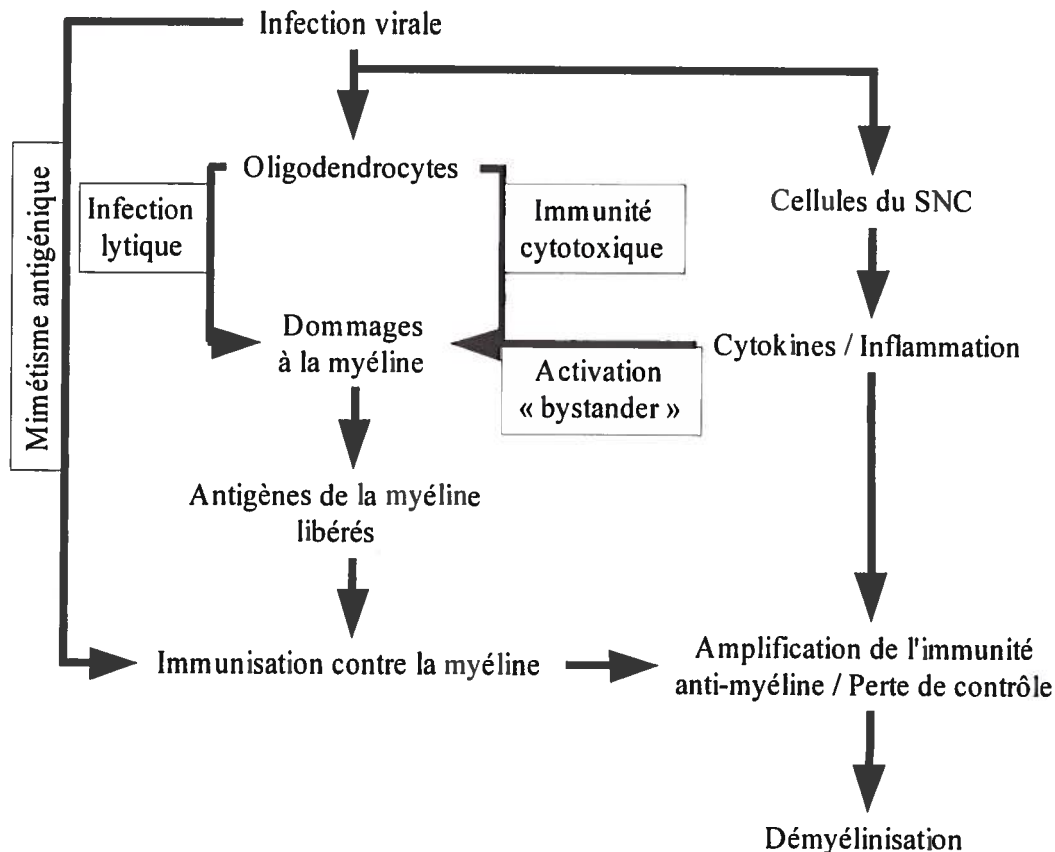


Figure 5: Mécanismes postulés de génération de l'auto-immunité anti-myéline déclenchée ou exacerbée par une infection virale transitoire.

L'immunsation anti-myéline survient suite à l'infection par divers mécanismes comme le mimétisme antigénique, ou la libération d'antigènes du soi suite à l'infection lytique ou par l'action du système immunitaire. Chez des individus génétiquement prédisposés, une réinfection couplée à une mauvaise régulation de la réponse immunitaire entraîne une amplification de la destruction de la myéline et la démyélinisation subséquente. Adapté de (Atkins *et al.*, 2000).

1.2.3.4 Le « syndrome » de la sclérose en plaques

L'étiologie exacte de la SP demeure toujours inconnue mais les études sur le sujet se poursuivent. Toutefois, ces efforts pourraient être peu productifs si l'on se borne à l'identification d'un seul facteur comme cause. Les données suggèrent effectivement qu'il y aurait plusieurs causes ou combinaison de facteurs génétiques et environnementaux à la maladie et d'autres facteurs capables d'amplifier les mécanismes pathologiques (Sospedra et Martin, 2005). Dans le cas du ou des facteurs infectieux, il est possible qu'il soit très répandu mais que la SP en soit une conséquence rare dans certaines combinaisons de susceptibilités génétiques (Figure 6).

Cette recherche pourrait s'avérer d'autant plus ardue si la SP est, comme certains le croient, un « syndrome » complexe, c'est-à-dire un groupe de maladies partageant un phénotype clinique similaire mais aux causes et à l'évolution distinctes (Gold *et al.*, 2006; Lucchinetti *et al.*, 2000). Citons comme exemple la forme progressive primaire qui affecte une population à prédominance mâle, plus âgée, avec un pronostic moins favorable associé avec moins de lésions inflammatoires (Compston et Coles, 2008). Cette forme de la SP pourrait être une tout autre maladie, provoquée par un virus différent.

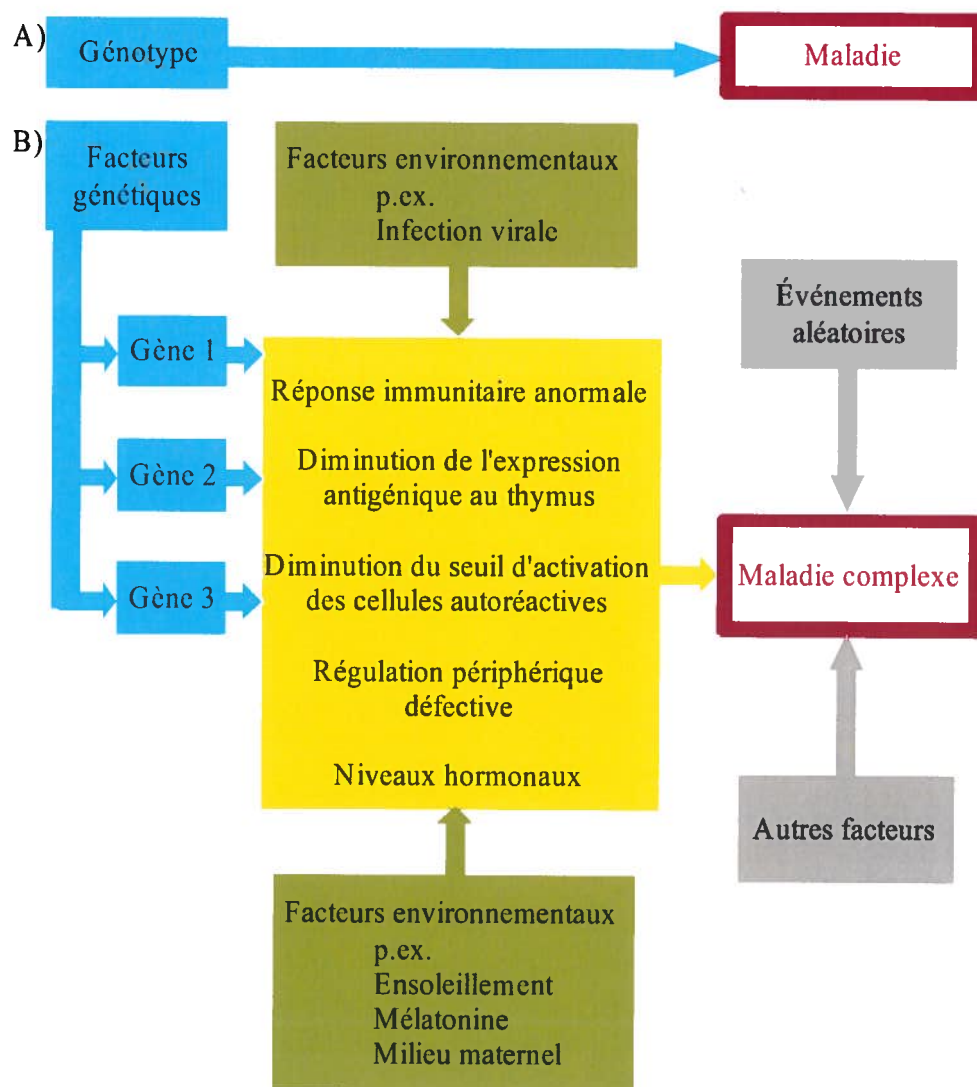


Figure 6: Modèle comparatif théorique des maladies monogéniques et multifactorielles.

Dans les maladies génétiques à hérédité mendélienne (A) le lien entre le génotype causal et la pathologie est déterminante. Dans les maladies multifactorielles (B) la maladie qui est reconnue résulte de l'interaction d'un ou plusieurs gènes avec les influences de l'environnement. Les génotypes individuels influencent le type et le niveau de la réponse immunitaire (innée et acquise) contre les infections mais aussi les antigènes du soi. Adapté de (Rioux et Abbas, 2005).

1.2.4 Modèles animaux de la sclérose en plaques

L'importance des modèles animaux de maladies humaines ne peut être nié. Malgré certaines limitations dont il faut toujours être conscient, ces modèles permettent l'étude de mécanismes pathologiques et surtout de développer des thérapies qui, une fois au point, pourront être testées et aider les patients. Dans le cas de la SP, ce ne sont non pas un mais une panoplie de modèles qui sont disponibles.

Ces modèles peuvent être classés en deux grandes catégories, selon la méthode employée pour induire la maladie; un antigène du soi – pour les modèles non-infectieux – ou un micro-organismes – pour les modèles infectieux.

1.2.4.1 Modèles non -infectieux

Les modèles non-infectieux de la SP sont en fait la transposition à l'animal d'un phénomène d'abord observé chez l'humain lors des premiers essais de vaccination à grande échelle. Le premier vaccin, contre la rage, développé par Louis Pasteur en 1885 était produit par la propagation par voie intracérébrale du virus rabique dans les lapins (Baxter, 2007). Le traitement consistait en l'injection d'émulsions d'extraits séchés de moelle épinière de ces lapins, pour en inactiver le virus, de moins en moins longtemps (Baxter, 2007). Le succès du vaccin de Pasteur mena à la vaccination de 5000 personnes dans les deux années suivantes, sans complication apparente (Stuart et Krikorian, 1928). Malheureusement, des cas d'échec de la vaccination amenèrent par la suite Pasteur et ses disciples à injecter précocement des extraits plus virulents (Baxter, 2007). Dès 1888, des cas furent rapportés de patients vaccinés souffrant de paralysie (Baxter, 2007). Les caractéristiques cliniques de ces cas étaient distinguables des effets de la rage entre autre par les infiltrations lymphoïdes et la démyélinisation du SNC avec les neurones relativement épargnés, contrairement à ce qui est observé dans la rage (Baxter, 2007). Il aura fallu plusieurs années avant que la nature non infectieuse et l'association avec la myéline de ce trouble paralytique ne se fasse (Rivers et Schwentker, 1935; Rivers *et al.*, 1933; Schwentker et Rivers, 1934). Les premiers protocoles expérimentaux pour ce modèle impliquaient de très nombreuses injections d'extraits de cerveau ou de moelle épinière

humaine ou de lapin à divers animaux (Freund *et al.*, 1947; Genain *et al.*, 1995; Innes, 1951; Lipton et Freund, 1952; Lumsden, 1949; Morrison, 1947; Olitsky et Yager, 1949; Ranzenhofer *et al.*, 1958; Rivers *et al.*, 1933; Tal *et al.*, 1958; Thomas *et al.*, 1950). Le développement de l'adjuvant de Freund (Freund et McDermott, 1942) permet de simplifier le protocole (Freund *et al.*, 1947; Kabat *et al.*, 1946a; Kabat *et al.*, 1946b; Morgan, 1947) et éventuellement de circonscrire le phénomène à la matière blanche (Waksman *et al.*, 1954). La nature de l'agent déclenchant fut approfondie avec l'induction de la maladie par injection de myéline (Laatsch *et al.*, 1962) puis de peptides dérivés de la MBP (Eylar *et al.*, 1970; Lennon *et al.*, 1970) puis d'épitopes précis (Fritz *et al.*, 1983; Pettinelli *et al.*, 1982).

Le modèle initialement appelé « encéphalomyélite allergique expérimentale » (EAE) était perçu comme une manifestation immunologique à médiation humorale (Kabat *et al.*, 1946b; Morgan, 1947). La nature cellulaire des mécanismes en jeu fut plus tard démontrée à l'aide de transferts de splénocytes (Paterson, 1960) conférant la maladie (EAE passive), la thymectomie (Arnason *et al.*, 1962) et l'injection d'antisérum ciblant les lymphocytes supprimant au contraire la maladie. Pour être encore plus précis, le modèle semble médié principalement par les lymphocytes T CD4⁺ (Ben-Nun *et al.*, 1981), la suppression des CD8⁺ n'ayant aucun effet observable (Jiang *et al.*, 1992; Koh *et al.*, 1992). Le dernier élément de la preuve de cette réaction vint de l'isolement de cellules T auto-aggressives (Schluesener et Wekerle, 1985). À ce moment l'EAE devint « auto-immunitaire » plutôt qu'allergique.

Les modèles d'EAE sont très hétérogènes (Gold *et al.*, 2006; Lassmann *et al.*, 2007) dans les aspects cliniques, la progression et l'histopathologie selon l'espèce hôte (Baxter, 2007; Encinas *et al.*, 1996) et l'agent inducteur employé: *myelin basic protein* (MBP) (Pettinelli *et al.*, 1982), *proteolipid protein* (PLP) (Tuohy *et al.*, 1988), *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) (Mendel *et al.*, 1995) ou *myelin associated glycoprotein* (MAG) (Morris-Downes *et al.*, 2002).

Le modèle de l'EAE est, sous certains aspects, mieux défini que la SP. Il s'agit d'un bon outil dans l'étude des éléments de la pathologie tout comme de l'immunosurveillance du SNC en général (Gold *et al.*, 2006; Lassmann *et al.*, 2007). C'est d'ailleurs grâce à ce

modèle que fut redécouverte l'importance des dommages ou pertes neuronales dans la pathologie (Gold *et al.*, 2006). C'est aussi grâce à ce modèle qu'ont été développées trois thérapies en usage dans le traitement des patients atteints de la SP (Tableau II). Comme pour tout modèle animal, certaines différences existent entre l'EAE et la SP (Tableau III). Des critiques s'élèvent contre l'étude de ce modèle, mettant en avant les nombreuses études cliniques sur des thérapies efficaces dans le traitement de l'EAE mais ayant échoué dans la SP (Sriram et Steiner, 2005).

Tableau II: Thérapies développées dans le modèle animal d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et éventuellement certifiées pour le traitement de la sclérose en plaques (SP).

Thérapie développée	EAE	SP
Acétate de glatiramère (polypeptides aléatoire)	(Keith <i>et al.</i> , 1979) (Teitelbaum <i>et al.</i> , 1974) (Teitelbaum <i>et al.</i> , 1971)	(Johnson <i>et al.</i> , 1995) (Johnson <i>et al.</i> , 1998) (Wolinsky <i>et al.</i> , 2002) (Miller <i>et al.</i> , 2008) (Abramsky <i>et al.</i> , 1977) (Bornstein <i>et al.</i> , 1987)
Mitoxantrone (immunosuppresseur)	(Lublin <i>et al.</i> , 1987) (Levine et Saltzman, 1986) (Watson <i>et al.</i> , 1991) (Ridge <i>et al.</i> , 1985)	(Edan <i>et al.</i> , 1997) (Hartung <i>et al.</i> , 2002) (Mauch <i>et al.</i> , 1992) (Millefiorini <i>et al.</i> , 1997) (Noseworthy <i>et al.</i> , 1993) (van de Wyngaert <i>et al.</i> , 2001)
Natalizumab (anticorps monoclonal humanisé ciblant l'intégrine VLA4)	(Yednock <i>et al.</i> , 1992) (Steinman, 2005)	(Rudick <i>et al.</i> , 2006) (Polman <i>et al.</i> , 2006)

Tableau III: Comparaison des pathologies associées à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et à la sclérose en plaques (SP).

Adapté de (Baxter, 2007; Bettelli, 2007; Frohman *et al.*, 2006; Gold *et al.*, 2006; Ransohoff, 2006).

Pathologie	EAE	SP
Démýélinisation	Prédominance périveineuse	Typiquement présente dans toute la matière blanche du SNC. Atteinte de la matière grise aussi observée.
Lésions	Variable selon l'antigène MBP et PLP: dominance dans les régions lombaires MOG: Tronc cérébral	Zones périventriculaires cérébrales, cervelet, tronc cérébral, nerfs optiques, moelle épinière, etc. Peu fréquentes dans les régions thoraciques et lombaires
Évolution	Multiphasique ou monophasique selon le modèle	Rémission/rechutes (multiphasique, 80 %) ou progressive (20 %)
Infiltrations / Inflammation	Cellules T CD4 ⁺ Macrophages activés Quelques CD8 ⁺	Périvasculaire: Macrophages activés Cellules T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ , clones restreints
Cytokines	MBP et PLP: T _H 1 MOG: T _H 2	Variable
Liquide céphalorachidien	Anticorps anti-myéline présents	Bandes oligoclonales Anticorps anti-myéline peu fréquents
Remyélinisation	Présente	Présente Incomplète avec pertes permanentes
Dommages aux axones	Présents	Présents

Une des différences majeures entre l'EAE et la SP est que cette dernière est une maladie « spontanée » contrairement à l'EAE qui nécessite une immunisation active. Quelques modèles spontanés ont été développés mais nécessitent l'utilisation de la transgénèse (Bettelli *et al.*, 2003; Waldner *et al.*, 2000; Zehntner *et al.*, 2003). Dans ce sens, les modèles infectieux offrent un avantage, l'infection en laboratoire n'est que la manifestation sous paramètres contrôlés, de phénomènes pouvant théoriquement et de façon plausible se produire naturellement.

1.2.4.2 Modèles infectieux

Divers virus sont capables d'infecter le SNC et d'y causer une maladie démyélinisante (Tableau IV). Par contre, dans l'étude des mécanismes menant à une démyélinisation inflammatoire du SNC certains modèles sont préférés. Dans les pages qui suivent deux modèles, le TMEV et le MHV, seront présentés.

Tableau IV: Modèles animaux de démyélinisation chronique induite par les virus.

Sélection d'infections virales du système nerveux central (SNC) d'animaux menant à une maladie de démyélinisation. Adapté de (Griffin, 2003; Lipton *et al.*, 2007).

Virus	Famille	Hôte	Cellules infectées Persistance ^a / Réservoir ^b
Virus de la maladie de Carré	<i>Paramyxoviridae</i>	Chien	Oligodendrocytes Neurones
(Summers <i>et al.</i> , 1979; Vandeveld et Zurbriggen, 2005)			+/astrocyte
Coronavirus murin	<i>Coronaviridae</i>	Souris	Neurones Microglies Astrocytes Oligodendrocytes
(Bergmann <i>et al.</i> , 2006; Lavi <i>et al.</i> , 1984b)			+/astrocyte
Virus de Theiler	<i>Picornaviridae</i>	Souris	Neurones Microglies Oligodendrocytes
(Brahic <i>et al.</i> , 2005; Lipton, 1975)			+++/macrophage
Virus Visna	<i>Retroviridae</i>	Mouton d'Islande	ND
(Gendelman <i>et al.</i> , 1986; Pétursson <i>et al.</i> , 1976)			++/monocyte/macrophage

^aNiveaux relatif de persistance: + antigènes viraux seulement ++ antigènes viraux et virus infectieux limités +++ antigènes viraux et virus infectieux.

^bCellules principales hébergeant le virus lors de l'infection persistante.

Virus de l'encéphalomyélite de Theiler

Le virus de l'encéphalomyélite de Theiler ou poliomyélite murine (TMEV; (Theiler, 1937)) est un petit virus non enveloppé à ARN monocaténaire positif d'environ 8100 nucléotides, du genre *cardiovirus* et de la famille des *Picornaviridae* (Ohara *et al.*, 1988; Ozden *et al.*, 1986; Pevear *et al.*, 1987; Racaniello, 2001). Le TMEV est un virus entérique des souris qui peut provoquer une maladie ressemblant à celle causée par l'infection chez l'humain par le virus de la poliomyélite (Oleszak *et al.*, 2004; Racaniello, 2001).

Les souches sont généralement regroupées selon leur virulence (Tableau VIII) suite à l'inoculation intracérébrale (i.c.) à des souris (Oleszak *et al.*, 2004). Le TMEV est principalement un pathogène entérique et peut être détecté dans les muqueuses intestinales et parfois les ganglions mésentériques mais étonnamment sans causer de lésions histologiques de l'intestin. Le virus quitte l'organisme par le contenu intestinal et la transmission se fait par voie fécale-orale. La réponse immunitaire limite la dispersion du virus et éventuellement parvient à l'éliminer ou du moins à le restreindre au SNC où il persiste. L'infection naturelle d'un hôte immunocompétent est généralement asymptomatique mais l'infection expérimentale de souris susceptible induit une maladie biphasique. En phase aiguë, les neurones de la matière grise sont infectés et il s'ensuit une encéphalomyélite parfois fatale. Après un à trois mois de maladie, la phase de persistance fait suite à l'infection aiguë, alors que le virus infecte les oligodendrocytes et les astrocytes mais surtout les macrophages, ce qui mène à une démyélinisation du SNC. Le système immunitaire élimine le virus de la matière grise mais pas de la blanche (Njenga *et al.*, 2004).

Les virus faiblement virulents produisent une infection persistante du SNC résultant en une démyélinisation du SNC médiée par le système immunitaire (Clatch *et al.*, 1986; Karpus *et al.*, 1995) autant que par des dommages directs causés aux oligodendrocytes par le virus (Rodriguez *et al.*, 1983). Dans la maladie démyélinisante provoquée par le TMEV, la destruction de la myéline est initiée par des CD4⁺ T_H1 spécifiques au virus (Clatch *et al.*, 1986) et l'auto-immunité se développe après que les dommages à la myéline soient déjà initiés (Katz-Levy *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 1997b). La persistance ne s'établit que dans les

souches de souris susceptibles de même que la sévérité et la nature de la maladie dépend de la souche virale, de la route d'infection, du génotype et de l'âge de l'hôte (Downs, 1982; Steiner *et al.*, 1984).

La démyélinisation chez les souris immunocompétentes est immunomédiée par les CTL (Lindsley *et al.*, 1992). L'immunosuppression inhibe la démyélinisation (Rodriguez et Lindsley, 1992) tout comme l'ajout de sérum antiviral. Les caractéristiques comparatives du modèle infectieux avec TMEV et de la SP sont résumés dans le tableau V.

Tableau V: Comparaison des pathologies associées à l'infection chronique par le virus de l'encéphalomyélite de Theiler et de la sclérose en plaques.

Adapté de (Frohman *et al.*, 2006; Oleszak *et al.*, 2004).

Pathologie	TMEV	SP
Démyélinisation	En phase tardive	Typiquement présente dans toute la matière blanche du SNC. Atteinte de la matière grise aussi observée.
Lésions	Matière grise du thalamus, hypothalamus, hippocampe, mésencéphale, cortex cérébral, moelle épinière (cornes antérieures) Lésions de la matière blanche en phase tardive	Zones périventriculaires cérébrales, cervelet, tronc cérébral, nerfs optiques, moelle épinière, etc. Peu fréquentes dans les régions thoraciques et lombaires
Évolution	Biphasique	Rémission/rechutes (multiphasique, 80 %) ou progressive (20 %)
Infiltrations / Inflammation	Présentes: périvasculaire, dans la matière grise	Périvasculaire: Macrophages activés Cellules T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ , clones restreints
Cytokines	Variable selon la souche de souris infectée	Variable
Liquide céphalorachidien	Anticorps anti-MBP Anticorps anti-TMEV	Bandes oligoclonales Anticorps anti-myéline peu fréquents
Remyélinisation	Présente	Présente Incomplète avec pertes permanentes
Domages aux axones	Présentes	Présents

Coronavirus de l'hépatite murine

Le coronavirus de l'hépatite murine (MHV) représente un large groupe de virus, très similaires génétiquement et antigéniquement, retrouvés naturellement chez la souris partout sur la planète (Brayton *et al.*, 2004). Certaines souches ayant émergées en laboratoire sont toutefois capables de pénétrer le SNC et d'y induire une encéphalite aigüe, souvent mortelle, suivie d'une infection chronique accompagnée d'une maladie de démyélinisation du SNC chez les survivantes (Tableau VI). Cette maladie est associée avec un contrôle de l'infection où il y a disparition des particules virales infectieuses mais persistance du génome viral et infiltration lymphocytaire. Les animaux infectés sont ainsi atteints à un degré variable de paralysie des membres postérieurs et parfois antérieurs tout comme dans l'EAE.

Tableau VI: Comparaison des pathologies associées à l'infection par les souches neurovirulentes du coronavirus murin et de la sclérose en plaques.

Adapté de (Bergmann *et al.*, 2006; Frohman *et al.*, 2006; Griffin, 2003; Marten *et al.*, 2001; Perlman et Dandekar, 2005; Weiss et Navas-Martin, 2005).

Pathologie	MHV	SP
Démyélinisation	Présente dans toute la matière blanche du SNC, peu fréquente dans la matière grise	Typiquement présente dans toute la matière blanche du SNC. Atteinte de la matière grise aussi observée.
Lésions	Matière blanche de l'encéphale et de la moelle épinière	Zones périventriculaires cérébrales, cervelet, tronc cérébral, nerfs optiques, moelle épinière, etc. Peu fréquentes dans les régions thoraciques et lombaires
Évolution	Biphasique	Rémissions/rechutes (multiphasique, 80 %) ou progressive (20 %)
Infiltrations / Inflammation	Périvasculaire Peu fréquente dans la matière grise Macrophages/microglies activés, cellules NK, cellules T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ , spécifiques ou non pour le virus	Périvasculaire: Macrophages activés Cellules T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ , clones restreints
Cytokines	Variables selon la souche virale	Variable
Liquide céphalorachidien	Anticorps anti-virus et autres spécificités (détails ND)	Bandes oligoclonales Anticorps anti-myéline peu fréquents
Remyélinisation	Présente	Présente Incomplète avec pertes permanentes
Dommages aux axones	Présents et concomitants à la démyélinisation	Présents

Le virus est hautement contagieux et se propage par les fèces et les sécrétions nasopharyngées par contact direct, aérosols et matières contaminées (Kraft, 1982; National Research Council, 1991). Dans ce modèle, la maladie dépend du fond génétique et de l'âge de l'hôte, ainsi que de la souche virale, la dose et la voie d'infection (Matthews *et al.*, 2002b). Le sujet de cette thèse, portant sur ce modèle, est discuté plus en détails à la section « 1.4.4 ».

Quoiqu'il en soit, MHV, TMEV, ou tout autres modèles animaux infectieux de la SP partagent une propriété commune; la capacité d'infecter de façon chronique voire persistante le SNC. Cette infection persistante semble même un prérequis à la maladie de démyélinisation du SNC.

1.3 Les infections virales persistantes

Dérivé du mot latin pour « poison » le terme virus a longtemps désigné la cause de toutes les maladies transmissibles (Murphy, 2002). Éventuellement, la démonstration par Mayer et Ivanovsky en 1886 (Murphy, 2002) qu'une maladie puisse se transmettre via des extraits filtrés a conduit à l'utilisation de l'expression « virus filtrables » qui finit par devenir simplement « virus ». Toutefois les limitations techniques ne permirent pas l'étude et l'identification de nombreux virus avant le développement de méthodes de culture cellulaire, le couplage d'anticorps à des « étiquettes » moléculaires et la microscopie électronique dans les années '50 (Murphy, 2002). Par la suite de nombreux nouveaux virus furent isolés et caractérisés (Murphy, 2002).

Lors de l'infection virale, les cellules infectées produisent de nouvelles particules virales qui vont à leur tour infecter de nouvelles cellules. Cette phase de l'infection est qualifiée d'aiguë. C'est aussi l'occasion d'une course entre le virus et le système immunitaire; le premier devant se reproduire et quitter l'organisme pour en infecter un autre avant que le système immunitaire ne soit en mesure de l'éliminer. Il existe un nombre très important de virus, chacun ayant un spectre d'hôte et une stratégie d'infection, de réplication et de propagation qui lui est propre. Si certains virus parviennent à survivre en tant qu'espèce malgré l'induction d'une forte ou rapide mortalité dans l'organisme hôte, d'autres

au contraire ont évolué avec des stratégies favorisant leur maintien à long terme dans l'hôte (Tableau VII). Lorsque le système immunitaire échoue à éliminer le virus dans l'infection aiguë la persistance virale peut s'établir. Le type de maladie associé à cette persistance est souvent très différent de celui lié à l'infection aiguë et peut requérir des mutations ou encore l'infection de cellules spécialisées.

Tableau VII: Liste de virus employant les différents types de persistance.

Adapté de (Gonzalez-Scarano, 2002).

Virus	Hôte(s)	Site de la persistance	Maladie
Infections latentes			
<i>Herpesviridae</i>			
CMV	Humain Souris	Reins, glandes salivaires, lymphocytes, macrophages	Pneumonite, rétinite, <u>encéphalite</u>
EBV	Humain	Cellules épithéliales du pharynx, lymphocytes B	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, carcinome nasopharyngien, lymphome non- Hodgkinien
HHV-6	Humain	Monocytes, macrophages	Roséole
HHV-8	Humain	Cellules endothéliales, lymphocytes B	Sarcome de Kaposi, lymphome
HSV	Humain	Neurones sensoriels	Feu sauvage, <u>encéphalite</u> , kératite, herpès génital
VZV	Humain	Neurones sensoriels	Zona, varicelle
<i>Papovaviridae</i>			
VPH	Humain	Cellules épidermales	Condylome, néoplasies cervicales
Infections chroniques à haut titre			
<i>Arenaviridae</i>			
LCMV	Souris	Macrophage	Glomérulonéphrite, vasculite
<i>Hepadnaviridae</i>			
VHB	Humain	Hépatocyte, lymphocytes, macrophages	Hépatite, hépatocarcinome
VHD	Humain	Hépatocytes	Exacerbation de l'hépatite B
<i>Parvoviridae</i>			
B19	Humain	Progéniteurs érythroïdes de la moelle osseuse	Anémie hémolytique, déficience chronique de la moelle osseuse
FPV	Chat	Épithélium intestinal	<u>Ataxie cérébrale</u> , panleucopénie
VMVA	Vison	Macrophages des ganglions lymphatiques	Glomérulonéphrite, vasculite

Tableau VI: suite...

Infections chroniques lentes

<i>Flaviviridae</i>			
VHC	Humain	Hépatocytes, lymphocytes, macrophages	Hépatite, hépatocarcinome
<i>Picornaviridae</i>			
TMEV	Souris	SNC Cellules gliales	<u>Démyélinisation</u>
<i>Paramyxoviridae</i>			
CDV	Chien	SNC	<u>Encéphalite, démyélinisation</u>
Rougeole	Humain	Neurones, cellules gliales	<u>Panencéphalite subaiguë sclérosante</u>
Rubéole	Humain	SNC	<u>Panencéphalite progressive</u>
<i>Retroviridae</i>			
EIAV	Cheval	Monocytes, macrophages	Anémie hémolytique épisodique
HTLV-1	Humain	Lymphocytes T	<u>Paraparésie spastique tropicale, leucémie lymphoïde T</u>
VIH	Humain	Lymphocytes CD4 ⁺ , monocytes, macrophages, microglies	SIDA
VMV	Mouton	Monocytes, macrophages	<u>Pneumonite interstitielle, démyélinisation</u>
<i>Papovaviridae</i>			
JC	Humain	Reins, oligodendrocytes	<u>Leucoencéphalopathie multifocale progressive</u>
BK	Humain	Reins	Cystite hémorragique
<i>Coronaviridae</i>			
HCoV	Humain	SNC	Aucune confirmée
MHV	Souris	SNC	<u>Encéphalomyélite, démyélinisation</u>
<i>Adenoviridae</i>			
	Humain	Glandes adénoïdes, amygdales, lymphocytes	Leucémie lymphoblastique aiguë

Trois types de persistance ont été caractérisées (Lipton et Gilden, 1996) selon la stratégie de réplication virale adoptée (Figure 7). L'infection latente se produit lorsque le génome est maintenu dans les cellules hôtes en absence de production virale, le virus passant par un cycle réplicatif sous certaines conditions. L'infection chronique défective se produit lorsque le cycle réplicatif viral ne produit que les protéines virales, sans assemblage de particules infectieuses. L'infection chronique lente se produit lorsque de faibles quantités de particules infectieuses sont produites de façon continue.

Certains facteurs doivent par contre être présents afin de permettre ce phénomène. Bien que la cytolysse soit possible, celle-ci doit être limitée (de la Torre et Oldstone, 1996) ou du moins limitée à certains types de cellules plus qu'à d'autres. Le génome viral doit être maintenu dans l'hôte, soit par incorporation au génome cellulaire (VIH), sous forme d'épisome (Herpès) ou même sous un intermédiaire d'ADN dans le cas de certains virus à ARN (Klenerman *et al.*, 1997). Finalement le virus doit être en mesure d'échapper à l'élimination par le système immunitaire (Ahmed et Gray, 1996; de la Torre et Oldstone, 1996; Oldstone, 1989).

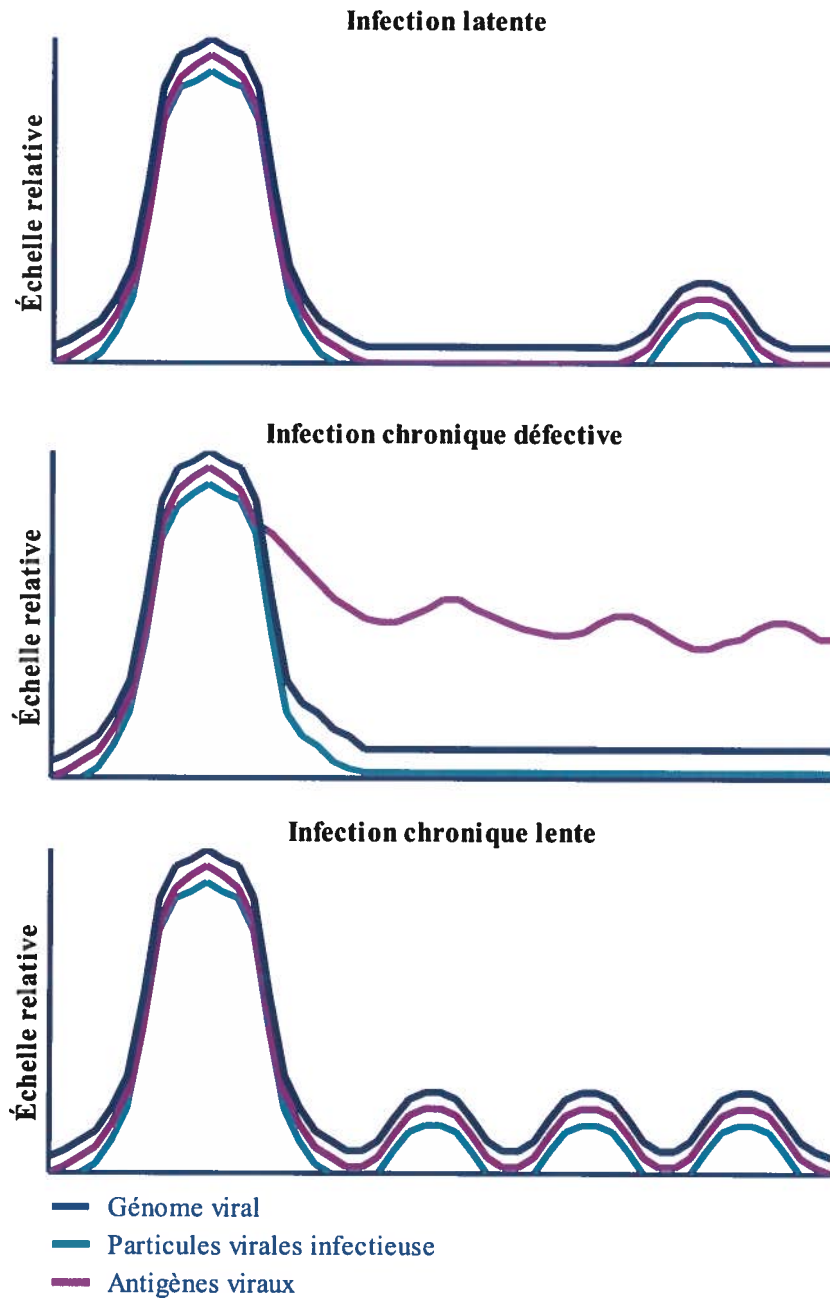


Figure 7: Production infectieuse, antigénique et génomique selon les types de persistance virale.

Les infections persistantes peuvent être classées en trois groupes selon leur stratégie de réplication, soit l'infection latente avec récurrence, l'infection chronique à haut titre de particules défectives ou l'infection chronique lente. Adapté de (Gonzalez-Scarano, 2002; Lipton *et al.*, 2007).

1.3.1 Évasion virale à la réponse immunitaire

Afin d'échapper à la détection et l'élimination par le système immunitaire, une multitude de stratégies sont observées, allant de la faible expression des protéines virales (Herpès, VIH), la variation antigénique rapide (VIH, VHC), la suppression de molécules cellulaires de surface (Adénovirus, CMV, HSV), l'interférence avec la présentation antigénique (HSV), l'interférence ou la sécrétion d'analogues de cytokines (virokines; (Spriggs, 1996)), l'induction de molécules anti-apoptotiques (de la Torre et Oldstone, 1996; Spriggs, 1996) et même la tolérance via la délétion clonale ou l'anergie (VHB) et la dispersion via des syncytiums ou l'infection de sites dits immunoprivilégiés (Herpès, VZV, Rubéole). À ce titre, le SNC constitue un site de persistance de choix: la faible expression du CMH, un métabolisme restreignant la réplication virale, le transport sur de longues distances dans les neurones sont quelques uns des facteurs pouvant contribuer à l'établissement d'une infection persistante (de la Torre et Oldstone, 1996).

De façon générale, l'infection persistante se produit lorsque la réponse immunitaire échoue à éliminer complètement le virus (Oldstone, 2006). En fait, les stratégies virales ont pour effet d'empêcher l'établissement d'une réaction immunitaire efficace en court-circuitant la voie de production, d'activation et de régulation des lymphocytes T. Parmi ces stratégies, on connaît l'interférence avec la dégradation par le protéasome et la présentation via le CMH en présence de signaux de costimulation et l'infection des cellules présentatrices ou des lymphocytes et l'altération des fonctions effectrices (Oldstone, 2006).

Tableau VIII: Virus capables d'échapper à la détection et l'élimination par le système immunitaire.

Adapté de (Gonzalez-Scarano, 2002; Griffin, 2002; Tyler et Nathanson, 2001).

Famille	Virus	Famille	Virus
Infection de sites « immunoprivilégiés »		Dispersion par syncytium	
<i>Arenaviridae</i>	LCMV	<i>Coronaviridae</i>	MHV
<i>Coronaviridae</i>	MHV	<i>Herpesviridae</i>	HSV
<i>Herpesviridae</i>	HSV	<i>Herpesviridae</i>	VZV
<i>Herpesviridae</i>	VZV	<i>Paramyxoviridae</i>	Rougeole
<i>Paramyxoviridae</i>	Rougeole	Variation antigénique rapide	
Faible expression antigénique		<i>Flaviviridae</i>	VHC
<i>Herpesviridae</i>	EBV	<i>Retroviridae</i>	VIH
<i>Herpesviridae</i>	HSV	<i>Arenaviridae</i>	LCMV
<i>Retroviridae</i>	VIH	<i>Herpesviridae</i>	EBV
Récepteur de l'immunité		Infection du thymus	
<i>Paramyxoviridae</i>	Rougeole	<i>Paramyxoviridae</i>	Rougeole
Altération de la présentation antigénique		<i>Arenaviridae</i>	LCMV
<i>Adénoviridae</i>	Adénovirus A, B, C, D, E	Production d'homologues de cytokines, chimiokines et immunomodulateurs	
<i>Arenaviridae</i>	LCMV	<i>Herpesviridae</i>	CMV
<i>Herpesviridae</i>	CMV	<i>Herpesviridae</i>	EBV
<i>Herpesviridae</i>	EBV	<i>Herpesviridae</i>	HHV-6 et 8
<i>Herpesviridae</i>	HHV-7 et 8	<i>Poxviridae</i>	Vaccine et Myxoma
<i>Herpesviridae</i>	HSV	Infection / délétion de cellules effectrices	
<i>Herpesviridae</i>	VZV	<i>Arenaviridae</i>	LCMV
<i>Poxviridae</i>	Virus Myxoma	<i>Hepadnaviridae</i>	VHB
<i>Retroviridae</i>	VIH	<i>Herpesviridae</i>	CMV
<i>Retroviridae</i>	HTLV-1	<i>Herpesviridae</i>	EBV*
Induction de molécules anti-apoptotiques		<i>Herpesviridae</i>	HSV
<i>Herpesviridae</i>	EBV	<i>Paramyxoviridae</i>	Rougeole
<i>Herpesviridae</i>	HSV	<i>Retroviridae</i>	VIH

1.3.1.1 Le cas du virus Epstein-Barr

Le virus de l'herpès humain 4 (HHV-4) mieux connu sous le nom de virus Epstein-Barr (EBV) est un membre de la sous-famille gamma dans la famille des *herpesviridae* (ICTV, 2005). Ce virus à ADN double-brin de 170 kpb est enveloppé d'une membrane plus ou moins sphérique (ICTV, 2005) et comme la très grande majorité des *herpesviridae*, EBV induit chez son hôte une infection latente (Tableau VII) avec possibilité de réactivation sous certaines stimulations (Amon et Farrell, 2005; Stowe *et al.*, 2001).

L'infection primaire par EBV est généralement asymptomatique et se produit suite aux contacts entre parents et enfants. Il en résulte donc que 90 % de la population humaine est infectée par ce virus (Henle et Henle, 1970) qui peut causer de sérieuses complications chez les individus immunosupprimés (Yin *et al.*, 2005). L'EBV induit une infection latente chez l'humain immunocompétent par une combinaison de stratégies (Tableau VIII) lui permettant selon la situation d'éviter la détection par le système immunitaire ou encore d'en dérouter la réponse.

Suivant un schéma typique des infections latentes par les virus herpès, il y a d'abord infection primaire lytique de cellules permissives au site d'entrée. Cette infection primaire pour EBV se fait par transmission orale et le virus infecte initialement les cellules épithéliales pavimenteuses mais de façon plus importante encore, les lymphocytes B en surface des épithéliums des amygdales et autres tissus lymphoïdes (Anagnostopoulos *et al.*, 1995; Niedobitek *et al.*, 1997). Lors de l'infection des cellules B, l'EBV en cycle lytique induit une prolifération (Tierney *et al.*, 1994) de la cellule hôte qui donne lieu à certaines des manifestations associées à ce virus. L'EBV est ainsi l'agent causal de la mononucléose infectieuse (Henle *et al.*, 1968) mais aussi d'une grande variété de tumeurs incluant des tumeurs lymphoïdes du type du lymphome de Burkitt, de la maladie de Hodgkin, des lymphomes associés au SIDA, des carcinomes gastriques, etc. (Niller *et al.*, 2008).

Dans une seconde phase, une réponse immunitaire vigoureuse élimine les cellules B infectées jusqu'au passage au cycle latent (Tosato *et al.*, 1979). Ici par contre, contrairement à la tendance observée chez les autres virus herpès, EBV se maintient en latence dans le

même type de cellules que celles où il effectue son cycle lytique, les lymphocytes B. Dans le cas du HSV par exemple, le cycle latent se situe dans les neurones (Rock et Fraser, 1983) alors que le cycle lytique se produit dans les cellules épithéliales. Dans cette phase le virus doit échapper à la détection et se maintenir en tant qu'entité génomique. Pour ce faire presque tous les 80 promoteurs viraux sont mis sous silence et seulement quelques produits des gènes viraux s'expriment. Dans le cas d'EBV, le génome viral est maintenu sous forme d'épisome, qui grâce à un site oriP, est répliqué simultanément au génome cellulaire et dont les copies sont séparées entre les cellules filles en cas de division (Mattia *et al.*, 1999). Finalement, la dernière phase de l'infection latente, la réactivation, survient sous divers stimulus plus ou moins bien connus. Pour EBV un de ces stimulus est la différenciation en plasmocyte (Crawford et Ando, 1986; Laichalk et Thorley-Lawson, 2005).

Le virus possède différents moyens complémentaires afin d'éviter la détection par le système immunitaire. Par exemple, une protéine virale, EBNA1, possède des répétitions Gly-Ala qui rendent la protéine plus résistante à la dégradation (Levitskaya *et al.*, 1995) et incidemment à la présentation antigénique par les molécules du CMH. Mais il ne suffit pas de prévenir la présentation d'une seule protéine, même importante. C'est pourquoi le produit du gène BZLF2 lie directement la molécule HLA-DR et inhibe la présentation du CMH-II (Spriggs *et al.*, 1996) en plus de participer à l'infection des cellules B (Li *et al.*, 1997). La variation antigénique est aussi un moyen appliqué par EBV. L'étude d'un épitope majeur reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques présenté par l'allèle HLA-A11 a permis d'observer qu'il est présent chez le virus circulant dans une population où cet allèle est peu fréquent. Dans une population humaine où l'allèle est plus fortement présent, l'épitope du virus est muté, abrogeant toute reconnaissance de ce dernier (de Campos-Lima *et al.*, 1993). Le génome viral code aussi pour des produits, LMP1 et LMP2A, qui chevauchent les signaux des récepteurs cellulaires CD40 et BCR respectivement, ce qui permet aux lymphocytes B infectés de survivre dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes indépendamment des contacts avec des lymphocytes T et des antigènes. En cas d'échec de l'évitement le virus code pour des produits qui lui permettent d'amoindrir les effets d'une réponse immunitaire. Ainsi le génome viral encode un homologue de bcl-2 (Henderson *et al.*, 1993) et au moins deux autres produits aux propriétés anti-apoptotiques (Komano *et al.*,

1999) en plus d'une molécule à l'activité similaire à la cytokine immunosuppressive IL-10 (Hsu *et al.*, 1990).

Ceci ne constitue pas une liste exhaustive des mécanismes exploités par EBV pour échapper et manipuler la réponse immunitaire mais représente une panoplie variée qui s'agrandira avec le temps et les recherches sur le sujet.

1.3.1.2 Le cas du virus du virus de la chorioméningite lymphocytaire

Le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) est un virus de la famille des Arenaviridae (ICTV, 2005). Ce virus consiste en deux fragments d'ARN monocaténaire de moins de 12 000 nucléotides au total, à l'intérieur d'une capsidie enveloppée d'une membrane (ICTV, 2005). Ce virus infecte principalement la souris mais aussi les humains avec des conséquences mortelles chez les sujets les plus immunosupprimés (CDC, 2005).

Le LCMV est un virus à infection chronique à haut titre (Tableau VII) exploitant divers mécanismes afin d'échapper à l'élimination par la réponse immunitaire (Tableau VIII). L'infection congénitale par ce virus mène à l'infection du thymus et à la démonstration de l'induction de la tolérance au virus. Les thymocytes infectés éliminent par sélection négative les clones de lymphocytes T spécifiques du virus par présentation d'antigènes viraux en lieu d'antigènes du soi. Il en résulte l'absence de cellules T CD8⁺ spécifiques du virus et la persistance virale. L'ajout de lymphocyte T CD8⁺ permet non seulement d'éradiquer l'infection mais les souris ainsi traitées produisent alors leurs propres cellules T CD8⁺ antivirales (King *et al.*, 1992).

Chez l'hôte adulte le LCMV peut altérer la réponse immunitaire en infectant les CPA qui sont alors détruites par les lymphocytes T spécifiques du virus, résultant en une immunosuppression globale. De cette façon, les cellules dendritiques sont ciblées par certains variants (Borrow *et al.*, 1995; Zinkernagel, 1992). Le variant 13, immunosuppresseur, se réplique à plus hauts titres dans les macrophages que le variant Armstrong, immunogénique (Matloubian *et al.*, 1993). Les lymphocytes B sont aussi infectés, principalement ceux spécifiques du virus qui internalisent celui-ci et sont éliminés

par une réponse CTL. En conséquence, les anticorps spécifiques du virus qui pourraient participer à l'élimination du virus sont absents, mais les autres anticorps, incluant ceux spécifiques d'épitopes internes du virus, demeurent présents (Planz *et al.*, 1996). Finalement l'infection des lymphocytes T termine cet aperçu des cellules du système immunitaire ciblées par le LCMV (Ahmed *et al.*, 1987; Borrow *et al.*, 1991; Tishon *et al.*, 1988).

À l'infection des cellules du système immunitaire s'ajoute d'autres mécanismes avec entre autre l'induction de l'IL-10 (Brooks *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2006) qui ne seront pas explorés ici.

1.3.1.3 Le cas du virus de la rougeole

Le virus de la rougeole fait partie du genre morbilivirus de la famille des *paramyxoviridae* (ICTV, 2005). Il s'agit d'un virus à ARN monocaténaire de polarité négative de 16 kb à l'intérieure d'une capsidie hélicoïdale enveloppée (ICTV, 2005). Le virus cause une maladie fort répandue chez l'humain et outre la fièvre, la maladie se caractérise cliniquement par des éruptions cutanées (CDC, 1982). L'infection peut par contre dans certains cas se compliquer et provoquer une infection persistante connue comme la panencéphalite subaiguë sclérosante (Griffin, 1995).

Cela fait près d'un siècle que von Pirquet a créé le terme « anergie » pour décrire la perte transitoire de réaction d'hypersensibilité retardée à la tuberculine produite par le virus de la rougeole (Kerdiles *et al.*, 2006; Schneider-Schaulies et Dittmer, 2006). Cette anergie se reflète *in vitro* par l'incapacité des lymphocytes du sang à proliférer suite à la stimulation polyclonale et spécifique d'antigène (Griffin et Ward, 1993; Griffin *et al.*, 1989; Ward *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1991). Cette anergie est aussi accompagnée d'une leucopénie touchant les cellules B, CD4⁺, CD8⁺, les monocytes et les neutrophiles en plus d'induire un changement de la réponse de type T_H1 pour une réponse T_H2 (Griffin et Ward, 1993; Griffin *et al.*, 1989; Ward *et al.*, 1991). Bien que les ratios CD4⁺/CD8⁺ demeurent constants, le nombre de lymphocytes T est de retour à la normale après 10 jours alors qu'il faut plus de 6 semaines pour les lymphocytes B (Arneborn et Biberfeld, 1983; Okada *et al.*, 2001; Ryon

et al., 2002). La polarisation de la réponse qui se produit dans les dernières étapes entraîne une production accrue d'IL-4 et réduite d'IL-2 et d'IFN- γ (Griffin et Ward, 1993).

Les cellules souches hématopoïétiques expriment CD150, le récepteur commun de toutes les souches de la rougeole (Tatsuo *et al.*, 2000; Yanagi *et al.*, 2002). Cependant l'infection des cellules stromales serait à blâmer pour la lymphopénie observée (Manchester *et al.*, 2002). Une fois infectées, ces cellules ne pourraient fournir aux lymphocytes en développement les signaux nécessaires à leur survie et leur différenciation. Il est fort probable que les thymocytes ne sont pas affectés par une infection directe mais plutôt par l'infection de cellules de supports relâchant des protéines virales (Valentin *et al.*, 1999). D'ailleurs, la fréquence de lymphocytes T infectés dans le sang de patients est très basse même lors de l'infection aiguë (Borrow et Oldstone, 1995; Griffin, 1995). De plus, la production thymique en nouvelles cellules T, révélée par la détection des cercles d'excision de réarrangement, est augmentée chez les patients indiquant que la déplétion des précurseurs de cellules T ne contribue pas de façon significative à la lymphopénie (Permar *et al.*, 2003). Et d'ailleurs l'immunosuppression dure plus longtemps que la lymphopénie (Kerdiles *et al.*, 2006; Schneider-Schaulies et Dittmer, 2006).

L'infection par le virus de la rougeole semble affecter l'acquisition de nouvelles fonctions effectrices tandis que celles acquises avant l'infection demeurent inchangées (Borrow et Oldstone, 1995; Casali *et al.*, 1984). Les analyses n'indiquent pas de déficiences en production d'IL-2 ni une absence d'expression de l'IL-2R (Griffin et Ward, 1993; Moss *et al.*, 2002) et l'IL-10 est sécrétée à des niveaux variables (Moss *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2001).

Il a été montré que deux protéines virales, F et H, à elles seules sont suffisantes pour induire l'immunosuppression (Avota *et al.*, 2001; Marie *et al.*, 2001; Marie *et al.*, 2004; Ravanel *et al.*, 1997; Schlender *et al.*, 1996). Puisque la liaison de CD150 par un anticorps fournit aux lymphocytes T des signaux négatifs d'activation, il a été proposé que l'immunosuppression puisse agir via ce récepteur, mais celui-ci n'est pas exprimé par les lymphocytes T non stimulés (Aversa *et al.*, 1997). En fait, il a été montré que l'immunosuppression par le virus de la rougeole ne dépend pas des récepteurs d'entrée

connus (Schneider-Schaulies et Dittmer, 2006). Dans le modèle proposé par les auteurs, des protéines virales présentes dans les lymphocytes T et les cellules dendritiques, mais aussi des protéines libérées par les cellules infectées, en interagissant avec des récepteurs à identifier, mènent à une immunosuppression (Kerdiles *et al.*, 2006).

1.4 Les Coronavirus

Les coronavirus font partie de ces virus capables d'infecter de façon persistante certains organes de leur hôte, incluant le SNC. Les virus à ARN monocaténaire, linéaire et non segmenté à polarité positive de l'ordre des Nidovirales sont regroupés en trois familles, les *Arteriviridae*, les *Coronaviridae* et les *Roniviridae* (Lai et Holmes, 2001). Les particularités moléculaires distinguant ces virus des autres virus à ARN concernent l'organisation de la réplicase sur le cadre de lecture 1a et 1b (Lai et Holmes, 2001). La famille *Coronaviridae* se divise elle-même en deux genres, coronavirus et torovirus. Les coronavirus forment un ensemble très vaste de virus (Tableau IX) possédant plusieurs caractéristiques particulières. En premier lieu, leur apparence distinctive en microscopie électronique avec ces globules protubérants s'alignant autour de la particule virale et formant une couronne est à l'origine de leur nom. Ces virus sont aussi dotés d'un très long génome sous forme d'un ARN monocaténaire de 27 à 32 kb (Tableau IX), le plus long des virus à ARN (Belshaw *et al.*, 2008; Vabret *et al.*, 2008).

Les premiers coronavirus ont été identifiés dans les années 1930 (Hudson et Beaudette, 1932) et depuis, des coronavirus ont été isolés d'une variété d'oiseaux et de mammifères (Tableau IX). En fait les coronavirus infectent un très large éventail d'animaux et causent une très grande variété d'infection: hépatites (Piazza, 1969); pneumonies (Parker *et al.*, 1970); péritonites (Bhatt *et al.*, 1977; Pedersen, 1976); entérites (Hierholzer *et al.*, 1979) et même encéphalites (Bailey *et al.*, 1949).

Tableau IX: Les coronavirus identifiés à ce jour et leur propriétés.

Adapté de (Holmes, 2001; ICTV, 2005; Siddell et Snijder, 2008).

Virus	Groupes	Hôte <i>hôte occ.</i>	Maladie (Isolation)	Taille <i>bases</i>	Séquence	Référence
BCoV: Bovine coronavirus	AH187	2 (2A)	Gastroentérique, respiratoire	30969	NC_012948	1
	ENT	2 (2A)		31028	NC_003045	2
	LUN	2 (2A)		31028	AF391542	3
	Mebus	2 (2A)		31032	U00735	4
	OH440TC	2 (2A)		30953	NC_012949	5
	Quebec	2 (2A)		31028	AF220295	6
BtCoV: Bat coronavirus	1A	(1B)	ND (Entérique)	28326	NC_010437	7
	1B	(1B)		28476	NC_010436	8
	133/2005	(2C)		30307	NC_008315	9
	512/2005	(1B)		28203	NC_009657	10
	HKU2	(1B)		27165	NC_009988	11
	HKU3	(2B)		29728	NC_009694	12
	HKU4-1	(2C)		30286	NC_009019	13
	HKU5-1	(2C)		30482	NC_009020	14
	HKU8	(1B)		28773	NC_010438	15
	HKU9-1	(2D)		29114	NC_009021	16
	Rf1/2004	(2B)		29709	NC_009695	17
	Rm1/2004	(2B)		29749	NC_009696	18
	Rp3/2004	(2B)		29736	NC_009693	19
BuCoV: Bulbul coronavirus	(3C)	Bulbuls	26476	NC_011548	20	
CCoV: Canine coronavirus	1	Chiens	---	---	Partiel	21

Virus	Groupe	Hôte <i>hôte occ.</i>	Maladie (Isolation)	Taille <i>bases</i>	Séquence	Référence
CECoV: Chicken enteric coronavirus	ND	Poulets	Entérique	---	Partiel	22
CRCoV: Canine respiratory coronavirus	ND	Chiens	Respiratoire	---	Partiel	23
DCoV: Duck coronavirus	ND	Canards	ND (Entérique)	---	Partiel	24
ECoV: Equine coronavirus	(2A)	Chevaux	Respiratoire, gastroentérique, hépatique, neurologique	30992	NC_010327	25
FECoV: Feline enteric coronavirus	1 (1A)	Félins <i>Chiens</i>	Entérique	29277	DQ848678	26
FIPV: Feline infectious peritonitis virus	1 (1A)	Félins <i>Chiens</i>	Respiratoire, entérique, neurologique, hépatique	29147	NC_007025	27
GiCoV: Giraffe coronavirus	(2B)	Giraffes	Entérique	30979	EF424622	28
GoCoV: Goose coronavirus	ND	Oies	ND (Entérique)	---	Partiel	29
HCoV: Human coronavirus	OC43	Humains	Respiratoire	30738	NC_005147	30
	229E	1 (1B)	Respiratoire	27317	NC_002645	31
	NL63	(1B)	Respiratoire	27553	NC_005831	32
	HKU1	(2A)	Respiratoire	29926	NC_006577	33
HECoV: Human enteric coronavirus	2 (2A)	Humains	Entérique	30953	NC_012950	34
IBV: Avian infectious bronchitis virus	3 (3A)	Oiseaux	Respiratoire, hépatique	27608	NC_001451	35

Virus	Groupe	Hôte <i>hôte occ.</i>	Maladie (Isolation)	Taille <i>bases</i>	Séquence	Référence
MHV: Murine hepatitis virus	1	Souris	Respiratoire, entérique	31386	FJ647223	36
	2	Rats	Hépatique, neurologique (méninges)	31276	AF201929	37
	3		Hépatique	31448	FJ647224	38
	A59		Hépatique, neurologique	31357	NC_001846	39
	JHM		Neurologique	31526	NC_006852	40
	S		Hépatique	---	Partiel	41
	Y		Entérique	---	Partiel	42
MuCoV: Munia coronavirus	(3C)	Lonchuras	ND (Respiratoire / Entérique)	26552	NC_011550	43
PaCoV: Parrot coronavirus	ND	Perroquets	ND (Respiratoire / Entérique)	---	Partiel	44
PEDV: Porcine epidemic diarrhea virus	1 (1B)	Porcs	Entérique	28033	NC_003436	45
PhCoV: Pheasant coronavirus	3	Faisans	Entérique	---	Partiel	46
PHEV: Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus	2 (2A)	Porcs	Respiratoire, neurologique	30480	NC_007732	47
PiCoV: Pigeon coronavirus	ND	Pigeons	ND (Respiratoire / Entérique)	---	Partiel	48
PRCoV: Porcine respiratory coronavirus	1 (1A)	Porcs	Respiratoire, entérique	27550	DQ811787	49
PuCoV: Puffinosis coronavirus	2	Puffins	Respiratoire	---	Partiel	50
RbCoV: Rabbit coronavirus	ND	Lapins	Entérique	---	Partiel	51

Virus	Groupe	Hôte <i>hôte occ.</i>	Maladie (Isolation)	Taille <i>bases</i>	Séquence	Référence
RtCoV: Rat coronavirus	2 (2A)	Rats	Respiratoire	31250	NC_012936	52
SaCoV: Sable antelope coronavirus	(2A)	Antilopes	ND (Entérique)	30995	EF424621	53
SARS-CoV: Severe acute resp. syndrome associated CoV	2 (2B)	ND <i>Humains</i>	Respiratoire	29751	NC_004718	54
SDAV: Sialodacryoadenitis virus	2	Rats	Neurologique	---	---	Partiel 55
SDCoV: Sambar Deer coronavirus	(2A)	Cerfs	ND (Entérique)	30997	FJ425189	56
SW1: Beluga whale coronavirus	(3B)	Bélugas	Respiratoire, entérique	31686	NC_010646	57
TCoV: Turkey coronavirus	3 (3A)	Dindons	Respiratoire, entérique	27657	NC_010800	58
TGEV: Transmissible gastroenteritis virus	1 (1A)	Porcs	Gastroentérologique	28586	NC_002306	59
ThCoV: Thrush coronavirus	(3C)	Merles	ND (Respiratoire / Entérique)	26396	NC_011549	60
WbCoV: Waterbuck coronavirus	(2A)	Antilopes	ND (Entérique)	30962	FJ425186	61
WtDCoV: White-tailed Deer coronavirus	(2A)	Cerf de Virginie	ND (Entérique)	31020	FJ425187	62
(x): Non classé officiellement (Groupe apparent)			ND: Non disponible			

Références: Identification/Séquençage

- 1 ND / Soumission directe (NCBI)
 2 (Chouljenko *et al.*, 2001a) / (Chouljenko *et al.*, 2001b)
 3 (Chouljenko *et al.*, 2001a) / (Chouljenko *et al.*, 2001b)
 4 (Sharpee *et al.*, 1976) / (Abraham *et al.*, 1990a; Abraham *et al.*, 1990b; Chang *et al.*, 1994; Hofmann *et al.*, 1993; Kienzle *et al.*, 1990; Lapps *et al.*, 1987)
 5 ND / Soumission directe (NCBI)
 6 (Dea *et al.*, 1995) / (Yoo et Pei, 2001)
 7 (Chu *et al.*, 2008)
 8 (Chu *et al.*, 2008)
 9 (Tang *et al.*, 2006)
 10 (Tang *et al.*, 2006)
 11 (Lau *et al.*, 2007)
 12 (Lau *et al.*, 2005)
 13 (Woo *et al.*, 2007)
 14 (Woo *et al.*, 2007)
 15 (Woo *et al.*, 2007)
 16 (Woo *et al.*, 2007)
 17 (Li *et al.*, 2005)
 18 (Li *et al.*, 2005)
 19 (Li *et al.*, 2005)
 20 (Woo *et al.*, 2009)
 21 (Appel, 1987) / (Decaro et Buonavoglia, 2008)
 22 ND / ND
 23 (Erls *et al.*, 2003) / ND
 24 (Jonassen *et al.*, 2005) / ND
 25 (Guy *et al.*, 2000) / (Zhang *et al.*, 2007a)
 26 (Pedersen *et al.*, 1981) / Soumission directe (NCBI)
 27 (Wolfe et Griesemer, 1966) / (Dye et Siddell, 2005)
 28 (Hasoksuz *et al.*, 2007)
 29 (Jonassen *et al.*, 2005) / ND
 30 (McIntosh *et al.*, 1967b) / (Vijgen *et al.*, 2005)
 31 (Hamre et Procknow, 1966) / (Thiel *et al.*, 2001)
 32 (van der Hoek *et al.*, 2004)
 33 (Woo *et al.*, 2005)
 34 (Chany *et al.*, 1982) / Soumission directe (NCBI)
 35 (Hudson et Beaudette, 1932) / (Binns *et al.*, 1985; Boursnell *et al.*, 1985a; Boursnell *et al.*, 1985b; Boursnell *et al.*, 1984; Brierley *et al.*, 1987; Ziebuhr *et al.*, 2000)
 36 (Hierholzer *et al.*, 1979) / (De Albuquerque *et al.*, 2006)
 37 (Hirano *et al.*, 1974) / (Sarma *et al.*, 2001)
 38 (Mallucci, 1965) / Soumission directe (NCBI)
 39 (Hierholzer *et al.*, 1979) / (Leparc-Goffart *et al.*, 1997; Ziebuhr *et al.*, 2000)
 40 (Cheever *et al.*, 1949) / Soumission directe (NCBI)
 41 (Tisdale, 1963) / ND
 42 (Barthold *et al.*, 1982) / ND
 43 (Woo *et al.*, 2009)
 44 (Gough *et al.*, 2006) / ND
 45 (Pensaert et de Bouck, 1978) / (Bridgen *et al.*, 1993; Bridgen *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 1994; Kocherhans *et al.*, 2001; Tobler et Ackermann, 1995)
 46 (Spackman et Cameron, 1983) / ND
 47 (Greig *et al.*, 1962) / (Vijgen *et al.*, 2006)
 48 (Jonassen *et al.*, 2005) / ND

Références: Identification/Séquençage

- 49 (Pensaert *et al.*, 1986; Wesley *et al.*, 1990) / (Zhang et Reichart, 2007)
50 (Nuttall et Harrap, 1982) / ND
52 (Parker *et al.*, 1970) / Soumission directe (NCBI)
54 (voir texte) / (He *et al.*, 2004; Marra *et al.*, 2003b; Snijder *et al.*, 2003)
55 (Jacoby *et al.*, 1975) / ND
57 (Mihindukulasuriya *et al.*, 2008)
59 (Doyle et Hutchings, 1946) / (Almazán *et al.*, 2000)
61 (Tsunemitsu *et al.*, 1995) / (Alekseev *et al.*, 2008).
51 (Descôteaux *et al.*, 1985) / ND
53 (Zhang *et al.*, 2007b) / Soumission directe (NCBI)
56 (Tsunemitsu *et al.*, 1995) / (Alekseev *et al.*, 2008)
58 (Peterson et Hymass, 1951) / (Gomaa *et al.*, 2008)
60 (Woo *et al.*, 2009)
62 (Tsunemitsu *et al.*, 1995) / (Alekseev *et al.*, 2008)
-

1.4.1 *Classification*

Les coronavirus ont été jusqu'à présent regroupés selon quatre paramètres: 1) la position et la variété des protéines non structurales et non essentielles en 3' du génome, 2) les propriétés antigéniques, 3) le clivage de la protéine S en deux sous-unités (S1 et S2), 4) l'étendue d'hôtes infectés (ICTV, 2005). Malgré cela, les paramètres d'utilisation de ces critères sont peu définis et le séquençage de nombreux nouveaux coronavirus et autres *Nidovirales* a très récemment mené à la proposition d'une nouvelle taxonomie et classification qui sera soumise à l'ICTV pour son prochain rapport (Congrès Nidovirus XI, 2008, Oxford, UK). Présentement, toutefois les coronavirus sont divisés en trois groupes (Tableau IX), le SARS-CoV étant quelque peu distant génétiquement de ces plus proches parents du groupe 2 (Figure 8).

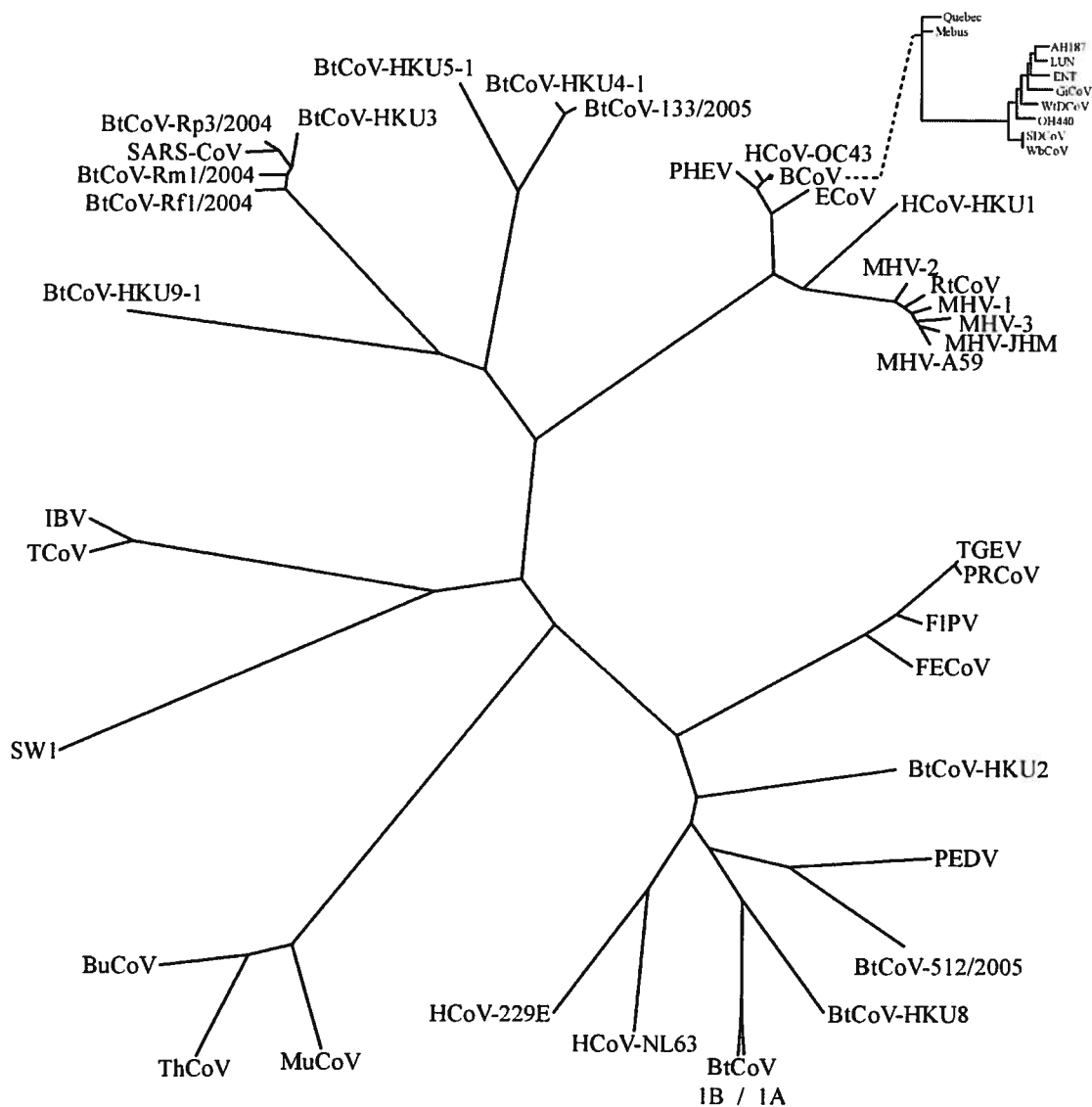
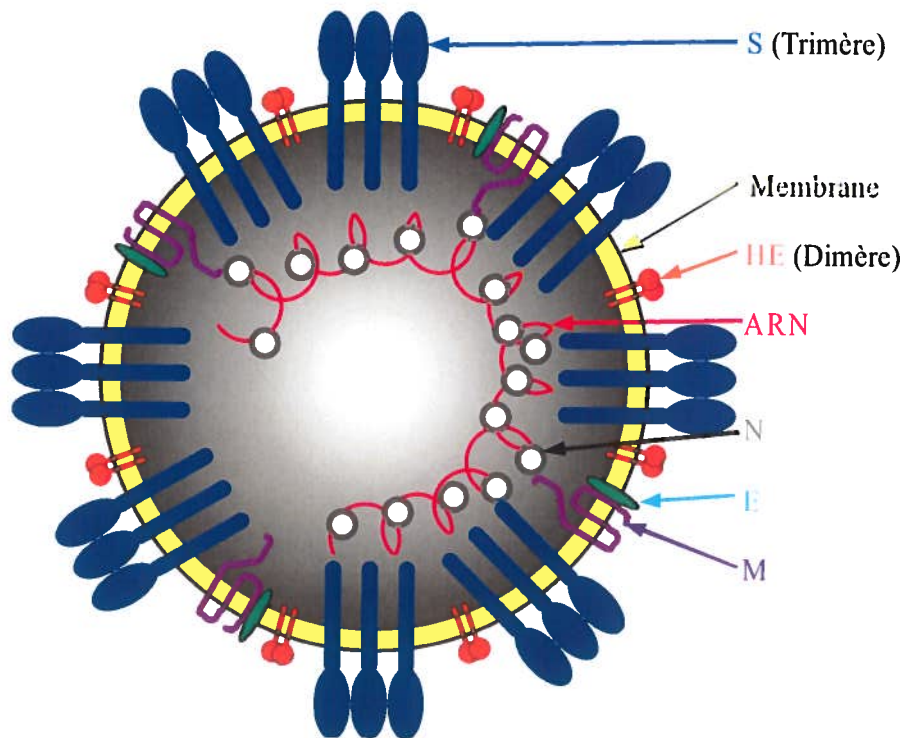


Figure 8: Arbre phylogénétique des coronavirus.

Incluant tous les génomes de coronavirus entièrement séquencés (Num.d'accession NCBI dans le Tableau IX). Alignement des séquences par le logiciel ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), version 2.0.9, et création de l'arbre phylogénétique par le logiciel PHYLIP (Felsenstein, 2005), version 3.68.

1.4.2 Propriétés virales

Le coronavirus sont des virus enveloppés d'apparence plus ou moins arrondie en microscopie électronique et de taille très variable selon les virus, de 60 à 200 nm (Vabret *et al.*, 2008). La membrane virale provient de la cellule hôte et entoure la nucléocapside hélicoïdale (Figure 9) composée de l'ARN génomique et de la protéine de la nucléocapside (N) (Vabret *et al.*, 2008). L'apparence de couronne des coronavirus est due à la protéine de spicule (S) qui, ancrée dans la membrane s'étend sur près de 20 nm (Vabret *et al.*, 2008). La protéine de la membrane (M) est aussi ancrée dans la membrane et y fait le lien avec la nucléocapside, assurant l'assemblage d'une particule complète (Vabret *et al.*, 2008) en coopération avec la protéine de l'enveloppe (E). La protéine de l'hémagglutinine-estérase (HE) est particulière aux coronavirus de groupe 2 mais n'est pas toujours exprimée comme dans certaines souches du MHV (Vabret *et al.*, 2008).



Nom	Fonctions
N	Protéine de la Nucléocapside Lie l'ARN viral et forme la nucléocapside
M	Protéine Membranaire Assemblage des particules virales Interagit avec la nucléocapside
E	Petit protéine de l'Enveloppe Assemblage des particules virales Associée à l'enveloppe virale
S	Glycoprotéine Spicule Forme les protubérances visibles en microscopie électronique Liaison au récepteur cellulaire et fusion des membranes virale et cellulaire Lie les ac. neuraminique 9-O-acétylé et N-glycolylneuraminique
HE	Hémagglutinine-estérase Forme les petites spicules à la surface de certains coronavirus (gr.2) Lie l'acide neuraminique 9-O-acétylé Clivage des groupes acétyles de l'acide neuraminique

Figure 9: Structure des coronavirus et propriétés des protéines structurales.

Adapté de (Holmes, 2001; ICTV, 2005; Vabret *et al.*, 2008).

1.4.2.1 Génome et réplication

Le génome viral très long des coronavirus comprend sur les deux premiers tiers (Figure 10) deux cadres de lectures, ORF1a et 1b, codant pour deux précurseurs qui sont clivés en 15-16 fragments associés au complexe de réplication virale (Vabret *et al.*, 2008). Plus en aval, se trouvent les gènes structuraux (Figure 10) dans l'ordre précis et toujours conservé de HE-S-E-M-N intercalés de gènes de protéines non structurales (Vabret *et al.*, 2008). Absent des groupes 1 et 3 mais présent dans les virus du groupe 2, le gène HE est parfois non fonctionnel et la protéine n'est donc pas toujours exprimée. La réplication du virus s'effectue dans le cytoplasme de la cellule hôte et la stratégie particulière des coronavirus produit de nombreux ARNm de tailles décroissantes, composés d'une séquence leader commune en 5' et de tous les gènes en aval de celui qui sera traduit en protéine (Figure 10).

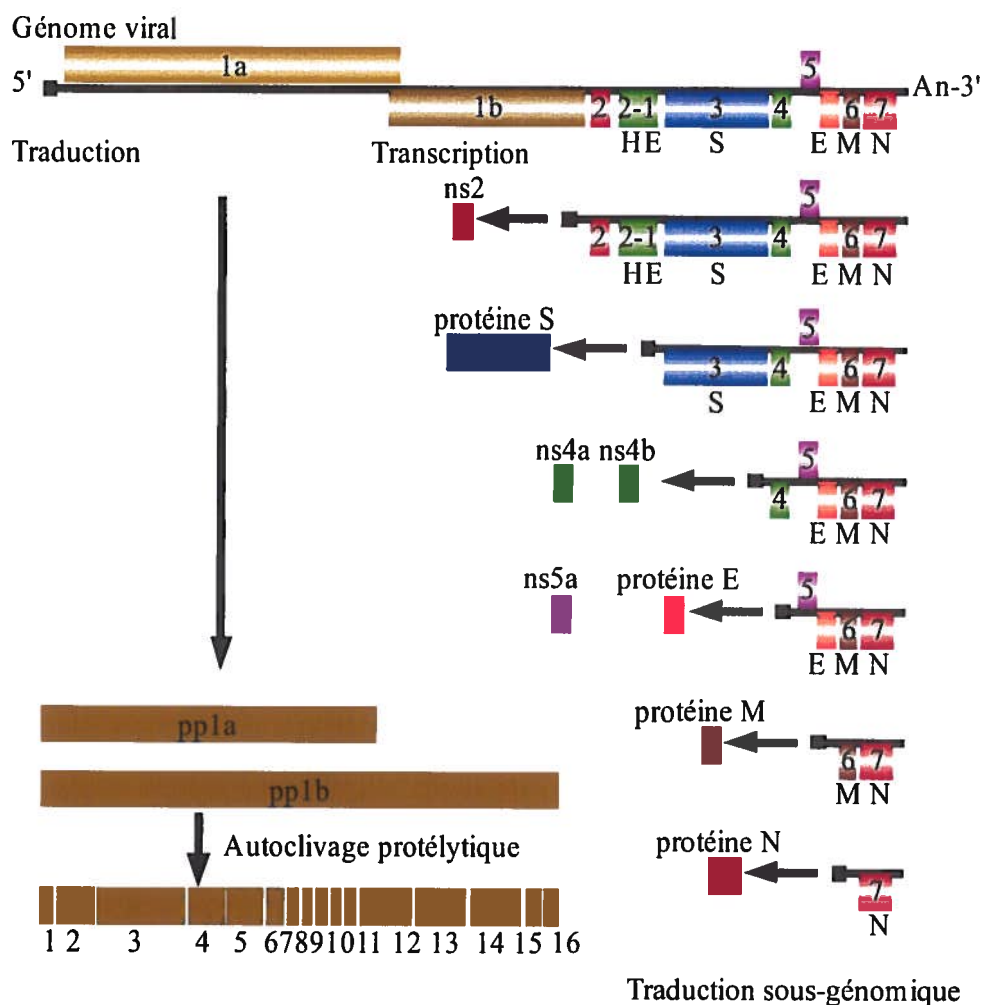


Figure 10: Organisation génomique et stratégie de répliation des coronavirus.

Le premier cadre de lecture code deux longues protéines, pp1a et pp1b, elle-mêmes clivées par des auto-protéases en différents produits associés au complexe de répliation. Le dernier tiers du génome code les protéines structurales et quelques protéines non structurales selon une stratégie particulière de plusieurs ARNm de tailles diminuant. Seul le gène situé en 5' de chaque ARNm est traduit en protéine. Adapté de (Lai et Holmes, 2001; Sawicki *et al.*, 2007).

1.4.3 Les coronavirus humains

Les coronavirus humains (HCoV) sont jusqu'à présent reconnus comme des pathogènes respiratoires. Les deux souches les plus anciennement connues, OC43 (McIntosh *et al.*, 1967b) et 229E (Hamre et Procknow, 1966) induisent des infections des voies respiratoires supérieures (Hamre et Procknow, 1966; McIntosh *et al.*, 1967a; McIntosh *et al.*, 1974; McIntosh *et al.*, 1967b). Les deux sérotypes sont à eux seuls responsables de 10-35 % des rhumes avec près de 100 % de la population exposée (Myint, 1994). Il arrive parfois que ces virus infectent les voies respiratoires inférieures et provoquent des maladies plus sérieuses telles des pneumonies, des myocardites ou des méningites (Riski et Hovi, 1980; Riski *et al.*, 1980). Des diarrhées graves ont aussi été associées avec les HCoV (Resta *et al.*, 1985) rappelant la nature gastroentérique d'autres proches parents des HCoV (TGEV, PEDV, BCoV).

Toutefois chez l'humain c'est le coronavirus (SARS-CoV) associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SARS) qui provoque la maladie la plus sévère et surtout avec le plus haut taux de mortalité (Vabret *et al.*, 2008). Lors de la première épidémie connue de SRAS qui a touché la planète en 2003 (Fouchier *et al.*, 2003; Marra *et al.*, 2003a; Rota *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2007) les efforts de nombreuses équipes partout dans le monde menèrent relativement rapidement à l'identification et au séquençage d'un coronavirus semi-apparenté aux virus du groupe 2 mais dont une large portion du génome diffère de ceux-ci. Il s'agirait d'un virus animal qui aurait accidentellement infecté l'humain. Bien que la civette ait d'abord été suspectée, en tant que réservoir ou vecteur, il semblerait maintenant que le virus origine de la chauve-souris comme en fait fois la proximité de certaines souches isolées (Figure 8). D'autres coronavirus infectant les humains ont été depuis isolés chez des patients atteints de bronchites et de pneumonies, les virus HCoV-NL63 (van der Hoek *et al.*, 2004) et HCoV-HKU1 (Woo *et al.*, 2005). Les quatre souches humaines ont été classées dans le groupe 1 pour 229E et NL63 et le groupe 2 pour OC43 et HKU1 (Vabret *et al.*, 2008). Il existe une forte parenté entre les coronavirus humains (HCoV) et les souches neurotropes de souris et de porc (Bradburne, 1970; Hierholzer *et al.*, 1979; Pedersen *et al.*, 1978).

Parmi les nombreux virus soupçonnés d'être impliqués dans la SP, l'intérêt pour les coronavirus fait suite à diverses observations au sujet d'une souche neurotrope du coronavirus murin (MHV) et de la pathologie associée, fort semblable à la SP (Lampert *et al.*, 1973; Weiner, 1973). Le coronavirus a été isolé du cerveau de deux patients atteints de SP (Burks *et al.*, 1980) et le génome viral détecté par hybridation *in situ* chez 12 patients atteints de SP, sur un groupe de 22 (Murray *et al.*, 1992a; Stewart *et al.*, 1992) avec confirmation de la présence d'antigènes viraux chez deux patients par immunohistochimie (IHC) (Burks *et al.*, 1980). Toutefois, l'origine murine du virus détecté par analyse génomique (Weiss, 1983) et antigénique (Fleming *et al.*, 1988) laisse planer quelques doutes sur la découverte. Cependant, puisque l'inoculation i.c. (Murray *et al.*, 1992b) et périphérique (Cabirac *et al.*, 1994) du MHV chez les primates non humains mène à une maladie du SNC, il est possible de croire que ces isolats obtenus chez l'humain puissent être dérivés d'une infection par un coronavirus murin (Talbot *et al.*, 2001). Des études subséquentes ont toutefois échouées dans leur tentatives de montrer la présence de l'ARN de HCoV-OC43 dans les tissus de quatre autopsies et une biopsie de patients atteints de SP (Sorensen *et al.*, 1986), peut être à cause d'un trop faible titre viral ou du petit nombre de cellules infectées. Malgré tout de l'ARN du HCoV-229E (Arbour *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 1992) et du HCoV-OC43 (Arbour *et al.*, 2000) a été détecté dans des autopsies de patients atteints de SP (Arbour *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 1992) et de diverses maladies neurologiques (Arbour *et al.*, 2000). Chez les primates, les astrocytes ont été identifiés comme le site de la persistance virale (Murray *et al.*, 1997). La formation d'anticorps spécifiques contre le virus dans l'espace arachnoïdien (Salmi *et al.*, 1982) pourrait faire suite à une infection du SNC ou alors il pourrait s'agir d'une manifestation de la synthèse variable d'anticorps qui accompagne typiquement la SP. Ainsi, aucune augmentation significative des anticorps anti-HCoV dans le sérum ou le fluide cébrospinal n'a été détectée chez les patients atteints de SP (Fleming *et al.*, 1988; Hovanec et Flanagan, 1983; Johnson-Lussenburg et Zheng, 1987).

La réponse T induite contre le virus est capable à l'occasion de réactions croisées (Boucher *et al.*, 2007; Talbot *et al.*, 1996). L'infection virale persistante a été obtenue dans diverses lignées cellulaires humaines. De nombreuses lignées cellulaires et cultures

primaires d'origine neurale sont susceptibles à l'infection par les HCoV (Arbour *et al.*, 1999a; Arbour *et al.*, 1999b; Arbour et Talbot, 1998; Collins et Sorensen, 1986). Les cultures primaires de microglies et d'astrocytes (Bonavia *et al.*, 1997), d'oligodendrocytes (Viau *et al.*, non publié) et de cellules endothéliales de cerveau (Cabirac *et al.*, 1995) sont aussi susceptibles à l'infection. Les cultures primaires de souris sont aussi susceptibles à l'infection par HCoV-OC43 (Jacomy et Talbot, 2003; Pearson et Mims, 1985).

1.4.4 *Les coronavirus murins*

Comme mentionné précédemment, l'infection de la souris par le MHV est identifiée depuis longtemps comme un des modèles animaux mimant les différentes étapes de la SP (Marten *et al.*, 2001; Matthews *et al.*, 2002b; Talbot *et al.*, 2001). Plus de 25 souches différentes du MHV ont été isolées mais une poignée seulement ont fait l'objet d'études en laboratoire (Homberger, 1997). Comme les coronavirus induisent divers types de maladies entériques, pulmonaires et neurologiques, les souches de MHV sont capables d'induire chez des hôtes susceptibles l'une ou l'autre de ces maladies. Sur les principales souches étudiées du MHV, deux sont connues pour induire une maladie avec démyélinisation du SNC et sont ainsi employées comme modèle de la SP.

La première souche neurotrope chez la souris fut découverte en 1949 suite à l'isolement de la souche MHV-JHM chez deux souris souffrant d'encéphalomyélite avec démyélinisation étendue (Awasthi *et al.*, 2007; Bailey *et al.*, 1949; Cheever *et al.*, 1949; Lampert *et al.*, 1973). Une autre souche, MHV-A59, bien que moins neurovirulente, est aussi capable d'induire la démyélinisation du SNC chez la souris, en plus de causer une hépatite (Talbot *et al.*, 2001). Dans ce modèle, la contribution de la réponse immunitaire et de la cytotoxicité virale à la démyélinisation du SNC est modulée selon divers facteurs liés à l'hôte comme au virus. Bien que la plupart des publications décrivent les particularités de MHV-JHM comme si elles étaient communes aux MHV neurovirulents, incluant MHV-A59, il est de plus en plus clair que ces deux souches diffèrent entre elles par bien plus que le niveau d'inflammation induite au SNC et la mortalité qui en résulte. Il faut donc prendre la peine de distinguer les propriétés communes et divergentes des deux souches virales.

1.4.4.1 L'infection par les coronavirus murins neurovirulents

Les deux souches virales neurotropes (MHV-A59 et MHV-JHM) infectent toutes deux la souris, MHV-JHM infectant en plus les rats et les primates (Murray *et al.*, 1992b). Toutefois, MHV-A59 est beaucoup moins virulent que MHV-JHM puisqu'il en faut 750 fois plus en injection i.c. que ce dernier pour obtenir la dose létale tuant 50 % des souris infectées (DL₅₀) (Lavi *et al.*, 1986).

Lorsqu'inoculées par voie intranasale, MHV-A59 et MHV-JHM, infectent les cellules du bulbe olfactif où la BHE est réputée plus perméable (Ermisch, 1992; Mori *et al.*, 2005; Widdowson *et al.*, 1996). Les particules virales parviennent au SNC par transport antérograde via le nerf olfactif (Barnett et Perlman, 1993; Lavi *et al.*, 1988) et possiblement via les macrophages du sang périphérique (Bang et Warwick, 1960; Knobler *et al.*, 1981). Au SNC, les deux souches virales infectent les oligodendrocytes et les astrocytes (Lavi *et al.*, 1987; Stohlman *et al.*, 1995a).

En plus de la souche virale impliquée, la susceptibilité à la maladie dépend de facteurs génétiques et non-génétiques liés à l'hôte. Un exemple de facteur de susceptibilité non-génétique, l'âge de la souris au moment de l'infection, affecte le résultat de la maladie avec une réplication virale et une démyélinisation accrue chez les jeunes comparativement aux adultes (Awasthi *et al.*, 2007). La susceptibilité génétique des souris à l'infection par le MHV est sous le contrôle d'un gène autosomal dominant localisé sur le chromosome 7 (Knobler *et al.*, 1981; Knobler *et al.*, 1984a). C'est sur ce chromosome qu'est codé le gène d'une molécule d'adhésion cellulaire apparentée aux antigènes carcinoembryonnaires (CEACAM), un récepteur de la famille des antigènes des carcinoembryonnaires (CEA) de la superfamille des immunoglobulines, le récepteur utilisé par le MHV (Williams *et al.*, 1991). Cette molécule est toutefois faiblement exprimée dans le SNC et une molécule apparentée, la glycoprotéine spécifique de la gestation (PSG) servirait potentiellement de récepteur alternatif pour MHV-A59 mais pas pour MHV-JHM (Chen *et al.*, 1995). Un cofacteur inconnu pourrait être impliqué dans l'étape de fusion membranaire subséquente à la reconnaissance du récepteur (Yokomori *et al.*, 1993). La molécule CEACAM1 possède deux formes alléliques: 1a et 1b exprimées chez les souris BALB/c et SJL respectivement

(Dveksler *et al.*, 1993; Yokomori et Lai, 1992). Les deux formes retiennent la fonction de récepteur de MHV mais la forme CEACAM1a lie beaucoup plus efficacement le virus (Ohtsuka *et al.*, 1996). Ces deux formes alléliques expliquent la différence de susceptibilité observée entre les deux souches murines SJL et C57BL/6 (Ohtsuka et Taguchi, 1997). Les deux souches MHV-JHM et MHV-A59 sont d'ailleurs capables d'infecter des cellules sans récepteur spécifique du MHV, c'est-à-dire par une infection indépendante de CEACAM1 (Gallagher *et al.*, 1992; Nash et Buchmeier, 1996). Par exemple, le virus n'infecte pas les cellules BHK-21 seules, mais infecte celles-ci en coculture avec les cellules DBT (CEACAM1 positives) infectées (Gallagher *et al.*, 1992; Nash et Buchmeier, 1996). La protéine S est impliquée dans cette infection et la fusion indépendante de CEACAM1 puisque les anticorps spécifiques de la protéine S préviennent l'infection (Nash et Buchmeier, 1996). Alors que l'expression de la protéine S seule induit la fusion de cellules n'exprimant pas CEACAM1 (Gallagher *et al.*, 1992; Taguchi *et al.*, 1992).

MHV-JHM

L'infection de souris adultes par MHV-JHM résulte en une encéphalite aiguë avec un taux de mortalité dépassant 95 % (Talbot, 1997; Talbot *et al.*, 2001). Les cellules gliales et les neurones sont alors le siège de l'infection (Talbot, 1997; Talbot *et al.*, 2001). Les souris survivantes développent, dans la matière blanche au niveau du cerveau et de la moelle épinière, une pathologie chronique sous forme de foyers de lésions de démyélinisation suivie d'épisodes successifs de remyélinisation et de démyélinisation (Talbot, 1997; Talbot *et al.*, 2001).

MHV-A59

La souche MHV-A59 est un virus neurotrope causant une maladie biphasique chez les souris susceptibles. La phase aiguë consiste en une hépatite sévère et une méningo-encéphalite focale tandis que la phase chronique consiste en des lésions de démyélinisation trouvées surtout dans la moelle épinière (Lavi *et al.*, 1984c).

1.4.4.2 Réponse immunitaire

MHV-JHM

Dans le SNC, l'infection virale induit l'expression du CMH-II sur les astrocytes (Massa *et al.*, 1986) et le CMH-I sur les astrocytes et les oligodendrocytes (Suzumura *et al.*, 1986). L'infection directe des astrocytes est par contre requise pour cette expression accrue du CMH-I (Gilmore *et al.*, 1994). L'infection des oligodendrocytes résulte initialement en la mort par nécrose, l'apoptose étant présente dans les tissus infectés plus tardivement, même en absence d'antigènes viraux (Barac-Latas *et al.*, 1997). L'infection des cellules gliales, astrocytes et microglies, a pour conséquence le relarguage des médiateurs immunitaires tels l'oxyde nitrique (NO) (Grzybicki *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 1999), l'IL-1b, l'IL-6, le TNF- α (Sun *et al.*, 1995), le « *macrophage chemoattractant protein 1* » (MCP-1), des MMP et des chimiokines comme IP-10, CRG-2, MIP-1b, MCP-3, RANTES (CCL5), MIP-2 et Mig (Lane *et al.*, 1998). L'inoculation i.c. ou intranasale (i.n.) du virus provoque l'infiltration au sein du SNC de cellules inflammatoires incluant les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Haring et Perlman, 2001). Au septième jour post-infection (jpi) 50-70 % des CD8⁺ (Bergmann *et al.*, 1999; Pewe *et al.*, 1999) et 35 % des CD4⁺ présents dans le SNC sont spécifiques contre le virus (Haring *et al.*, 2001). L'élimination efficace du virus nécessite les deux sous-types cellulaires (Flory *et al.*, 1993; Stohlman *et al.*, 1995a; Wijburg *et al.*, 1996; Williamson et Stohlman, 1990). Les lymphocytes T CD4⁺ sont nécessaires à la survie des CD8⁺ au SNC qui autrement périssent rapidement par apoptose (Stohlman *et al.*, 1998), avec un délai dans l'infiltration des lymphocytes et des macrophages. Les anticorps spécifiques contre le virus ne semblent pas nécessaires à l'élimination du virus mais sont essentiels pour prévenir la réactivation de l'infection (Lin *et al.*, 1999) et la mort de l'animal hôte. Le transfert passif d'anticorps prévient cette recrudescence et la mortalité associée (Lin *et al.*, 1999).

MHV-A59

La maladie induite par MHV-A59 dépend également de la dose et de la voie d'inoculation. Selon la dose et le site d'infection, la maladie induite peut être uniquement

hépatique (intrapéritonéale: i.p.), hépatique et neurologique (i.c., i.n. ou i.g.), ou uniquement neurologique (i.c. à faible dose) (Lavi *et al.*, 1986).

Lors de la phase chronique de démyélinisation, des astrocytes, des oligodendrocytes, des macrophages et des microglies apoptotiques sont présents dans les lésions de démyélinisation (Palma *et al.*, 1999; Tsunoda *et al.*, 2004). Chez les souris $B_2m^{-/-}$ (déficientes en $CD8^+$), la DL_{50} est 1000 fois inférieure à celle des souris sauvages (Gombold *et al.*, 1995). Contrairement à ce qui est observé avec MHV-JHM, les processus de lyse des cellules infectées *in vitro* implique les cellules T $CD4^+$ mais pas les cellules T $CD8^+$ (Heemskerk *et al.*, 1995).

1.4.4.3 Persistance du MHV

Suite à l'encéphalite aiguë, l'infection par le MHV n'est jamais complètement éliminée. Malgré la chute rapide des titres de virus infectieux, une infection persistante s'installe et l'ARN viral est détecté dans le SNC un an après la fin de la phase aiguë de l'infection (Rowe *et al.*, 1997). De plus, les lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques contre le virus sont encore présents dans le SNC, 60 jpi (Marten *et al.*, 2000b). En infection persistante, les lymphocytes T $CD8^+$ perdent leur pouvoir cytolytique (Bergmann *et al.*, 1999) et leur nombre diminue avec le titre viral mais plusieurs de ces cellules, spécifiques ou non du virus, demeurent retenues dans le SNC en corrélation avec le titre d'ARN viral (Marten *et al.*, 2000b). La persistance dans le SNC implique l'infection des oligodendrocytes (Knobler *et al.*, 1982), des astrocytes (Perlman et Ries, 1987) et possiblement des neurones (Pasick et Dales, 1991).

1.4.4.4 Démyélinisation

Quatre mécanismes sont suggérés pour expliquer la démyélinisation induite par le MHV soit; 1) l'infection cytolytique directe des oligodendrocytes, 2) un mécanisme médié par la réponse immunitaire s'attaquant à des cellules infectées ou même encore à des cellules saines, 3) une combinaison des deux premiers mécanismes, 4) un événement d'activation non-spécifique lors de la réponse inflammatoire (Lavi *et al.*, 1984c). Bien que

le premier mécanisme ait longtemps été privilégié, plusieurs données suggèrent que la pathologie retrouvée au sein du SNC serait médiée par une réponse immunitaire (Houtman et Fleming, 1996b; Wang *et al.*, 1990).

MHV-JHM

Plusieurs évidences permettent de mettre en cause le système immunitaire dans la démyélinisation du SNC suite à l'infection par MHV-JHM (Awasthi *et al.*, 2007; Houtman et Fleming, 1996a; Houtman et Fleming, 1996b; Lampert *et al.*, 1973; Wang *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2000b). Les premières observations, indirectes, à ce sujet, montrent que l'infection potentialise l'EAE (Cross *et al.*, 1987) et le traitement immunosuppresseur des souris infectées prévient la démyélinisation (Talbot *et al.*, 2001). Cette démyélinisation au sein du SNC est par ailleurs transférable (Wang *et al.*, 1990) via les splénocytes de souris infectées qui contiennent des clones de lymphocytes T activés reconnaissant des auto-épitopes du SNC (Kyuwa *et al.*, 1991).

Des études plus directes de la réaction immunitaire précisent les connaissances sur l'auto-immunité induite. Les souris avec un déficit immunitaire combiné sévère (SCID) ou déficientes dans le gène activateur de la recombinaison ($RAG^{-/-}$), qui ne possèdent pas de lymphocytes, vont développer, suite à l'infection, une encéphalite fulminante sans démyélinisation (Houtman et Fleming, 1996a; Houtman et Fleming, 1996b; Wu *et al.*, 2000b). Par contre, le transfert à ces souris de splénocytes de souris syngéniques, résulte en une démyélinisation 7-9 jours après le transfert (Wu *et al.*, 2000a). Cette démyélinisation est aussi présente lorsque les splénocytes sont déplétés de leurs cellules $CD4^{+}$ ou $CD8^{+}$ avant transfert, mais pas si les cellules $CD4^{+}$ et $CD8^{+}$ sont simultanément déplétées (Wu *et al.*, 2000a). Les souris réceptrices de splénocytes déplétés en cellules $CD4^{+}$ survivent plus longtemps mais subissent une augmentation de la démyélinisation relativement à leurs congénères recevant les splénocytes déplétés en cellules $CD8^{+}$ (Wu *et al.*, 2000a). Après le transfert, les macrophages et microglies sont observés au site de démyélinisation (Perlman, 1998; Wu *et al.*, 2000b) mais la déplétion chimique des macrophages hématogènes ne diminue en rien la démyélinisation (Xue *et al.*, 1999). De plus, les macrophages circulants ne seraient pas le réservoir principal du virus chez les souris infectées chroniquement par

MHV-JHM (Xue *et al.*, 1999). Ces résultats ne permettent pas d'exclure la possibilité que les macrophages périvasculaires et les microglies du parenchyme puissent être impliqués dans la démyélinisation (Xue *et al.*, 1999). Les molécules d'IFN- γ , TNF- α , perforines, IL-10 et NO ne sont pas requises dans les modèles de démyélinisation par infection avec MHV-JHM (Lin *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 1999; Stohlman *et al.*, 1995b).

MHV-A59

Le virus MHV-A59 cause une encéphalite avec hépatite aiguë. Après élimination du virus infectieux, l'encéphalite se développe en démyélinisation (Lavi *et al.*, 1984c; Sutherland *et al.*, 1997). La démyélinisation peut s'observer dès le jour 6 jpi, et de larges lésions sont visibles après 20 jpi avec un sommet à 30 jpi lorsque le virus infectieux est indétectable mais que l'ARN viral est toujours présent (Das Sarma *et al.*, 2000; Lavi *et al.*, 1984a). Les souris RAG^{-/-} (déficientes en lymphocytes) infectées par MHV-A59 meurent en 15 jpi (Matthews *et al.*, 2002a). Des souris traitées avec un sérum hyperimmun (HIS : *mouse hyperimmune serum*, obtenu par exposition répétée à MHV-A59) peuvent survivre jusqu'à 25 jpi sans toutefois éliminer le virus (Matthews *et al.*, 2002a). Ces souris traitées ont par contre des titres d'anticorps plus élevés dans le SNC mais autant de lésions de démyélinisation que les souris C57BL/6 et les RAG^{-/-} reconstituées en lymphocytes (Matthews *et al.*, 2002a). Concernant le traitement HIS il a été déterminé que les anticorps monoclonaux spécifiques ont une demi-vie de 8 à 13 jours (Talbot et Buchmeier, 1987) et qu'en présence de l'antigène, il est probable que cette période soit plus courte (Matthews *et al.*, 2002a). De plus, le transfert d'anticorps durant les jours 13-20 après infection, ne résulte pas en une démyélinisation accrue, suggérant que ceux-ci n'augmentent pas les lésions (Linnington et Lassmann, 1987; Schluesener *et al.*, 1987). L'absence de lymphocytes B, et d'anticorps, n'affecte pas plus la présence de lésions de démyélinisation (Matthews *et al.*, 2002a). Les mécanismes de la voie du complément, de la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) ou d'induction de la phagocytose ne sont pas impliqués dans la démyélinisation du SNC (Matthews *et al.*, 2002a). La remyélinisation, favorisée par le transfert d'anticorps spécifiques (Miller *et al.*, 1997a; Miller *et al.*, 1994;

Pavelko *et al.*, 1998; Rodriguez, 1991; van Engelen *et al.*, 1994) ne semble pas en cause (Matthews *et al.*, 2002a).

Lors de l'infection par MHV-A59, l'encéphalite est associée à l'induction de l'apoptose, telle que révélée par la réaction TUNEL (associée à la présence d'ADN fragmentée) (Das Sarma *et al.*, 2000). Les cellules apoptotiques sont en nombre important dans les régions où l'on retrouve de hauts titres viraux (Fishman *et al.*, 1985; Lavi *et al.*, 1988) mais la colocalisation des antigènes viraux et de la coloration TUNEL n'est présente que dans une minorité de cellules. La réaction TUNEL n'est pas présente dans toutes les cellules mourantes, suggérant que l'apoptose n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la mort cellulaire (Schwartz *et al.*, 2002). Lors de la phase chronique, les cellules positives en TUNEL sont fortement associées aux lésions de démyélinisation, dans la moelle épinière (Schwartz *et al.*, 2002). Lors de la démyélinisation quelques oligodendrocytes sont en apoptose mais la vaste majorité des cellules apoptotiques sont des cellules microgliales et des macrophages. Cependant puisqu'un seul oligodendrocyte peut envahir un très grand nombre de neurones, une faible quantité d'oligodendrocytes en apoptose n'est pas incompatible avec la présence de zones de démyélinisation d'une bonne étendue. La zone d'influence de ces oligodendrocytes ou de la perte de ceux-ci peut ainsi être très étendue. De plus, il est fort probable que les cellules apoptotiques dans le SNC, comme les oligodendrocytes, soient rapidement phagocytées par les macrophages et microglies activées et ne soient plus visibles lors de l'investigation (Schwartz *et al.*, 2002).

Malgré ces données expérimentales minimisant l'implication du système immunitaire dans la démyélinisation suite à l'infection par MHV-A59, des cellules T autoréactives contre la MBP ont tout de même été identifiées chez la souris à 7 jpi (Gruslin *et al.*, 2005). Il se pourrait très bien que certains de ces lymphocytes soient capables de réactions croisées et que ceux-ci soient impliqués dans la phase aiguë de démyélinisation et peut être aussi dans la phase chronique mais de façon moins importante.

1.5 Hypothèse

Les virus comme le MHV qui peuvent induire une infection persistante doivent d'abord échapper avec succès à leur détection et à leur élimination par le système immunitaire. Parmi les mécanismes employés à cet effet par le virus se retrouve la modulation négative de la réponse immunitaire. Il a été montré que la persistance était nécessaire au développement de la maladie démyélinisante (Stohlman *et al.*, 1982), toutefois la présence et le rôle de l'immunosuppression dans l'établissement de cette persistance n'a été qu'effleuré jusqu'à présent. Nous proposons donc de vérifier les caractéristiques de l'immunosuppression lors de l'infection par MHV-A59 et son importance durant l'infection persistante associée à une maladie démyélinisante du système nerveux central.

1.5.1 Objectifs

1. Établir les paramètres d'une infection virale persistante du SNC avec maladie démyélinisante (Chapitre 3).
2. Caractériser les paramètres de la réponse immunitaire induite par l'infection avec MHV-A59 (Chapitre 4).
3. Identifier les mécanismes de l'immunosuppression induite par l'infection avec MHV-A59 (Chapitre 5).
4. Proposer un modèle pouvant expliquer l'immunosuppression induite par MHV-A59 (Chapitre 6).

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Lignées cellulaires

La lignée de cellules DBT (delayed brain tumor; gracieuseté Dr Michael Buchmeier, Scripps Research Institute) provient de la tumeur cervicale d'une souris de souche CDF1 infectée par le virus du sarcome de Rous, souche Schmidt-Ruppin (Kumanishi, 1967). La lignée de cellules L929 (ATCC, cat. VR-764) provient du tissu connectif sous-cutané de souris C3H/An. Les cellules DBT ont été cultivées dans du milieu MEM Alpha (Invitrogen, cat. 12571-063) supplémenté de 10 % (volume pour volume: v/v) de sérum de veau fœtal (SVF; PAA Laboratories, cat. A15-701) décomplémenté et d'acides aminés non essentiels 10 mM (Invitrogen, cat. 11140-050). Les cellules L929 ont été cultivées dans un milieu constitué à part égale de Earle's Minimum Essential Medium (MEM) (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) et de 199 Hank's (Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.), auquel ont été ajoutés 5 % (v/v) de SVF décomplémenté (56 °C pendant 20 minutes) (Wysent, St-Bruno, Québec, Canada), 1,7 % (v/v) de bicarbonate de sodium (Invitrogen) et de 50 µg/mL de gentamycine (Invitrogen).

2.2 Virus

2.2.1 Production

La souche MHV-A59 (ATCC, cat. VR-764) a été purifiée par plages cytopathiques à deux reprises puis multipliée quatre fois sur cellules DBT à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 tel que décrit auparavant (Daniel et Talbot, 1987). Un feuillet de cellules DBT en flacon F150 (Corning, cat. 430825) confluent à 90 %, a été infecté avec 3 mL de milieu MEM (Invitrogen 12571-063) contenant 1 % (v/v) de sérum de veau fœtal ajusté à pH 6,0 et dans lequel a été dilué le virus. Après une incubation d'une heure à 37 °C avec 5 % (v/v) CO₂, 12 mL de milieu ont été ajoutés et l'incubation poursuivie durant toute la nuit. Le surnageant recueilli a été centrifugé à 300 x g (Beckman, GS-6R) pendant 10 minutes pour en éliminer les débris cellulaires et aliquoté pour entreposage à -80 °C. Le stock viral employé pour toute la durée de la présente recherche est le surnageant de cellules DBT infectées à pH 6,0 avec le quatrième passage de MHV-A59, à MOI de 0,001;

il contient $2,25 \times 10^6$ unités formatrices de plages (UFP)/mL en aliquotes de 100 μ L à usage unique.

2.2.2 Titrage des particules infectieuses

2.2.2.1 Prélèvement des tissus de souris infectées

Les tissus prélevés stérilement des souris ont été pesés et homogénéisés au Polytron® (Kinematica, PT2100) dans la solution saline avec tampon phosphate (PBS: sans calcium ni magnésium; (Dulbecco et Vogt, 1954)) à raison de 10 mL pour chaque gramme d'organe (10 % poids pour volume: p/v). Après centrifugation à 250 x g (Beckman, GS-6R) pendant 5 minutes à 4 °C, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et conservé à -80 °C jusqu'au moment du titrage. À ce moment, les échantillons décongelés sur glace ont été de nouveau centrifugés afin d'éliminer les débris cellulaires.

2.2.2.2 Titrage

Le titre viral a été déterminé par la formation de plages cytopathiques tel que décrit auparavant (Daniel et Talbot, 1987). Des cellules DBT ont été préparées en plateaux de 12 puits (Corning, cat. 3513) afin d'obtenir des feuilletts confluent à près de 90 %. Deux cents microlitres de dilution en série de la solution à tester ont été inoculés sur les feuilletts de cellules DBT. Après un contact de 1 heure dans un incubateur à 37 °C avec 5 % (v/v) de CO₂ la solution virale a été aspirée et remplacée par 1 mL de méthylcellulose (1 % p/v (Sigma, cat. M04030)), MEM-Earle (Invitrogen, cat. 11095-098), 10 % (v/v) sérum de veau foetal (PAA Laboratories, cat. A15-701), bicarbonate de sodium 0,1 % (v/v; Invitrogen, cat. 25080-094), Pen-Strep (Invitrogen, cat. 15140-122)), et l'incubation poursuivie pour 48 heures. Les cellules ont été fixées une heure par l'ajout de formaldéhyde 25 % (v/v; 125 mL formaldéhyde 37 %, 375 mL PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954))). Après la fixation, tout le liquide a été aspiré et le feuillet coloré une heure (cristal violet 0,1 % p/v; éthanol 10 % v/v, PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954))).

2.3 Souris

2.3.1 Souches

Les souris de souche C57BL/6 (Charles River Laboratories, C57BL/6NCRL) femelles de 21-28 jours (Charles River Laboratories) ont été acclimatées en animalerie pour une semaine avant l'infection. Les souris transgéniques 2.102tg (Figure 11) (gracieuseté Dr Claude Daniel, INRS - Institut Armand-Frappier), sur fond génétique de C57BL/6, produites sur le site ont été transférées après le sevrage pour acclimatation avant l'infection. Les souris ont été groupées à cinq ou moins dans des cages ventilées dans une pièce d'animalerie de confinement biologique de niveau 2 et manipulées sous enceinte biologique à flux laminaire vertical selon les normes de Santé Canada. Le protocole d'expérimentation a été approuvé par le comité institutionnel d'éthique et de santé animale (CISAU #0412-05).

○ Lymphocytes T

● Spécifique Hb 64-76

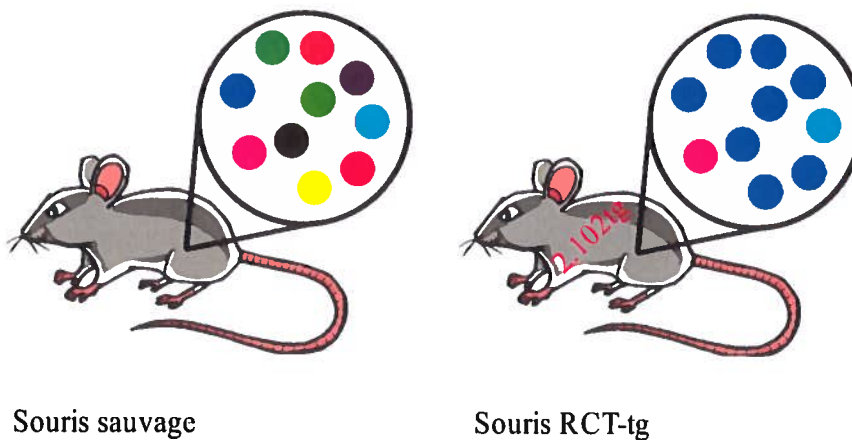


Figure 11: Souris transgéniques 2.102 TCR tg.

Les souris 2.102 tg possèdent un répertoire de reconnaissance antigénique par les lymphocytes T restreint au peptide 64-76 de l'hémoglobine.

2.3.2 Infections

Les souris âgées de 28-35 jours ont été pesées puis l'analgésie et l'anesthésie générale induite par l'injection i.p. de 10 µL/g d'un mélange de kétamine (Vetalar de Bioniche, DIN01989529), de xylazine (Rompun de Bayer, DIN02169592) et de PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) dans un ratio 2:1:17. L'infection par MHV-A59 a ensuite été réalisée par l'injection i.c. de 50 µL de virus dilué (p. ex. 1/100 pour obtenir 450 UFP) ou de milieu stérile pour les témoins non infectés.

2.3.2.1 Raffinements

En accord avec les recommandations du comité d'éthique animale, les souris infectées ont été injectées jusqu'à deux fois par jour d'une solution de réhydratation de lactate de Ringer (Baxter, cat. JB2324). En plus de la diète normale, des morceaux de gélose et de nourriture « malléable » Nuta-Gel (Bio-Serv, cat. S4798-Cup) ont été ajoutés dans le fond des cages, à la portée des souris en difficultés locomotrices.

2.3.3 Traitements in vivo

2.3.3.1 Injections d'interleukine 2

Lorsque mentionné, les souris ont reçu en injection i.p. 2000 UI d'IL-2 recombinante humaine (IL-2rh) deux fois par jour pendant 10 jours suivants l'infection. L'IL-2rh, gracieuSeté de Roche (Tecin Ro23-6019), a été reconstituée dans le PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) à raison de 2×10^4 UI/mL. Des souris témoins ont reçu en parallèle des injections de PBS seulement.

2.3.3.2 Injections d'anticorps bloquant le récepteur de l'interleukine 10

Lorsque mentionné, les souris ont reçu en injection i.p. 200 µg d'anticorps bloquant du récepteur de l'IL-10 (IL-10R, CD210; BioLegend, LEAF™ clone 1B1.3a cat. 112708) au jour de l'infection et 100 µg au quatrième jour suivant l'infection.

2.3.4 Évaluation clinique

Suite à l'infection, les souris ont été observées quotidiennement pour les signes cliniques de troubles neurologiques (Tableau X). L'échelle suivante, inspirées des échelles couramment employées dans les études de l'EAE, a été utilisée.

Tableau X: Critères d'évaluation neurologique des souris infectées par MHV-A59

Score	Description
0	Normale, pas de signes visibles
0,5	Queue partiellement flasque (le tiers distal)
1,0	Queue flasque (traîne au sol sur deux tiers et plus de sa longueur)
1,5	Bassin près du sol sans faiblesse notable des pattes arrières
2,0	Faiblesse légère d'une ou deux pattes arrière Généralement un réflexe de retournement rapide Démarche plus rapprochée du sol, les hanches comprises
2,5	Faiblesse légère mais retournement lent
3,0	Faiblesse sévère des pattes arrières, généralement les deux pattes Accompagné d'un réflexe de retournement lent Démarche lente avec petits pas et en levant peu les pieds Possibilité de démarche ballotante, peu stable
3,5	Paralysie incomplète des pattes arrières Les doigts sont repliés ce qui empêche l'animal d'utiliser adéquatement ses pattes
4,0	Paralysie d'une ou deux pattes arrières Démarche « natation » en se traînant avec les pattes avant
4,5	Pas de mouvement malgré la fonctionnalité des pattes (une ou deux paralysées)
5,0*	Pas de mouvement notable dans la cage Pattes avant paralysées ou non mais trop faible pour permettre le déplacement Perte de poids importante

* Les souris dans cet état sont sacrifiées en absence d'amélioration après 24 heures.

2.4 Histologie

2.4.1 Tissus

2.4.1.1 *Perfusion et fixation*

Pour la perfusion, l'abdomen et la cage thoracique des souris sous analgésie et anesthésie générale (10 µL/g de solution xylazine et kétamine) ont été ouverts et la solution de PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) injectée dans le ventricule gauche du coeur de la souris, l'oreillette droite percée pour l'écoulement du sang. Après la lente injection de 5-10 mL de PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), une solution de paraformaldéhyde 4 % (p/v) (PFA: EMD, cat. PX0055-3) a été injectée de la même façon. Par la suite, les organes d'intérêt ont été extraits des souris et placés dans des tubes identifiés contenant 10 mL de paraformaldéhyde 4 % (p/v) pour un minimum de 24 heures.

2.4.1.2 *Coupes au cryostat*

Pour les coupes ultrafines, un fragment de la moelle épinière de quelques millimètres a été coupé et placé dans une solution de saccharose 30 % (p/v) pour une période minimale de 24 heures. Cette étape dite de cryoprotection protège les tissus à congeler contre les dommages causés par la congélation de l'eau. Lorsque la solution de saccharose a remplacé la PFA dans le tissu, la densité de celui-ci augmente et il tombe au fond du tube. Suite à la cryoprotection, les organes sont enrobés de solution Histo-prep (Fisher, cat. SH75-125D) et congelés lentement en atmosphère froide créée par de la glace sèche. Les blocs obtenus ont été ensuite coupés au cryostat en tranches de 20 µm d'épaisseur et récupérées sur des lames « Superfrost Plus » (Fisher, cat. 12-550-15, et lamelles cat. 12-545M) en alternant sur trois lames distinctes. Les coupes ont ensuite été séchées à l'air libre quelques minutes avant coloration immédiate ou entreposage à -20 °C.

2.4.2 Colorations

Pour la coloration, les lames sont réchauffées et séchées brièvement sur une plaque chauffante avant de procéder.

2.4.2.1 *Hématoxyline et éosine*

La coloration de routine à l'hématoxyline et l'éosine (H&E) permet de visualiser l'aspect général des tissus et en immunologie permet d'observer les infiltrations lymphoïdes caractérisée par une densité anormale de petites cellules aux noyaux densément coloré. Alors que l'hématoxyline, colorant cationique, fixe les acides nucléiques, l'éosine, colorant acide, forme des liens avec les structures basiques du cytoplasme. Il en résulte une coloration violet foncé des noyaux et rose pour le cytoplasme. Les tissus ont d'abord été fixés par trempage des lames dans le méthanol 100 % pendant 5 minutes. Les lames ont ensuite été hydratées par trempage d'une minute dans les bains successifs d'éthanol 100, 95, 80, 70 et 50 % (v/v). Après lavage des lames dans l'eau distillée pendant deux minutes, les lames ont été colorées pendant cinq minutes dans la solution d'hématoxyline de Harris (Fisher, cat. 23-245-677), lavage dans l'eau distillée et fixation du colorant dans la solution d'eau ammoniacée 0,3 % (v/v; Hydroxide d'ammonium de Fisher, cat. A669-500). Après rinçage des lames dans l'eau distillée, les lames ont été trempées dans la solution d'éosine (Fisher, cat. 23-245-658) pendant 20 secondes et immédiatement rincées dans l'eau distillée. Finalement, les lames ont été déshydratées par trempage d'une minute dans les bains successifs d'éthanol 50, 70, 80, 95 et 100 % (v/v) puis fixation dans le xylène 100 % (v/v). Les lames ont été recouvertes de liquide de montage Entellan® (VWR, cat. 65037-71) et d'une lamelle (Fisher, cat. 12-545-M) avant séchage sous hotte chimique.

2.4.2.2 *Luxol Fast Blue*

La coloration de la myéline a été accomplie par la méthode de « Luxol Fast Blue » (LFB), un colorant de type phthalocyanine de cuivre sulfoné produisant une réaction de type acide-base sur les lipoprotéines comme celles composant la myéline. Les lames de tissus coupés au cryostat tels que décrits plus haut ont été déshydratées par immersions

successives de deux minutes dans les solutions d'eau distillée puis de gradient d'éthanol, 50, 70, 80 et 95 %. Les lames ont ensuite été colorées dans la solution de LFB (Aldrich, cat. 22,934-2) pour toute la nuit à 37 °C. Après réfrigération des lames pendant 45 minutes, celles-ci ont été lavées par dix trempages dans l'eau distillée. La différenciation a été amorcée par trempage des lames dans la solution de lithium 0,05 % (p/v) (Sigma, cat. 1231) fraîche pendant 3 minutes. Après immersion de une minute dans l'eau distillée les lames ont été immergées dans l'éthanol 70 % pendant 5 minutes, puis dans les bains successifs d'éthanol 80, 95 et 100 % – trois fois – pendant deux minutes avant la solution de xylène (Fisher, cat. X5-4) et le montage de la lamelle (Fisher, cat. 12-545M) avec le liquide de montage Entellan® (VWR, cat. 65037-71) avant séchage sous hotte chimique.

2.4.3 Immunohistochimie

Sur les coupes de tissus fixés à la PFA, les marquages par anticorps monoclonaux sont souvent rendus impossibles par la modification de conformation et les ponts créés entre les protéines. Malgré l'absence d'anticorps α CD3 fonctionnel en coupes à la PFA, les anticorps anti-Mac-2 conservent leur spécificité contre les macrophages et microglies activés.

2.4.3.1 Mac-2

Le marquage α Mac-2 a été réalisé tel que décrit précédemment (Jacomy et Talbot, 2003). En résumé, les lames supportant les tissus à marquer ont été recouvertes d'une dilution 1/20 (PBS sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) du surnageant de culture de l'hybridome produisant l'anticorps contre Mac-2 (ATCC, cat. M3/38.1.2.8 HL.2) et incubée dans un contenant humide pendant deux heures à température ambiante. Après deux lavages de 5 minutes dans le PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), les lames ont été incubées une heure à température ambiante dans 1 mL de l'anticorps secondaire anti-rat biotinylé (Chemicon, AP164B) dilué 1:1000 (PBS, sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)). Après deux lavages de cinq minutes dans le PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), les lames ont été incubées

une heure dans la solution ABC (Vectastin ABC kit de Vector, cat. PK-6102) préparée selon les instructions du fabricant. Après un rinçage avec du PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) les lames ont été recouvertes d'une solution 30 % (p/v) de 3,3'-diaminobenzidène (DAB de Sigma, cat. D-5905) avec 0,01 % (v/v) de peroxyde d'hydrogène dans le PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), pour un maximum de 10 minutes. Les tissus ont par la suite été déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de 50 à 100 % (v/v) avant fixation dans le xylène. Les lames ont été recouvertes de liquide de montage Entellan® (VWR, cat. 65037-71) et d'une lamelle (Fisher, cat. 12-545M) avant séchage sous la hotte chimique.

2.5 Acides nucléiques

En raison de la fragilité et de la sensibilité des acides nucléiques, particulièrement l'ARN, les organes prélevés à cet effet ont été immédiatement introduits dans des tubes (Ultident, cat. 170-T4300-S) déposés sur glace sèche puis congelés à -80 °C en attendant l'extraction.

2.5.1 *Extraction de l'ARN*

Deux stratégies ont été employées selon l'origine de l'ARN, selon qu'il s'agit des organes entiers ou des cellules isolées ou en culture.

2.5.1.1 *Organes*

Les organes prélevés ont été homogénéisés au Polytron® (Kinematica, PT2100) dans 1 mL de Trizol® (Invitrogen, cat. 15596-026) et laissés à température ambiante pour 5 minutes. Suite à l'ajout de 200 µL de chloroforme (Sigma, cat. C-2432), les tubes ont été mélangés à l'agitateur vortex pendant quinze secondes et laissés au repos à température ambiante pour 3 minutes. L'ARN a par la suite été séparé du contenu protéique par centrifugation à 14 500 x g (Eppendorf, 5418) pour 15 minutes à 4 °C. La phase aqueuse obtenue a été transférée dans un nouveau tube et l'ARN a été précipité par l'ajout de 0,5 mL d'isopropanol (Fisher, cat. A-416) pendant 5 minutes à température ambiante et

centrifugation à 14 500 x g pour 10 minutes à 4 °C. Le surnageant jeté, le culot d'ARN a été lavé par l'ajout de 1 mL d'éthanol 75 % (v/v), détachement du culot à l'agitateur vortex et centrifugation à 14 500 x g pendant 10 minutes à 4 °C. Le liquide enlevé, les culots ont été laissés à sécher par évaporation avant d'être dissouts dans 100-400 µL d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma, cat. D-5758) (100 µL pour SNC, rates, poumons; 400 µL pour le foie). L'ARN obtenu est chauffé à 65 °C pendant 10 minutes puis dosé au NanoDrop (ThermoScientific, ND-1000) et entreposé à -80 jusqu'à son utilisation.

2.5.1.2 Cellules

L'ARN de cellules en culture ou de splénocytes a été extrait et purifié selon les instructions du fabricant de la trousse « RNeasy Mini Kit » (QIAGEN, cat. 74104) et des colonnes « QIAshredder » (QIAGEN, cat. 79654). En résumé, les cellules récoltées ont été centrifugées à 250 x g (Beckman, GS-6R) et le surnageant attentivement aspiré pour ne garder qu'un culot pratiquement sec. Les cellules ont été ensuite détachées dans le tampon RLT additionné de β-mercaptoéthanol (Gibco, cat. 21985-023) et homogénéisées sur colonnes QIAshredder. Suivant l'addition d'un volume d'éthanol 70 % (v/v), les extraits ont été déposés sur les colonnes de purification et centrifugés pendant 15 secondes à 14 500 x g (Eppendorf, 5418) et la fraction écoulée, jetée. Les colonnes ont été ensuite lavées avec 700 µL de tampon RW1 et centrifugées pendant 15 secondes à 14 500 x g (Eppendorf, 5418) et la fraction écoulée, jetée. Un second lavage a été effectué avec 500 µL de tampon RPE, suivi d'une centrifugation pendant 15 secondes à 14 500 x g (Eppendorf, 5418) puis une seconde fois, mais pour 2 minutes de centrifugation. Finalement, l'ARN a été élué avec 30 µL d'eau sans RNase.

2.5.2 Détection de séquences d'acides nucléiques

Lors de son cycle de réplication, l'ARN génomique du MHV est transcrit en plusieurs ARNm qui ont tous le même fragment « leader » en 5' en plus de contenir tous les gènes en aval de celui qui sera traduit (Figure 10). Ce mode de réplication permet entre autres choses de distinguer la réplication virale de la simple présence du génome viral par la proximité de

la séquence « leader » 5' du gène N, normalement le plus éloigné en 3'. De plus, la séquence du gène N se retrouve sur chaque ARNm, facilitant la détection du virus.

2.5.2.1 Transcription inverse

La trousse « Superscript First-Strand Synthesis System » (Invitrogen, cat. 11904-018) a été employée selon les instructions du fabricant résumées ici. Un maximum de 5 µg d'ARN a été ajouté à un microtube contenant 1 µL de dNTP (Invitrogen), 1 µL d'oligonucléotides dT (Invitrogen) et un volume d'eau DEPC (Invitrogen) pour compléter à 10 µL le volume de réaction. Les tubes incubés à 65 °C pendant cinq minutes puis placés sur glace plus d'une minute ont été additionnés de 9 µL du mélange de réaction (2 µL Tampon 10X; 4 µL MgCl₂; 2 µL DTT; 1 µL RNase OUT). Après une incubation de deux minutes à 42 °C, 1 µL d'enzyme « Superscript II » a été ajoutée à chaque tube de réaction avant de poursuivre l'incubation à 42 °C pour 50 minutes. La réaction a été terminée à 70 °C pendant 15 minutes avant d'être refroidie sur glace. La matrice d'ARN a ensuite été éliminée par digestion enzymatique, 1 µL de RNase H pendant 20 minutes à 37 °C. L'ADNc ainsi obtenu est prêt pour amplification par polymérisation en chaîne (PCR).

2.5.2.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'ADNc, à raison de 5 µl, a été mélangé à la solution de réaction composée de 5,0 µL de tampon 10X (Roche, cat. 11059400), de 1,0 µL de dNTP 10 mM (Amersham, cat. US77212), de 36,5 µL d'eau DEPC, de 2,0 µL d'amorces spécifiques 10 mM (voir Tableau XI, synthèse par Alpha DNA) et de 0,5 µL de polymérase Expand (Roche, cat. 10856826). La réaction de polymérisation se débute toujours par 5 minutes de dénaturation à 94 °C suivis des cycles de 30 secondes à 94 °C, 30 secondes d'appariement (Tableau XI) et 1 minute à 72 °C avec une terminaison de la réaction de 7 minutes à 72 °C puis entreposage à 4 °C avant la migration sur gel d'agarose 1,5 % ou à -20 °C pour long terme.

Pour la réalisation de PCR nichées, des paires d'amorces ont été conçues à l'intérieur des séquences amplifiées par une première paire (Tableau XI, synthèse par Alpha DNA).

Les PCR nichées ont été réalisées par amplification de 30 cycles à partir de la solution d'amplification du premier tour à 20 cycles selon le mélange déjà décrit en remplaçant les 5 μL d'ARN par 2 μL du mélange du premier tour et 3 μL d'eau.

Tableau XI: Description des amorces employées pour la détection de MHV-A59 lors de l'infection persistante.

Gène	Séquence des amorces (5' -> 3') Homologue / Inverse	Position sur le gène	Taille du fragment	Nombre de cycles	Température d'appariement
Gapdh	H: CCG AGT CAA CCG ATT TGG TCG TAT I: AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC	85-368 NM_0010812 ^a	307 pb	40	50 °C
MHV (N) génomique	H: CCT CTA CTG TAA AAC CTG ATA TGG I: CTA ATT TAG ATC CAA AGA AGA AGG	677-991 NC_001846	315 pb	20 (Niché) 40	50 °C
MHV (N) ARNm	H: TAA GAG TGA TTG GCG TCC I: AGA CCT TCC AGA GCC TCC	3-662 ^b	660 pb	20 (Niché) 40	50 °C
Niché MHV (N) génomique	H: GCT GCT CTT GTT TTG GCT AAG C I: ACT CTG CAA GAA TGG GGA ACT GT	36-273 ^c	238 pb	30	50 °C
Niché MHV(N) ARNm	H: TAA GAG TGA TTG GCG TCC GT I: ATT GCT TCT GCT GCC CAT CA	1-433 ^d	433 pb	30	50 °C

Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH), coronavirus murin (MHV).

^a Numéro d'accès de la banque des séquences du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI).

^b Calculé sur une construction à partir de la séquence NC_001846 dont les séquences entre le leader et N ont été éliminées.

^c Fait référence à la position sur l'amplicon de la paire d'amorces MHV (N) génomique.

^d Fait référence à la position sur l'amplicon de la paire d'amorces MHV(N) ARNm.

2.5.2.3 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

La trousse pour qPCR « SYBR Green » (New England Biolabs, cat. F-4100S/L) a été employée selon les instructions du fabricant. Pour chaque gène à l'étude, l'ADNc produit lors de la transcription inverse a été ajouté dans trois tubes de réactions contenant les amorces et le mélange 2X de la trousse. Les tubes ont été placés dans l'analyseur (Corbett Life Science, Rotor Gene 3000). Le programme des cycles similaires à la PCR sauf pour une dénaturation initiale de 15 minutes. Les valeurs de cycle de seuil (Ct) ont été déterminées dans la portion exponentielle de l'amplification (Logiciel Rotor-Gene 6).

Tableau XII: Description des amorces employées dans la quantification relative des ARNm de cytokines par RT-qPCR.

Gène	Séquence des amorces (5' -> 3') Homologue / Inverse	Position sur le gène	Taille du fragment	Nombre de cycles	Température d'appariement
Gapdh	H: CCG AGT CAA CCG ATT TGG TCG TAT I: AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC	85-368 NM_0010812 ^a	307 pb	40	50 °C
(Gruslin <i>et al.</i> , 2005)					
Il-2	H: CTT CAA GCT CCA CTT CAA GCT I: CCA TCT CCT CAG AAA GTC CAC	115-515 NM_008366	401 pb	40	50 °C
(Ghasemlou <i>et al.</i> , 2007)					
Il-4	H: AGC TAG TTG TCA TCC TGC I: GAT GCT CTT TAG GCT TTC C	104-489 NM_021283	384 pb	40	50 °C
(Ghasemlou <i>et al.</i> , 2007)					
Il-6	H: CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC I: ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC	32-669 NM_031168	634 pb	40	50 °C
(Furlan <i>et al.</i> , 2005)					
Il-10	H: CAG GGA TCT TAG CTA ACG GAA A I: GCT CAG TGA ATA AAT AGA ATG GGA AC	679-788 NM_010548	110 pb	40	50 °C
(Vicente-Suarez <i>et al.</i> , 2007)					
Tgfb1	H: TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G I: GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC	1461-1630 NM_011577	170 pb	40	50 °C
(Overbergh <i>et al.</i> , 1999)					

Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH), interleukine (IL), facteur de croissance transformant (TGF).

^a Numéro d'accès de la banque des séquences du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI).

Tableau XIII: Description des amorces employées dans la quantification relative des ARNm des produits affectés par le récepteur du TGF- β_1 par RT-qPCR.

Gène	Séquence des amorces (5' -> 3') Homologue / Inverse	Position sur le gène	Taille du fragment	Nombre de cycles	Température d'appariement
Gapdh (Gruslin <i>et al.</i> , 2005)	H: CCG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT I: AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC	85-368 NM_0010812 ^a	307 pb	40	60 °C
Gata3 (Grogan <i>et al.</i> , 2001; Usui <i>et al.</i> , 2003)	H: AGA ACC GGC CCC TTA TCA A I: AGT TCG CGC AGG ATG TCC	1478-1549 NM_008091	72 pb	40	60 °C
Ifng (Grogan <i>et al.</i> , 2001)	H: GGA TGC ATT CAT GAG TAT TGC I: CCT TTT CCG CTT CCT GAG G	438-564 NC_000076	127 pb	40	60 °C
Stat4 (Usui <i>et al.</i> , 2003)	H: CCT GGG TGG ACC AAT CTG AA I: CTC GCA GGA TGT CAG CGA A	2315-2416 NM_011487	102 pb	40	60 °C
Tbx21 (t-bet) (Grogan <i>et al.</i> , 2001; Usui <i>et al.</i> , 2003)	H: CAA CAA CCC CTT TGC CAA AG I: TCC CCC AAG CAG TTG ACA GT	1097-1205 NM_019507	109 pb	40	60 °C

Glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH), Facteur de transcription GATA 3 (GATA3), interféron (IFN), transducteur de signal et activateur de la transcription (STAT), facteur de transcription T-box exprimé dans les cellules T (TBX).

^a Numéro d'accès de la banque des séquences du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI).

2.5.2.4 Génotypage des souris 2.102tg

Au moment du sacrifice des souris 2.102tg, un morceau de queue d'environ 1 cm a été coupé et placé dans un microtube identifié. Les morceaux ont été ensuite digérés dans 400 µL d'une solution de digestion (TrisHCl 0,05 M; EDTA 0,1 M; NaCl 0,1 M; SDS 1 % (p/v)) et 35 µL de protéinase K (10 mg/mL; Boehringer Mannheim, cat. 161-519) toute une nuit à 55 °C. L'ADN génomique a ensuite été précipité à l'aide de 0,7 volume d'isopropanol à la température ambiante et centrifugation à 300 x g pendant cinq minutes. Le surnageant jeté, le culot a été lavé avec 1,0 mL d'éthanol 70 % (v/v) froid (-20 °C) et centrifugé de nouveau à 300 x g pendant cinq minutes. Le surnageant jeté, le culot sec a été dissous dans 200 µl d'eau et incubé plus de dix minutes à 55 °C puis conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation subséquente.

Pour la détection du transgène en PCR, l'ADN génomique obtenu précédemment (2,50 µL) a été additionné d'un mélange de réaction dans les proportions suivantes pour chaque tube de réaction: 2,85 µL d'eau, de 0,23 µL de polymérase Taq (Pharmacia, cat. 27-0798-06), 10,0 µL du mélange d'amorces spécifiques (fourni par le Dr Claude Daniel, INRS-Institut Armand-Frappier) et 6,34 µL de mélange SPA (Tampon PCR 3,33 X; MgCl₂ 5 mM; Glycérol 0,17 % (v/v); dNTP 0,66 mM et Crésol rouge 0,33 mg/mL). Le programme d'amplification suivi se décline ainsi; dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 minutes suivie de 40 cycles de 94 °C pendant 10 secondes, 60 °C pendant 50 secondes puis 72 °C pendant 30 secondes terminés immédiatement à 4 °C. Les fragments attendus suite à une migration sur gel sont de 402 pb pour le transgène et de 800 pb pour le témoin interne.

2.6 Évaluation de la réponse immunitaire

2.6.1 Dosage immunoenzymologique des anticorps

La détection des anticorps spécifiques de MHV a été accomplie, à température ambiante, selon la méthode immunoenzymologique (ELISA) décrite précédemment (Daniel *et al.*, 1994). L'antigène viral a été dilué dans du PBS (sans calcium ni magnésium

(Dulbecco et Vogt, 1954)) et distribué à 100 μ L dans un plateau 96 puits à fond plat non traité pour la culture cellulaire (Costar, cat. 3369) a été incubé pour la nuit. Le lendemain, la solution d'antigène a été jetée et remplacée par la solution de blocage (PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)); sérum de veau fœtal 10 % (v/v); Tween-20 0,2 % (v/v)) pour une incubation d'une heure. La solution de blocage a ensuite été remplacée par 100 μ L de solution de blocage fraîche. Les sérums ont été dilués en série par facteur de trois en ajoutant 50 μ L de sérum dilué 1/50 au premier puits puis en transférant 50 μ L d'une rangée vers la suivante, en jetant le dernier 50 μ L. Après une incubation de 1,5-2 heures les puits ont été lavés cinq fois (PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), Tween-20 0,1 % (v/v)) avant l'ajout de la solution contenant l'anticorps de détection de chèvre anti- IgM (Jackson, cat. 115-035-075), anti-IgG (Jackson, cat. 115-035-164), anti-IgG1 (Jackson, cat. 115-035-205), anti-IgG2a (Jackson, cat. 115-035-206), anti-IgG2b (Jackson, cat. 115-035-207), ou anti-IgG3 (Jackson, cat. 115-035-209) de souris conjugués à la peroxydase et dilué dans la solution de blocage. Après l'ajout de 100 μ L par puits et incubation de 1,5-2 heures les puits ont été lavés cinq fois (PBS, (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)); Tween-20 0,1 % (v/v)). Le substrat (tampon citrate (acide citrique 0,05 M; phosphate sodique 0,1 M; pH 5,0); o-phénylène diamine 40 % p/v (Sigma, cat. P-9029) et H₂O₂ 0,033 % (v/v) (Fisher, cat. H325-500)) a été ajouté et les plateaux incubés pour 30 minutes dans l'obscurité. La réaction a été interrompue par l'ajout de 100 μ L par puits de HCl 1 N. La quantification a été faite par densité optique à 492 nm (Bio-Rad, Microplate Reader 680). Le titre d'anticorps a été calculé par la soustraction de la DO₄₉₂ des anticorps sur l'antigène témoin (L929) de la DO₄₉₂ des mêmes dilutions d'anticorps sur antigène cible (L929/A59). La dilution est considérée positive lorsque la DO₄₉₂ ajustée est supérieure à deux fois celle d'un échantillon témoin de souris témoin non infectée.

2.6.2 Cultures primaires de cellules

Les souris sacrifiées par inhalation de CO₂ ont été disséquées stérilement sous enceinte biologique selon les normes de confinement de niveau 2 de Santé Canada. Pour les expérimentations sur cellules fraîches, les organes ont été immédiatement prélevés et

déposés dans des tubes stériles (Corning, cat. 430790) contenant 5 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11875-101) 1 % (v/v) SVF.

2.6.2.1 Splénocytes, thymocytes et lymphocytes des ganglions lymphatiques cervicaux

Les organes lymphoïdes prélevés stérilement ont été triturés dans 5 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 1 % (v/v) SVF à l'intérieur de treillis de 100 µm (BD Falcon, cat. 352360) à l'aide du piston d'une seringue de 5 mL. Pistons et treillis ont ensuite été lavés avec 8 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 1 % (v/v) SVF et transférés dans un tube 15 mL stérile (Corning, cat. 430790) pour centrifugation à 300 x g (Beckman, cat. GS-6R) pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant jeté, les culots de cellules ont été défaits dans 5 mL de solution de lyse (NH₄Cl 0,15 M; KHCO₃ 10 mM) et laissés à la température ambiante pour 5 minutes avec agitation occasionnelle. Additionnées de 8 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 1 % (v/v) SVF, les cellules ont été centrifugées de nouveau à 300 x g (Beckman, GS-6R) pour 10 minutes à 4 °C et le culot défait dans 3 à 5 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 1 % (v/v) SVF.

2.6.2.2 Lymphocytes infiltrés au système nerveux central

Afin d'obtenir des cellules T primaires, le SNC a été prélevé: après perfusion au PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), pour éliminer les lymphocytes circulant, comme décrit auparavant. Le cerveau a été prélevé suite à l'ouverture du crâne et la moelle épinière expulsée de la colonne vertébrale par injection de PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)).

Les organes ont été homogénéisés dans 5 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 1 % (v/v) SVF au « Pellet Pestle » (Kimble Konte, cat. 749530-1500) dans les tubes 15 mL du même fabricant (Kimble Konte, cat. 749515-1500). Le piston a ensuite été lavé avec 8 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 1 % (v/v) et la solution obtenue, centrifugée à 300 x g (Beckman, GS-6R) pour 10 minutes à 4 °C. Le culot obtenu a été défait dans 5 mL de Percoll 40 % (Amersham, cat. 17089102) sous lequel une solution de

Percoll 80 % (v/v) a été déposée délicatement. Dans ce gradient discontinu, les cellules ont été centrifugées à 800 x g (Beckman, GS-6R) pendant 20 minutes à 4 °C sans freinage actif. Les cellules lymphoïdes ont été récoltées dans la phase séparant les solutions de Percoll® (Amersham, cat. 17-0891-01), les lipides, abondants dans le SNC, se retrouvant en surface. Après lavage dans 10-20 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) avec 1 % (v/v) SVF les cellules ont été dénombrées pour leur utilisation subséquente.

2.6.2.3 Enrichissement en lymphocytes T sur laine de nylon

Lorsque précisé les splénocytes ont été enrichis en lymphocytes T. Cette procédure simple met en application les propriétés d'adhérence différentes des cellules T et des CPA. Les premières adhérant moins bien à la laine de nylon.

Les colonnes ont été préparées préalablement à l'isolement des splénocytes. La laine (Polysciences) a d'abord été immergée dans une solution de HCl 1 % (v/v) portée à ébullition de 5 à 10 minutes. Après refroidissement à température ambiante, la laine a été essorée puis lavée à l'eau 10 fois et le pH du dernier lavage vérifié. Lorsque le pH de lavage devenu neutre, la laine a été séchée et 1,0 g de laine inséré dans le réservoir d'une seringue de 10 mL puis compactée et stérilisée à l'autoclave. Immédiatement avant l'isolement des splénocytes, la colonne a été couplée à une valve et une aiguille 19G, stériles, puis équilibré par le passage de 25 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 5 % (v/v) SVF à 37 °C. Une fois les bulles d'air éliminées, la laine a été compactée et la colonne placée en incubateur à 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ pour 45 minutes. Une fois la suspension de splénocytes obtenue, celle-ci a été ajustée à $7,5 \times 10^7$ cellules par mL dans un volume maximal de 2 mL de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 5 % (v/v) SVF chaud (37 °C). La suspension cellulaire a été ajoutée sur la colonne et écoulee avec 500 µL supplémentaires de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 5 % (v/v) SVF. La colonne remplie de splénocytes a été incubée 45 minutes à 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ afin de permettre l'adhésion des CPA à la laine de nylon. Pour l'éluion des cellules T, l'aiguille de 19G a été remplacée par une aiguille de 23G, la colonne remplie de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) 5 % (v/v) SVF chaud et le robinet ouvert. Les premiers 15 mL écoulés, contenant les lymphocytes T, ont été

centrifugés à 200 x g (Beckman, GS-6R) pendant 10 minutes et le culot resuspendu dans le volume approprié (voir la section sur la lymphoprolifération) et analysé en cytométrie (voir la section cytométrie) pour le rendement (>90 % de cellules T, données non montrées).

2.6.2.4 Lymphocytes T purifiés

Les cellules T de la rate ont été purifiées selon les instructions du fabricant de la trousse « EasySep® Mouse T Cell Enrichment Kit » (StemCell Technologies, cat. 19751). Les splénocytes ont été extraits comme décrits précédemment sans lyse des globules rouges. Pour le compte des cellules nucléées la solution de cristal violet (0,01 % (p/v) (Sigma, cat. 229288)) et d'acide acétique 1 % (v/v) a été employée afin de colorer les cellules mortes et de provoquer la lyse des érythrocytes. Ajustées à 1×10^8 cellules par mL dans le milieu PBS-SVF 2 % (v/v) les cellules ont été incubées en tubes de polypropylène 12 x 75 mm 15 minutes à 4 °C avec du sérum de rat 5 % (v/v) et le cocktail d'enrichissement (50 µl/mL de cellules) puis avec le cocktail de sélection biotine (100 µl/mL de cellules) et finalement les nanoparticules magnétiques (50 µl/mL de cellules). Pour isoler les cellules T, le volume de chaque tube a été complété à 2,5 mL avec le PBS-SVF 2 % (v/v) et placé dans l'aimant pour 5 minutes, avant de verser le contenu dans un nouveau tube.

2.6.2.5 Cellules Dendritiques purifiés

Les cellules dendritiques de la rate ont été purifiées selon les instructions du fabricant de la trousse « EasySep® Mouse CD11c Positive Selection Kit » (StemCell Technologies, cat. 18758). Les splénocytes ont été extraits comme décrits précédemment sans lyse des globules rouges. Pour le compte des cellules nucléées la solution de cristal violet (0,01 % (p/v) (Sigma, cat. 229288)) et d'acide acétique 1 % (v/v) a été employée afin de colorer les cellules mortes et de provoquer la lyse des érythrocytes. Ajustées à 1×10^8 cellules par mL dans le milieu PBS-SVF 2 % (v/v) les cellules ont été incubées en tubes de polypropylène 12 x 75 mm brièvement avec l'anticorps bloqueur des récepteur Fc (10 µL/mL de cellules). Les cellules ont ensuite été incubées successivement avec l'anticorps de sélection anti-

CD11c couplé au PE (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cellules) et le cocktail de sélection PE (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cellules) pendant 15 minutes à la température de la pièce puis finalement avec les nanoparticules magnétiques (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cellules) pour 10 minutes à la température de la pièce. Pour isoler les cellules dendritiques, le volume de chaque tube a été complété à 2,5 mL avec le PBS-SVF 2 % (v/v) et placé dans l'aimant pour 5 minutes, avant de verser le contenu dans un nouveau tube. Après l'ajout de 2,5 mL de PBS-SVF 2 % (v/v) une seconde ronde de sélection dans l'aimant a été réalisée.

2.6.3 Activité des lymphocytes

Plusieurs types d'agents peuvent activer les lymphocytes T, de façon spécifique ou non. Cette activation se manifeste par la production de cytokines ou de leur récepteur et ultimement, par la prolifération des cellules activées, c'est-à-dire la division cellulaire amplifiant de plusieurs facteurs les clones activés. Même si la prolifération n'est pas une fonction spécifique des lymphocytes T, le test de prolifération est une méthode dont la simplicité et la facilité en ont fait un outil largement employé afin d'évaluer l'immunocompétence globale.

2.6.3.1 Préparation des antigènes et stimulants

Anticorps anti-CD3. L'hybridome de hamster arménien 145-2C11 produisant l'anticorps $\alpha\text{CD3}\epsilon$ (ATCC, cat. CRL-1975) a été mis en culture et le surnageant collecté et accumulé jusqu'à l'obtention du volume désiré. Après centrifugation de 10 minutes à 250 x g pour éliminer les débris cellulaires l'anticorps a été purifié sur colonne Sepharose®-protéine G (Amersham Biosciences, cat. 17-0618-01). Après avoir très lentement fait passer tout le surnageant de culture dans la colonne contenant la résine (<7,5 mL/min) celle-ci a été lavée (2 h à 18 mL/min) avec un tampon phosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,078 M; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,122 ; pH 7,0). L'anticorps a finalement été élué (1 mL/min) avec un tampon glycine (0,1 M; pH 3,0) et récolté par fractions de 1 mL dans des tubes contenant 0,1 mL de tampon Tris (1 M; pH 9,0) afin de neutraliser le pH. Les tubes contenant des protéines ont été combinés et la solution résultante dialysée avec 4 L de PBS (sans calcium

ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), 3 fois. Après réduction sur poudre Aquacide II (EMD, cat. 17851) l'anticorps a été stérilisé sur filtre 0,22 μm (Millipore, cat. SLGP033RS), aliquoté et congelé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à son utilisation. L'anticorps a été employé à la concentration finale de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'anticorps αCD3 par la de la chaîne ϵ du CD3 associée au TCR et le rapprochement induit de ces molécules provoque l'initiation du signal d'activation.

Anticorps anti-CD28. L'anticorps anti-CD28 (αCD28 ; LEAF™ BioLegend, cat. 102112) a été employé à la concentration finale de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Concanavaline A. La concanavaline A (ConA: Sigma, cat. C5275) a été dissoute dans le PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) à la concentration de 0,5 mg/mL et aliquoté pour conservation à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le mitogène a été employé à la concentration finale de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le mécanisme utilisé par lectine ConA pour induire la prolifération des lymphocytes T est inconnu, mais il nécessite la présence du TCR.

Homogénat de poumon de souris. La méthode a été réalisée par Edith Gruslin au laboratoire tel que décrit brièvement (Gruslin, 2002). Des poumons de souris ont été prélevés, puis homogénéisés sur glace dans du RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11874-101) à l'aide d'un homogénéisateur Polytron® (Kinematica). Une centrifugation à 510 x g pendant 20 minutes à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ensuite été effectuée. La quantité de protéines totales présentes dans le surnageant a été dosée tel que décrit plus bas. L'homogénat a été ajusté à une concentration de 1 mg/mL et aliquoté pour conservation à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'antigène a été employé à la concentration finale de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

IL-2. L'interleukine 2 recombinante humaine (IL-2rh) est une gracieuseté de Roche (Tecin Ro23-6019) et a été reconstituée dans le PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) à raison de 1×10^4 UI/mL. La cytokine a été employée à la concentration finale de 10 UI/mL.

Lysats de cellules DBT. Des cellules DBT en feuillettes et infectées ou non, ont été congelées puis décongelées à trois reprises afin de provoquer la rupture des membranes et obtenir un relargage des protéines virales. Le lysat cellulaire ainsi obtenu a été centrifugé

dix minutes à environ 250 x g pour éliminer les plus gros débris cellulaires. Les lysats de cellules non infectées et infectées ont été titrés par la méthode de plage de lyse telle que décrite précédemment (Section 2.2.2.2). Le titre du lysat de cellules infectées a été établi à 2×10^6 UFP/mL. Les lysats ont été conservés en aliquotes à -80 °C.

MBP. La protéine basique de la myéline a été préparée au laboratoire par Édith Gruslin (Gruslin, 2002) selon la méthode décrite par Cheifetz et Moscarello (Cheifetz et Moscarello, 1985) et résumée ici. La matière blanche d'un cerveau bovin (gracieuseté de l'Abattoir Gilles Fortin, Napierville) a été homogénéisé et mélangée pendant une nuit dans un mélange 2:1 chloroforme/méthanol à 4 °C. Suite à une filtration sur papier (Whatman #1) le résidu a été lavé avec un mélange chloroforme/méthanol puis d'acétone froide. Le résidu a été plus amplement homogénéisé dans le fluorure de phényméthylsulfonyle (PMSF) et agité une autre nuit. Après centrifugation, une heure à 9000 x g, le culot a été lavé dans un mélange H_2SO_4 /PMSF et centrifugé de nouveau. Les deux surnageants combinés à un volume d'éthanol très froid ont été laissés au repos pour la nuit. Après centrifugation, le culot a été lavé trois fois à l'éthanol et le culot repris dans l'eau distillée et centrifugé 7 minutes à 230 x g et le surnageant aliquoté, dosé et lyophilisé. La présence, la pureté et l'intégrité de la MBP a été vérifiée par immunobuvardage de type Western (Gruslin, 2002).

Avant utilisation, le contenu d'un tube de MBP lyophilisée a été dissout dans 4 mL de PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), stérilisé sur filtre $0,22$ μ m (Millipore, cat. SLGP033RS) et dosé selon la méthode décrite plus loin (mêm section). La solution ajustée à 1 mg/mL, aliquotée et conservée à -20 °C.

Ovalbumine. L'albumine d'œuf (Sigma-Aldrich, cat. A-7642) a été dissoute dans 18 mL de PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) puis stérilisée sur filtre $0,22$ μ m (Millipore, cat. SLGP033RS). Après le dosage protéique tel que décrit plus loin, la solution a été ajustée à 1 mg/mL et aliquotée pour conservation à -20 °C. L'antigène a été employé à la concentration finale de 10 μ g/mL.

Peptide Hb₆₄₋₇₆. Le peptide spécifique pour le TCR des souris transgéniques 2.102 tg et le peptide aléatoire témoin (Q72) ont été produits et fournis gracieusement par le Dr Claude Daniel (INRS - Institut Armand-Frappier) et ont été employés aux concentrations finales de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 et 10,0 μM .

Phorbol 12-myristate 13-acétate/Ionomycine. Le PMA (Sigma, cat. P1585) et l'ionomycine (Sigma, cat. I0634) ont été préparés dans le DMSO à 1 mg/mL pour conservation à -20 °C. Les deux molécules ont été employées à la concentration finale de 0,01 et 0,2 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Le PMA est un activateur des protéines kinases C (Liu et Heckman, 1998) et son action, conjuguée à l'ionophore du calcium ionomycine (transporteur d'ion Ca^{2+}) induit la division cellulaire et chez les lymphocytes T la production de cytokines dont l'IL-2.

Dosage des protéines. Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode mise au point par Bradford (Bradford, 1976). Les échantillons ont été dosés à plusieurs dilutions dans le PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), toujours en duplicata. Un volume de 100 μL de solution à 40 % (v/v) de colorant (Bio-Rad Laboratories, cat. 500-0006) a été ajouté à chaque puits d'un plateau à 96 puits à fond plats (Costar, cat. 3369) contenant 100 μL de protéine à doser. Après dix minutes, l'absorbance de chaque puits a été quantifiée au lecteur de plateaux Easy Reader (SLT-Labinstruments, EAT 400AT). La quantité de protéine a été calculée à l'aide d'une courbe standard obtenue en diluant une solution d'albumine de boeuf (BSA) ou d'immunoglobuline selon la nature des protéines à doser.

2.6.3.2 Lymphoprolifération

Pour le test de lymphoprolifération (Figure 12), les cellules à tester ont été diluées dans le RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11875-101) complet (10 % (v/v) SVF, HEPES 0,01 M, Na-Pyruvate 1mM, Pénicilline 50 U/mL, Streptomycine 100 U/mL, β -Mercaptoéthanol 50 μM) à 1×10^6 cellules par mL pour les splénocytes et les CPA ou à $0,2 \times 10^6$ cellules par mL pour les lymphocytes T purifiés ou isolés du SNC. Après distribution de 200 μL de cellules par puits de plateaux de 96 puits (Costar, cat. 3595), les antigènes ou autres

stimulants ont été ajoutés dans 10 μL par puits et les plateaux incubés à 37 °C avec 5 % de CO_2 pour deux jours. De la *thymidine* tritiée (MP, cat. 2406005) a ensuite été ajoutée aux puits (0,5 μCi dans 10 μL) et les plateaux incubés de nouveau pour 18 heures à 37 °C avant le transfert sur filtre (Wallac, cat. 1450-421) au « *Harvester* » (TOMTEC, ver.1.02) et décompte de la radioactivité incorporée avec une solution de scintillation (Beta Plate Scint, Perkin Elmer, cat. 1205-440) au Trilux (Wallac, 1450 Microbeta). Dans chaque expérimentation et chaque plateau, des puits ont été stimulés avec une solution de PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) comme témoin négatif et d'autres avec un témoin positif comme la ConA (Sigma, cat. C5275) ou l'anticorps αCD3 (clone 145-2C11). Les puits avec des comptes de moins de 100 coups par minute (cpm) ont été exclus (il s'agit généralement d'une erreur technique) ces puits n'ayant probablement pas reçu de [^3H] thymidine. Les puits où les cellules ont été stimulées au PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) donnant des signaux inférieurs à 1500 cpm alors qu'il est normal de s'attendre à des signaux de 20 000 cpm voir même jusqu'à 100 000 cpm et plus (combinaison αCD3 et αCD28). Le signal obtenu varie aussi selon le nombre de cellules stimulées, le temps de culture, la dose de thymidine tritiée et la nature du stimulant employé.

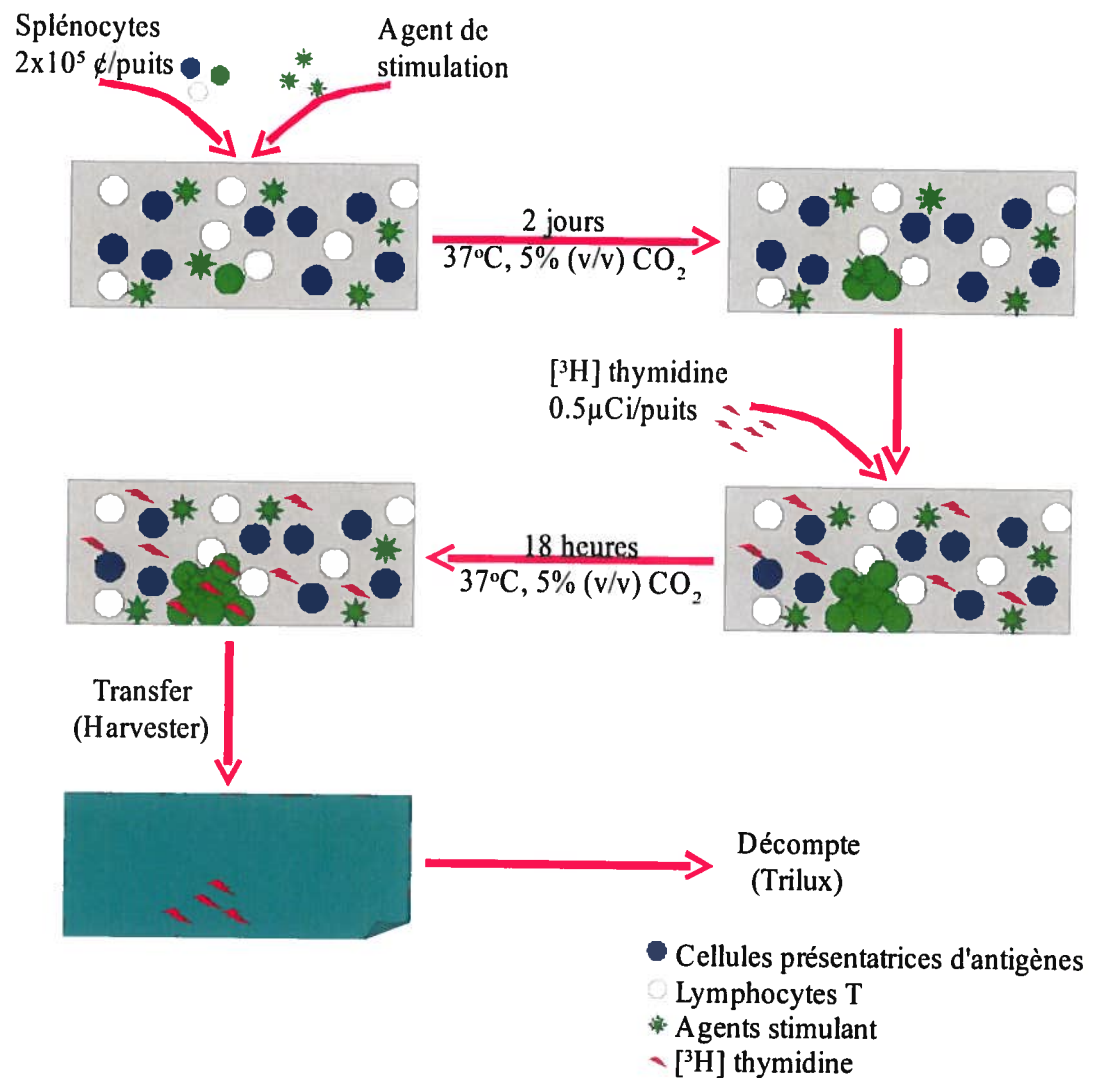


Figure 12: Schéma expérimental de lymphoprolifération.

Les cellules d'intérêt sont mises en présence de stimulants pour deux jours de culture avant l'ajout de [³H] thymidine pour une journée supplémentaire. Le contenu des puits est transféré sur les filtres où l'ADN est retenu alors que les nucléotides libres sont éliminés. Le décompte radioactif est proportionnel à la thymidine incorporée aux nouveaux brins d'ADN synthétisés.

2.6.3.3 Cellules présentatrices d'antigènes

Les CPA ont été préparées à partir de splénocytes isolés de la façon décrite précédemment et irradiés en suspension dans le RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11875-101) 1 % (v/v) SVF avec une dose de 5000 rads afin d'éliminer toutes capacités de prolifération.

2.6.3.4 Lymphoproliférations croisées

Afin de mesurer la contribution respective des CPA et des lymphocytes T dans la prolifération obtenue, un test croisé a été développé (Figure 13). Brièvement, les splénocytes de souris témoins et infectées ont été isolés comme décrit précédemment. Une partie de ces lymphocytes a été irradiée afin de servir de CPA. De la portion restante, les lymphocytes T ont été isolés selon le protocole EasySep® décrit auparavant. Les cellules ont ensuite été mélangées à raison de $0,5 \times 10^6$ cellules par mL de CPA et $0,2 \times 10^6$ cellules par mL de cellules T avant stimulation pour le test de prolifération.

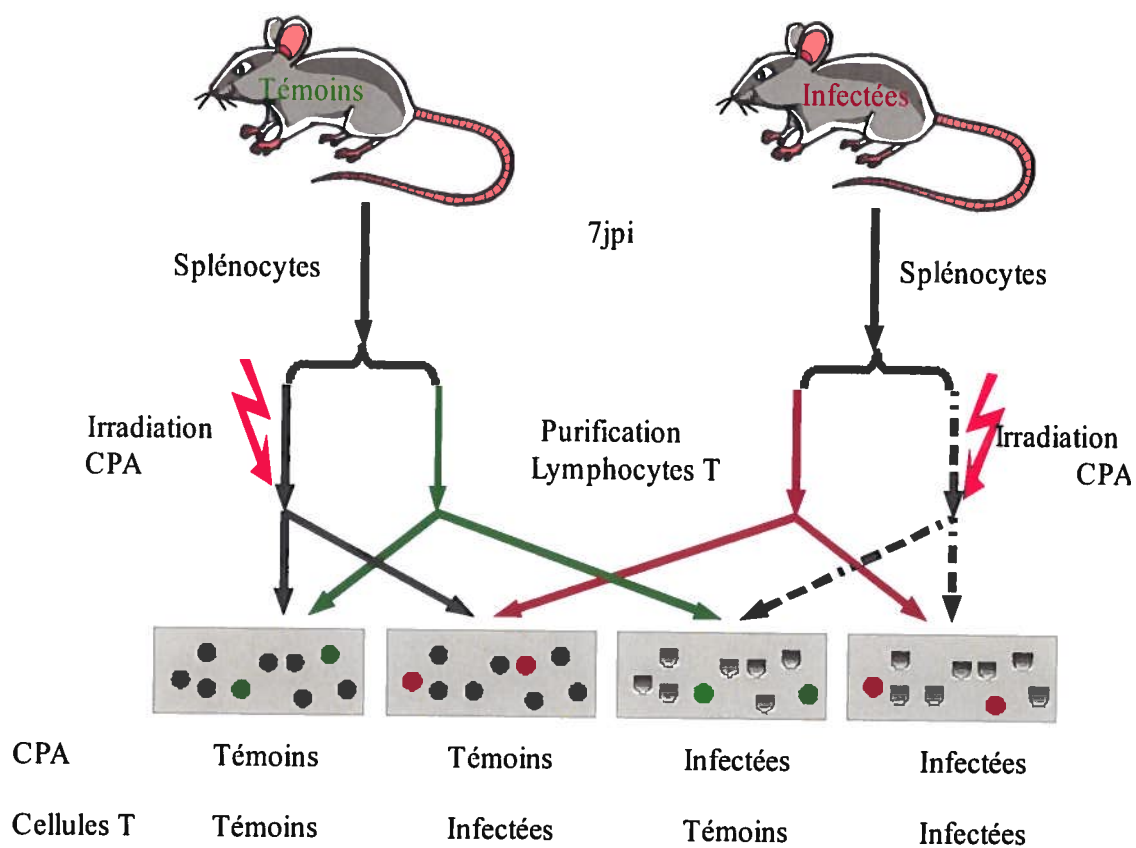


Figure 13: Schéma expérimental de lymphoprolifération croisée.

Suite à l'isolement des splénocytes une partie de ceux-ci ont été irradiés pour servir de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) non proliférantes tandis que de l'autre partie a été purifiée les lymphocytes T. Les CPA et cellules T purifiées ont été mélangées de façon à mettre en contact des cellules de diverses sources.

2.6.3.5 Suivi des divisions cellulaires

Les cellules obtenues tel que décrit précédemment (Section 2.6.2.1), ont été marquées au 5(6)-carboxyfluoresceine diacétate N-succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen, cat. C1157) afin de suivre leurs divisions en conditions de lymphoprolifération *in vitro*. La concentration des cellules à marquer a été ajustée à environ 5×10^6 cellules/mL dans du RPMI-1640 sans sérum (Invitrogen, cat. 11875-101) chauffé à 37 °C dans un tube de 15 mL (≤ 2 mL) ou 50 (> 2 mL). La moitié du milieu est ajouté pour défaire le culot de cellules tandis que l'autre moitié est ajoutée avec le CFSE dilué (1:2000 à 1:4000). Des cellules non marquées ont été employées comme témoin négatif. Les cellules ont été incubées dans la solution de marquage 10 minutes à 37 °C avec agitation à mi-parcours. Afin de neutraliser le CFSE non incorporé, un demi-volume de SVF a été ajouté pour 5 minutes à température ambiante puis les tubes ont été remplis de RPMI-1640 (Invitrogen, cat. 11875-101). Après centrifugation deux lavages de 10 minutes à 300 x g (Beckman, GS-6R), la concentration de cellules a été ajustée dans le RPMI complet comme décrit pour la méthode de lymphoprolifération.

Suite à l'incubation de deux ou trois jours, les cellules récoltées ont été marquées en surface tel que décrit plus loin en tenant compte du fait que le CFSE et le FITC sont détectés dans le même canal et donc incompatibles. Un tube marqué uniquement au CFSE est conservé comme témoin pour la compensation en cytométrie. Un grand nombre d'événements ont été acquis pour permettre de bien mettre en évidence les différents pics de division (10 000 lymphocytes T).

2.6.4 Cytokines

2.6.4.1 Dosage immunoenzymologique dans le sérum

Le TGF- β_1 activé et total contenu dans les sérums de souris collectés lors du sacrifice à 7 jpi a été dosé par ELISA selon les instructions du fabricant de la trousse « Quantikine Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta 1 ELISA kit » (R&D Systems, cat. MB100B). Le

TGF- β_1 total a été dosé après activation acide et neutralisation, tandis que le TGF- β_1 actif dosé directement à partir du sérum. Pour l'activation, 40 μ L de sérum ont été incubés 10 minutes à température de la pièce avec 10 μ L d'acide chlorhydrique (HCl, 1N) et neutralisés par 8 μ L d'hydroxyde de sodium (NaOH, 1,2N). Les sérums ainsi activés ont été dilués en ajoutant 10 μ L d'échantillon activé à 590 μ L de diluant « Calibrator RD5-53 ».

Après préparation des échantillons, 50 μ L de ceux-ci ont été ajoutés aux 50 μ L de diluant « RD1-73 » préalablement ajoutés à chaque puits des plateaux fournis dans la trousse. Après une incubation de deux heures à température de la pièce, les puits ont été lavés quatre fois avec le tampon fourni. Après avoir bien vidé les puits de tout liquides, 100 μ L de solution de conjugué à chaque puits les plateaux ont été de nouveau incubés pour deux heures à température de la pièce. Après de nouveaux lavages tel que décrit précédemment, 100 μ L de solution de substrat ont été ajoutés à chaque puits pendant 30 minutes à l'obscurité et arrêt de la réaction à l'aide de 100 μ L de solution d'arrêt fournie. Les densités optiques ont été enregistrées à 450 et 570 nm (Bio-Rad, Microplate Reader 680). La quantité de TGF- β_1 déduite par la soustraction de la DO_{570} de la DO_{450} et comparaison à la courbe standard.

2.6.4.2 Dosage dans les homogénats de rates par matrice

Pour le dosage des cytokines TGF- β_1 , IL-2, IL-4 et IL-10, les échantillons de rates, homogénéisées tel que décrit à la section 2.2.2.1, ont été expédiés sur glace sèche pour le service de détection « Searchlight® Protein Array » (Pierce ThermoFISHER).

2.6.4.3 Dosage immunoenzymologique dans le surnageant de culture de splénocytes et de lymphocyte T

Le TGF- β_1 total contenu dans les surnageants de culture de splénocytes de souris collectés après 2 et 3 jours de culture a été dosé par ELISA selon les instructions du fabricant de la trousse « Human/Mouse TGF β 1 ELISA Ready-SET-Go! Kit » (eBioscience, cat. 88-7449). Le TGF- β_1 total a été dosé après activation acide et neutralisation. Pour l'activation 100 μ L de surnageant a été incubé 10 minutes à température de la pièce avec

20 μL d'acide chlorhydrique (HCl, 1N) et neutralisé par 20 μL d'hydroxyde de sodium (NaOH, 1N). Les sérums ainsi activés ont été dilués en ajoutant 10 μL d'échantillon activé à 590 μL de diluant « Calibrator RD5-53 ».

Après préparation des échantillons, 100 μL de ceux-ci ont été ajoutés aux puits des plateaux fournis dans la trousse. Après une incubation de deux heures à température de la pièce, les puits ont été lavés cinq fois avec le tampon fourni. Après avoir bien vidé les puits de tout liquide, 100 μL de solution d'anticorps de détection ont été ajoutés à chaque puits. Les plateaux ont été de nouveau incubés pendant une heure à température de la pièce. Après de nouveaux lavages tel que décrit précédemment, 100 μL de solution d'Avidine-peroxydase de raifort (HRP) ont été ajoutés à chaque puits pendant 30 minutes à température de la pièce. Après sept lavages tel que décrit précédemment, 100 μL de solution de substrat ont été ajoutés pour incubation 15 minutes. La réaction a été terminée par l'ajout de 50 μL de solution « stop ». Les densités optiques ont été enregistrées à 450 et 570 nm (Bio-Rad, Microplate Reader 680). La quantité de TGF- β_1 déduite par la soustraction de la DO_{570} de la DO_{450} et comparaison à la courbe standard.

2.7 Cytométrie en flux

L'acquisition des données en cytométrie en flux fut accomplie sur l'appareil du laboratoire local de cytométrie (BD, FacsCalibur). Selon la politique de biosécurité du laboratoire de cytométrie, les échantillons de souris ou de cellules infectées *in vitro* furent tous fixés après marquage un minimum d'une heure dans une solution de PFA 1 % (p/v) avant l'acquisition.

Sauf avis contraire, chaque tube (BD Falcon, cat. REK352052) contenait 1×10^6 cellules totales dans un volume de 0,5 à 1 mL. Les compensations nécessaires ont été accomplies sur les cellules de même source et marquées d'un seul fluorochrome à la fois. Afin de maximiser le signal obtenu, les molécules moins abondantes ou intracellulaires ont été marquées avec des anticorps couplés avec les fluorochromes donnant les meilleurs signaux ([PE \approx PE-Cy5 \approx APC] \gg FITC), lorsque disponibles (PE-Cy5 rarement disponible et APC requière des ajustements supplémentaires).

2.7.1 Cellularité

Les cellules à marquer ont été centrifugées à 300 x g (Beckman, GS-6R) pendant 5 minutes à 4 °C et le culot résultant défait dans la solution de marquage (PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)); BSA 0,5 % (p/v; Boehringer Mannheim, cat. 735094)) en ajustant à la concentration finale de 2×10^7 cellules par mL. Les récepteurs Fc ont ensuite été bloqués en ajoutant 0,5-1 µg par million de cellules de l'anticorps anti-CD16/32 (eBioscience, cat. 14-0161) pendant 5 minutes sur glace. Les cellules ont ensuite été ajoutées (50 µL) aux tubes contenant 50 µL d'anticorps (Tableau XIV) (dilutions déterminées selon le titrage des lots) et incubées sur glace, pour prévenir l'internalisation, 20 minutes dans l'obscurité. Les cellules marquées ont ensuite été lavé à trois reprises avec 2 mL de la solution de marquage et centrifugées 5 minutes à 300 x g (Beckman, GS-6R). Les cellules ont finalement été resuspendues dans la solution de fixation (PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), PFA 1 % (p/v)).

Tableau XIV: Liste des anticorps sélectionnés pour l'analyse en cytométrie en flux.

Cible	eBioscience #cat.	Clone	Isotype
CD3ε (sous-unité epsilon)	-0031-	145-2C11	Hamster arménien IgG
CD4 (L3T4)	-0041-	GK1.5	Rat IgG2b, κ
CD8 (Ly-2)	-0081-	53-6.7	Rat IgG2a, κ
CD19	-0193-	eBio1D3	Rat IgG2a, κ
CD25 (IL-2Ra, p55)	-0251-	PC61.5	Rat IgG1, κ
CD28	-0281-	37.51	Hamster syrien IgG
CD69 (Very Early Activation Antigen)	-0691-	H1.2F3	Hamster arménien IgG
CD90.2 (Thy-1.2) ^a	-0902-	53-2.1	Rat IgG2a, κ
FoxP3 (Forkhead box P3, Scurfin)	-5773-	FJK-16s	Rat IgG2a, κ
TGF-β ₁	R&D Systems IC240P	9016	Souris IgG1
Témoins			
Rat IgG2b, κ	-4031-	N.D.	
Rat IgG1, κ	-4301-	N.D.	
Rat IgG2a, κ	-4321-	N.D.	
Rat IgG2b, κ	-4331-	N.D.	(PeCy5.5) ^b
Hamster arménien IgG	-4888-	N.D.	
Hamster syrien IgG	-4914-	N.D.	
Souris IgG1	R&D Systems IC002P	N.D.	

^a Marquage des lymphocytes T ayant été stimulés avec l'αCD3

^b CD3/APC et CD4/PeCy5.5 (pour exp. CFSE), chevauchement moindre que Cy5

2.7.2 *Lymphocytes T régulateurs*

Les lymphocytes T régulateurs de souris ont été détectés en suivant les instructions du fabricant de la trousse de détection « Mouse FoxP3 Staining Set » (eBioscience, cat. 72-5775). Sommairement, les cellules à l'étude ont d'abord été marquées en surface tel que décrit précédemment. À l'étape de fixation, le tampon de fixation/perméabilisation de la trousse a toutefois remplacé la PFA 1 % (p/v). Après incubation à 4 °C pendant 30 minutes dans l'obscurité, les cellules ont été lavées deux fois avec 2 mL de tampon de perméabilisation et centrifugées à 300 x g (Beckman, GS-6R) pendant 5 minutes. L'anticorps anti-FoxP3 et le témoin isotypique ont été ensuite dilués dans 100 µL de tampon de perméabilisation pour défaire le culot de cellules. Après l'incubation finale de 30 minutes à 4 °C, les cellules ont été lavées deux fois avec 2 mL de tampon de perméabilisation. Les cellules ont été dissociées dans 1 mL de PFA 1 % (p/v) avant l'acquisition au cytomètre.

2.7.3 *Marquage intracellulaire*

Les splénocytes précédemment infectés *in vitro* ont été marqués en surface comme décrit auparavant avant d'effectuer le marquage intra/extracellulaire. Après l'étape de marquage de surface avec l'anticorps αMHV/FITC les cellules ont été fixées, mais 100 µL de tampon de fixation (eBioscience, cat. 00-8222) a remplacé la PFA 1 % (p/v). Après incubation de 20 minutes à température ambiante et dans l'obscurité, les cellules ont été lavées 2 fois avec 1 mL de tampon de perméabilisation (eBioscience, cat. 00-8333) et centrifugées à 300 x g (Beckman, GS-6R) pendant 5 minutes. L'anticorps αMHV/FITC ou le témoin isotypique a été ensuite dilué dans 20 µL de tampon de perméabilisation pour défaire le culot de cellules. Après l'incubation finale de 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité, les cellules ont été lavées 2 fois avec 1 mL de tampon de perméabilisation. Les cellules ont été dissociées dans 1 mL de PFA 1 % (p/v) avant l'acquisition du signal au cytomètre.

2.8 Manipulations *ex vivo*

2.8.1 Infection *ex vivo*

Un million de cellules, splénocytes ou lymphocytes T, à infecter ont été centrifugés à 300 x g pour 10 minutes (Beckman, GS-6R) et le culot resuspendu dans 500 µL de surnageant de DBT infecté à $2,0 \times 10^7$ UFP/mL (MOI=10). Après 1 heure d'incubation à 37 °C avec le virus les cellules ont été lavées 3 fois avec du RPMI 1 % (v/v) SVF et centrifugation avant d'être ajustée à la concentration de $1,0 \times 10^6$ cellules/mL et placées à l'incubateur à 37 °C pour 24 et 48 heures.

2.8.2 Lymphoprolifération et virus

Des splénocytes et des lymphocytes T ont été mis en contact avec une solution virale préalablement mise en contact une heure avec un surnageant d'anticorps anti-MHV (7-10A13) ou anti-HCoV-229E (7-8D4) produit au laboratoire. Les cellules et le virus ont été incubés pendant cinq heures à 37 °C avec 5 % (v/v) CO₂. Les cellules ont finalement été distribuées en plateaux adsorbés de l'anticorps αCD3 (145-2C11) et stimulées avec l'anticorps αCD28 ou l'IL-2rh. Les plateaux ont par la suite été incubés et analysés tel que décrit à la section 2.6.3.2 .

2.9 Statistiques

Lorsque mentionné les valeurs pour les souris témoins et infectées ont été analysées par un test statistique de Mann-Whitney. Ce test est non paramétrique, ne faisant aucune hypothèse sur la forme des distributions des observations, et permet de comparer deux échantillons contenant des nombres différents d'observations. Lorsque les tests ont été effectués sur les cellules de souris individuelles, l'analyse des variances (ANOVA) non paramétrique ou test de Kruskal Wallis a été effectuée et lorsque significatif un test de comparaison multiple de Dunn. Ce test est préférable à des répétitions de test de t sur chaque paire de résultats. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism®, version 5, de la compagnie GraphPad.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3 PARAMÈTRES DE L'INFECTION VIRALE PERSISTANTE AVEC MALADIE DE DÉMYÉLINISATION DU SNC

3.1 Brève introduction

Le modèle de maladie démyélinisante du SNC par le MHV varie en fonction de la souche et de l'âge de l'hôte, tout comme de la souche, de la dose et de la voie d'inoculation du virus (Matthews *et al.*, 2002b). Avant même d'amorcer le projet de recherche, il convenait donc de sélectionner les paramètres du modèle. Tandis que la souche de souris SJL n'est que peu ou pas susceptible à l'infection, les souris BALB/c et C57BL/6 sont tout à fait susceptibles (Smith *et al.*, 1984). Cependant puisque la majorité des modèles de souris transgéniques sont produits sur un fond génétique de souris C57BL/6, ces dernières ont été préférées pour le projet. Dans la majorité des maladies auto-immunes les femmes sont plus susceptibles, ce qui est aussi le cas dans certains modèles animaux de ces maladies (Whitacre, 2001). Toutefois dans le cas de l'infection chronique démyélinisante par le MHV, les souris mâles et femelles sont également susceptibles (Knobler *et al.*, 1981), même si l'inflammation en phase aiguë est influencée par les hormones sexuelles (Armstrong *et al.*, 2005). Dans un souci de restreindre les variables de notre étude, les souris femelles ont été sélectionnées. Dans les publications sur le modèle, une très large gamme d'âges de souris, de 4 à 8 semaines, ont été employés avec succès. Encore une fois, par souci de limiter les variations de l'étude, des souris de 21-28 jours ont été choisies pour infection à 28-35 jours d'âge suite à la semaine réglementaire d'acclimatation en animalerie. Comme il est déjà établi que les souches neurovirulentes du MHV, soit A59 et JHM, sont capables d'infecter le SNC suite à l'inoculation i.n. (Carthew et Sparrow, 1981; Goto *et al.*, 1977; Hirano *et al.*, 1981), les souris ont plutôt été infectées par inoculation i.c. Cette voie a été préférée dans l'espoir d'obtenir une dose infectieuse atteignant le SNC de façon plus reproductible et de limiter les variations entre les individus. La souche MHV-JHM étant trop virulente (données non montrées), la souche MHV-A59, induisant aussi une encéphalite aiguë suivie de démyélinisation du SNC en phase chronique, a été préférée. Par contre, cette souche cause également une hépatite modérée à sévère (Weiss et Leibowitz, 2008). Dans cette section, les expérimentations ont été effectuées dans le but d'identifier une dose infectieuse pour MHV-A59 conciliant à la fois un haut taux de survie et l'induction d'une maladie de démyélinisation du SNC.

La démyélinisation observée en phase chronique de l'infection par MHV-A59 survient après le contrôle de l'infection par le système immunitaire et la disparition des particules virales infectieuses. Le virus parvient toutefois à persister sous forme d'ARN génomique. L'infection cytopathique des oligodendrocytes (Herndon *et al.*, 1977) semble maintenant exclue des mécanismes induits par le virus pour causer la démyélinisation, et la réponse immunitaire, antivirale ou auto-réactive est impliquée à divers degrés (Marten *et al.*, 2000a; Wu *et al.*, 2000a; Wu et Perlman, 1999). Malgré cette réaction immunitaire dans le SNC, le MHV induit des troubles immunologiques qui sont décrits depuis de nombreuses années. Par exemple, il a été rapporté que l'infection par MHV induisait un délai dans la guérison des plaies (Kenyon, 1983) ou dans le rejet des greffons cutanés (Cray *et al.*, 1993) et l'infection par MHV-3 réduit l'habileté des souris hôtes à séroconvertir à d'autres antigènes ou virus (Carrano *et al.*, 1984; de Souza *et al.*, 1991; Leray *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1987b). Dans cette section les effets du virus sur les organes et cellules du système immunitaire des souris hôtes furent explorés au niveau morphologique, histologique et cellulaire.

3.2 Procédure expérimentale

Les souris femelles de souche C57BL/6 de 28-35 jours ont reçu, sous anesthésie et analgésie générales, une série de doses de MHV-A59 inoculées par voie i.c. dans un volume de 50 μ L. Par la suite, leur poids et les signes neurologiques ont été enregistrés quotidiennement. Des souris ont été sacrifiées à tous les jours pendant les dix premiers jours pour prélever la rate, le foie, les poumons et le cerveau qui, une fois homogénéisés dans le PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)), ont été analysés pour en évaluer le contenu en virus infectieux sur feuillet de cellules DBT. D'autres souris ont été sacrifiées à tous les cinq jours sur une période de trente jours pour en prélever le cerveau qui a été homogénéisé dans le Trizol pour en extraire l'ARN pour la détection du génome viral en RT-PCR. Un dernier groupe de souris a été sacrifié à 15, 20, 25 et 30 jpi par perfusion au PBS (sans calcium ni magnésium (Dulbecco et Vogt, 1954)) puis PFA 4 % (p/v) pour prélever les organes du SNC et obtenir des coupes histologiques afin d'effectuer le suivi histologique des lésions, particulièrement la démyélinisation.

Les agents mitotiques ConA et α CD3 qui produisent efficacement une stimulation générale des lymphocytes T, sans égard à la spécificité de leur TCR, ont été employés dans une cinétique de la capacité proliférative des splénocytes dans le but de déterminer le moment de réponse minimale suite à l'infection. À titre d'organes lymphoïdes d'importance, le thymus et la rate ont été de prime abord étudiés. Les ganglions lymphatiques cervicaux et le SNC, plus pauvres en cellules ont aussi été employés puisqu'en premières lignes de la lutte contre l'infection virale par MHV-A59. Le thymus et la rate ont été prélevés à 7 jpi pour l'observation morphologique ainsi que la réalisation des coupes histologiques en coloration H&E. La cellularité à 7 jpi dans le SNC, dans les ganglions lymphatiques cervicaux, la rate et le thymus a été déterminée par un triple marquage α CD3/FITC, α CD4/PE, α CD8/PE-Cy5. Pour la rate, un marquage α CD3/PE et α CD19/PE a été effectué pour détection en cytométrie.

3.3 Résultats

3.3.1 Dose infectieuse et survie

Selon les données scientifiques disponibles, la dose létale pour 50 % des souris (DL_{50}) de MHV-A59 se situe entre 3000 et 6000 UFP (Coley *et al.*, 2005; Das Sarma *et al.*, 2000; Lavi *et al.*, 1984c; Phillips *et al.*, 1999; Rempel *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 1996). Une dose inférieure devrait donc permettre un taux de survie supérieur à 50 %. La souche MHV-A59 employée ici a induit une mortalité très élevée jusqu'à une dose de 1000 UFP (Figure 14). Seule la dose de 450 UFP a permis un taux de survie supérieur à 50 % (plus de 95 %; Figure 14).

La dose de 450 UFP a ensuite été conservée tout au long de l'étude. Elle a induit rapidement (dès 2 jpi) et chez toutes les souris infectées, des signes classiques de maladies comme les poils ébouriffés, un comportement de replis asocial, le dos courbé, etc. En plus, les souris ont développé, à un degré variable des troubles d'origine neurologique, tels que les troubles de la locomotion et du retournement (données non montrées). De plus, malgré les injections quotidiennes de solution de réhydratation et la nourriture malléable placée à

leur portée dans le fond de la cage, les souris ont souffert d'une déshydratation et d'une perte de poids fort importante. Les souris infectées par la souche A59 ont perdu de 20 à 30 % de leur poids de départ, qu'elles ont récupéré avant 20 jpi (Figure 15). Malgré cela, grâce à un suivi étroit et l'injection de solution de réhydratation, plus de 95 % des souris ont survécu à la phase aiguë de l'infection.

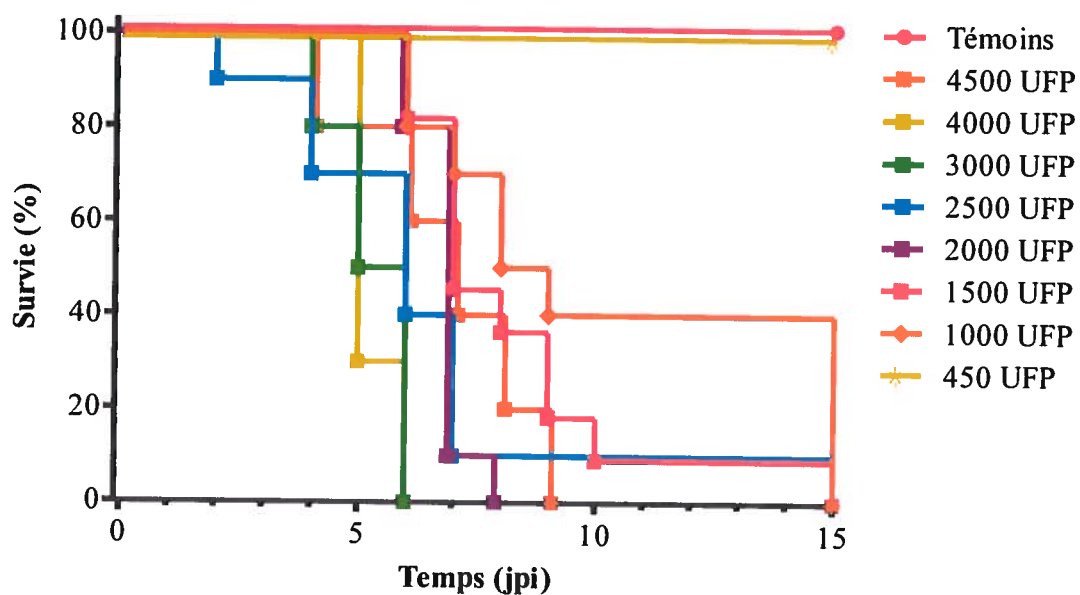


Figure 14: Survie de souris C57BL/6 à l'infection par MHV-A59.

Les souris C57BL/6 femelles de 28-35 jours ont été inoculées avec 50 µL i.c. de doses variables (n=10/dose) de MHV-A59 ou de milieu de culture stérile (témoin). Les souris ont été observées quotidiennement et ont reçu des injections de solution de réhydratation en plus d'avoir un accès facilité à la nourriture (sèche et en gélose au fond de la cage). Les souris ayant atteint le score neurologique de 5 ou un autre point limite ont été euthanasiées et comptabilisées dans la mortalité.

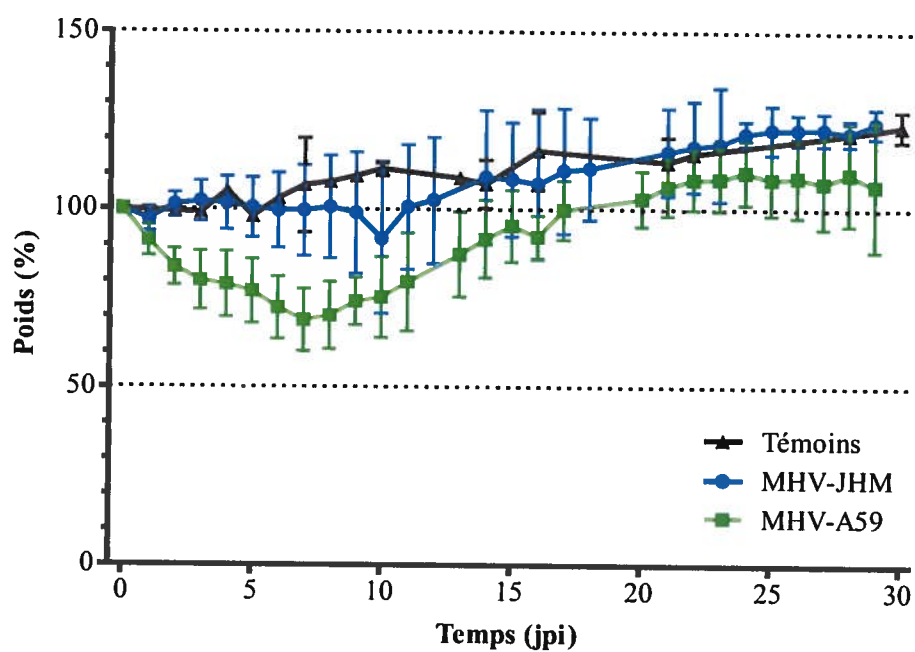


Figure 15: Poids corporel suite à l'infection de souris C57BL/6 par MHV de souches JHM et A59.

Poids quotidiens des souris C57BL/6 femelles de 28-35 jours infectées par inoculation i.c. de 1 UFP de MHV-JHM (30 % de mortalité), de 450 UFP de MHV-A59 (5 % de mortalité) et de milieu de culture stérile (témoins). Les souris ayant perdu plus de 30 % de leur poids initial ont été euthanasiées selon l'ordonnance du comité d'éthique en santé animale.

3.3.2 *Cinétique virale*

Le virus infectieux n'a été détecté que dans les dix premiers jours suivants l'infection au cerveau et au foie, la rate et les poumons demeurant presque toujours négatifs (Figure 16). Le titre infectieux au cerveau déjà important dès 2 jpi s'est maintenu jusqu'à 5 jpi avant de chuter après 7 jpi. Par contre au foie, le virus était présent dès 2 jpi, mais le titre viral n'a atteint un sommet qu'à 4 jpi avant de tomber sous le seuil de détection dès 7 jpi (Figure 16).

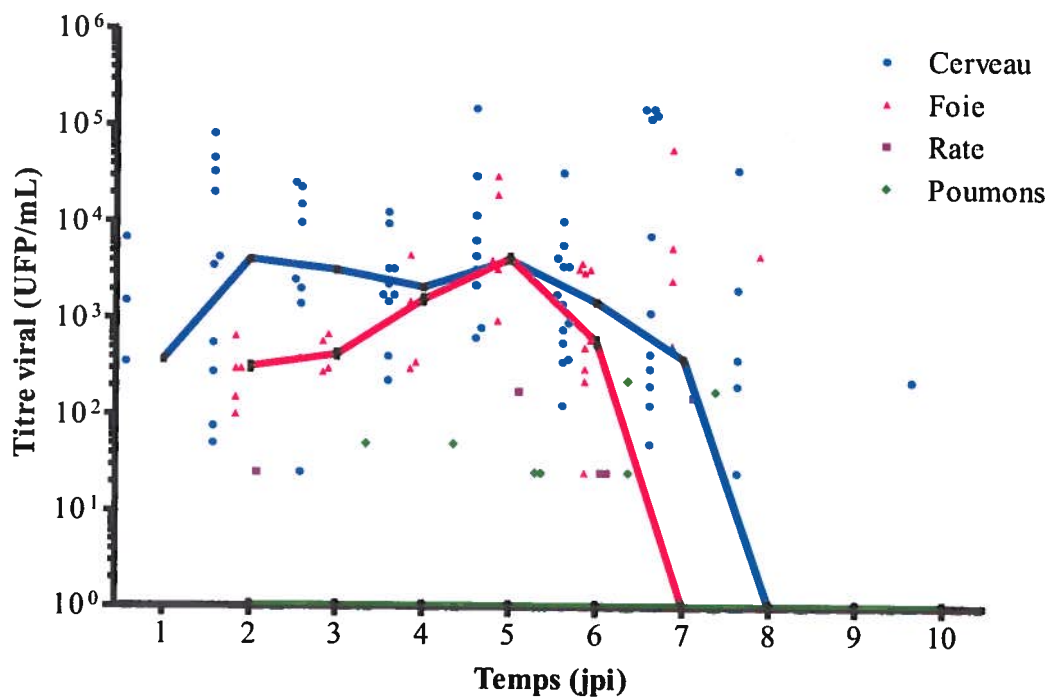


Figure 16: Titres viraux dans certains organes lors de la phase aiguë de l'infection de souris C57BL/6 par MHV-A59.

Titres en particules virales infectieuses retrouvés chez les souris individuelles (points) et titre médian (trait), tel que déterminés sur feuillet de cellules DBT. Les particules virales infectieuses ont été titrées entre 1 et 10 jpi (n=10/jour) dans des homogénats de cerveau (●), de foie (▲), de rate (■) et des poumons (◆) de souris C57BL/6 femelles de 28-35 jours ayant reçues par injection i.c. 450 UFP de MHV-A59.

3.3.3 *Persistence virale*

Suite à la réaction de transcription inverse (RT), avec les amorces d'oligos dT permettant la rétrotranscription de tous les ARNm présents dans l'échantillon, les ADNc obtenus ont été amplifiés (PCR) avec des amorces spécifiques pour le gène codant pour la GAPDH, le gène N du MHV et une paire d'amorces de détection de la transcription de l'ARN génomique viral en ARNm (RepMHV(N)). Tel que révélé par la présence du transcrit encodant la GAPDH (Figure 17), tous les échantillons provenant de rates et de cerveau de souris témoins et infectées contenaient du matériel génétique. De plus, tous les témoins négatifs de RT et de PCR, sont demeurés sans trace visible de transcrits (Figure 17). Les échantillons provenant de souris témoins ne contenaient pas d'ARN génomique viral tandis que les échantillons de souris infectées étaient positifs pour le SNC à 5, 10, 15, 20, 25 et 30 jpi (Figure 17). De plus la totalité de ces échantillons, de 5 à 30 jpi, était positive pour la présence de l'ARNm spécifique de la nucléoprotéine (Figure 17), démontrant la présence d'une activité de transcription à partir de l'ARN génomique viral. Par contre, seules quelques rates étaient positives pour l'ARN génomique à 5 et 10 jpi (Figure 17). Sur ces cinq échantillons positifs à la rate, seuls deux ont révélé des niveaux détectables de transcrits ARNm pour la nucléoprotéine (Figure 17).

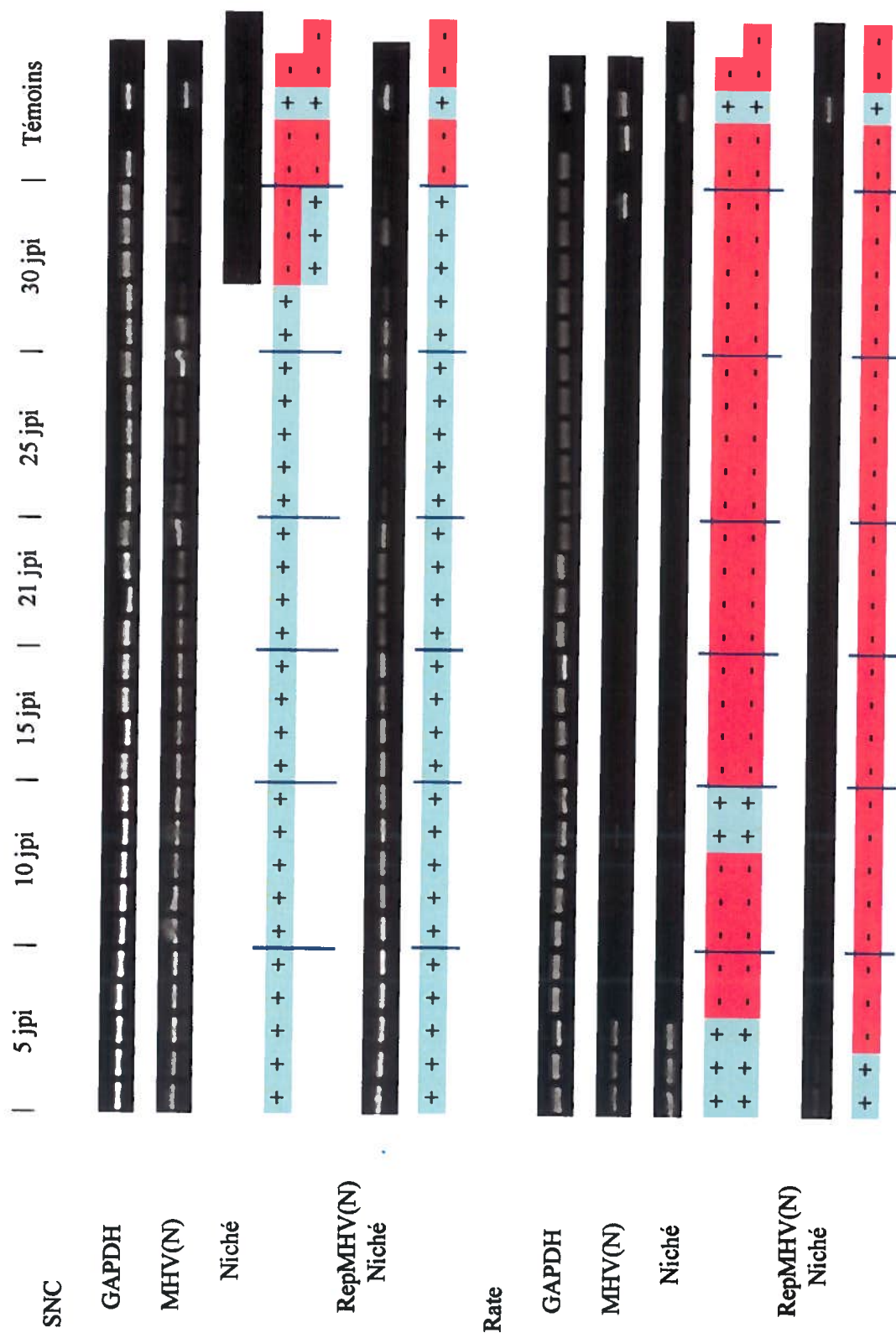


Figure 17: Persistance de l'ARNm viral et réplication génomique au sein du système nerveux central et de la rate de souris C57BL/6 infectées par MHV-A59.

Des souris C57BL/6 femelles ayant reçues 450 UFP de MHV-A59 par voie i.c. ont été sacrifiées tous les cinq jours pendant un mois et leurs cerveaux et leurs rates homogénéisées et l'ARN total extrait au Trizol. Les ARNm ont été transcrits en ADNc (RT avec amorces oligos dT) et les gènes cibles amplifiés par polymérisation en chaîne (PCR) de 30 cycles (amorces GAPDH, MHV(N)). L'amplification par PCR niché a été réalisée par ré-amplification (amorces MHV(N) niché et RepMHV(N) niché) du produit de 20 cycles à l'aide des amorces précédentes (MHV(N) et RepMHV(N) respectivement). Dix microlitres des amplifications ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % avec un courant de 100 V pendant au moins une heure. Les ARN extraits de souris saines, en infection aiguë et de l'eau stérile (traitée au DEPC) ont été employé comme témoins.

3.3.4 *Démyélinisation du SNC*

Chaque échantillon a été évalué pour la présence et l'étendue des lésions visibles avec la coloration de la myéline au LFB, les infiltrations cellulaires à l'hématoxyline et éosine (H&E) et les macrophages et microglies activés, exprimant Mac-2 (α Mac-2). La myéline, la composante principale de la matière blanche, riche en lipides, est colorée en bleu par le LFB. Pour les échantillons ainsi traités, la matière blanche de la moelle épinière des souris témoins et infectées s'est coloré de bleu alors que la matière grise, centrale, est demeurée incolore (Figure 18). L'absence de myéline a ainsi été mise en évidence par l'apparition de zones ou plaques blanches dans la matière blanche chez les souris infectées (Figure 18). La coloration H&E met en évidence le noyau des cellules. Donc dans les zones normalement peu denses en cellules comme la matière blanche de la moelle épinière, peu de noyaux sont visibles. Dans le cas de la maladie induite par MHV, ces infiltrations ont été surtout visibles en périphérie des vaisseaux sanguins. Toutefois, le marquage anti-Mac-2 permet d'identifier les macrophages et les microglies, dans un état activé (Ho et Springer, 1982; Walker *et al.*, 1995). Dans ce modèle expérimental, ce marquage correspondait parfaitement avec les plaques de démyélinisation (Figure 18) et précédait parfois l'apparition de ces plaques. Les lésions de la moelle épinière, telles que définies par l'apparition des plaques de démyélinisation, l'infiltration cellulaire ou l'activation de macrophages et microglies étaient visibles dès 15 jpi (données non montrées). Par contre, il a fallu attendre 30 jpi pour que la majorité des tissus ne soit affectée de plaques de démyélinisation de tailles importantes, d'infiltrations et d'activation des cellules macrophagiques (Tableau XV).

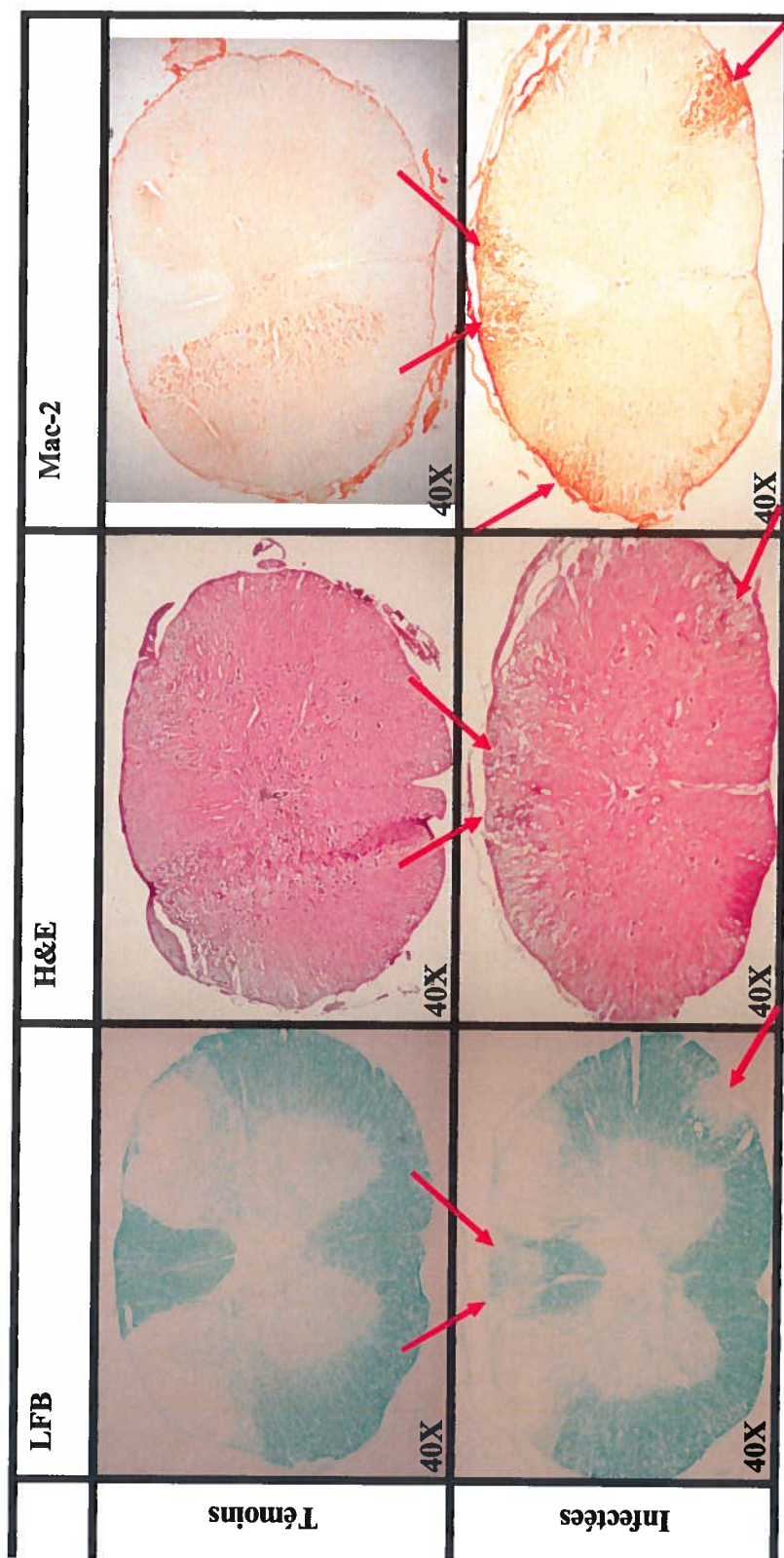


Figure 18: Lésions de démyélinisation avec infiltrations cellulaires et activation des macrophages et microglies dans la moelle épinière de souris C57BL/6 suite à l'infection par MHV-A59.

À 30 jpi les moelles de souris C57BL/6 femelles témoins (haut) et infectées (bas) i.c. par 450 UFP de MHV-A59 ont été colorées au *luxol fast blue* (gauche) à l'hématoxyline et éosine (centre) et en immunohistochimie pour le marqueur d'activation Mac-2 (droite). Deux lésions de démyélinisation sont visibles à deux endroits de la coupe représentative des moelles de souris infectées avec activation correspondant des macrophages et microglies. Également une zone d'activation des microglies (marquage Mac-2) sans présence correspondante de démyélinisation est aussi visible.

Tableau XV: Cinétique d'apparition des lésions au sein du système nerveux central suite à l'infection par MHV-A59.

Suivi à 15, 20, 25, 30 jpi des signes de lésions: démyélinisation, infiltration et activation de cellules macrophagiques/microgliales. Nombre de souris évaluées (n=5/jour, sauf 4 pour 15 jpi) pour chaque type de lésion: Luxol fast blue (LFB), Hématoxyline et éosine (H&E), Mac-2.

	15		20			25			30		
(nb de souris)											
Aucune lésion	4	1	3	2		2	3		1	2	
Lésions présente(s)	4	3	2	3	5	3	2	5	4	3	5

3.3.5 Cinétique d'immunosuppression

Diverses études ont montré une diminution marquée de la prolifération globale des splénocytes de souris infectées par MHV (Cook-Mills *et al.*, 1992; Cray *et al.*, 1993; de Souza et Smith, 1991; de Souza *et al.*, 1991; Kyuwa *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1987b; Smith *et al.*, 1991). Cette diminution étant par contre très variée d'une étude à l'autre il convenait avant tout d'observer à quel moment ce phénomène se produisait dans les conditions expérimentales ici sélectionnées. Afin de mieux mettre en évidence le phénomène en action, une cinétique de prolifération des cellules T a été réalisée avec deux agents mitotiques (ConA, α CD3), dont l'effet est indépendant de la spécificité du TCR. Les rates de souris témoins et infectées ont été prélevées à 4, 7, 10, 14, 20 jpi et les splénocytes recueillis ont été stimulés avec la ConA et l' α CD3. En comparaison avec les splénocytes de souris témoins, les splénocytes de souris infectées ont proliféré en moyenne 25 % plus avec l' α CD3 à 4 jpi, mais avec une très grande variation (+/-50 %) entre les souris (Figure 19). Cependant, toujours à 4 jpi, cette prolifération était de 50 % inférieure à celle des cellules provenant de souris témoins en stimulation avec la ConA, mais avec une variation inter-souris plus réduite (Figure 19). À 7 jpi, les deux stimulations (ConA et α CD3) ont induit seulement 50 % de la prolifération par rapport aux cellules de souris témoins stimulées de façon identique (Figure 19). Dès 10 jpi, la prolifération des cellules de souris infectées induite par α CD3 était revenue à un niveau identique à celui des cellules de souris témoins (Figure 19). Ce niveau demeurait néanmoins à 50 % en stimulation avec la ConA (Figure 19). De 14 à 20 jpi, les stimulations à la ConA et à l' α CD3, produisaient chez les cellules de souris infectées, une prolifération équivalente à celle des cellules de souris témoin (Figure 19). Puisque l'inhibition de prolifération des cellules de souris infectées était maximale à 7 jpi, toutes les expérimentations subséquentes furent produites avec des cellules provenant de souris à 7 jpi.

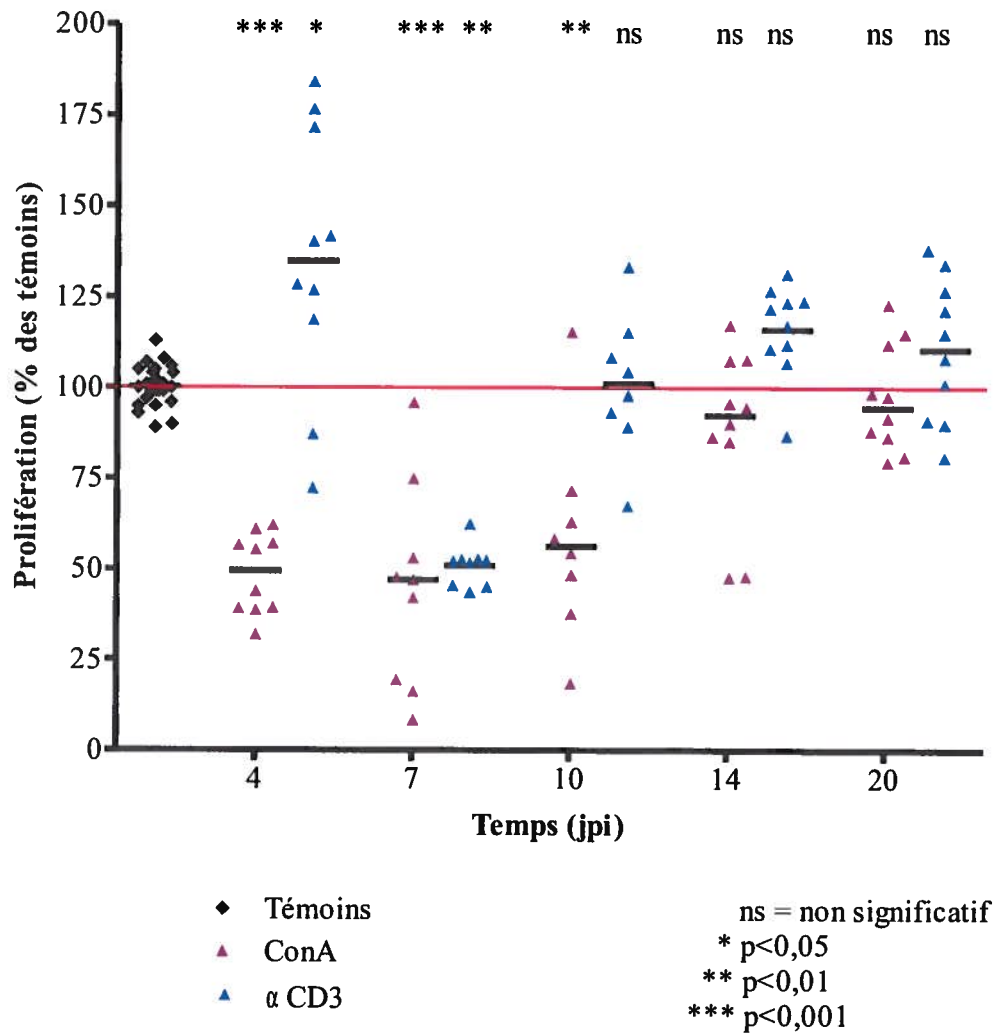


Figure 19: Cinétique de l'immunosuppression suite à l'infection par MHV-A59.

Prolifération à 4, 7, 10, 14 et 20 jpi de splénocytes de souris ayant reçues par voie i.c. 450 UFP de MHV-A59 ou de milieu stérile (témoins \blacklozenge) stimulés avec la concanavaline A (\blacktriangle) ou l'anticorps α CD3 (\blacktriangle). Les comptes de [3 H] thymidine incorporée pour chaque souris ($n=10$ /jour) sont exprimés en pourcentage relatif au compte moyen pour les témoins (ligne rouge à 100 %, prolifération équivalant celle des cellules des souris témoins) accompagné de la médiane pour chaque groupe (—).

3.3.6 Histopathologie

Lors du sacrifice à 7 jpi, les souris infectées possédaient des rates de tailles très variables, parfois comparables aux rates des souris témoins et parfois plus petites (Figure 20). Par contre, les thymus étaient toujours réduits en taille d'un facteur très important (Figure 20).

L'observation histologique des organes lymphoïdes primaires que sont la rate et le thymus a démontré une différence entre les souris témoins et infectées. Les zones corticales des thymus de souris infectées étant nettement moins densément peuplées que dans les thymus de souris témoins (Figure 21). Dans la rate, la pulpe blanche semblait d'apparence similaire entre souris témoins et infectées, mais la zone marginale avec la pulpe rouge était un peu moins densément peuplée chez les souris infectées (Figure 21).

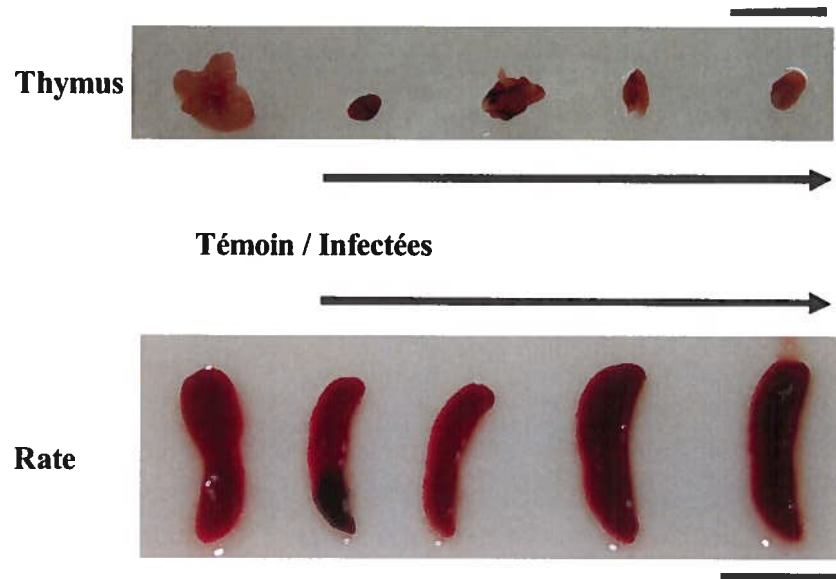


Figure 20: Involutions thymiques et spléniques à 7 jpi suite à l'infection du système nerveux central par MHV-A59.

Morphologie comparée à 7 jpi des thymus (haut) et des rates (bas) de souris C57BL/6 femelles ayant reçu du milieu stérile (témoin, organes à l'extrême gauche) ou 450 UFP de MHV-A59 (4 organes de droite) par injection i.c. à l'âge de 28-35 jours. (— 1 cm).

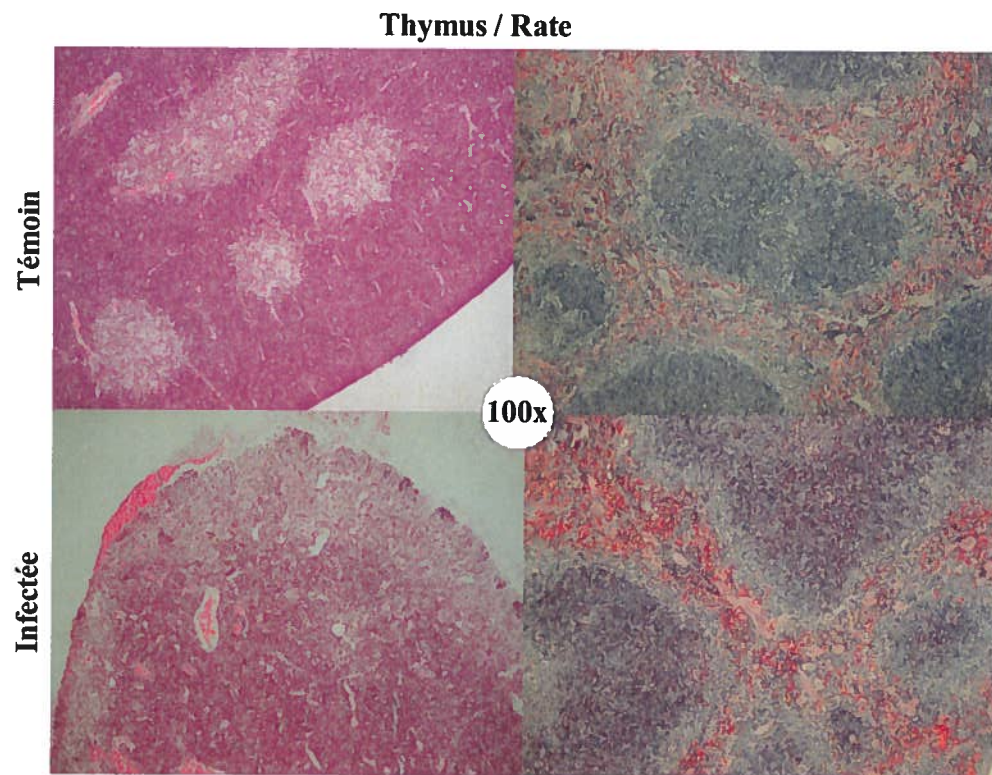


Figure 21: Coupes histologiques de la rate et du thymus.

Coupes au cryostat et coloration hématoxyline et éosine à 7 jpi de thymus (gauche) et de rates (droite), fixés à la paraformaldéhyde, de souris ayant reçu 450 UFP de MHV-A59 (bas) ou de milieu stérile (témoin, haut).

3.3.7 Cellularité

L'étude des populations cellulaires des principaux organes lymphoïdes d'intérêt, soit le SNC (comme site d'infiltration et de formation de centres germinatifs), les ganglions lymphatiques cervicaux, la rate et le thymus a permis de mieux comprendre le phénomène qui survient. À 7 jpi, les lymphocytes T ont infiltré le SNC des souris infectées, quoiqu'en nombre très variable, alors qu'il n'y en avait aucun de détectable chez les souris témoins (Figure 22). Les cellules infiltrantes ne semblent pas avoir dépassé 200 000 cellules pour l'ensemble du SNC et souvent le nombre était encore moindre. Ces cellules T étaient principalement des lymphocytes T CD8⁺, qui composaient plus de la moitié des cellules infiltrantes. Toutefois, au thymus et à la rate, le nombre de lymphocytes T était nettement en réduction chez les souris infectées par MHV-A59 comparativement aux témoins (Figure 22, $p < 0,001$). Le nombre absolu de cellules dans les ganglions n'a pas été évalué, car, contrairement aux autres organes, il est difficile de prélever avec certitude les mêmes ganglions – localisation et nombre – pour tous les animaux. Si, dans les ganglions et la rate, les ratios CD4⁺/CD8⁺ sont demeurés sensiblement identiques, il en fut autrement dans le thymus (Figure 22, $p < 0,05$ pour CD4⁺ et $p < 0,001$ pour les CD8⁺ et CD4⁺CD8⁺). En effet, la population immature des CD4⁺CD8⁺ « doubles positives » a disparu presque totalement et le ratio a basculé en faveur des CD8⁺ « simple positives » avec une légère diminution en importance relative des CD4⁺ « simples positives » (Figure 22).

Cette perte de cellularité n'a pas touché uniquement les lymphocytes T mais aussi les lymphocytes B. Étonnamment, cette perte de près de 50 % des cellules B ($p < 0,001$) était similaire à la perte des cellules T, ce qui n'a pas entraîné de modification dans les ratios T/B à la rate (Figure 23).

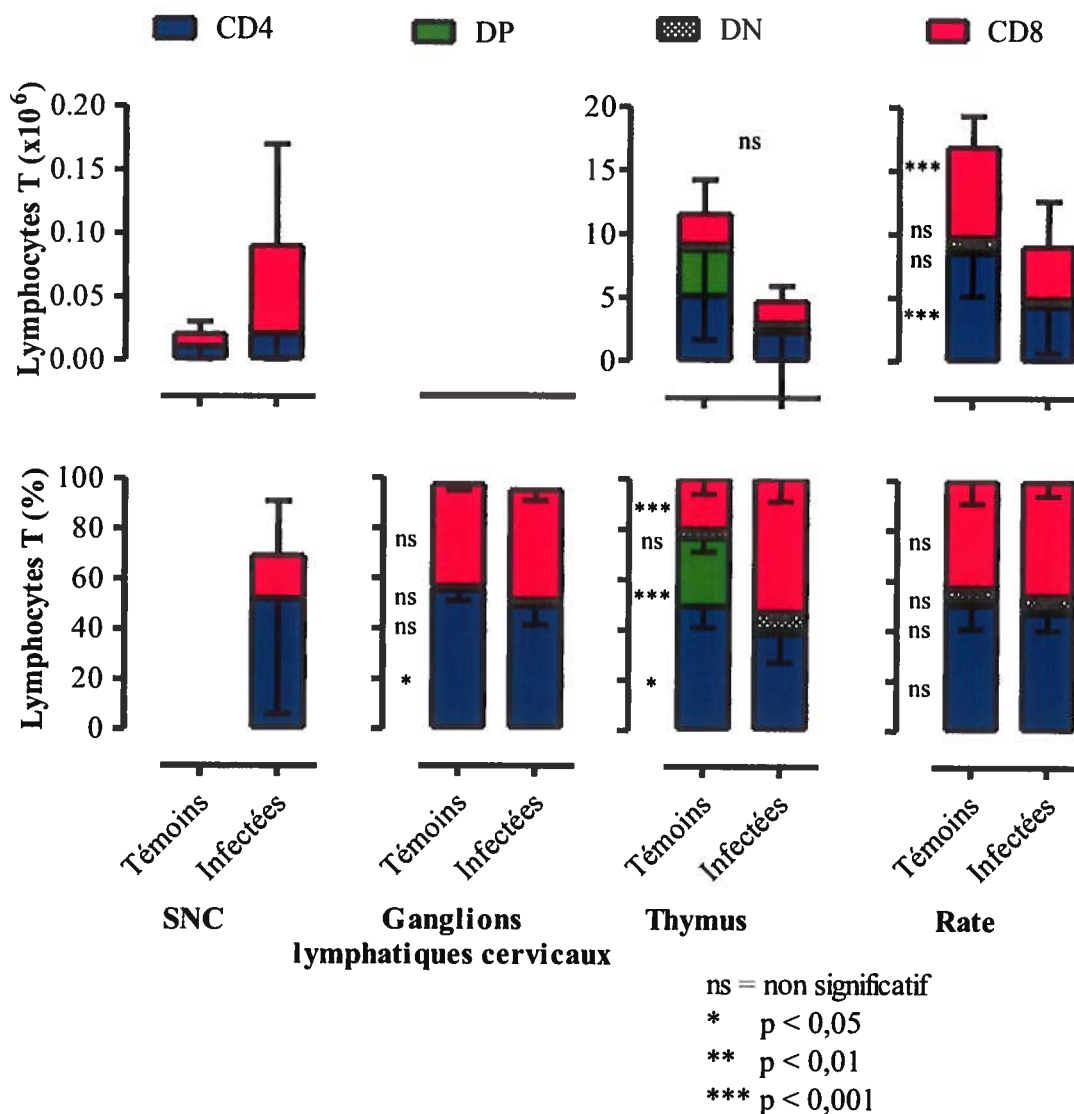


Figure 22: Cellularité à 7 jpi des lymphocytes T dans le système nerveux central, dans les ganglions lymphatiques cervicaux, dans la rate et dans le thymus suite à l'infection intracérébrale par MHV-A59.

Mise en évidence en cytométrie des marqueurs de lymphocytes T (CD3, CD4, CD8) dans le système nerveux central (SNC, extrême gauche), dans les ganglions lymphatiques cervicaux (centre gauche), dans le thymus (centre droite) et dans la rate (extrême droite) de souris ayant reçues 450 UFP de MHV-A59 (Infectées) ou du milieu stérile (témoins). Cellules CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (CD4 ■); CD3⁺CD4⁺CD8⁺ (DP ■); CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (DN ■); CD3⁺CD4⁻CD8⁺ (CD8 ■). Moyennes compilées de deux (Thymus et SNC, n=3 témoins et 7 infectées), quatre (Ganglions, n=6 témoins et 16 infectées) et cinq (Rate, n=14 témoins et 49 infectées) expérimentations.

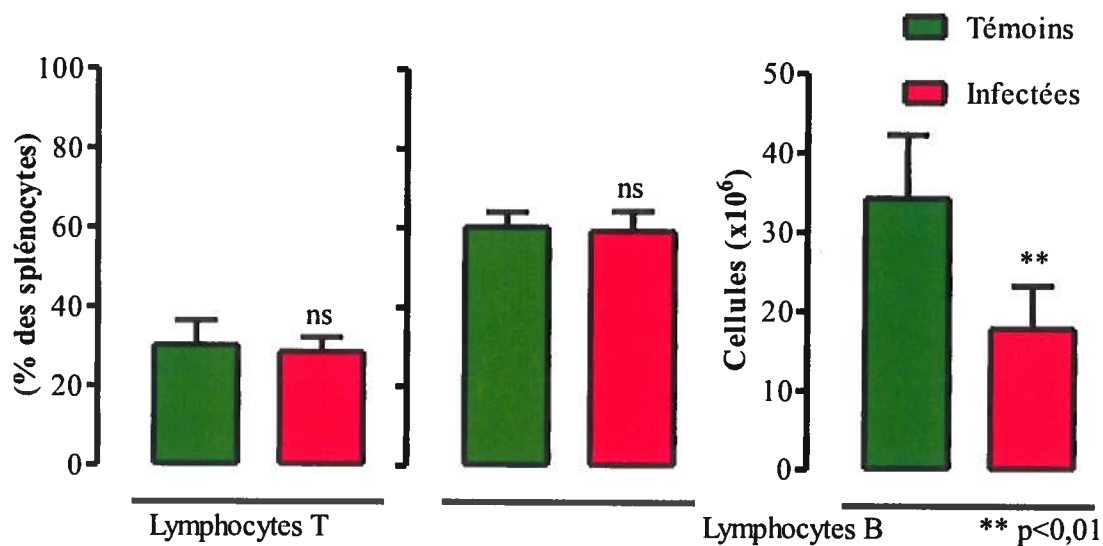


Figure 23: Cellularité à 7 jpi des lymphocytes dans la rate suite à l'infection par MHV-A59.

Mise en évidence des marqueurs lymphocytaires CD3 (cellules T) et CD19 (cellules B) à 7 jpi dans la rate suite à l'inoculation i.c. de 450 UFP de MHV-A59 (■) ou de milieu stérile (témoins ■). (ns = non significatif). Moyennes compilées de deux expérimentations (n=3 témoins et 10 infectées).

3.4 Discussion

3.4.1 Infection virale et démyélinisation

Dans la période qui correspond à la phase aiguë, soit entre 1 et 10 jpi, les souris infectées par MHV-A59 ont développé à la fois une encéphalite qui se manifeste par des troubles neurologiques, mais aussi une hépatite, qui s'est manifestée par des nodules visibles sur le foie (observations personnelles) et une perte de poids élevée. La perte de poids fut aussi retrouvée dans d'autres infections coronavirales (TGEV (Lanza *et al.*, 1992; Vannier, 1990), FIPV (de Groot-Mijnes *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2007)), mais généralement en présence de diarrhées importantes. Il est difficile de relier cette perte de poids avec la maladie infectieuse du SNC ou l'hépatite. En effet, bien que les souris infectées par MHV-A59 aient subies divers troubles du comportement et de la locomotion, les injections biquotidiennes de solution de réhydratation et la nourriture plus malléable et accessible ne semblent pas avoir modifié cet effet. De plus, les souris infectées avec la souche JHM, plus neurovirulente, mais non hépatotrope, ont également subi une perte de poids. Par contre, dans ce dernier cas le phénomène de la perte de poids était associé à la mortalité, les souris de moins de 15 g à 10 jpi sont décédées tandis que les autres ont survécu (0 % et 25 % de survie à 30 jpi respectivement pour une dose infectieuse de 1 UFP). De plus, dans l'infection avec 1 UFP de JHM les troubles neurologiques étaient pratiquement absents (données non montrées). S'il est difficile de lier la perte de poids avec la maladie induite, elle est toutefois associée à la réponse immunitaire. En effet, le transfert de cellules CD8⁺, spécifiques du virus, avant l'infection avec MHV-A59 réduit presque totalement la perte de poids sans affecter significativement le titre viral, du moins au SNC (MacNamara *et al.*, 2005). La réponse immunitaire innée est aussi impliquée dans la mortalité suite à l'infection. En effet, sans qu'il y ait de production virale plus importante, les souris « *Nude* », sans lymphocytes, meurent avant la fin de la première semaine d'infection avec une dose non létale de MHV-A59 (Dong Kim *et al.*, 2007). Ce phénomène a été tempéré par l'injection de lymphocytes T et reproduit par l'injection de poly i:c, un composé activant l'immunité innée via le « *toll-like receptor* » 3 (TLR3) (Dong Kim *et al.*, 2007).

Il a été publié par le passé qu'une dose virale de MHV-A59 inférieure à 1200 UFP en injection i.c. n'induit qu'une maladie neurologique sans passage en périphérie, en l'occurrence au foie (Lavi *et al.*, 1986). Toutefois, nos résultats indiquent qu'avec une dose de 450 UFP, une réplication virale élevée dans le SNC s'est ensuivi du passage en périphérie du virus et de l'infection productive du foie. Cette production virale au foie fut sporadiquement accompagnée de titres viraux détectables aux poumons et à la rate. Le virus ayant été pratiquement absent de ces derniers organes, il est justifié de douter qu'une réelle infection productive s'y soit produite. Il est plus probable que de forts titres de virus produits au SNC et au foie aient entraîné une virémie élevée dans la circulation sanguine (Lavi *et al.*, 1984c). Cette virémie serait alors détectable dans les organes prélevés de quelques souris. Il est vraisemblable que la perfusion systématique des souris au PBS puisse éliminer ce type de biais. La production virale au foie s'est estompée plus rapidement, que celle dans le SNC. Il s'agit peut-être là de l'effet d'une réponse immunitaire plus rapide et plus robuste au foie qu'au cerveau. Le foie n'est d'ailleurs pas reconnu comme un site de persistance du MHV au contraire du SNC.

Selon les travaux publiés sur l'infection par les MHV neurovirulents (Stohlman et Weiner, 1981), les particules virales cessent d'être détectées bien avant le début de la phase chronique et de l'apparition des plaques de démyélinisation dans le SNC, vers 14 jpi. Toutefois, le génome viral demeure détectable jusqu'à un an suivant l'infection (Adami *et al.*, 1995; Fleming *et al.*, 1993; Fleming *et al.*, 1986). En conformité avec ces travaux, nos résultats indiquent que le virus infectieux est disparu avant 10 jpi au cerveau, mais aussi au foie. L'ARN viral fut cependant détecté dans tous les cerveaux jusqu'à 30 jpi. Les lésions étaient quant à elles détectables en partie dès 15 jpi et de façon très évidente à 30 jpi, comme décrit par d'autres. La cinétique d'induction des lésions a montré une présence de l'activation des macrophages et des microglies tel que révélé par le marquage Mac-2 (15 jpi), sur une infiltration marquée, qui inclue, selon la littérature établie (Wu *et al.*, 2000a), des lymphocytes T (15-20 jpi). Il est d'ailleurs soupçonné que ces cellules macrophagiques puissent amorcer les dommages à la myéline avant l'arrivée des lymphocytes T (Houtman et Fleming, 1996a; Wu et Perlman, 1999). Par contre, il est difficile de déterminer si la myéline qu'elles absorbent provient de déchets cellulaires

phagocytés ou de destruction directe des oligodendrocytes par ces cellules macrophagiques. Il est clair cependant que des lymphocytes sont présents dans le SNC dès 7 jpi comme l'ont montré les marquages en cytométrie (Figure 22).

3.4.2 *L'infection virale et le système immunitaire*

Au septième jour de l'infection et ce malgré l'ajout de la ConA et de l'anticorps monoclonal ciblant le récepteur CD3 comme agents mitogènes, les splénocytes de souris infectées n'ont pas proliférés de façon normale, en comparaison aux splénocytes de souris témoins (Figure 19). Des résultats antérieurs du laboratoire ont pourtant montré qu'une réponse spécifique de prolifération en présence d'antigènes viraux, est possible et ce précisément à 7 jpi et avec une dose inférieure de virus (Gruslin *et al.*, 2005). Par contre, d'autres ont aussi rapporté une diminution de la réponse proliférative face à des stimulants généraux comme la ConA et l' α CD3, mais avec une amplitude et une durée des effets bien variables (Cook-Mills *et al.*, 1992; Cray *et al.*, 1993; de Souza et Smith, 1991; de Souza *et al.*, 1991; Even *et al.*, 1995; Leray *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1987a; Smith *et al.*, 1987b). Il en ressort toutefois que l'effet fut bel et bien transitoire, dans le cas présenté ici, entre le quatrième et le dixième jour de l'infection. À 7 jpi la réponse proliférative comparée aux témoins était à son minimum avec les deux mitogènes employés, la ConA et l' α CD3. Une, voire deux semaines plus tard, toutes les proliférations ont alors atteint des niveaux comparables pour les splénocytes de souris témoins et infectées. Dans une autre méthodologie expérimentale l'immunosuppression a été observée jusqu'à 24 jpi (Cray *et al.*, 1993) avec là aussi un retour subséquent à la normale. Par contre, ces souris infectées conservaient une réponse de rejet de greffes cutanées plus lentes, jusqu'à 102 jpi (Cray *et al.*, 1993).

Les rates des souris infectées n'ont pas semblé avoir subi une involution aussi marquée que celle observée pour les thymus. De plus, comme ces souris ont subi une perte importante de leur poids corporel, il est possible que la taille réduite des rates n'ait été qu'apparente et ne se soit pas reflété en proportion. Effectivement, le ratio du poids de la rate divisé par le poids de la souris a augmenté chez plusieurs souris infectées (Figure 24)

ce qui pourrait laisser croire qu'il y ait en fait eu une hypertrophie de la rate suite à l'infection. Mais cette relative hypertrophie ne s'est pas accompagné d'un nombre de cellules comparables, tout au contraire, les rates de souris infectées ne contenaient que de 50 à 80 % des splénocytes des rates de souris témoins. Une diminution, qui fut dans la plupart des cas, plus importante que la diminution totale de masse corporelle maximale de 30 %. Au thymus, une perte cellulaire marquée a accompagné une involution tout aussi importante de l'organe (Figure 20). L'effet était d'autant plus marquant qu'il y avait très peu de variabilité entre les souris infectées, et toutes n'ont plus eu qu'un vestige de thymus. En fait, l'aspect histologique des organes corroborait ces résultats de comptes cellulaires puisque certaines zones étaient moins denses en cellules. Ce phénomène est observé au thymus lors de l'infection par MHV-3 (Virelizier *et al.*, 1976), qui provoque une déplétion de cellules dans le cortex en laissant la médulla relativement intacte. À forte dose (2 fois la DL_{50}), MHV-A59 induit un effet similaire au niveau de la rate avec la déplétion de la couche de lymphocytes T et de macrophages du manteau pariétal ainsi que des centres folliculaires de la pulpe blanche (Lavi *et al.*, 1990). Dans des conditions similaires, MHV-JHM laisse intacts la rate et le thymus (Lavi *et al.*, 1990). En bref, selon nos résultats, la rate de taille quasi normale et de poids relatif augmenté serait en fait normale qu'en apparence, avec toutes les structures de support habituelles, mais en réalité elle compterait beaucoup moins de cellules du système immunitaire qu'une rate normale. Quant au thymus, tout indique une altération importante des fonctions (taille de l'organe et nombre de cellules réduites, histologie anormale). Il est à noter que certains auteurs ont plutôt rapporté un élargissement de la rate (Lardans *et al.*, 1996b) et un nombre normal de splénocytes (Cook-Mills *et al.*, 1992; Coutelier *et al.*, 1994). Les différences d'approches expérimentales: infection dite « naturelle » (Cook-Mills *et al.*, 1992) ou par voie i.p. (Coutelier *et al.*, 1994), pourraient expliquer les variations dans l'effet obtenu, tel que décrit pour la maladie neurologique et hépatique (Lavi *et al.*, 1986).

À 7 jpi, alors que le SNC des souris infectées était infiltré par les lymphocytes T, la rate et le thymus semblaient se dépeupler. Toutefois, il ne semblerait pas que l'un se fasse au détriment de l'autre, car le nombre de cellules infiltrant le SNC était nettement inférieur au nombre de cellules « perdues » à la rate et au thymus. Moins de 200 000 cellules T ont

infiltré le SNC contre une perte moyenne de 5 millions de lymphocytes T à la rate et au thymus. Comme montrées ici, plusieurs études rapportent une perte marquée des thymocytes (Godfraind *et al.*, 1995a; Lavi *et al.*, 1990) des splénocytes (Cray *et al.*, 1993; Lavi *et al.*, 1990) et des cellules des ganglions lymphatiques (Cray *et al.*, 1993). Plus spécifiquement, ce sont tous les types cellulaires qui sont affectés, les ratios de cellules B et T et dans ces dernières les ratios CD4⁺ et CD8⁺, sont demeuré relativement inchangés. Au thymus l'importance des sous-populations était altérée significativement par la perte des cellules T CD4⁺CD8⁺ « doubles positives », un phénomène déjà rapporté suite à l'infection i.p. de souris de souches BALB/c (Godfraind *et al.*, 1995a). L'apoptose est accrue au thymus à 4 jpi (Godfraind *et al.*, 1995a) mais à la rate à 7 jpi, elle semblait n'avoir affecté que quelques cellules éparses (TUNEL, données non montrées). Ce type de mort cellulaire, décrit lors de certaines infections virales (Bishop *et al.*, 1993; Bonyhadi *et al.*, 1993; Razvi *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1994), pourrait expliquer la lymphopénie observée. Toutefois, la présence d'apoptose au thymus n'explique pas la perte qui fut observée des lymphocytes B à la rate, tout comme le faible nombre de cellules en apoptose à la rate semble bien peu pour expliquer une pareille lymphopénie. Il serait plus probable que l'apoptose à la rate n'implique que les cellules B ou alors qu'une apoptose importante survienne avant 7 jpi et élimine près de la moitié des lymphocytes de ces organes. Une telle cinétique pourrait éclaircir la question de la perte cellulaire mais apporterait peu pour résoudre la question de l'incapacité des cellules survivantes à proliférer normalement.

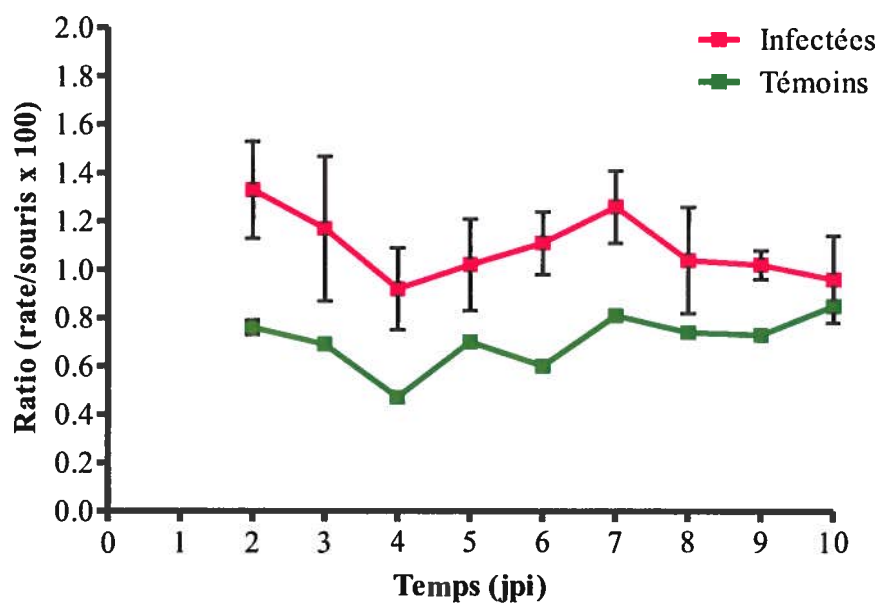


Figure 24: Ratio des poids de la rate et des poids corporels suite à l'infection du système nerveux central par MHV-A59.

Cinétique du ratio du poids de la rate divisé par le poids de la souris, multiplié par 100, ayant reçu 450 UFP de MHV-A59 (■) ou de milieu stérile (■) par voie i.c. à l'âge de 28-35 jours. (n= 5, 5, 5, 5, 10, 9, 8, 4, 4 chronologiquement pour les infectées et n=2/jours pour les témoins).

3.4.3 *Synthèse*

Nous avons démontré que, contrairement aux observations publiées, une dose de 450 UFP de la souche A59 du MHV est parvenu à induire la maladie biphasique classique avec 1) une encéphalite aiguë accompagnée d'une hépatite sévère suivie 2) d'une phase chronique caractérisée par la persistance virale. Cette persistance virale était caractérisée par la présence de l'ARN viral, l'absence de particules infectieuses détectables et l'induction de lésions de démyélinisation inflammatoire (macrophages et microglies activées) du SNC. La phase aiguë et le début de la phase chronique étaient caractérisée par une diminution notable de la taille du thymus des souris infectées accompagné à des degrés variables d'une diminution de la taille de la rate. Cette diminution s'est traduit aussi par une perte considérable de cellules, particulièrement les thymocytes CD4⁺CD8⁺ en développement ainsi que les lymphocytes T et B de la rate. Cette perte en cellules immunitaire pourrait avoir de graves conséquences jusqu'à maintenant peu étudiées, lors de la réponse immunitaire contre le virus.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4 RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE L'INFECTION VIRALE

4.1 Brève introduction

L'involution thymique et, en moindre mesure, l'involution splénique accompagnées de la diminution importante du nombre de cellules suite à l'infection du SNC par MHV-A59 sont des observations fort intéressantes. Cependant, elles ne fournissent pas d'information sur la capacité à réagir des cellules qui y demeurent. L'incorporation de thymidine marquée par un isotope radioactif ($[^3\text{H}]$ thymidine) est une méthode éprouvée et largement acceptée pour la vérification de l'activation et de la prolifération des lymphocytes. Sans se limiter à un seul ou un à groupe limité d'épitopes, la méthode employée au laboratoire auparavant (Gruslin *et al.*, 2005) utilise des lysats de cellules infectées ou non. La réactivité contre le virus peut ainsi être rapidement évaluée pour un très grand nombre de souris et à partir de diverses sources de cellules. Dans un contexte plus général, des agents mitogènes très variés permettent d'évaluer la capacité proliférative de toutes les cellules mises en présence et non seulement celles ayant une spécificité contre le virus. Deux de ces agents fort employés dans les stimulations de cellules provenant de souris sont la ConA et l'anticorps spécifique contre la chaîne epsilon du CD3. Ces agents agissent au niveau du TCR des lymphocytes T et induisent un signal d'activation menant à une forte prolifération des cellules. D'autres agents peuvent venir potentialiser ces proliférations par leurs actions complémentaires. Par exemple, comme la majorité des lymphocytes T répondent à l'activation par la production d'IL-2, cytokine qui elle-même agit positivement sur l'activation et la prolifération des cellules T, la différence observée dans la prolifération peut refléter une différence de production de l'IL-2 par les cellules activées. L'ajout d'IL-2 exogène, en venant suppléer à un manque de sécrétion de cette cytokine, permet ainsi de confirmer un tel manque (Figure 25). Il est possible aussi de stimuler l'activation des cellules T plus efficacement par la costimulation αCD3 et αCD28 ou encore en agissant plus en aval de la voie de signalisation du complexe TCR-CD3 avec la combinaison de PMA et d'ionomycine (Figure 25). Ces agents mitogènes, quoiqu'efficaces, agissent de façon globale, c'est-à-dire sans égard à la spécificité des TCR. Le mécanisme normal d'activation des lymphocytes T nécessite la captation d'un peptide par la CPA et sa présentation sur le CMH au TCR accompagné d'autres signaux via CD28 et des récepteurs de cytokines. Malheureusement, en temps normal les lymphocytes spécifiques d'un

antigène particulier ne se retrouvent qu'en bien petit nombre, ce qui limite les possibilités expérimentales. Surtout lorsque bien peu d'épitopes efficaces sont reconnus pour MHV-A59 dans l'infection de souris C57BL/6 (Castro et Perlman, 1995; Heemskerk *et al.*, 1995). La technologie des souris transgéniques a permis de développer des souris dont le TCR est dirigé vers des cibles bien précises. Les souris 2.102 tg possèdent des cellules T dont presque toutes possèdent un TCR spécifique du peptide Hb₆₄₋₇₆. Cela permet donc d'étudier la réponse des cellules de ces souris, lorsqu'elles sont stimulées par leur antigène correspondant. Puisque le test de prolifération ne mesure que l'incorporation de [³H] thymidine et non pas la division mitotique complète, le marquage au CFSE a été effectué avant le test de lymphoprolifération. Cette molécule qui se distribue en parts égales aux cellules filles permet de suivre non seulement les cellules qui ont effectué une division complète, mais aussi le nombre de divisions effectuées. Afin de vérifier la fonction auxiliaire des lymphocytes T CD4⁺ les anticorps antiviraux de type IgM et IgG, et les sous-types, ont été titrés. Une coopération efficace des cellules T et B étant nécessaire à la commutation de classe des IgM en faveur des IgG.

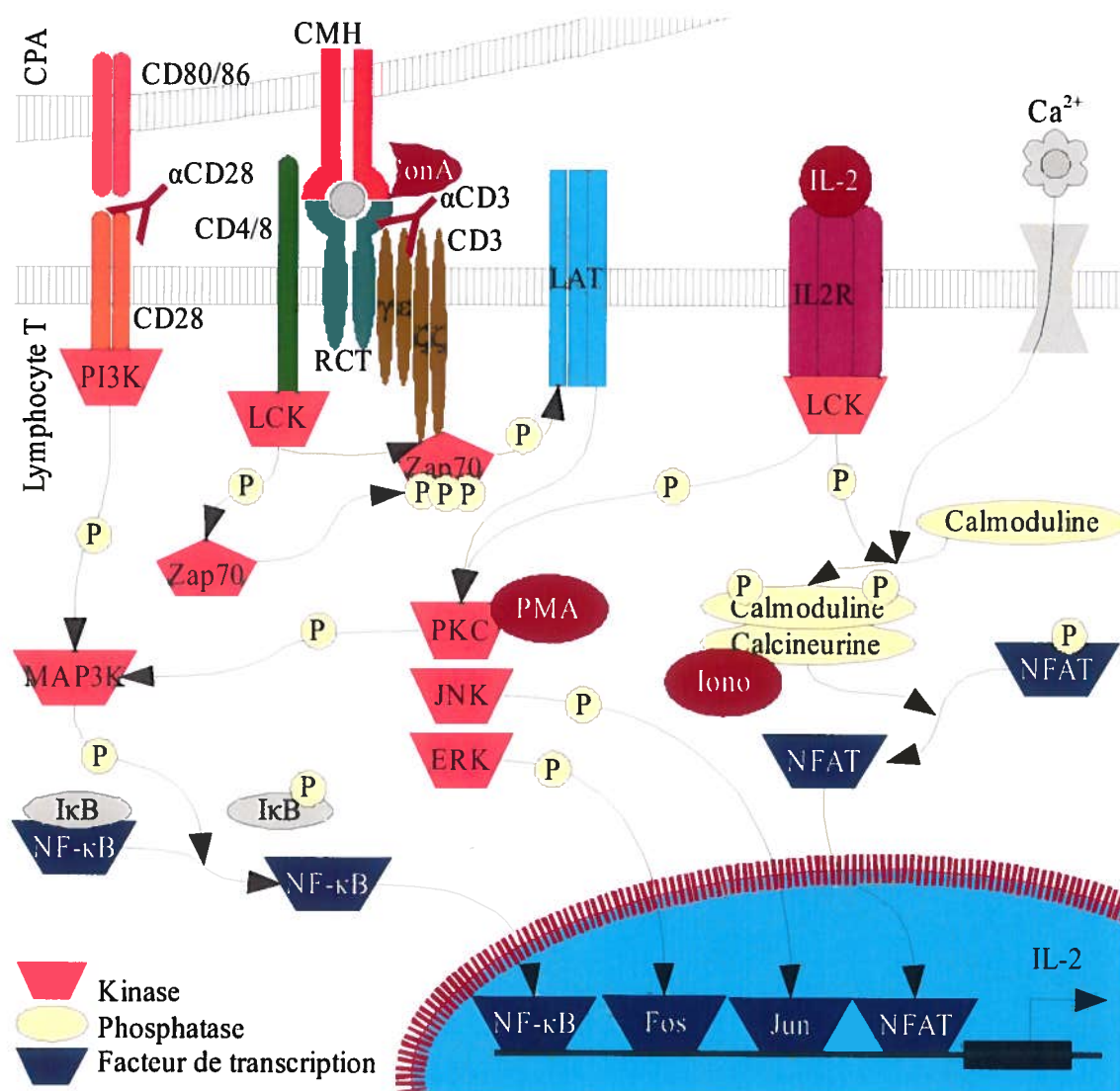


Figure 25: Voie de signalisation de l'activation des lymphocytes T.

TCR transite via les molécules adaptatrices CD3, le second signal transite via le récepteur CD28. Le signal combiné active différentes voies d'activations: MAPK, NFAT, JNK, ERK qui résulte en l'activation de facteur de transcription et la production de protéine, par exemple l'IL-2. Pour la prolifération *ex vivo* les agents ConA et l' α CD3 produisent le rapprochement de molécules du complexe TCR-CD3, ce qui a pour effet d'artificiellement induire un signal. L' α CD28 induit artificiellement ce signal par le rapprochement des molécules du récepteur CD28 et l'IL-2 agit via son récepteur exprimé en surface des cellules. Le PMA et l'Ionomycine n'induisent la prolifération que lorsqu'elles sont combinées, la première activant la kinase PKC et la voie MAPK, la seconde intervenant sur la calcineurine et la voie NFAT. Adapté de (Béné, 2006; Choudhuri et van der Merwe, 2007; Delves *et al.*, 2006; Espinosa et Chillet, 2006; Gray-Owen et Blumberg, 2006; Protein Lounge, 2003).

4.2 Procédure expérimentale

Le test de prolifération cellulaire a été employé pour évaluer la réactivité des splénocytes ou des lymphocytes enrichis, en stimulation avec des antigènes viraux (lysats de cellules infectées) ou des stimulations artificielles (ConA, α CD3, CD28, IL-2rh, PMA, ionomycine). Des cellules provenant de souris infectées à 100 UFP, qui ont montré une certaine capacité à proliférer à 7 jpi face à des antigènes viraux et de la MBP (Gruslin *et al.*, 2005), ont été testées en parallèle de celles provenant de souris infectées par une dose de 450 UFP. Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été stimulés par l' α CD3 en présence de costimulateurs, l'anticorps α CD28 ou l'IL-2rh afin de simuler ou d'amplifier les signaux complets d'activation. Ces cellules ont aussi été stimulées avec le mélange de PMA/Iono qui induit la prolifération des cellules, en induisant des mécanismes de la voie d'activation en aval du complexe TCR-CD3. Ces agents agissent de façon quasi dépendante de la dose, c'est-à-dire que la prolifération induite augmente avec la dose du mitogène jusqu'à un seuil à partir duquel la prolifération diminue. En conséquence, différentes doses de ces mitogènes ont d'abord été testées avant d'entreprendre une évaluation plus précise de la réponse proliférative des splénocytes de souris infectées. De la même façon, différents ratios de CPA, représentées par des cellules dendritiques purifiées de souris saines, ont été mis en contact avec les lymphocytes T de souris témoins et infectées.

Des souris aux TCR transgéniques, 2.102 tg, ont été infectées par inoculation i.c. de 450 UFP de MHV-A59 et leurs splénocytes ont été isolés à 7 jpi pour un test de prolifération en présence de leurs antigènes spécifiques, le peptide Hb₆₄₋₇₆. Les divisions mitotiques lors de la prolifération cellulaire ont été suivies par marquage au CFSE et analysées en cytométrie par les marqueurs CD3, CD4 et CD8. La présence de marqueurs d'activation à 7 jpi à la rate a été déterminée par un double marquage α CD3/PE et α CD25/PE ou α CD69/PE a été effectué pour détection en cytométrie. Le corécepteur de l'activation, CD28, a été marqué de même façon. Finalement, la fonction auxiliaire des lymphocytes T CD4⁺ a été indirectement vérifiée par la capacité des souris à développer une réponse spécifique par anticorps avec changement de classe des IgM vers les IgG. Les titres en anticorps spécifiques contre le virus de ces deux classes d'Ig ont été réalisés par la méthode ELISA.

La détection de la prolifération peut être affectée par divers biais techniques tels que la contamination bactérienne, une mauvaise distribution des cellules ou une forte mortalité suite à l'activation *in vitro*. C'est pourquoi les plateaux de prolifération ont été visuellement surveillés, et aucune contamination n'a été détectée. De même la distribution des cellules a été similaire d'un puits à l'autre. La mortalité cellulaire est présente en culture *in vitro*, mais aucune différence significative n'a été observée entre les conditions expérimentales (données non montrées).

4.3 Résultats

4.3.1 Réactivité antivirale

Une réponse inflammatoire au sein du SNC, composée entre autres de lymphocytes T, est survenu dès 7 jpi (Figure 22) et les souris semblaient donc être en mesure de monter une réponse immunitaire. Cette réponse aurait normalement dû cibler l'infection virale et donc être spécifique de MHV-A59. La vérification de cette réponse, mesurée par un test de prolifération de splénocytes en présence d'un lysat de cellules DBT infectées, a montré une très faible réponse qui était activée surtout à 14 jpi avant de retourner à un faible niveau à 21 jpi (Figure 26). Même si certaines souris infectées par la dose de 450 UFP répondaient plus fortement (jusqu'à 100 % de puits positifs) que celles infectées à la dose de 100 UFP (max 58,3 % de puits positifs) cela n'a pas été représentatif de la tendance. En effet selon les médianes calculées (Figure 26) les cellules de souris infectées à faibles doses ont eu plus de prolifération que celles de souris infectées à plus forte dose. Sauf pour quelques exceptions, l'ovalbumine a induit très peu de prolifération et jamais au-delà de 20 % (Figure 26).

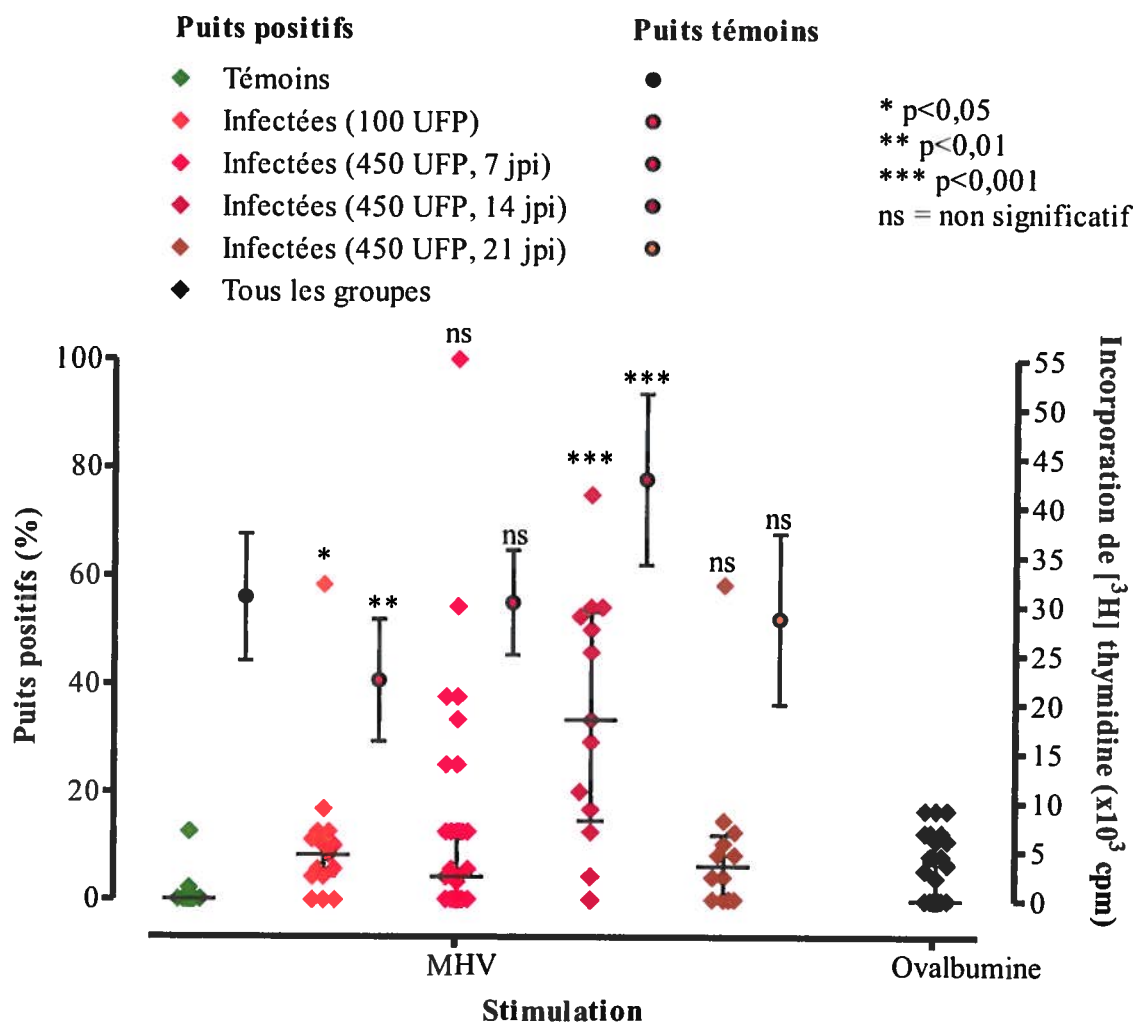


Figure 26: Proliférations spécifiques des splénocytes contre les antigènes viraux suite à l'infection par MHV-A59.

Le ratio de prolifération positive à 7 (◆◆), 14 (◆) et 21 jpi (◆◆) de splénocytes de souris C57BL/6 femelles ayant reçu 100 (◆) ou 450 UFP de MHV-A59 (◆◆◆) ou du milieu de culture stérile (témoins ◆). Les splénocytes ont été stimulés par un lysat de cellules DBT saines ou infectées. Les puits de cultures ont été considérés comme positifs lorsque le compte de radioactivité, suite à l'incorporation de [³H] thymidine, était supérieur au double du compte moyen de radioactivité en stimulation avec le lysat de cellules DBT non infectées. Le ratio de puits positifs avec l'antigène témoin d'ovalbumine (◆) a été déterminé pour chaque souris avec les comptes de radioactivité de puits stimulés au PBS et compilés ensemble. Le ratio de chaque souris est représenté (n=16, 15, 33, 13, 12 et 89 respectivement) avec la médiane et l'écart interquartile du groupe. Les cpm moyens et leurs écarts-types pour la stimulation avec l'anticorps αCD3 (puits témoins ○) sont rapportés pour chaque groupe.

4.3.2 *Activation*

La faible, voire absente, réaction antivirale des splénocytes à 7 jpi, suite à l'infection par MHV-A59, pourrait indiquer une absence d'activation de ces cellules. La détection à la surface cellulaire des molécules associées à l'activation: la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (IL-2R α) aussi nommée CD25, et l'antigène précoce de l'activation ou CD69, devrait donc être réduite. Les résultats montrent plutôt que le pourcentage de lymphocytes T activés était en fait doublé pour les deux marqueurs (Figure 27), mais seule l'induction de CD69 est statistiquement significative ($p < 0,05$). Les cellules T des souris infectées avaient donc un phénotype activé, mais ne répondaient que peu au stimulus (ConA, α CD3, MHV-A59).

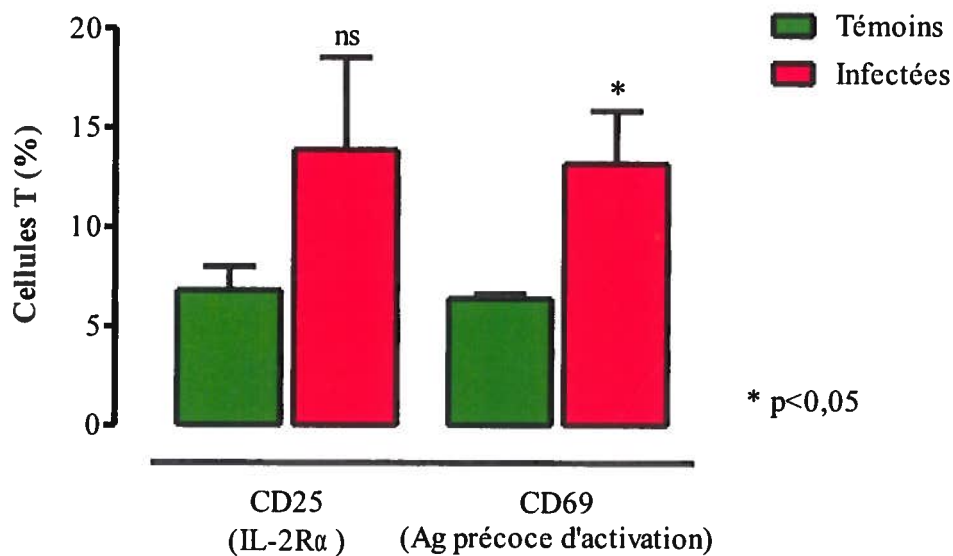


Figure 27: Marqueurs d'activation des lymphocytes T à la rate suite à l'infection par MHV-A59.

Marquage de surface et détection en cytométrie des molécules CD25 (chaîne alpha du récepteur de l'interleukine 2) et CD69 (antigène précoce de l'activation) sur les splénocytes à 7 jpi de souris infectées par injection i.c. de 450 UFP de MHV-A59 (■) ou du milieu stérile (témoins ■). (n=2 témoins et 5 infectées, ns = non significatif).

4.3.3 Dose virale

L'équipe du Dr Pierre Talbot a déjà publié sur le sujet de la prolifération des splénocytes isolés à 7 jpi de souris infectées par une dose de 100 UFP de MHV-A59 induisant la prolifération des splénocytes, en présence d'antigènes viraux ou de la MBP (Gruslin *et al.*, 2005). Toutefois, les résultats qui y sont présentés semblent difficilement conciliables avec ceux obtenus ici. Donc, un test de prolifération plus développé a été effectué pour comparer les deux approches expérimentales. Les doses de 100 et de 450 UFP ont été employées, et les splénocytes comparés aux lymphocytes T enrichis et additionnés de CPA. Que ce soit avec la ConA ou avec l' α CD3, les splénocytes, tout comme les lymphocytes T enrichis, des souris infectées par MHV-A59 ont proliféré nettement moins, 50 % de réduction, que les cellules provenant de souris témoins (Figure 28). Qui plus est, les cellules provenant de souris infectées à la dose de 450 UFP ont proliféré moins que celles des souris infectées à la dose de 100 UFP (Figure 28). Toutes ces différences sont statistiquement significatives ($p < 0,001$).

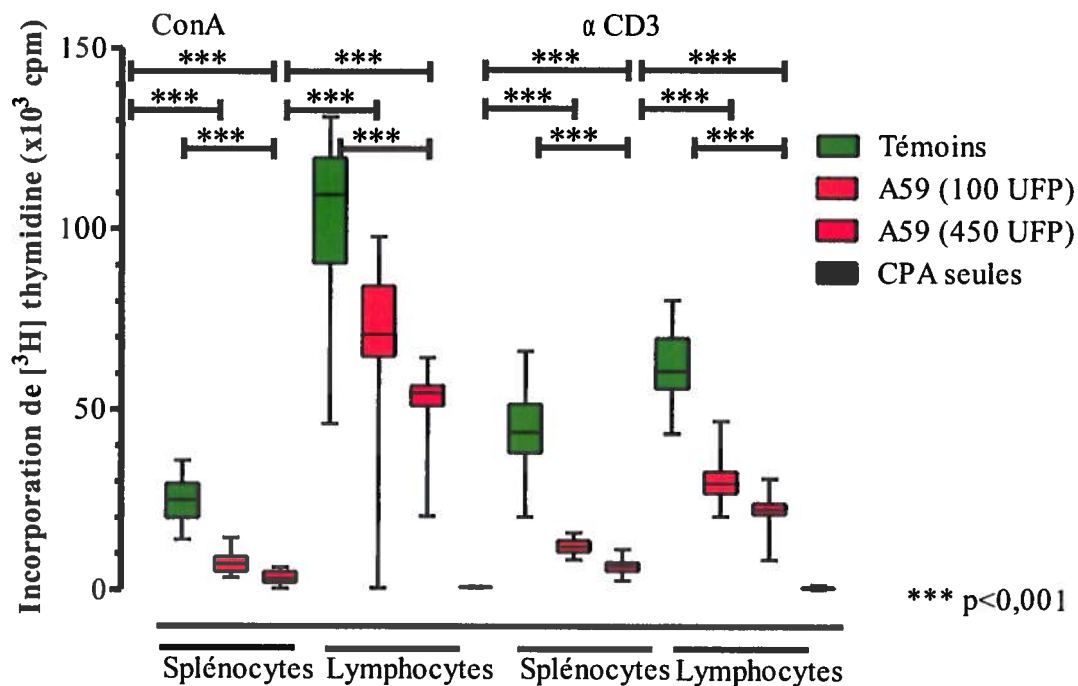


Figure 28: Immunosuppression des splénocytes et des lymphocytes T à différentes doses virales lors de l'infection par MHV-A59.

Prolifération à 7 jpi des splénocytes et des lymphocytes T, enrichis sur laine de nylon et additionnés de CPA, de souris infectées par injection i.c. de 100 (■) ou de 450 UFP (■) de MHV-A59 ou du milieu stérile (témoins ■). Les CPA seules (■) ont aussi été mises en culture avec les stimulations pour démontrer leur incapacité à proliférer. Chaque boîte contient 50 % des données d'un groupe (entre le 25^e et le 75^e percentile) qui sont entièrement délimitées par les barres (n=32).

4.3.4 Immunosuppression au sein du système nerveux central

L'effet immunosuppresseur observé à la rate serait d'autant plus pertinent si le phénomène survient de façon similaire dans le SNC. Les cellules T du SNC de souris infectées aux doses de 100 et 450 UFP ont donc été isolées afin d'évaluer leur capacité à proliférer en présence de CPA et des stimulants ConA et α CD3. Aucune donnée n'est disponible pour les souris témoins, puisqu'en condition normale, le SNC ne contient que très peu de lymphocytes T. De même, pour les souris témoins l'injection de milieu stérile, n'a pas induit l'infiltration en nombre ou pour une durée suffisante de lymphocytes T pouvant être isolés pour effectuer un test de prolifération. Malgré tout, la prolifération des cellules de souris infectées à 450 UFP fut inférieure à la prolifération détectée pour les cellules de souris infectées à 100 UFP comme retrouvé à la rate (Figure 29).

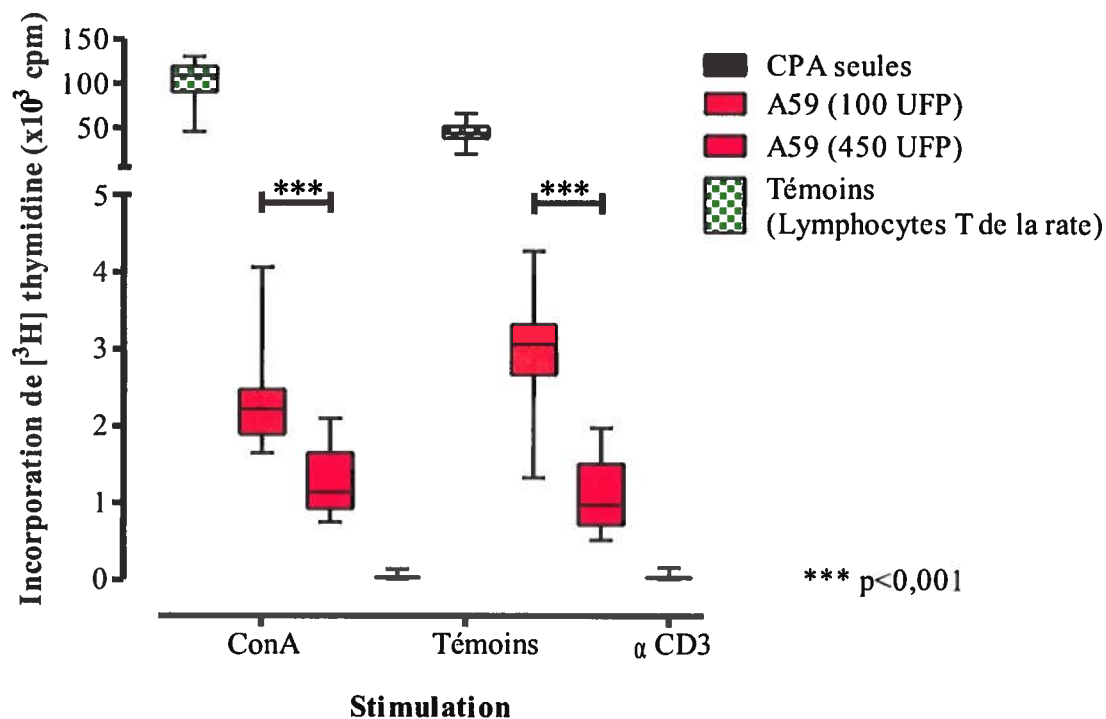


Figure 29: Immunosuppression des lymphocytes T au sein du système nerveux central suite à l'infection par MHV-A59.

Prolifération à 7 jpi des lymphocytes T isolés du système nerveux central (SNC) et additionnés de cellules présentatrices d'antigènes (CPA, splénocytes irradiés), de souris infectées par injection i.c. de 100 (■) et 450 UFP (■) de MHV-A59. Des lymphocytes T enrichis sur laine de nylon (▨) à partir de rates de souris témoins et CPA seules (■) ont aussi été mises en culture avec les stimulations pour démontrer leur incapacité à proliférer. Chaque boîte contient 50 % des données d'un groupe (entre le 25^e et le 75^e percentile) qui sont entièrement délimitées par les barres (n=16 en 4 expérimentations).

4.3.5 Effet dose-réponse

La ConA induit la prolifération des splénocytes dans un spectre de doses, cependant à forte dose l'effet inverse se produit et cette prolifération est éventuellement complètement absente. Lorsque mis en présence de doses de 1 à 10 $\mu\text{g/mL}$ de ConA les splénocytes de souris infectées avec 450 UFP de MHV-A59 ont toujours moins répondu au stimulus que les splénocytes de souris témoins (Figure 30A). Une exception puisqu'à la dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ les cellules de toutes les sources de souris ont à peine proliféré (Figure 30A). Dans le spectre de 0,1 à 5 $\mu\text{g/mL}$ de l'anticorps αCD3 , les cellules de souris infectées ont proliféré légèrement moins que celles de souris témoins (Figure 30B). L'augmentation de la dose de l'anticorps a toutefois graduellement rapproché les proliférations des deux types de sources (Figure 30B). Dans cette expérience la dose de l'anticorps αCD28 , lorsque combinée avec 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de l' αCD3 ne semble pas avoir eu d'effet notable, du moins entre 0,1 et 5 $\mu\text{g/mL}$, quoique les proliférations de cellules provenant de souris témoins aient produit de très forts écarts-types (Figure 30C). Dans le cas de l'ajout d'IL-2rh à l'anticorps αCD3 à 0,5 $\mu\text{g/mL}$, les cellules de souris infectées ont proliféré moins que celles de souris témoins aux doses de 0,1 à 3 UI/mL (Figure 30D). La dose de 10 UI/mL a donné des proliférations comparables (Figure 30D). Pour la PMA et l'ionomycine toutes les doses testées, de 0,01 à 0,1 $\mu\text{g/mL}$ et de 0,2 à 0,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivement, ont donné des proliférations comparables (Figure 30E-H). Pour la suite la dose de 1 $\mu\text{g/mL}$ de ConA a été retenue pour la prolifération maximale qu'elle permet. L'anticorps αCD3 a été employé à 1 $\mu\text{g/mL}$, une dose qui permet une prolifération maximale en association avec l' αCD28 à 1 $\mu\text{g/mL}$ ou l'IL-2rh à 10 UI/mL. La PMA et l'ionomycine ont été employées à 0,01 et 0,2 $\mu\text{g/mL}$ respectivement.

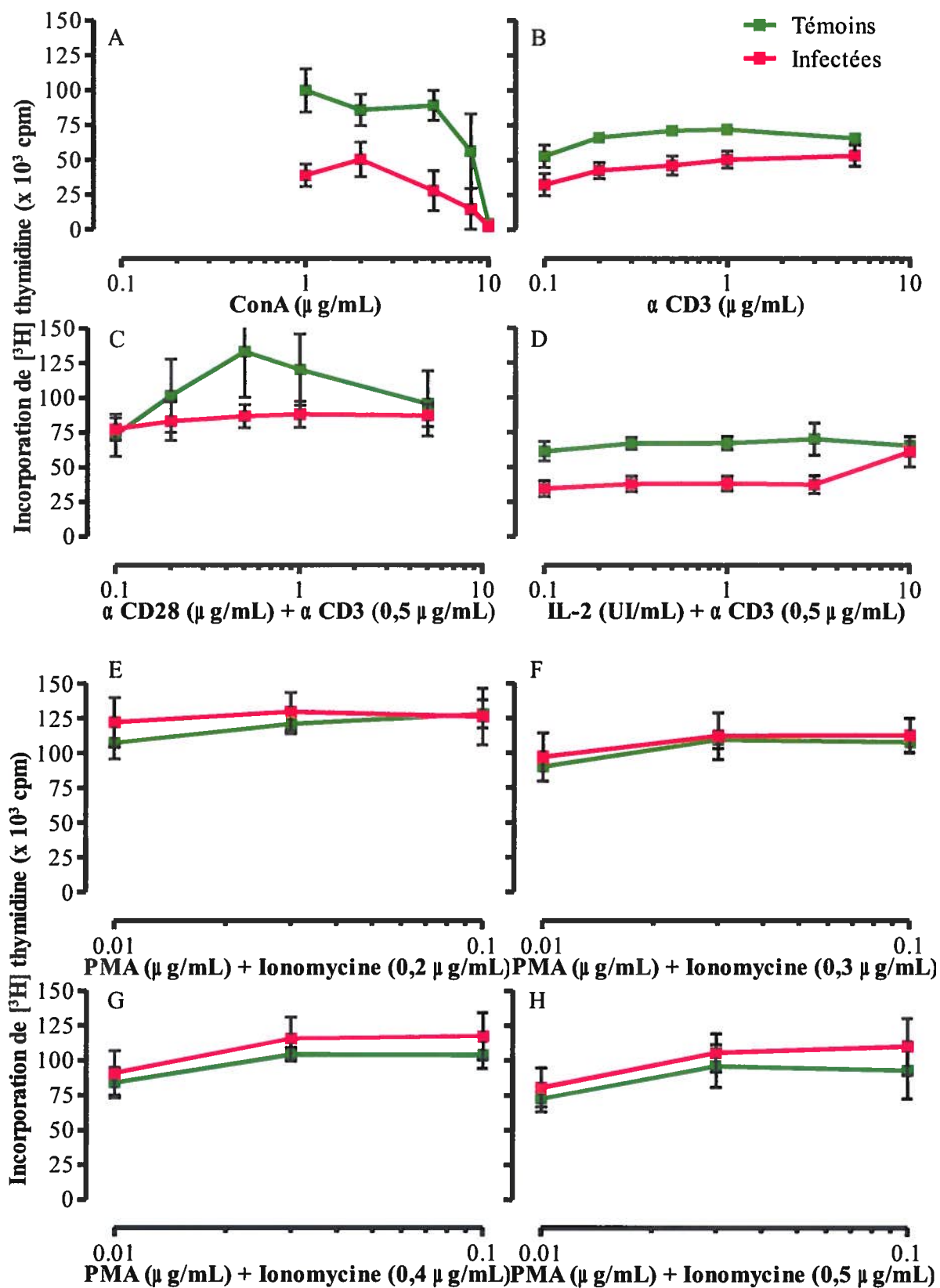


Figure 30: Immunosuppression des splénocytes sous diverses stimulations suite à l'infection par MHV-A59.

Prolifération à 7 jpi des splénocytes de souris infectées par injection i.c. de 450 UFP de MHV-A59 (■) ou du milieu stérile (témoins ■). Moyennes et écarts-types de l'incorporation de [³H] thymidine des puits (n=16 pour les témoins et 32 pour les infectées) stimulés à diverses doses de concanavaline A (panneau A), de l'anticorps αCD3 (panneau B), de l'anticorps αCD28 (panneau C), de l'IL-2 (panneau D), de PMA et d'ionomycine (panneaux E à H). Les stimulations avec l'αCD28 et l'IL-2 contiennent une dose sous-optimale de l'αCD3 nécessaire pour induire la prolifération.

4.3.6 Stimulations générales (ConA, α CD3, α CD28, IL-2, PMA/Iono)

À 7 jpi, lorsque les splénocytes des souris infectées ont été stimulés conjointement avec l' α CD3 et l' α CD28, ils n'ont toujours proliféré qu'à 50 % des splénocytes de souris témoins (Figure 31). Le nombre de cpm enregistrés fut toutefois largement augmenté (données non montrées), illustrant que les stimulations ont été plus efficaces dans tous les cas lors de la costimulation par comparaison à la stimulation simple. La costimulation α CD3 et IL-2rh a eu par contre un effet marqué, puisqu'elle a induit une prolifération similaire des splénocytes de souris témoins et infectées, et ce, de façon très reproductible entre les souris (Figure 31). De même la stimulation PMA/Iono, a rétablie la capacité de prolifération, peu importe la source des cellules (Figure 31).

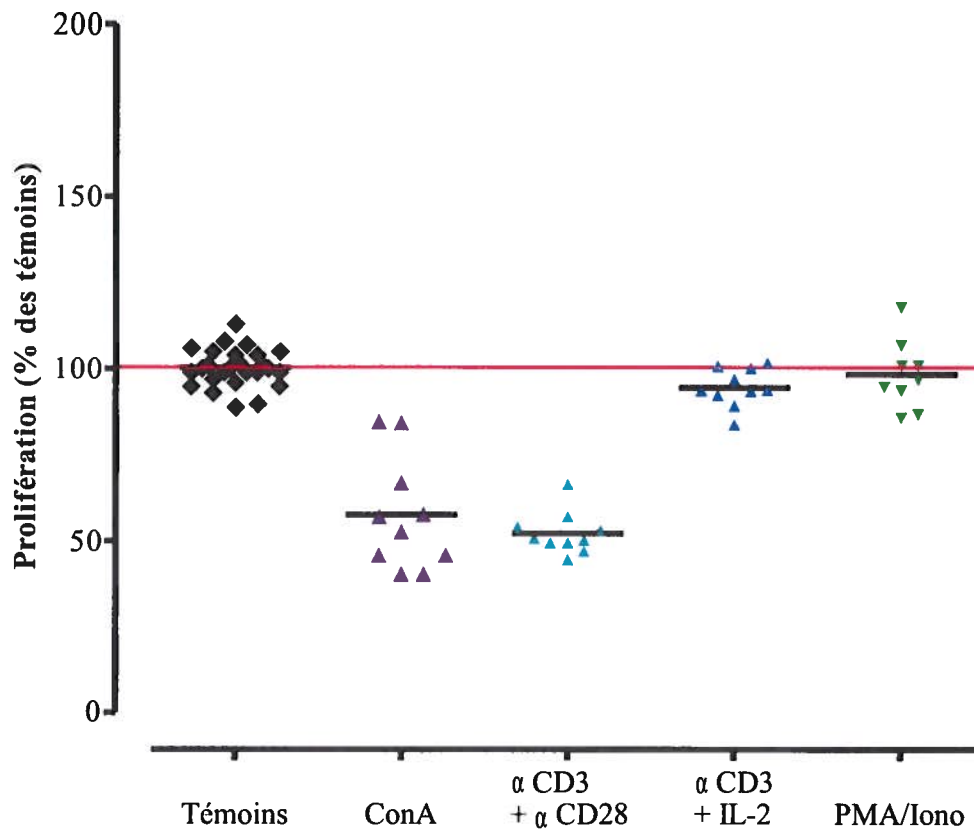


Figure 31: Stimulations alternatives et leurs effets sur l'immunosuppression suite à l'infection par MHV-A59.

Prolifération à 7 jpi de splénocytes de souris ayant reçu 450 UFP de MHV-A59 ou du milieu de culture stérile (témoins \blacklozenge). Les cellules ont été stimulées avec la concanavaline A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \blacktriangle) l' $\alpha\text{CD}3$ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et l' $\alpha\text{CD}28$ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \blacktriangle), l' $\alpha\text{CD}3$ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et l'IL-2rh (10 UI/mL \blacktriangle) et le PMA (0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) avec ionomycine (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \blacktriangledown). Les moyennes de cpm sont exprimées en pourcentage de la moyenne des témoins, la ligne rouge illustrant une prolifération normale. Les comptes de [^3H] thymidine incorporée pour chaque souris (n=10/jour) sont exprimés en pourcentage relatif au compte moyen pour les témoins (ligne rouge à 100 %, prolifération équivalant celle des cellules des souris témoins) accompagné de la médiane pour chaque groupe (—).

4.3.7 Corécepteur des lymphocytes T

Une prolifération moindre en présence d'un anticorps agoniste du corécepteur CD28 pourrait signifier une absence ou une diminution du récepteur en surface de certaines cellules. Le marquage de CD28 en surface des lymphocytes T (CD3⁺) CD4⁺ et CD8⁺ indique que ce récepteur était exprimé de façon similaire à la surface cellulaire des splénocytes de souris témoins et ceux de souris infectées (Figure 32). Un léger décalage vers une plus forte intensité a pu se remarquer sur les cellules CD8⁺ de souris infectées, mais sans plus (Figure 32). Dans le cas des cellules CD4⁺ cette intensité moyenne est demeurée la même mais avec un léger étalement de la courbe vers les deux extrêmes d'intensité (Figure 32).

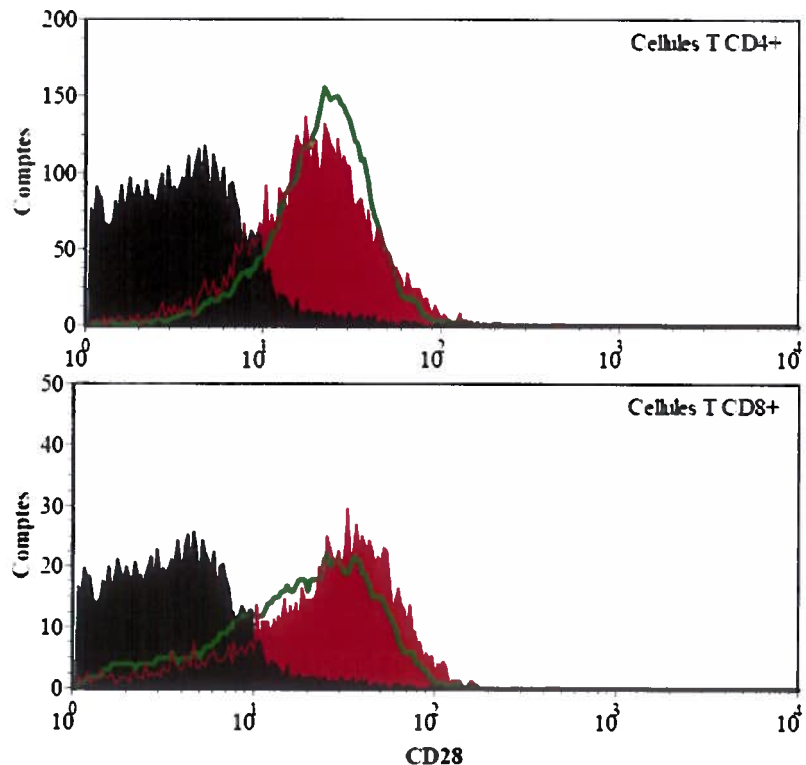


Figure 32: Expression du corécepteur CD28 à la surface des lymphocytes T de la rate suite à l'infection par MHV-A59.

Marquage de surface à 7 jpi du récepteur CD28 des lymphocytes T de la rate de souris C57BL/6 femelles ayant reçu 450 UFP de MHV-A59 (■) ou du milieu de culture stérile (témoins —) à l'âge de 28-35 jours. Histogrammes représentatifs (n=6 témoins et 15 infectées) avec un exemple de cellules négatives (■) du marquages sur les cellules T (CD3⁺) CD4⁺ (haut) et CD8⁺ (bas).

Si l'ajout d'IL-2 exogène a rétabli une prolifération normale, il est possible qu'un défaut de production de l'IL-2 soit en cause lors de l'infection par MHV-A59 pour expliquer la baisse de prolifération des splénocytes. Des injections d'IL-2 pendant l'infection pourraient stimuler la réponse immunitaire antivirale et potentiellement soit réduire ou exacerber la maladie démyélinisante au SNC. Les injections biquotidiennes d'IL-2 aux souris infectées par MHV-A59 ont permis de réduire le score clinique neurologique médian de un point sans toutefois empêcher la mortalité de certaines souris ni un certain niveau de handicap neurologique (Figure 33).

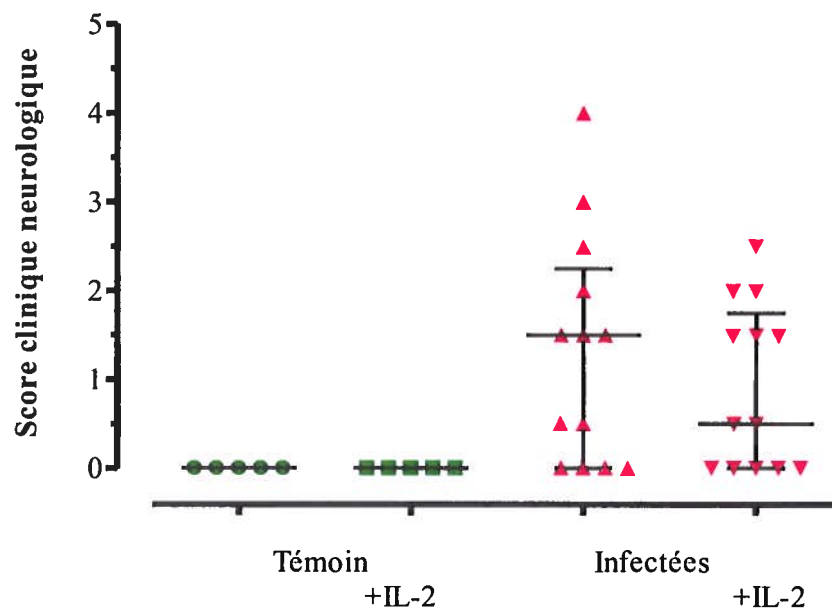


Figure 33: Traitement à l'interleukine 2 et scores cliniques neurologiques de souris suite à l'infection par MHV-A59.

Suivi et évaluation du score clinique neurologique sur 30 jours après l'injection de souris C57BL/6 femelles de 28-35 jours avec 450 UFP de MHV-A59 (▲ ▼) ou du milieu de culture (témoins ● ■). Les souris ont ensuite reçu deux injections quotidiennes de 2000 UI d'interleukine 2 (IL-2 ■ ▲) ou de PBS (● ▼) par injection i.p. pendant 10 jours. (n=5 témoins et 10 infectées).

Le ratio de CPA versus les lymphocytes T peut affecter la réponse proliférative induite *in vitro*. Pour éliminer ce facteur, divers ratios (1:1, 5:2, 5:1, 10:1) de cellules dendritiques purifiées de souris saines et de lymphocytes T purifiées ont été employés (Figure 34). En stimulation avec la ConA les cellules de souris infectées ont proliféré à tous les ratios, mais de façon plus marquée lorsque le ratio était de cinq CPA pour chaque cellule T (Figure 34, haut à gauche). En stimulation avec les anticorps α CD3 et α CD28 la différence de prolifération entre les cellules de souris témoins et infectées a augmenté progressivement avec l'augmentation de la quantité de cellules dendritiques (Figure 34, haut à droite). Tel qu'observé précédemment les stimulations avec les combinaisons α CD3 et l'IL-2rh tout comme PMA et l'ionomycine ont produit des proliférations similaires sans égard à la sources de cellules T (Figure 34, en bas). Par contre ici la prolifération globale a diminué avec l'augmentation de cellules dendritiques (Figure 34, en bas).

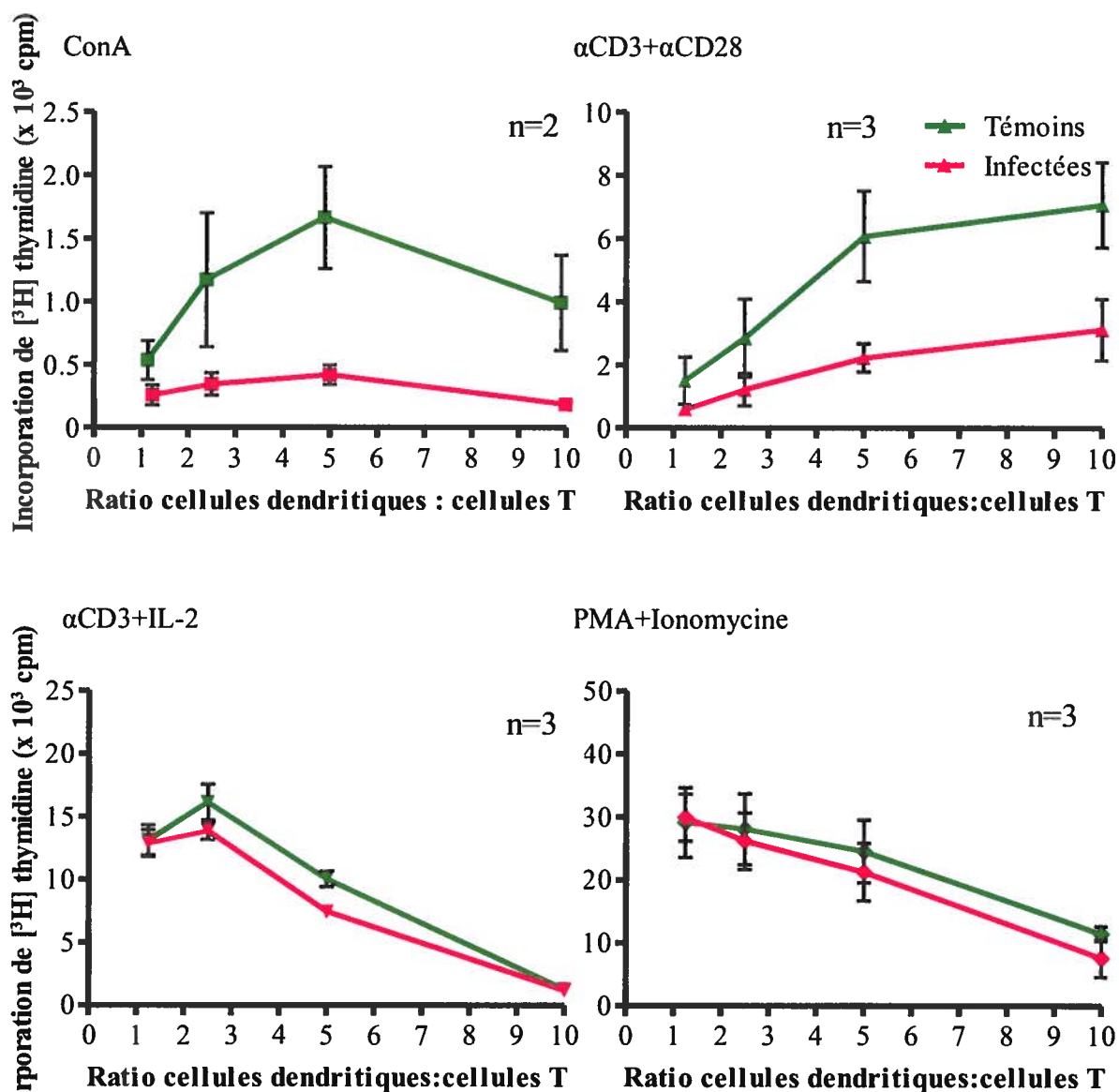


Figure 34: Prolifération de lymphocytes T en présence de divers ratios de cellules dendritiques.

Prolifération à 7 jpi de lymphocytes T de souris C567BL/6 femelles ayant reçu 450 UFP de MHV-A59 (■▲▼◆) ou du milieu de culture stérile (témoins ■▲▼◆) en présence de cellules dendritiques isolées de souris saines. Les cellules ont été stimulées avec la concanavaline A (haut, gauche ■■), l'αCD3 et l'αCD28 (haut, droite ▲▲), l'αCD3 et l'IL-2rh (bas, gauche ▼▼) et le PMA avec ionomycine (bas, droite ◆◆). Les comptes moyens de [³H] thymidine incorporée par les cellules dans les puits (graphiques représentatifs de deux expérimentations, n=3 par dose sauf pour la ConA ou n=2).

4.3.8 Présentation antigénique

Les souris 2.102 tg possèdent des cellules T qui ont presque toutes un TCR transgénique spécifique pour le peptide 64-76 de l'hémoglobine. Donc, lorsque mises en culture en présence de CPA et de ce peptide, ces cellules devraient proliférer. Malheureusement, ces souris sont aussi peu équipées pour survivre à l'infection par MHV-A59. En effet, n'ayant qu'une faible portion des cellules T spécifiques à d'autres antigènes qu'au peptide Hb₆₄₋₇₆, ces souris arrivent bien mal à élaborer une réponse antivirale efficace et la mortalité associée à l'infection par MHV-A59 qui n'est normalement que de 5 % à 450 UFP est montée en flèche à plus de 70 % (Figure 35). Malgré tout, un nombre suffisant de souris a survécu pour réaliser le test de prolifération en présence de l'antigène spécifique. Stimulés à des doses croissantes de peptide, les splénocytes de souris transgéniques infectées ont proliféré bien peu et l'incorporation de [³H] thymidine fut souvent de moins de 10 % par rapport à celle des cellules de souris transgéniques témoins (Figure 36). Cette différence est significative ($p < 0,01$). La diminution de prolifération en stimulation avec la ConA et l' α CD3 fut aussi présente chez les souris transgéniques infectées (Figure 36).

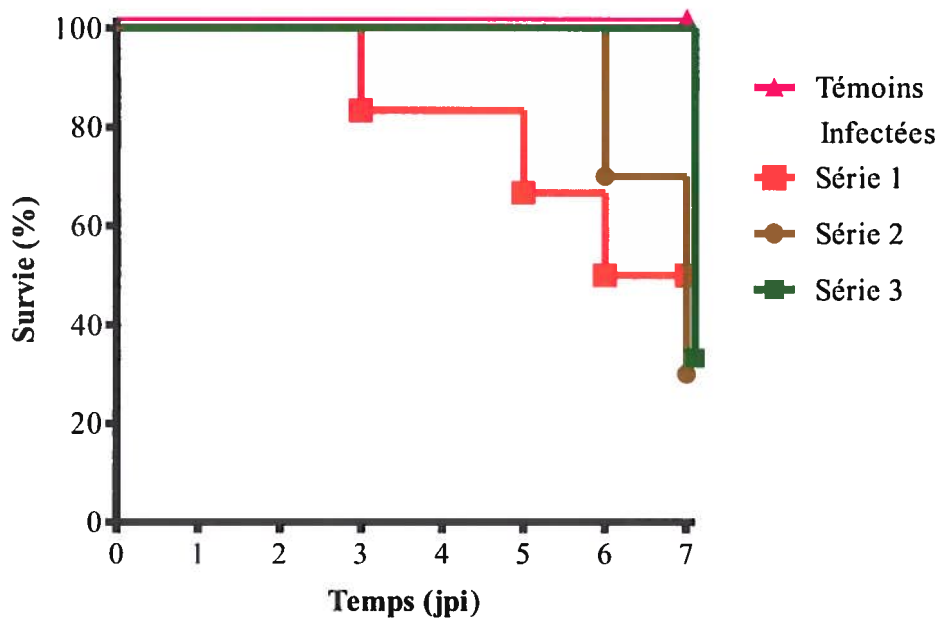


Figure 35: Survie des souris possédant un récepteur des lymphocytes T transgénique et spécifique du peptide Hb₆₄₋₇₆ lors de l'infection par MHV-A59.

Survie pendant une semaine des souris 2.102 tg femelles de 28-35 jours ayant reçu 450 UFP de MHV-A59 (n=6 ■, 10 ●, 9 ■) et de milieu de culture stérile (témoins, n=6 ▲). Les souris ont été observées quotidiennement et ont reçu des injections de solution de réhydratation en plus d'avoir un accès facilité à la nourriture (sèche et en gélose au fond de la cage). Les souris ayant atteint le score neurologique de 5 ou un autre point limite ont été euthanasiées et comptabilisées dans la mortalité.

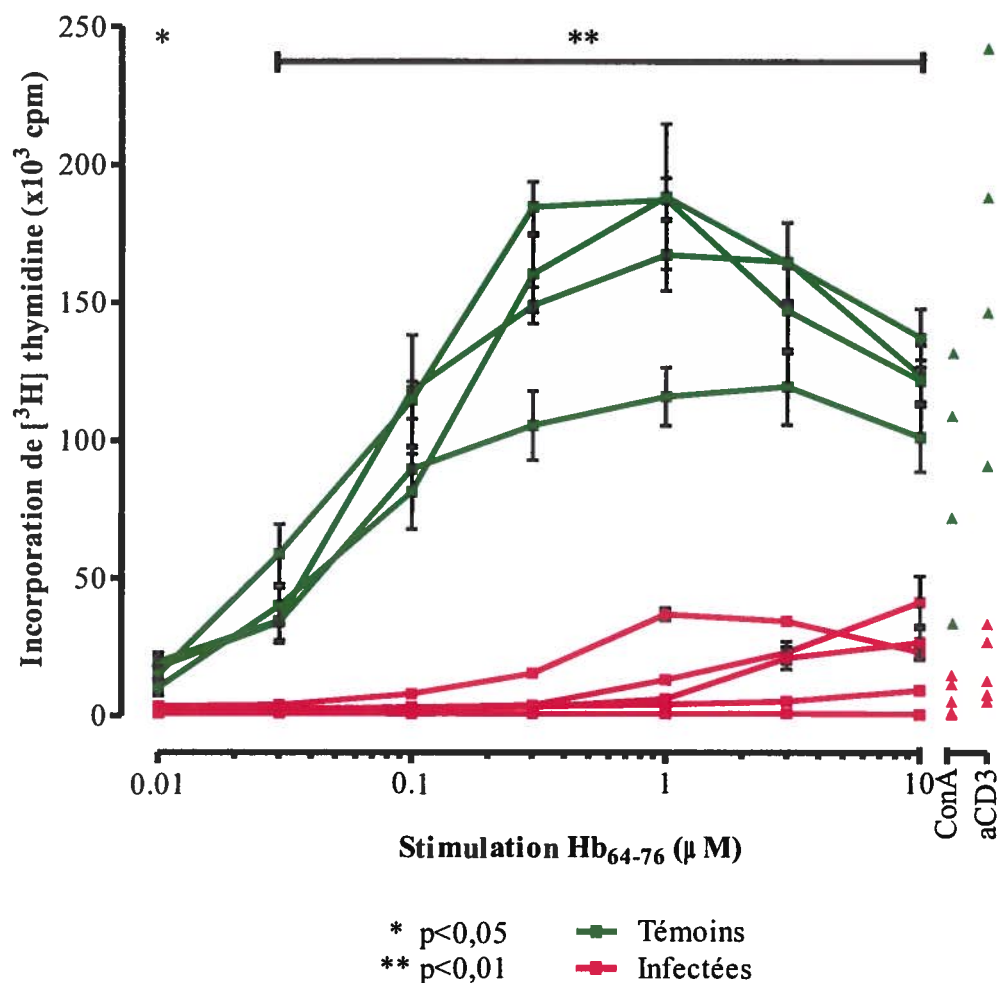


Figure 36: Prolifération dans un contexte de présentation antigénique spécifique et immunosuppression suite à l'infection par MHV-A59.

Prolifération à 7 jpi des splénocytes de souris TCR tg (2.102) femelles ayant reçu 450 UFP de MHV-A59 (■) ou du milieu de culture stérile (témoins ■) à l'âge de 28-35 jours. Les cellules ont été stimulées avec des doses croissantes du peptide spécifique Hb_{64-76} . Moyennes et écarts-types de l'incorporation de $[^3\text{H}]$ thymidine (cpm) de chaque souris ($n=5$ 4 témoins et 5 infectées en trois groupes expérimentaux).

4.3.9 Divisions cellulaires

Afin de distinguer les cellules qui sont impliquées dans une division cellulaire complète, un test de prolifération modifié a été réalisé avec marquage au CFSE. La molécule de CFSE se lie aux membranes cellulaires et se partage en parts égales entre les cellules filles lors des divisions mitotiques. Cette propriété permet donc de suivre en cytométrie le nombre de divisions subies par les cellules individuelles. Les splénocytes des souris témoins et infectées, marqués au CFSE et stimulés, ont été récoltés après 2 et 3 jours de culture et les marqueurs CD3, CD4 et CD8 ont été mis en évidence. Dès 2 jours de culture avec la stimulation à la ConA, les cellules de souris infectées montrèrent un retard de division (Figure 37). Sur la représentation graphique de distributions des cellules qui ont été analysées, deux pics de divisions sont clairement visibles à la gauche du pic plus important de cellules CD4⁺ de souris infectées non divisées, tandis que les cellules CD8⁺ et de souris témoins ont formés un troisième pic de division (Figure 37). De plus, alors qu'une troisième division est apparu après trois jours de culture pour les cellules CD4⁺ de souris infectées les cellules de souris témoins ont en majorité accomplie une quatrième division (Figure 37). Peu de cellules de souris témoins sont demeuré non divisées à trois jours, mais un nombre important de cellules CD4⁺ et de cellules CD8⁺ de souris infectées ne se divisèrent pas. Lors de la stimulation avec l' α CD3 et l' α CD28, les cellules CD4⁺ des souris infectées ont presque toutes initié des divisions cellulaires dès 2 jours de culture avec un sommet maximal en moins pour les CD4⁺ par rapport aux cellules de souris témoins (Figure 37). Lors de la stimulation par l' α CD3 avec l'IL-2, les cellules CD4⁺ des souris infectées ont accumulé un retard de division dès deux jours qui semble avoir été à peine rattrapé après 3 jours (Figure 37). Par contre, les cellules CD8⁺ semblent avoir proliféré à 2 jours bien normalement et à 3 jours de culture les divisions sont trop élevées et la plupart des cellules sont dans la zone (premier quart) des cellules sans CFSE détectable (Figure 37). Dans le cas de la prolifération avec la PMA et l'ionomycine les proliférations des CD4⁺ et des CD8⁺ des souris infectées et témoins ont eu des divisions bien semblables, voire identiques (Figure 37). Il est à noter que toutes les cellules des souris infectées ont légèrement moins de fluorescence, un effet de la variation de marquage qui peut se produire entre deux tubes de cellules.

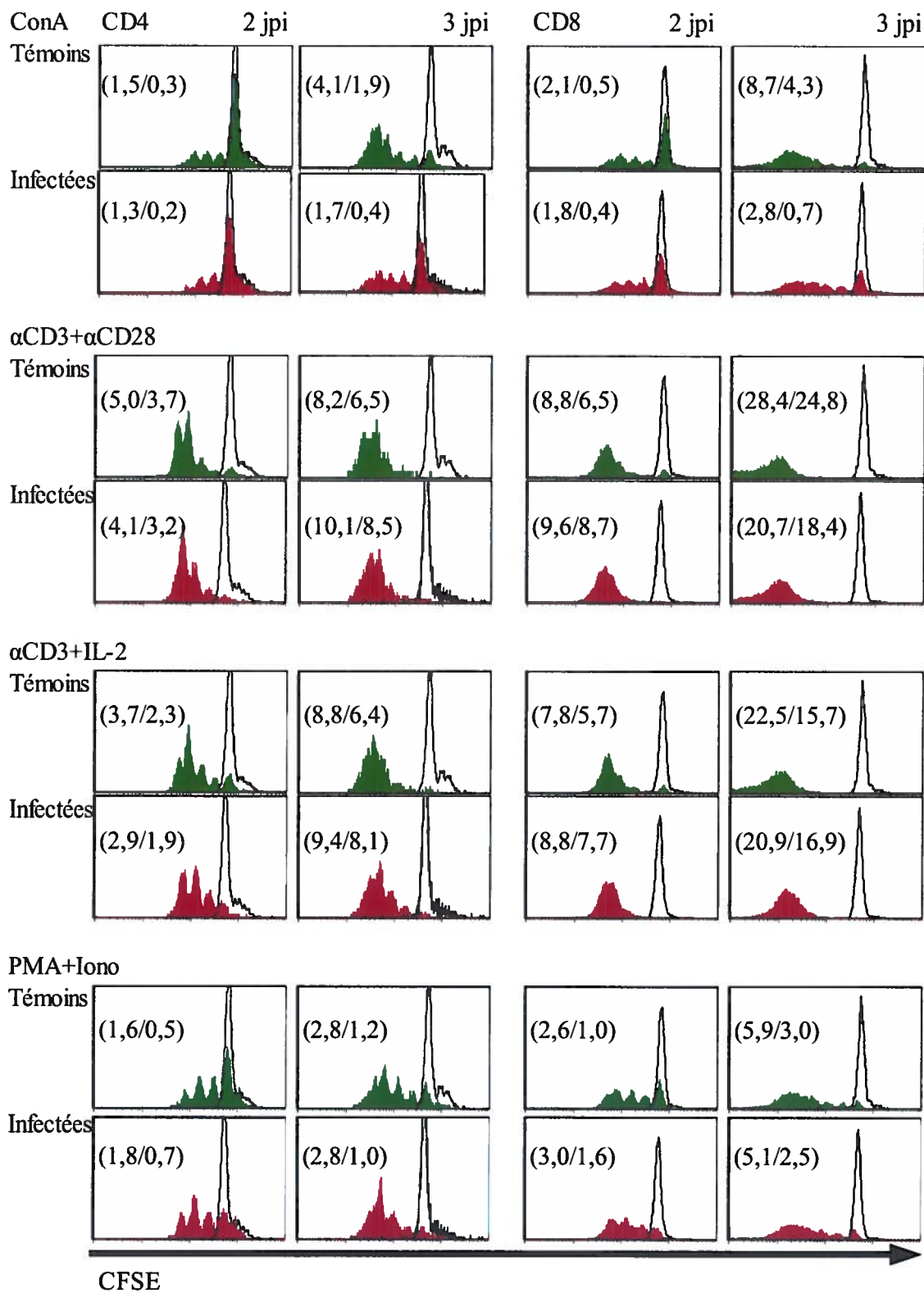


Figure 37: Prolifération de splénocytes marqués au CFSE et stimulés, suite à l'infection par MHV-A59.

Prolifération à 7 jpi de splénocytes de souris C57BL/6 femelles ayant reçu 450 UFP de MHV-A59 (—) ou du milieu de culture stérile (témoins —) à l'âge de 28-35 jours. Après marquage au CFSE les cellules ont été distribuées en plateau et stimulées (—) à la ConA (première rangée) avec l' α CD3 et l' α CD28 (seconde rangée), l' α CD3 et l'IL-2 (troisième rangée) et le PMA avec ionomycine (quatrième rangée) ou non stimulées (—). Les cellules ont été récoltées après 2 (gauche) et 3 (droite) jours de culture, les puits combinés puis marqués en surface pour les récepteurs CD3, CD4 (première et troisième colonnes) et CD8 (seconde et quatrième colonnes). Les histogrammes sont représentatifs de deux expérimentations conduites indépendamment. L'indice de prolifération (IP) est le nombre moyen de divisions accomplies par les cellules qui se sont divisées. L'indice de division (ID) est le nombre moyen de divisions accomplies par une cellule de la population de départ.

4.3.10 Commutation de classe

La réponse par anticorps spécifiques contre le virus est apparue chez les souris infectées dès 6 jpi sous forme d'IgM (Figure 38). La moyenne géométrique en IgM a atteint un plateau vers le sixième jour, au moment où est survenu un changement de classe. La moyenne géométrique en IgG totaux a augmenté jusqu'à 8 jpi (Figure 38). Jusqu'à 10 jpi, il n'y a pas eu de diminution importante du titre pour les deux types d'anticorps (Figure 38). Les IgG de type 1 ne sont apparus qu'à 8 jpi et leur titre était déjà à la baisse à 10 jpi (Figure 38). Les IgG de type 2a n'ont pas été détectés pendant toute la durée de l'infection aiguë tandis que ceux du type 2b étaient présents dès 6 jpi pour atteindre un pic élevé à 9 jpi tout comme les IgG de type 3 (Figure 38).

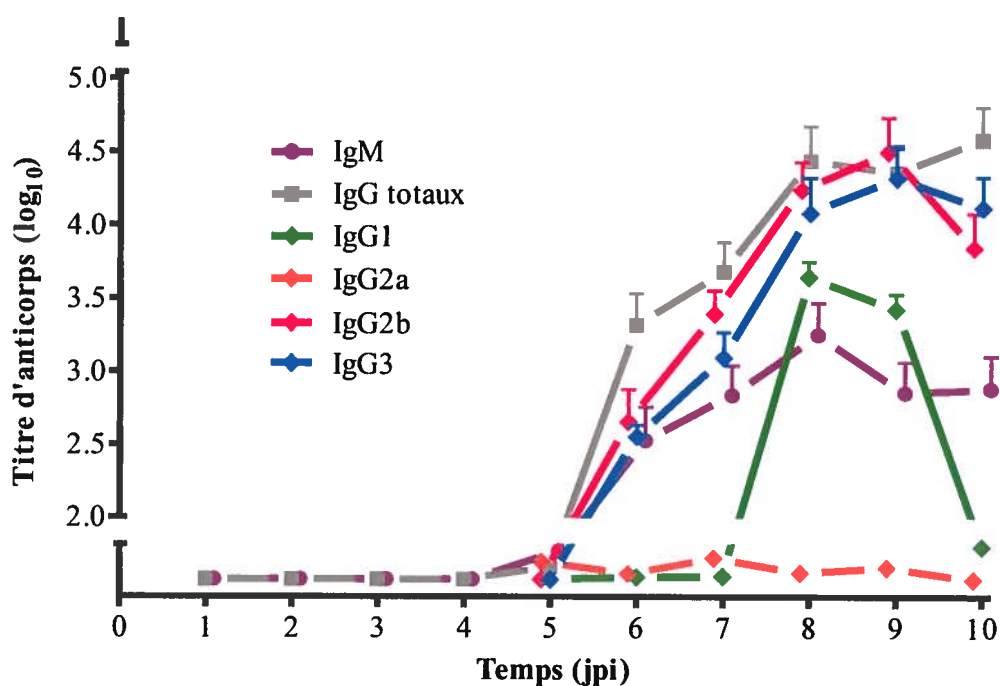


Figure 38: Titres d'anticorps spécifique de MHV-A59 pendant la phase aiguë de l'infection.

Titration immunoenzymatique (ELISA) des anticorps spécifiques contre le virus présents dans le sérum de souris ayant reçu 450 UFP par voie i.c. de MHV-A59, de 1 à 10 jpi. Les moyennes géométriques avec intervalle de confiance à 95% (n=5, 10, 7, 10, 16, 15, 13, 12, 12 et 9 chronologiquement) sont exprimées selon la spécificité de classe de l'anticorps secondaire de détection employé (IgM ●, IgG totaux ■, IgG1 ◆, IgG2a ◆, IgG2b ◆, IgG3 ◆).

4.4 Discussion

4.4.1 Réactivité antivirale

Suite à l'injection intracérébrale d'une solution de MHV-A59 une infection productrice s'est immédiatement produite au sein du SNC jusqu'à 7 jpi (Figure 16) suivi d'une infection chronique détectable par la présence de l'ARN viral (Figure 17). Une infection du foie s'est aussi rapidement produite jusqu'à 6 jpi (Figure 16) mais les poumons et la rate n'ont que très rarement été infectés de façon productive (Figure 16). Cependant, le thymus et la rate ont clairement été touchés, indirectement du moins. En effet, ces deux organes lymphoïdes très importants ont perdu énormément de cellules, entre autre des lymphocytes T et des lymphocytes B (Figure 22 et Figure 23) et possiblement d'autres types cellulaires de support et d'activation (macrophages et cellules dendritiques). Malgré cela il est depuis longtemps connu qu'une réaction immunitaire orchestrée par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ se développe et est en fait nécessaire au contrôle de l'infection sans être capable d'éliminer complètement le virus qui persiste (Wu *et al.*, 2000a). Dans le contexte expérimental présent, les cellules de souris infectées avec 450 UFP de MHV-A59 n'ont répondu que très peu à la stimulation par un lysat infecté à 7 jpi. Par contre, cette réponse fut présente à 14 jpi ce qui correspondait au retour à une prolifération normale. Si, *in vitro*, les splénocytes de souris infectées semblaient ne plus répondre, il y a présence, *in vivo*, de cellules activées (Cray *et al.*, 1993). Nos résultats indiquent d'ailleurs que les cellules fraîchement isolées à 7 jpi ont bel et bien exprimé à leur surface les marqueurs associés à l'activation, CD25 et CD69. Une certaine proportion d'entre elles fut donc bel et bien activée suite à l'infection par MHV-A59. L'absence ou la faible réponse était aussi présente lorsque les souris ont été infectées par une dose de 100 UFP du même virus. Cela diffère beaucoup de ce qui était jusqu'alors connu (Gruslin *et al.*, 2005). Il est difficile de clairement expliquer cette différence notée entre ces résultats publiés faisant état de près de 50 % de puits positifs en prolifération avec stimulation par le lysat infecté et les résultats présentés ici. Cependant une grande variété a souvent été observée entre les souris infectées par 450 UFP du virus et également dans les résultats publiés (Gruslin *et al.*, 2005). En effet, sur les 31 souris présentées par Gruslin et collaborateurs, plus de la moitié présente un

indice de stimulation moyen inférieur à 3 alors que le seuil pour déclarer un puits positif est établi à 2. L'explication de ce paradoxe apparent entre les résultats préalablement publiés (Gruslin *et al.*, 2005) et ceux présentés ici pourrait donc se trouver dans ces nombreuses réponses prolifératives des cellules près du seuil limite de positivité.

Cette explication est encore plus plausible au vu de la prolifération en conditions identiques de cellules isolées de souris infectées à deux doses du même virus, MHV-A59 à 100 et 450 UFP. Quelle que soit la stimulation (ConA ou α CD3) et la population cellulaire (splénocytes ou lymphocytes T) l'inhibition a augmenté avec la dose infectieuse employée. L'immunosuppression induite par MHV, particulièrement avec la souche A59, est donc directement liée à la dose utilisée et l'effet ne se limite pas à la rate, mais est reproduit au SNC. Les cellules ayant infiltré le SNC ont également été inhibées dans leur prolifération, ce qui laisse présager une réponse antivirale moins efficace.

La variation observée peut aussi provenir de différences dans les signaux secondaires d'activation fournis par les CPA. Cette différence pourrait être nivelée par l'ajout de CPA provenant de souris n'ayant jamais été manipulées. Les CPA, tel qu'entendu ici, sont des splénocytes entiers irradiés pour en éliminer la capacité proliférative, mais pas la capacité de présentation d'antigènes nécessaire pour la prolifération des cellules T non irradiées. La dose, et probablement la voie d'inoculation, affecteraient le degré d'immunosuppression et possiblement aussi sa durée. L'effet est aussi en partie indépendant des CPA en culture, puisque leur ajout, depuis une source saine, n'a pas permis de rétablir la prolifération des lymphocytes T enrichis de souris infectées au niveau des cellules T de souris témoins. Il faut toutefois prendre en considération que les lymphocytes T, ayant ici été enrichis sur laine de nylon peuvent contenir un nombre non négligeable de CPA de même source qui peuvent avoir affectés l'ampleur des résultats. Cependant, il faudrait une très bonne efficacité de ces quelques CPA pour inhiber la prolifération induite par les CPA saines. D'autant plus que les lymphocytes T isolés du SNC de souris infectées ont reproduit aussi l'effet dépendant de la dose infectieuse de la prolifération. Si les CPA sont en cause, du moins en partie, dans la faible prolifération des splénocytes de souris infectées, il ne semble pas que les cellules dendritiques en soient responsables. Effectivement, des cellules

dendritiques purifiées de souris saines n'ont pas changé les effets, et ce, même avec un plus fort ratio de ces CPA en présence de lymphocytes T (Figure 34).

4.4.2 *Processus d'activation*

L'immunosuppression observée était transitoire, mais aussi réversible. Une dose élevée d'agents mitogènes est parfois parvenu à induire une prolifération normale en comparaison à des souris témoins (Even *et al.*, 1995). Ici, l'effet fut observable avec la stimulation par l' α CD3, mais pas avec la ConA, qui produisait à certaines doses une stimulation sous-optimale même pour les cellules de souris témoins (données non montrées). La stimulation par l' α CD3 semble très efficace et c'est pourquoi l'immunosuppression n'a été observable qu'au moment du maximum d'inhibition soit à 7 jpi. Par contre, l'effet fut plus reproductible et constant entre les individus avec la lectine ConA. Il est possible que cette différence suggère un mécanisme d'action du MHV dans la voie d'activation. Par contre, si le mécanisme d'action menant à l'activation des cellules cibles par l' α CD3 est connu, il n'en est pas tout à fait de même pour la ConA. Tout au moins est-il connu que cette dernière agit aussi via la voie du TCR puisqu'elle est sans effet sur les cellules qui ne l'expriment pas (Tamaki, 1986). Peut-être la liaison transversale (*cross-linking*) de molécules CD3 induit un signal moins facilement bloqué que celui induit par la liaison transversale de molécules du TCR.

Il est possible que le récepteur de l'IL-2 des cellules ne soit pas fonctionnel. En effet, la chaîne α (CD25) du récepteur est insuffisante pour mener seule à une bonne activation et d'autres chaînes sont essentielles (Bachmann et Oxenius, 2007) pour l'initiation du signal intracellulaire. Il serait possible de détecter ces composantes en cytométrie, mais la prolifération rétablie des cellules de souris infectées en présence d'IL-2 exogène est en soi une preuve suffisante de la fonctionnalité du récepteur. La stimulation *in vitro* de splénocytes entraîne parfois ce qu'il est convenu d'appeler la mort cellulaire induite par l'activation (*Activation-Induced Cell Death*; AICD). Bien qu'il ne semble pas y avoir de mortalité significative lors du test de prolifération, une preuve supplémentaire contre ce phénomène se trouve dans la prolifération normale suite aux stimulations α CD3 avec IL-

2rh et PMA avec ionomycine. Ces résultats semblent plutôt indiquer une production anormale de l'IL-2 comme il a déjà été rapporté suite à l'infection par MHV (de Souza *et al.*, 1991; Even *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1987a). Cette production d'IL-2 est probablement aussi réduite chez les souris 2.102 tg infectées, dont les cellules T ne sont pas arrivées à proliférer. La présentation d'un peptide via le CMH et accompagnée des signaux habituels de costimulation devrait induire une cascade de signaux dont un des effets est la production de l'IL-2. En bref, ces cellules ont tout le potentiel voulu pour proliférer, mais elles ne semblent pas le faire.

La prolifération normale associée à la stimulation donne une indication sur le mécanisme en cause dans l'immunosuppression induite par l'infection avec MHV-A59. En effet, la combinaison du PMA et de l'ionomycine agit en aval de la voie d'activation du complexe TCR-CD3. Le PMA activant les protéines kinases C (PKC) et l'ionomycine, un transporteur d'ion calcium, agissant sur la calcineurine. Ces molécules sont bien en aval dans la voie de signalisation. Puisque le duo PMA/Ionomycine a rétabli une prolifération normale, il est juste de supposer que le blocage de l'activation induit par MHV-A59 soit en amont de ces molécules, mais en aval du complexe TCR-CD3. Ce blocage pourrait impliquer les molécules de cosignalisation comme CD28. Les stimulations *in vitro* qui n'impliquent que le TCR sans fournir un second signal via CD28 induisent chez les cellules cibles un état anergique justement renversé par l'ajout d'IL-2 exogène (Schwartz, 2003). Bien que la costimulation avec l' α CD28 ou en présence de CPA de souris saines (section précédente) ou même en présentation normale par le CMH (souris 2.102 tg) n'ai pas rétabli une prolifération normale, il pourrait être possible que le récepteur CD28 soit absent ou non fonctionnel et ne puisse donc fournir le signal essentiel. Cependant, le marquage de surface en cytométrie de CD28 et l'incorporation accrue de [³H] thymidine, toutes conditions confondues, en présence de l' α CD28 semblent indiquer que ce récepteur était présent et fonctionne normalement.

Si l'absence de signalisation IL-2 chez les souris IL-2^{-/-} et IL-2R^{-/-} induit des troubles auto-immunitaires (Sadlack *et al.*, 1995; Sadlack *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1995; Willerford *et al.*, 1995), ces souris produisent toutefois une réponse antivirale primaire

réduite (Bachmann *et al.*, 1995; Kündig *et al.*, 1993; Steiger *et al.*, 1995). En fait, l'ajout d'IL-2 exogène *in vivo* lors de l'infection persistante par le TMEV élimine complètement le virus de l'organisme (Larsson-Sciard *et al.*, 1997). Il se pourrait donc que l'inhibition de la production de l'IL-2 soit impliquée dans l'induction d'une immunosuppression, prélude à la persistance du MHV dans le SNC. Nos résultats préliminaires semblent toutefois indiquer que l'injection biquotidienne d'IL-2rh par voie i.p. pendant la phase aiguë, n'a pas éliminé la maladie démyélinisante du SNC (Figure 33). En effet, le taux de mortalité des souris infectées est demeuré inchangé et les signes cliniques n'ont été que très peu améliorés. Une production d'IL-2 en continu via des cellules transfectées avec le gène de l'IL-2 ou via des capsules sous-cutanées ou encore l'utilisation de la version améliorée, PEG-IL-2, seraient des avenues expérimentales qui pourraient s'avérer plus efficaces.

4.4.3 Divisions cellulaires

Les proliférations en présence de ConA et du mélange PMA/Iono fournissent des informations intéressantes. En effet, un des points principaux qui a distingué les cellules de souris témoins de celles des souris infectées est l'arrêt de la division cellulaire entre les jours 2 et 3 surtout les cellules CD4⁺ et à dans une moindre mesure pour les CD8⁺. Ce test de la mesure de division cellulaire permet aussi de conclure que les cellules de souris infectées stimulées avec la PMA/Iono ont proliféré normalement, comparativement aux cellules témoins et que ce qui était observé jusqu'alors n'était pas le fait d'une population cellulaire différente en surprolifération (par exemple, une prolifération accrue des CD8⁺ ne venait pas annuler l'effet d'une diminution de prolifération des CD4⁺). Pour les stimulations avec l' α CD3, le test actuel n'est pas en mesure de fournir des données expliquant la différence de prolifération observée. La stimulation avec l' α CD3 en conjugaison avec l' α CD28 devrait donner des divisions différentes et l'ajout de l'IL-2 devrait rétablir cette division. Dans le premier cas, la différence pourrait s'expliquer par la division différente d'autres populations cellulaires, telles les cellules B, sous l'influence des cellules T CD4⁺ activées. Ces résultats pourraient s'éclairer si les dernières divisions pouvaient être distinguées. Dans ce dessein, il serait possible d'augmenter la dose de CFSE employée afin de visualiser un plus grand nombre de divisions cellulaires (>6) mais dans cette situation la

fluorescence du CFSE des cellules peu ou pas divisées rendrait leur phénotypage (CD3 et CD4/CD8) complètement impossible puisque le spectre d'émission du CFSE chevauche et surpasse en intensité la fluorescence des anticorps employés en cytométrie. Une autre solution pourrait être de réduire les doses des stimulations, cela par contre modifierait les paramètres de prolifération tels qu'observés en synthèse d'ADN (lymphoprolifération mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée). Malgré cela les informations obtenues sont importantes en ce qu'elles permettent de préciser que les lymphocytes T CD4⁺ des souris infectées ont été en défaut de prolifération, mais que la PMA/Iono par son action en aval du complexe TCR-CD3, a induit une prolifération similaire sans égard à la source de cellules.

4.4.4 Fonctions auxiliaires

Bien que les anticorps neutralisants n'apparaissent qu'à la seconde semaine de l'infection avec MHV-A59 (Matthews *et al.*, 2002b), selon les résultats obtenus ici et confirmés par d'autres dans le même contexte (Gruslin, 2002), une réponse par anticorps spécifiques du virus s'est développée déjà avant la fin de la première semaine. Les faibles titres en IgM s'expliquent probablement par une commutation de classe rapide puisque le titre en IgG totaux augmente quasi simultanément. Les IgM étant de courte demi-vie (Bachmann *et al.*, 1994), ils sont rapidement remplacés par les IgG, de plus grande durabilité (Vieira et Rajewsky, 1988). Bien que la cinétique d'apparition des anticorps soit fort différente lors de l'infection par le SARS-CoV (Mo *et al.*, 2006), les titres maximums d'IgM dans le sérum des patients sont demeurés plus faibles d'un facteur de 10 que lors de l'infection par MHV-A59. Une telle commutation suppose une capacité inaltérée des lymphocytes T CD4⁺ à coopérer avec les lymphocytes B, afin de développer une réponse par anticorps plus efficace. Un changement peut prendre quelques semaines comme lors de l'infection par le LCMV, mais peu aussi s'avérer très rapide comme dans l'infection par le VSV (Hangartner *et al.*, 2006). Même dans les cas d'une réponse lente, comme lors de l'infection par le LCMV, une plus faible réponse CTL accélère le changement isotypique (Hangartner *et al.*, 2006). La réponse observée ici ne semble donc pas anormale et indique que *in vivo*, les CD4⁺ ont été en mesure d'assumer, du moins en partie, leurs fonctions

d'assistance. L'étude plus approfondie a montré par contre une production à faible titre et surtout transitoire du sous-type IgG1. La commutation vers ce sous-type est généralement tributaire de la présence de cytokines comme l'IL-2, mais surtout l'IL-4 et l'IL-10, des cytokines types de la réponse lymphocytaire de type T_H2 (Tableau XVI). La réponse antivirale est plus typiquement de type T_H1 et implique donc des cytokines comme l'IFN- γ qui entraînent une commutation vers le sous-type IgG2a (Coutelier *et al.*, 1988; Coutelier *et al.*, 1987; Maloy *et al.*, 2000; Sangster *et al.*, 2000; Snapper et Paul, 1987). Il a effectivement été rapporté que l'infection par MHV induit en fait une hypergammaglobulinémie restreinte au sous-type IgG2a (Coutelier *et al.*, 1990; Godfraind *et al.*, 1997). Cependant, une très grande proportion des IgG2a ne reconnaissent pas le virus (Lardans *et al.*, 1996a) ce qui s'est confirmé ici par les titres moyens quasi inexistantes de ces anticorps. Les sous-types IgG2b et IgG3 ont par contre été très fortement augmentés par l'infection avec MHV-A59. Une combinaison pouvant mener à un tel profil de commutation pourrait bien être due à l'action conjointe de l'IL-10 et du TGF- β 1 (Tableau XVI). Ces cytokines ont aussi été impliquées dans l'immunorégulation, par inhibition de certaines classes de cellules, T_H1 ou T_H2, selon le milieu de cytokines associées.

Tableau XVI: Cytokines et commutation de classe.

Le milieu de cytokines secrétées par les lymphocytes T auxiliaires et reçues par les lymphocytes B conditionne le type de commutation de classe qui en résulte. Adapté de (Delves *et al.*, 2006; Espinosa et Chillet, 2006)

Cytokines	Activent	Inhibent
IL-2	IgG1	
IL-4	IgE	
IL-4, 5, 6	IgG1	
IL-10	IgA, IgG1, IgG3	
IFN- α/β	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3	
IFN- γ	IgG2a	IgM, IgG1, IgG2b, IgG3
TGF- β_1	IgA, IgG2b	IgM, IgG1, IgG2a, IgG3

* Indépendant des lymphocytes T à forte dose

4.4.5 Synthèse

La réponse proliférative face aux antigènes viraux suite à l'infection par MHV-A59 fut fortement réduite *in vitro* malgré la présence de cellules activées. De plus, les lymphocytes T de toutes spécificités n'ont pas proliféré normalement, en comparaison à des cellules de souris témoins, en présence de stimulants ou mitogènes comme la ConA ou l' α CD3. Cette baisse de prolifération fut influencée par la dose virale injectée dans l'encéphale des souris: une plus forte dose entraînant une prolifération moindre. Globalement une augmentation de la dose de mitogène ou de la proportion de CPA, sous forme de cellules dendritiques, ne semble pas avoir affecté outre mesure cet effet. Par contre des agents agissant hors de la voie intracellulaire du TCR, comme l'IL-2 exogène ou plus en aval comme la combinaison PMA et ionomycine, ont annulé complètement cette perte de prolifération. La prolifération de lymphocytes T en présence de leur épitope spécifique a produit une prolifération nettement plus réduite suite à l'infection. L'augmentation de la dose du peptide n'a aucunement annulé cet effet.

Le suivi des divisions cellulaires au CFSE a permis d'observer que les lymphocytes T CD4⁺ ont été les plus affectés et se sont divisés moins suite à l'infection par MHV-A59. Par contre, les lymphocytes B ont produit de hauts taux d'anticorps spécifiques contre le virus dans les isotypes IgG2b et IgG3 avec absence d'IgG2a ce qui semble pointer vers un milieu de cytokine atypique de la réponse T_H1 normalement induite face à une infection virale. Des cytokines considérées immunosuppressives pourraient être impliquées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

5 MÉCANISMES DE L'IMMUNOSUPPRESSION PAR LE CORONAVIRUS MURIN DE SOUCHE A59

5.1 Brève introduction

S'il est connu depuis longtemps que l'infection par différentes souches de MHV induit des altérations de la réponse immunitaire les mécanismes associés le sont beaucoup moins. L'immunosuppression induite lors de l'infection aiguë est de durée limitée dans le temps même si l'infection elle-même persiste sur presque toute la durée de la vie de l'animal hôte. Elle est aussi généralisée par le fait qu'elle touche plusieurs types cellulaires, entre autres les lymphocytes T et B, mais aussi parce qu'elle touche également les cellules qui ne sont pas spécifiques du virus. L'ampleur de l'immunosuppression induite est liée à la dose virale et touche des organes comme le thymus et la rate même si l'infection productive touche principalement le SNC et de façon réduite le foie.

Le ou les mécanismes impliqués doivent donc permettre une immunosuppression dépendante du virus, mais agissant loin des sites de l'infection productive et sans être restreints par la spécificité des récepteurs immunitaires. Les mécanismes doivent aussi provoquer une forte réduction en cellularité des lymphocytes T et B, mais aussi des autres populations composant les splénocytes. Finalement, ils doivent permettre l'activation et la prolifération des lymphocytes T lorsque des mitogènes agissant en aval de la voie d'activation du TCR sont employés, ce qui suppose des mécanismes agissant eux-mêmes en amont de cette voie. Tout cela suggère fortement l'action de lymphocytes T régulateurs ou l'induction de lymphocytes T anergiques par un milieu de cytokines immunosuppressives. Cette section verra à approfondir le rôle des T_{Reg} et des cytokines immunosuppressives lors de l'infection du SNC par MHV-A59.

5.2 Procédure expérimentale

Dans un premier temps la susceptibilité des lymphocytes T à l'infection sera explorée par l'infection *in vitro* et des titrages des surnageants sur feuillet de cellules DBT. Pour détecter une infection faible ou non productive, des quantifications de l'ARN produit par RT-qPCR seront employées. La présence de cellules régulatrices sera explorée par marquages intracellulaires du facteur de transcription FOXP3 et cytométrie. Chez la souris,

ce marqueur est employé dans la recherche de T_{Reg} puisqu'il est considéré comme spécifique de ces cellules. Le rôle des CPA sera plus approfondi par un test d'incorporation de [3H] thymidine dans une prolifération croisée, c'est-à-dire où des cellules T seront mises en contact avec des CPA de souris saines ou infectées.

Le rôle des cytokines immunosuppressives sera exploré par la quantification en RT-qPCR des ARNm de celles-ci dans les splénocytes de souris témoins et infectées. Les cytokines présentes dans les homogénats de rates seront dosées par « protein array ». Finalement, le $TGF-\beta_1$ sera dosé dans le sérum de souris infectées, dans le surnageant de culture de splénocytes et marqué à l'intérieur des splénocytes en cytométrie.

5.3 Résultats

5.3.1 Infection des splénocytes

Bien que le virus infectieux n'ait été que rarement détecté à la rate (Figure 16) il n'est pas exclu qu'il y ait une infection abortive de certains types de cellules et en particulier les lymphocytes T. La présence de l'ARN viral à la rate à 5 et 10 jpi, tel qu'il fut détecté en RT-PCR (Figure 17) appuie cette hypothèse. Suite à l'infection *in vitro* à forte MOI, les splénocytes ont d'ailleurs produit de nouvelles particules virales (Figure 39A), mais pas les lymphocytes T purifiés (Figure 39B). Cependant, l'ARN viral fut détecté en association avec les cellules T en conditions d'infection, mais sans une augmentation significative du nombre de transcrits (Figure 39B). L'ARN viral détecté en RT-PCR pourrait donc n'être que l'inoculum associé aux cellules. La stimulation avec l' $\alpha CD3$ avant ou simultanément à l'infection n'a pas induit une plus grande susceptibilité à l'infection par MHV-A59.

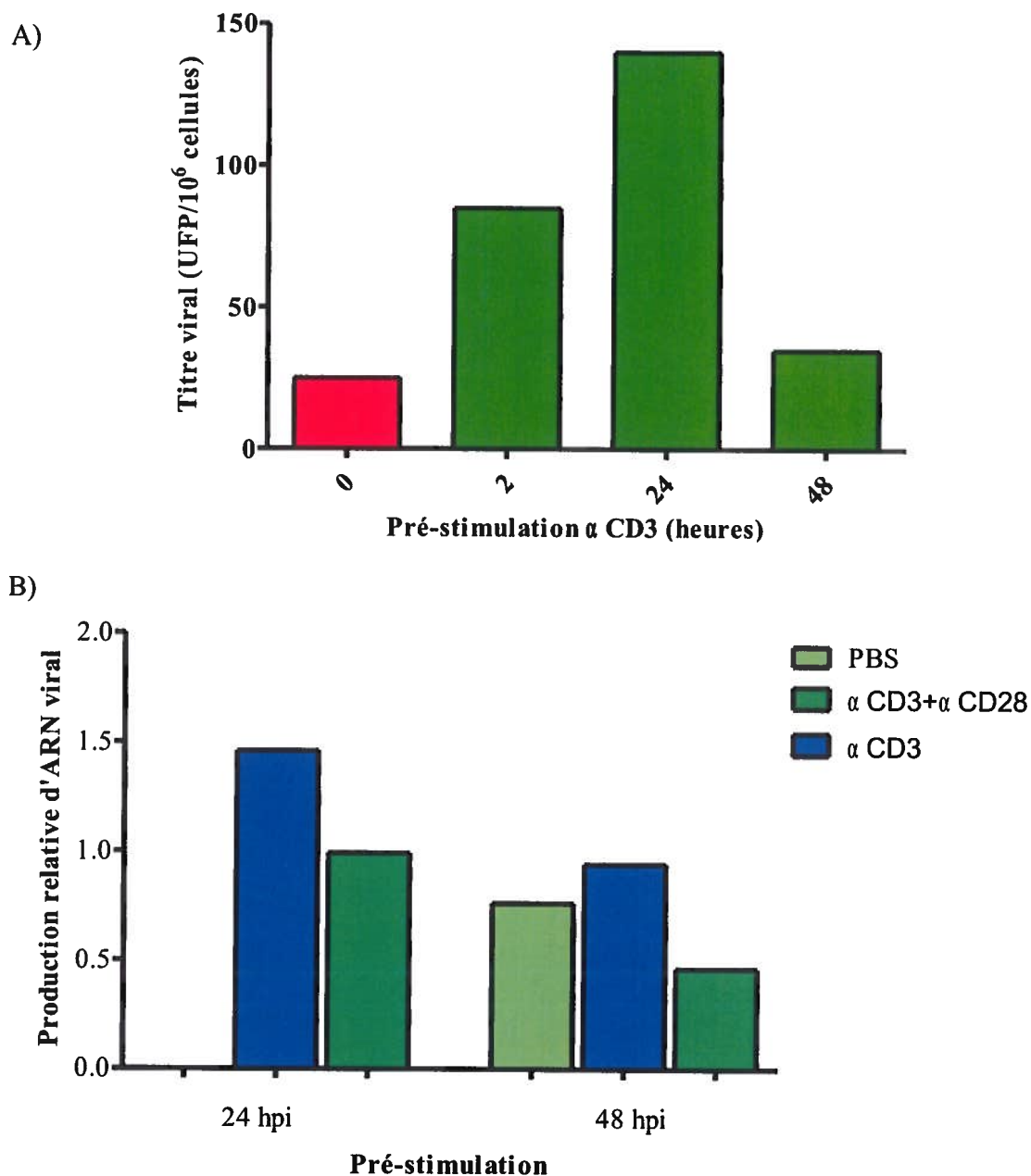


Figure 39: Susceptibilité à l'infection par MHV-A59 des splénocytes et des lymphocytes T.

A) Production de particules virales infectieuses détectées sur feuillet de cellules DBT, 72 heures après l'infection de splénocytes préalablement stimulés avec l' α CD3 pour 2, 24 et 48 heures ou sans stimulation avant contact une heure à dose virale élevée (MOI=10). B) Production dans les lymphocytes T d'ARN viral telle que déterminée par RT-qPCR relatif à l'inoculum associé aux cellules immédiatement congelées après contact. Les cellules ont été préalablement stimulées avec l' α CD3, l' α CD3 avec α CD28 ou sans stimulation avant contact une heure à dose virale élevée (MOI=10). Expérimentation unique.

5.3.2 *Lymphocytes T régulateurs*

Le marquage des lymphocytes T CD4⁺ de la rate n'a pas produit d'augmentation significative de la proportion des cellules T_{Reg} FOXP3⁺ chez les souris infectées. Dans cet organe, les pourcentages de T_{Reg} FOXP3⁺ sont demeurés identiques entre les souris témoins et infectées représentant environ 6 % de la population des lymphocytes T (Figure 40). De même, les lymphocytes T CD8⁺FOXP3⁺ n'ont pas été plus nombreux (données non montrées). Par contre, dans les ganglions lymphatiques une augmentation significative ($p < 0,05$) des cellules CD4⁺FOXP3⁺ fut observée suite à l'infection (Figure 40). Bien que les lymphocytes T n'aient pas été présents en nombre suffisant pour une analyse au SNC de souris témoins, le pourcentage de cellules FOXP3⁺ au SNC des souris infectées y était inférieur à 5 % (Figure 40).

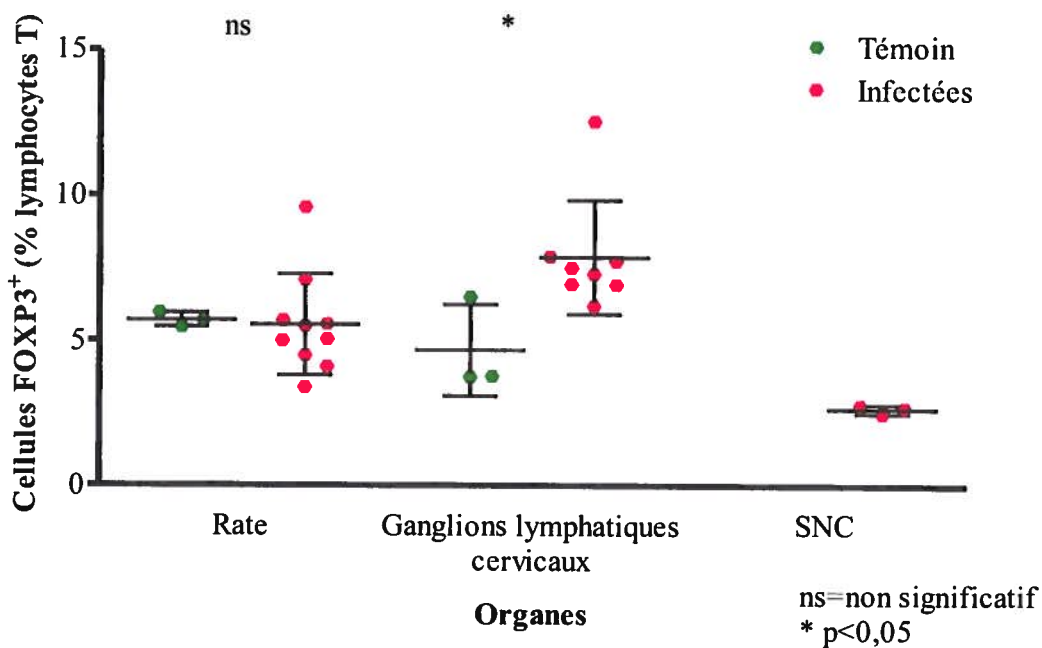


Figure 40: Lymphocytes T régulateurs FOXP3⁺ suite à l'infection par MHV-A59

Marquage intracellulaire du facteur de transcription FOXP3 dans les splénocytes et les lymphocytes, isolés des ganglions lymphatiques cervicaux et du SNC, à 7 jpi de souris C57BL/7 femelles ayant reçues 450 UFP de MHV-A59 (●) ou du milieu de culture stérile (témoins ●). Les cellules ont été marquées en surface pour les récepteurs CD3 et CD4. (n=3 souris témoins et 10 infectées, sauf 3 pour le SNC, ns = non significatif).

5.3.3 *Dysfonctionnement immunitaire*

Pour la prolifération croisée, des CPA de souris témoins ont été mélangés avec des lymphocytes T de souris témoins ou infectées. Inversement, des CPA de souris infectées ont été mélangées à des lymphocytes T de souris saines ou infectées. Dans les quatre conditions expérimentales ainsi produites, la prolifération en présence de ConA, d' α CD3 avec α CD28 et d' α CD3 avec IL-2rh a été déterminée. Dans la condition de stimulation avec la ConA, les CPA de souris témoins ont permis la prolifération des lymphocytes T des souris témoins et infectées, mais les lymphocytes T de ces dernières ont synthétisé nettement moins d'ADN (env. 50 %) que les lymphocytes T de souris témoins (Figure 41). Toutefois, les CPA de souris infectées ont été incapables d'induire une prolifération des lymphocytes T, peu importe la source (Figure 41). Toutes ces différences sont statistiquement significatives ($p < 0,001$). Lorsque l' α CD28 fut employé en costimulation avec l' α CD3, l'effet des CPA sur la prolifération a été aboli, la costimulation fournie par les CPA étant compensée par l'anticorps α CD28. Dans ces conditions, la prolifération des cellules T des souris infectées fut encore plus fortement réduite (Figure 41). La prolifération des lymphocytes T de souris infectées était alors en deçà de 20 % de celle des cellules de souris témoins. La stimulation avec l' α CD3 et l'IL-2rh a induit une prolifération des lymphocytes T des souris témoins et infectées identiques lorsque les CPA provenaient de la même source (Figure 41). Cependant, les proliférations obtenues ont été inférieures, de façon statistiquement significative ($p < 0,001$), lorsque les CPA provenaient de souris infectées comparativement aux proliférations en présence de CPA de souris témoins (Figure 41).

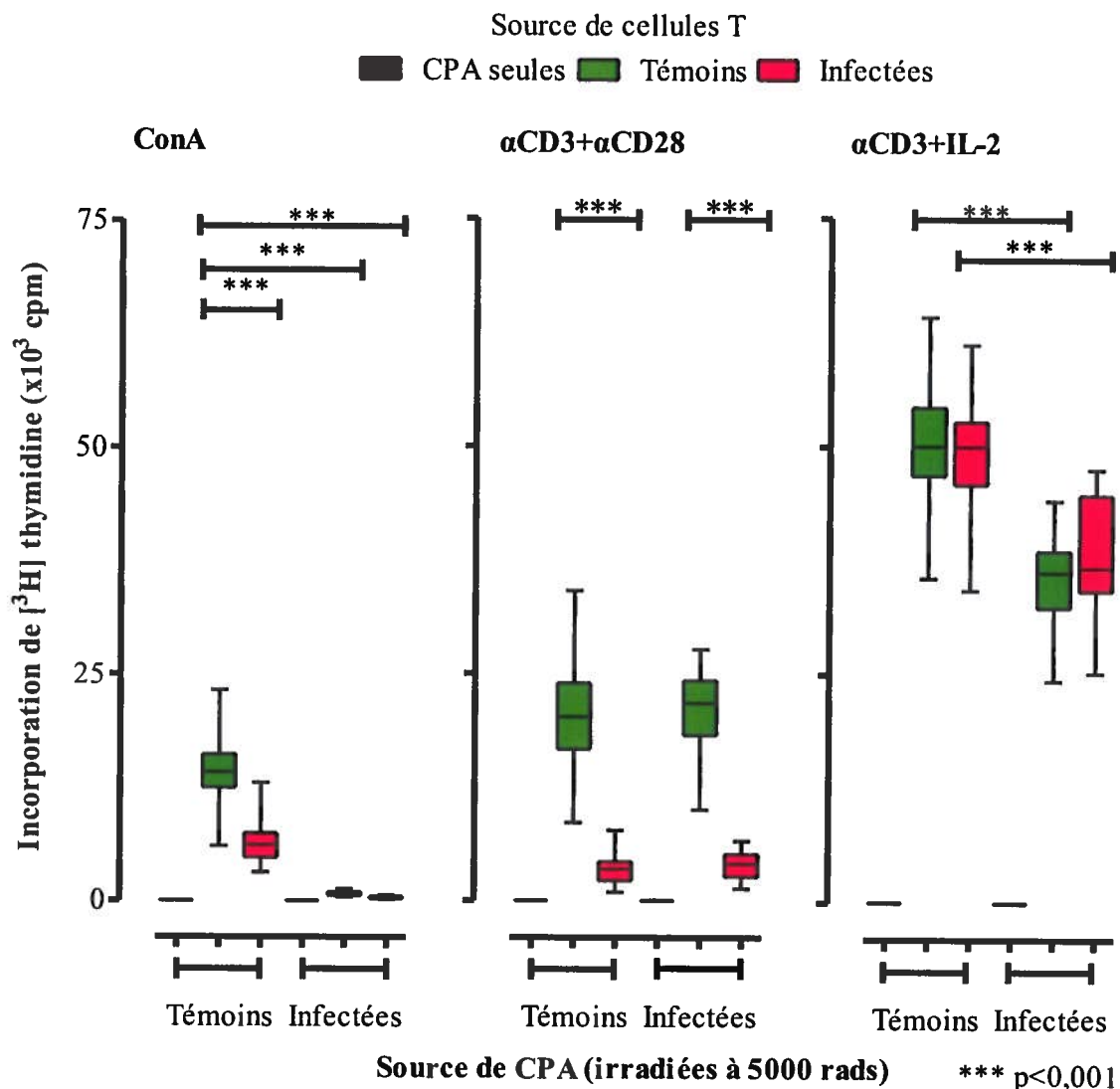


Figure 41: Test de lymphoprolifération croisée avec des lymphocytes T et des cellules présentatrices d'antigènes suite à l'infection par MHV-A59.

Prolifération des lymphocytes T purifiés des splénocytes à 7 jpi de souris C57BL/6 femelles ayant reçu 450 UFP par voie i.c. de MHV-A59 (■) ou du milieu de culture stérile (témoins ■) à 28-35 jours d'âge. Les des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes T de différentes combinaisons de sources ont servi pour un test de prolifération avec stimulation par la ConA (gauche), l' α CD3 avec l' α CD28 (centre) et l' α CD3 avec IL-2rh (droite). Chaque boîte contient 50 % des données d'un groupe (entre le 25^e et le 75^e percentile) qui sont entièrement délimitées par les barres (n=16 puits de CPA seules, 32 puits stimulés à la ConA et 48 puits pour les autres stimulations, en 2 expérimentations).

5.3.4 Cytokines immunosuppressives

La quantification des transcrits d'ARNm de cytokines pouvant par leur présence (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β_1) ou leur absence (IL-2) induire une diminution de la prolifération de certains types de lymphocytes T a été effectué sur les splénocytes totaux de souris témoins et infectées avec normalisation par le transcrit de la GAPDH. Malgré l'augmentation de transcrit de l'IL-2 et de l'IL-10 de quelques individus il n'y a eu augmentation statistiquement significative que d'un seul de ces transcrits pour tout le groupe de souris infectées, celui du TGF- β_1 (Figure 42). Cette augmentation ($p < 0,01$) a atteint des taux extrêmement élevés qui ne font de sens que lorsque l'on considère que les quantités de ces ARNm sont extrêmement faibles dans les cellules de souris témoins (Figure 42, valeurs non montrées). Toutefois, dans les homogénats de rates de souris différentes, aucune augmentation de production statistiquement significative de ces cytokines, incluant le TGF- β_1 ne s'est produite (Figure 43). Cependant, les cytokines IL-2 et IL-6 ont été significativement réduites (Figure 43). Quelques souris semblent avoir produit plus de l'IL-10 et du TGF- β_1 et moins de l'IL-2 et de l'IL-6 en moyenne (Figure 43) mais ces variations individuelles ne sont pas représentatives d'un nombre assez important d'individus. Le traitement des souris par un anticorps antagoniste du récepteur de l'IL-10 n'a pas produit d'effet notable sur la prolifération des cellules de ces souris à 7 jpi (Figure 44).

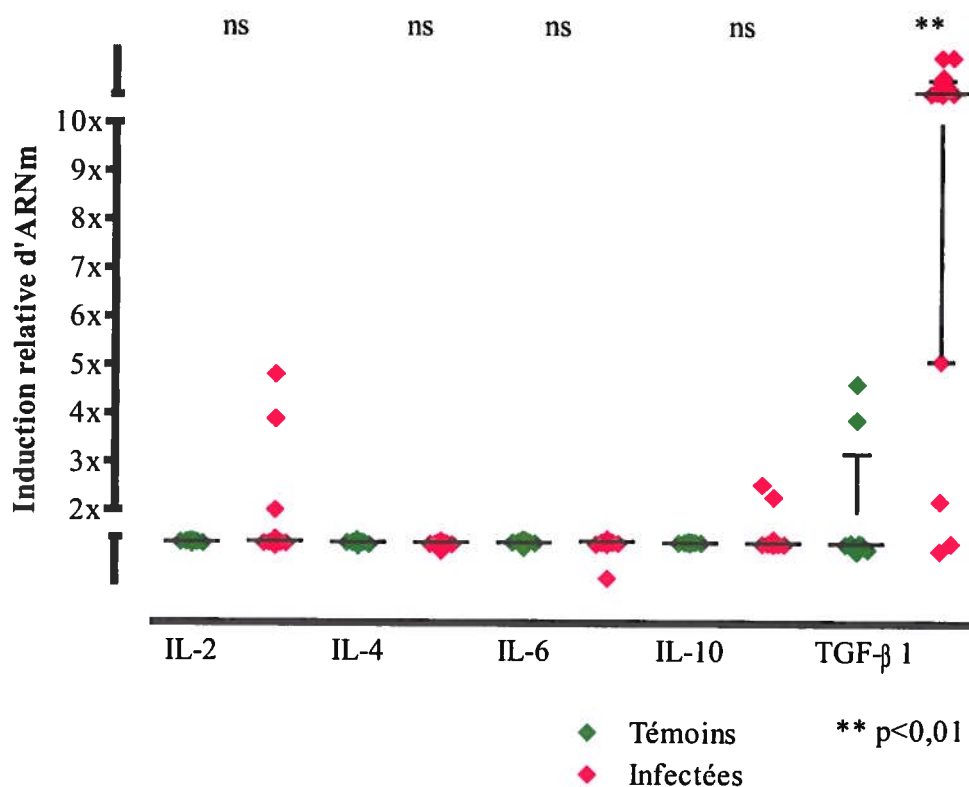


Figure 42: Modulation du niveau d'expression de gènes de cytokines à la rate suite à l'infection par MHV-A59.

Induction relative de la quantité d'ARNm de cytokines stimulatrices (interleukine 2, IL-2) ou inhibitrices (IL-4, IL-6, IL-10, facteur de croissance transformant (TGF-β₁)) à 7 jpi dans les splénocytes de souris C57BL/6 femelles âgées de 28-35 jours ayant reçu par injection i.c. 450 UFP de MHV-A59 (♦) ou de milieu de culture stérile (témoins ♦). L'induction est déterminée par RT-qPCR par comparaison de l'amplification du gène d'intérêt et du gène Gapdh pour chaque échantillon extrait de souris (trois paires d'amplifications pour chaque gène de n=9 témoins et 15 infectées en deux expérimentations).

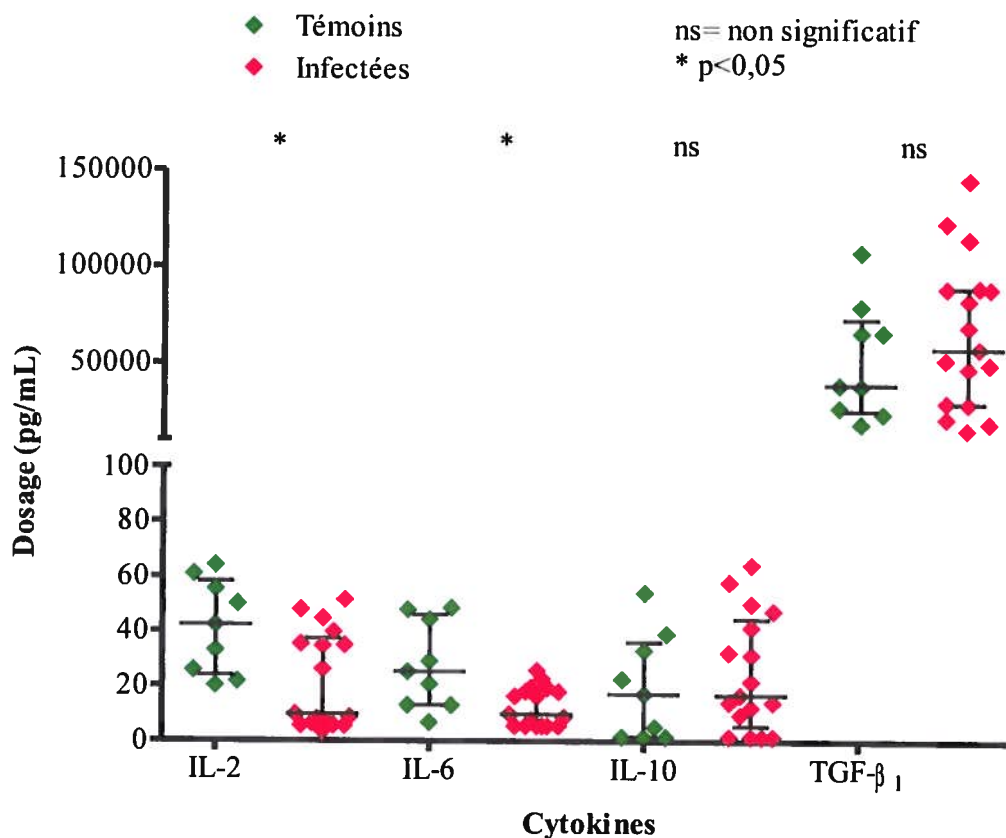


Figure 43: Dosages de cytokines sur des extraits totaux de rate suite à l'infection par MHV-A59.

Dosage des cytokines stimulatrices (interleukine 2, IL-2) ou inhibitrices (IL-4, IL-6, IL-10, facteur de croissance transformant TGF-β₁) dans les rates homogénéisées à 7 jpi de souris C57BL/6 femelles de 28-35 jours ayant reçu par injections i.c. de 450 UFP de MHV-A59 (◆) ou du milieu de culture stérile (témoins ◆). Le dosage à été effectué par le service externe sur « Searchlight® Protein Array ». (n=9 rates de souris témoins et 17 rates de souris infectées en deux expérimentations, ns=non significatif).

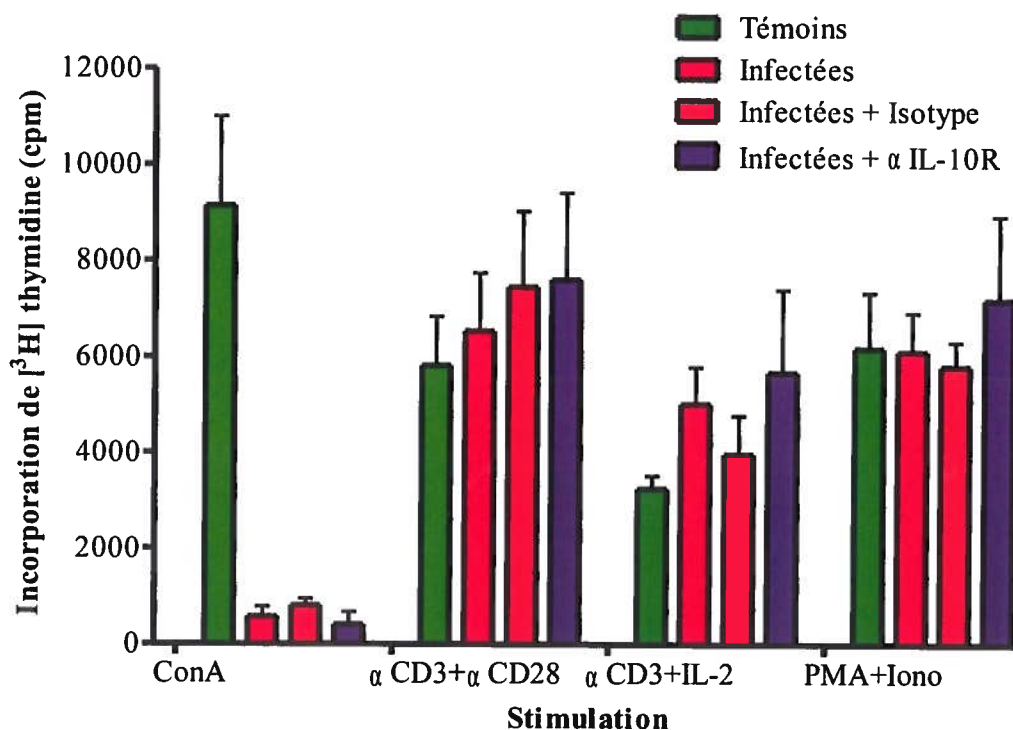


Figure 44: Lymphoprolifération de splénocytes de souris traitées par injection d'anticorps bloquant le récepteur de l'interleukine 10 suite à l'infection par MHV-A59.

Prolifération des splénocytes à 7 jpi de souris C57BL/6 femelles ayant reçu 450 UFP par voie i.c. de MHV-A59 (■) ou du milieu de culture stérile (témoins ■) à 28-35 jours d'âge. Les souris traitées ont ensuite reçu une injection i.p. de l'anticorps bloquant le récepteur de l'interleukine 10 (IL-10R ■), d'un anticorps non bloquant du même isotype (■) ou de PBS (■) au jour 0 (200 µg) puis une seconde injection au jour 4 (100µg). Les splénocytes ont été stimulés avec la ConA, l'αCD3 avec l'αCD28, l'αCD3 avec IL-2rh et la PMA avec ionomycine. Les moyennes sont représentées avec leurs écarts-types (n=16 puits pour chaque stimulation sauf la ConA avec n=16).

5.3.5 *Le facteur de croissance transformant*

La transcription accrue du gène du TGF- β_1 laisse croire à une production plus élevée de la cytokine chez les souris suite à l'infection par MHV-A59. Toutefois, dans le sérum tant les formes actives que latentes n'ont aucunement été affectées de façon statistiquement significative par l'infection (Figure 45). La culture *ex vivo* des splénocytes de souris témoins et infectées n'a pas non plus produit de hausse significative de sécrétion de TGF- β_1 (Figure 46). En fait, la stimulation avec l' α CD3 et l' α CD28 a produit l'effet inverse (Figure 46).

Il est possible que le TGF- β_1 produit ne soit pas relâché dans le milieu ou le sérum, mais demeure ancré en surface des T_{Reg} qui ainsi inhiberaient leurs cibles par contact direct. L'expression de certains gènes des lymphocytes T est affectées par l'action du TGF- β_1 et parmi ceux-ci on retrouve les facteurs de transcription GATA-3, T-bet, STAT4 et la cytokine IFN- γ . La quantification de la transcription de ces gènes ciblés par RT-qPCR a été effectuée sur les splénocytes isolés de souris témoins et infectées à 7 jpi (Figure 47). La transcription de toutes les cibles étudiées a été induite de façon statistiquement significative (GATA-3 et IFN-g: $p > 0,05$; T-bet et Stat4: $p > 0,01$) (Figure 47). Toutefois, le facteur de transcription T-bet a été induit de 2 à 7 fois plus que GATA-3.

Finalement, la présence de la cytokine TGF- β_1 a été détectée dans le cytoplasme des splénocytes de souris témoins ou infectées. Même si une hausse statistiquement significative de TGF- β_1 s'est produite dans les lymphocytes T (Figure 48, droite) celle-ci n'est que très faible puisque la proportion de cellules positives n'est passée que de 2 % à 3 % en moyenne. Cependant, cette hausse fut aussi présente dans les autres splénocytes (excluant les lymphocytes T), passant de 3 % à 5 % (Figure 48, droite).

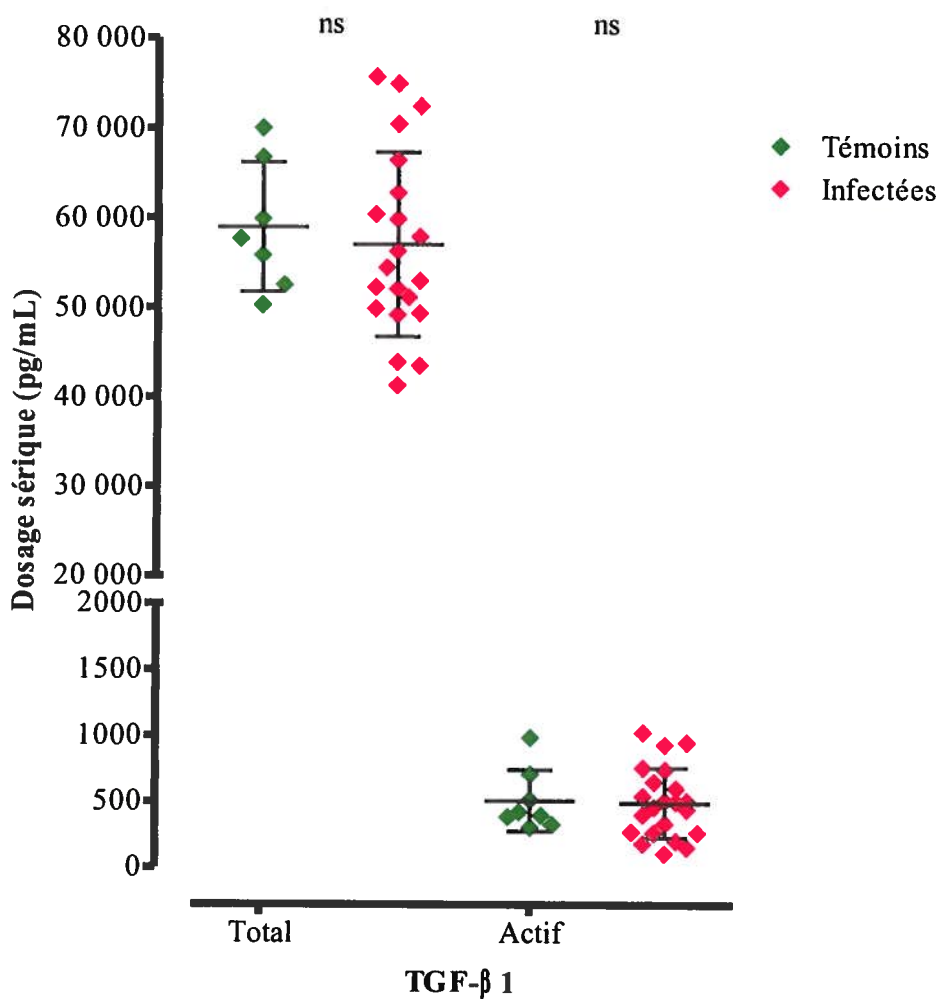


Figure 45: Dosages immunoenzymologique du facteur de croissance transformant dans le sérum suite à l'infection par MHV-A59.

Dosage immunoenzymologique (ELISA) du facteur de croissance transformant ($TGF-\beta_1$) dans le sérum à 7 jpi de souris C57BL/6 femelles ayant reçu par injections i.c. 450 UFP de MHV-A59 (♦) ou de milieu de culture stérile (témoins ♦) à 28-35 jours d'âge. (n=7 souris témoins et 21 souris infectées en trois expérimentations, ns=non significatif).

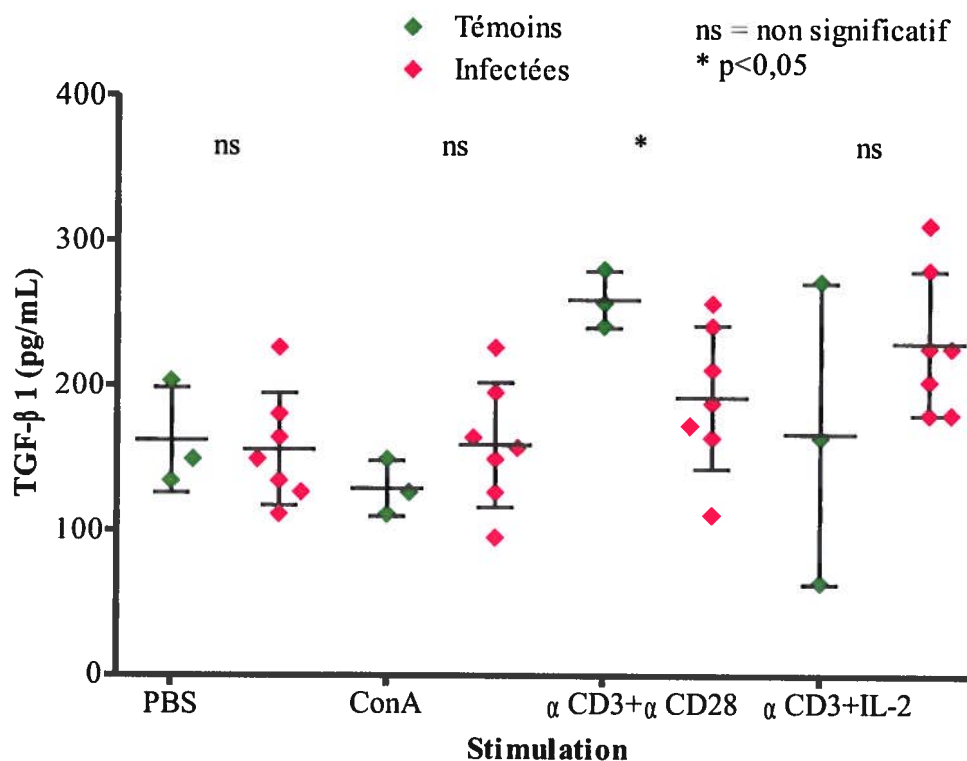


Figure 46: Dosage immunoenzymologique du facteur de croissance transformant dans le surnageant de cultures de splénocytes de souris suite à l'infection par MHV-A59.

Dosage immunoenzymologique (ELISA) du facteur de croissance transformant ($TGF-\beta_1$) dans le surnageant de splénocytes à 7 jpi de souris C57BL/6 femelles ayant reçu par injections i.c. 450 UFP de MHV-A59 (◆) ou de milieu de culture stérile (témoins ◆) à 28-35 jours d'âge. Les splénocytes ont été mis en culture 2 jours en présence de concanavale A (ConA), l' $\alpha CD3$ avec l' $\alpha CD28$, l' $\alpha CD3$ avec IL-2rh et la PMA avec ionomycine. (n=3 souris témoins et 7 souris infectées en deux expérimentations, ns=non significatif).

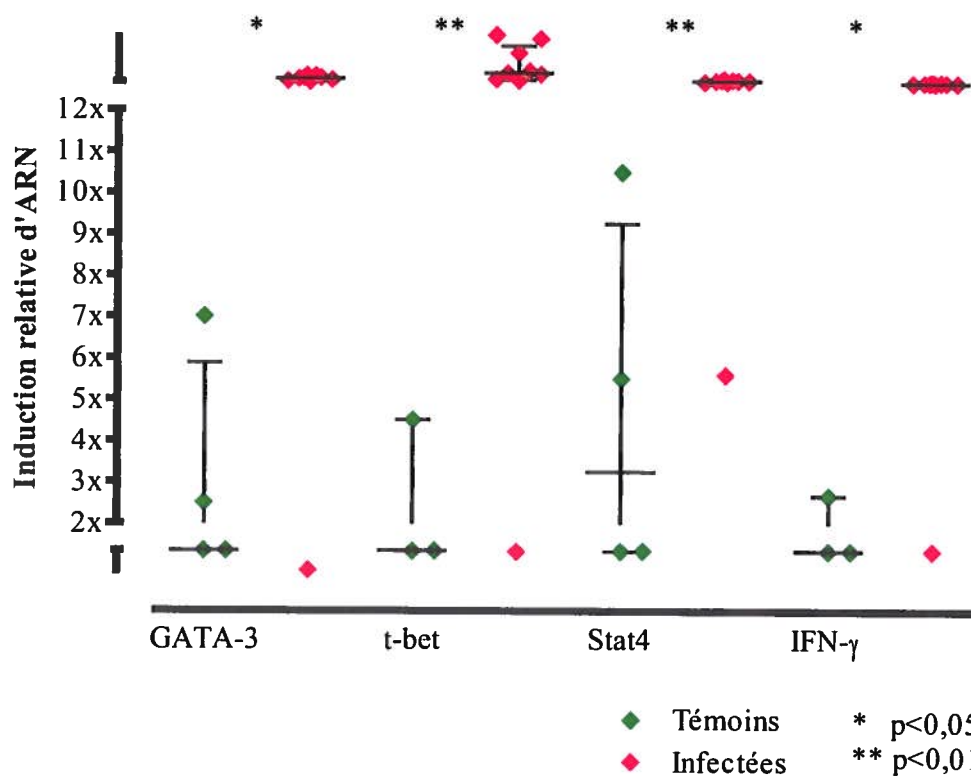


Figure 47: Induction de la transcription de gènes ciblés du facteur de croissance transformant à la rate suite à l'infection par MHV-A59.

Induction relative des quantités d'ARNm de gènes ciblés par le facteur de croissance transformant ($TGF-\beta_1$) dans les splénocytes à 7 jpi de souris C57BL/6 femelles de 28-35 jours ayant reçu par injections i.c. de 450 UFP de MHV-A59 (♦) ou de milieu de culture stérile (témoins ♦). L'induction est déterminée par RT-qPCR par comparaison de l'amplification du gène d'intérêt et du gène Gapdh pour chaque échantillon extrait de souris (trois paires d'amplifications pour chaque gène de n=6 témoins et 9 infectées en deux expérimentations).

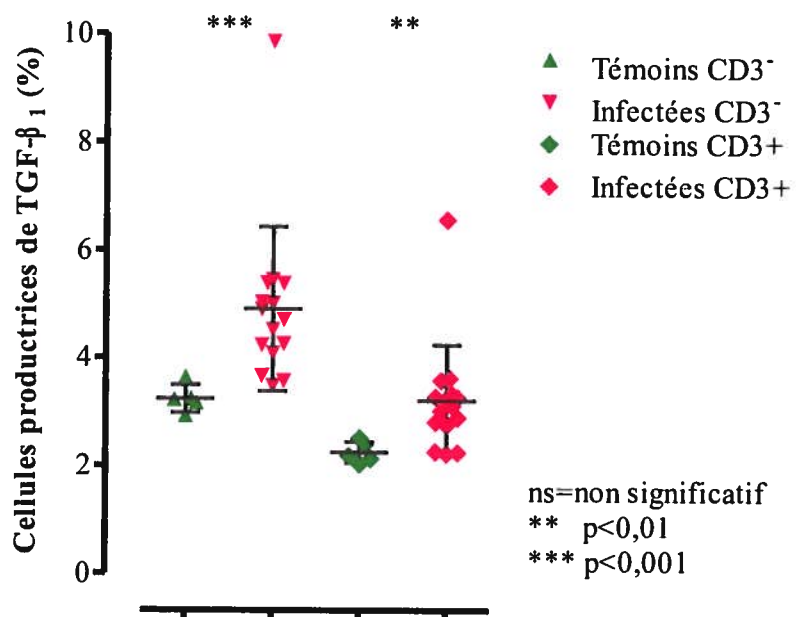


Figure 48: Expression du facteur de croissance transformant par les splénocytes suite à l'infection par MHV-A59.

Marquage intracellulaire à 7 jpi du facteur de croissance transformant (TGF- β_1) des splénocytes de souris C57BL/6 femelles ayant reçu 450 UFP de MHV-A59 (▼◆) ou du milieu de culture stérile (témoins ▲◆) à l'âge de 28-35 jours. Expression dans les cellules T (CD3⁺ ◆◆) et autres splénocytes (CD3⁻ ▲▼) de souris individuelles avec la moyenne et les écarts-types de chaque groupe (n=6 souris témoins et 15 souris infectées en deux expérimentations).

5.4 Discussion

Les virus comme MHV qui peuvent induire une infection persistante doivent d'abord échapper avec succès à la détection et l'élimination par le système immunitaire. Parmi les mécanismes employés à cet effet par les virus se retrouve la modulation négative de la réponse immunitaire. Jusqu'à maintenant, la nécessité d'une immunosuppression pour l'infection persistante par le MHV n'a pas été démontrée, par contre cette dernière est nécessaire au développement de la maladie démyélinisante du SNC (Stohlman *et al.*, 1982). L'immunosuppression pourrait donc contribuer à l'établissement d'une infection persistante par MHV. Divers mécanismes peuvent être mis à contribution lors de l'induction de cette immunosuppression, incluant l'infection de cellules du système immunitaire avec la perte subséquente des signaux activateurs ou l'induction de signaux répresseurs via contact direct ou par l'entremise des cytokines.

5.4.1 Infection des cellules du système immunitaire

La lymphopénie suite à l'infection par MHV est observée suite à diverses autres infections, par exemple les coronavirus comme le FIPV (de Groot-Mijnes *et al.*, 2005; Haagmans *et al.*, 1996; Kipar *et al.*, 2006) et le SARS-CoV (Booth *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003; Poutanen *et al.*, 2003; Tsang *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Le FIPV est un variant du FECoV (Perlman et Dandekar, 2005) qui infecte les macrophages et les monocytes (Stoddart et Scott, 1989) et dont l'ARN viral est retrouvé dans les tissus lymphoïdes (Dean *et al.*, 2003). La réponse humorale induite n'est aucunement protectrice et induit en fait l'infection de cellules non susceptibles, par l'absence du récepteur approprié, via l'opsonisation de virus reconnus par ces anticorps (Corapi *et al.*, 1992; Hohdatsu *et al.*, 1991; Vennema *et al.*, 1990). Tout comme pour l'infection par le MHV, l'élimination du FIPV requiert sûrement une réponse CD8⁺ forte et l'infection des CPA résulte probablement en une inhibition de cette réponse (Bergmann *et al.*, 2008). Dans le cas du SARS-CoV, le virus est détecté directement dans les lymphocytes isolés de patients infectés, suggérant leur susceptibilité (Gu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004). Lors de l'infection par MHV-A59, l'infection directe des lymphocytes T a d'abord été exclue en l'absence de détection de cellules infectées dans la rate (de Souza *et al.*, 1991; Godfraind

et al., 1995a; Smith *et al.*, 1987a; Smith *et al.*, 1987b) et surtout l'absence apparente du récepteur viral, CEACAM1a, à la surface de ces cellules (Godfraind et Coutelier, 1998; Godfraind *et al.*, 1995a; Godfraind *et al.*, 1998). Quoique CEACAM1a ne soit pas normalement exposé en surface sur les lymphocytes T naïfs, il est présent à l'intérieur de vésicules intracellulaires de façon constitutive et en surface suite à l'activation (Blau *et al.*, 2001; Hemmila *et al.*, 2004; Iijima *et al.*, 2004; Kammerer *et al.*, 1998; Moller *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2004). Malgré tout, les lymphocytes T qui ne semblaient pas directement infectés, le sont après avoir été mis en contact avec des cellules stromales déjà infectées par MHV-3 (Lamontagne et Jolicoeur, 1991). Ce phénomène est observé *in vitro* alors que des lignées cellulaires non susceptibles deviennent infectées lorsque mises en contact avec des lignées cellulaires susceptibles (Gallagher *et al.*, 1992). Cette susceptibilité des lymphocytes T est toutefois variable selon les souches de MHV employées, cependant ni JHM, ni A59 n'ont été testés (Lamontagne et Jolicoeur, 1991). Malgré la stimulation préalable ou simultanée avec l' α CD3, les lymphocytes T ne semblaient pas susceptibles à l'infection par MHV-A59 (Figure 39). De nouvelles particules virales ne semblaient pas avoir été produites, du moins à un niveau détectable dans le surnageant récolté, et l'ARN présent fut équivalent à la quantité de particules virales encore accrochées à la surface cellulaire. Il n'est pour l'instant pas possible de déterminer si les particules virales ont pu pénétrer les lymphocytes T, mais même si elles l'ont fait, aucune réplication significative ne semble s'être produite. L'utilisation d'un anticorps anti-protéine S de MHV-A59 couplé au FITC n'a pas permis d'élucider cette question, en raison d'un marquage intracellulaire non spécifique trop élevé, malgré la validation du marquage sur la lignée cellulaire susceptible A20 (données non montrées). L'expression du récepteur CEACAM1a en surface n'a pas été vérifiée, mais il se pourrait que les stimulations aient été sous-optimales pour son induction. Sur les cellules humaines, il a été montré que les stimulations avec l'IL-2rh induisaient 3 fois plus l'expression du récepteur CEACAM1a en surface qu'avec des stimulations à la phytohémagglutinine (PHA) (Boulton et Gray-Owen, 2002).

Ainsi l'infection directe des lymphocytes T ne semble pas être en cause dans l'immunosuppression induite suite à l'infection par MHV-A59. Tout comme la déplétion

thymique suite à l'infection par MHV-3 qui résulte d'une infection non productive, mais lytique des cellules stromales et des thymocytes qui y sont rattachés (Lamontagne et Jolicoeur, 1991), la lymphopénie associée à l'infection par MHV-A59 pourrait être liée à l'infection de cellules de support ou des CPA. En support à cette théorie, les rates de souris infectées contenaient de l'ARN viral entre 5 et 10 jpi, et les splénocytes infectés *in vitro* semblaient produire de nouvelles particules virales. Cela n'est pas du tout étonnant en soit, car la susceptibilité des différentes cellules qui composent les splénocytes a été montrée. De plus, les macrophages (Coutelier *et al.*, 1994; Godfraind et Coutelier, 1998; Godfraind *et al.*, 1998) ainsi que les cellules B (Coutelier *et al.*, 1994; Godfraind et Coutelier, 1998; Godfraind *et al.*, 1998) et dendritiques (Blau *et al.*, 2001; Godfraind et Coutelier, 1998; Godfraind *et al.*, 1998) expriment le récepteur CEACAM1a utilisé par le virus. L'infection des macrophages par le MHV a été indirectement montrée dès les années 1960 (Bang et Warwick, 1960) puis confirmée par la suite pour plusieurs souches de MHV (Knobler *et al.*, 1984b; Lamontagne et Jolicoeur, 1994; Schindler *et al.*, 1983; Taguchi *et al.*, 1981). Par contre seulement quelques souches semblent en mesure d'infecter les cellules B (Lamontagne et Jolicoeur, 1994). Lors de l'infection par MHV-JHM, les cellules B contiennent du virus infectieux et les macrophages des antigènes viraux (de Souza *et al.*, 1991). Les cellules dendritiques de la moelle sont susceptibles à l'infection *in vitro* par MHV (Turner *et al.*, 2004; Zhou et Perlman, 2006). Cette infection, qui se produit via le récepteur viral et non pas par endocytose du virus, est productive et induit la formation de syncytiums, (Turner *et al.*, 2004) mais pas l'apoptose (Zhou et Perlman, 2006). La réplication virale est plus efficace dans les cellules dendritiques matures qu'immatures, malgré l'expression équivalente du récepteur CEACAM1a (Zhou et Perlman, 2006). Cela pourrait expliquer l'absence d'infection des lymphocytes T même en présence du récepteur en surface des cellules activées. De plus, l'infection des CPA pourrait mener à des problèmes d'activation de la réponse immunitaire. Les cellules dendritiques qui ont été infectées ne diminuent pas l'expression des molécules de costimulation, CD86 ou MHC-II (Zhou et Perlman, 2006). Par contre, l'exposition au MHV-JHM réduit la capacité de ces cellules dendritiques à stimuler la prolifération de cellules T CD8⁺ spécifiques (Zhou et Perlman, 2006). Comme ces cellules dendritiques sont cinq à dix fois plus susceptibles à l'infection par MHV-A59 que par MHV-JHM (Zhou et Perlman, 2006), il est possible que

MHV-A59 soit en mesure de réduire la capacité de ces cellules à stimuler la prolifération des cellules T. La perte de cellules dendritiques dans la rate suite à l'infection par MHV-A59 n'a pas été démontrée spécifiquement dans ce travail. Toutefois, rappelons que malgré des pertes importantes de lymphocytes T et B celles-ci continuent de représenter un pourcentage constant de cellules spléniques, ce qui suggère fortement des pertes similaires en cellules dendritiques, macrophages et autres splénocytes.

5.4.1.1 *Les interférons*

La première phase de l'infection par plusieurs virus humains (influenza, rougeole, virus du nil occidental, Ebola, fièvre de Lassa, LCMV, MHV-3 et SARS) est caractérisée par une forte lymphopénie (Bahl *et al.*, 2006). Une lymphopénie similaire est observée lors de l'infection d'animaux domestiques (McNally *et al.*, 2001; Nabeshima *et al.*, 2002; Peacock *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003) et de laboratoire (Harder *et al.*, 1996; Tompkins *et al.*, 1991; Vallée *et al.*, 2001; Zitzow *et al.*, 2002). Cette lymphopénie est généralisée à travers l'organisme et atteint particulièrement les lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Bahl *et al.*, 2006). La production des interférons de type I précède immédiatement cette attrition (McNally *et al.*, 2001). De plus, le composé poly(I:C) inducteur de l'expression de TLR3, induit une perte cellulaire similaire à celle provoquée par le LCMV (Bahl *et al.*, 2006). Les souris déficientes en récepteur des IFN de type I (IFNAR^{-/-}) sont protégées face à cet effet de l'infection par LCMV (McNally *et al.*, 2001). Ceci laisse supposer que cette attrition initiale serve à faciliter le développement d'une réponse antivirale forte en éliminant les clones non spécifiques (Jiang *et al.*, 2003) pour laisser la place aux clones spécifiques (McNally *et al.*, 2001; Peacock *et al.*, 2003).

Il est donc tout à fait possible que les interférons de type I puissent être responsables de la lymphopénie observée suite à l'infection par MHV-A59. D'autant plus qu'ils sont décrits comme étant importants dans la réponse immunitaire contre le MHV (Ireland, Derek D C and Stohlman, Stephen A and Hinton, David R and Atkinson, Roscoe and Bergmann, Cornelia C, 2008). Selon cette théorie, une lymphopénie induite par les interférons, touchant les cellules de toutes les spécificités, pourrait donc éventuellement induire une

expansion clonale des lymphocytes T spécifiques du virus et ainsi permettre une meilleure réponse antivirale. Par contre, cette expansion pourrait aussi toucher d'éventuels clones autoréactifs qui alors attaqueraient la myéline en absence de virus, supportant le rôle de l'immunité acquise dans la démyélinisation inflammatoire du SNC. Cependant, il a aussi été montré que MHV-A59 peut inhiber l'action des interférons de type I, particulièrement l'IFN- β (Roth-Cross *et al.*, 2007). De plus, la lymphopénie induite par les interférons de type I touche surtout les lymphocytes mémoires, qui sont normalement absents de souris n'ayant pas encore été infectées, comme celles employées ici. Il devient alors plus difficile d'expliquer la disparition des lymphocytes T et B dans des proportions identiques.

Chez les souris déficientes en récepteur de l'interféron de type I (IFNAR^{-/-}) infectées par MHV-A59 il n'a pas été possible malheureusement d'observer un effet similaire à ce qui était observé avec le LCMV, celles-ci ne survivant pas plus de 2-3 jours à l'infection ((Cervantes-Barragan *et al.*, 2007) et données non montrées). Un blocage plus finement régulé lors de l'infection ou ne touchant qu'un ou quelques types cellulaires à la fois pourrait éventuellement permettre d'éclaircir le rôle des interférons de type I dans la lymphopénie associée à MHV-A59. Une alternative intéressante pourrait être possible si, comme on peut le supposer, les niveaux d'interférons induits par l'infection avec les doses de 100 et 450 UFP de MHV-A59 sont différents. Il serait alors possible d'injecter suffisamment d'interférons exogènes de façon à imiter les niveaux produits lors de l'infection virale.

5.4.2 *Lymphocytes T régulateurs*

Un des mécanismes les plus anciennement connus de la tolérance périphérique est sous la responsabilité de cellules T régulatrices (T_{Reg}). Ces cellules T_{Reg}, expriment souvent les récepteurs CD4 et CD25. Ces cellules se confondent donc avec les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs suite à une infection, mais se distinguent par l'expression du facteur de transcription FOXP3 (Sojka *et al.*, 2008; Tang et Bluestone, 2008; Vignali *et al.*, 2008). Ces cellules requièrent l'IL-2 pour leur prolifération mais contrairement aux cellules T conventionnelles n'ont pas besoin de signaux via le TCR et CD28 (Thornton et Shevach,

2000). La coculture de ces cellules régulatrices avec des cellules $CD4^+CD25^-$ inhibe l'activation de ces dernières dans une relation directement liée au nombre de cellules T_{Reg} . Le mécanisme d'action de ces cellules serait entre autres par contact direct et agirait sur les cellules $CD4^+$ et $CD8^+$ (Piccirillo et Shevach, 2001) en supprimant la transcription des gènes de l'IL-2, de l'INF- γ et de l'IL-2R α (CD25). De plus, la vaste majorité des cellules effectrices expriment CD69, même dans ces cocultures avec des cellules régulatrices (Qiao *et al.*, 2007). Ces cellules régulatrices ne prolifèrent pas en présence de stimulations du TCR et d' α CD28, mais l'addition d'IL-2 produit une prolifération (Schwartz, 2003). Cette façon de répondre pourrait s'accorder avec nos résultats où la costimulation par l' α CD28 ne produisait pas une prolifération normale tandis que l'IL-2 la rétablissait (Figure 31).

De façon naturelle, il a été montré qu'environ 5-10 % des cellules T en circulation dans les souris saines sont d'un phénotype régulateur (Mills, 2004). Les pourcentages de cellules FOXP3⁺ dans la rate et dans le SNC qui ont été observés suite à l'infection par MHV-A59 sont donc proches de la normale, alors peuvent-ils expliquer l'inhibition de prolifération des splénocytes en test de prolifération? Dans le modèle animal MCAO, ces cellules sont nettement augmentées, les cellules FOXP3⁺ passant de moins de 4 % à un peu plus de 12 %, une multiplication par trois malgré la diminution de 80 % du nombre de cellules T dans la rate (Offner *et al.*, 2006). Considérant donc nos résultats où une perte de 50-80 % des splénocytes a été observée chez les souris infectées par MHV-A59, la stabilité de la proportion en lymphocytes T FOXP3⁺ de la rate peut donc paraître intéressante. Puisque les cellules nT_{Reg} s'accumulent au site de l'infection pour s'y diviser (Klein *et al.*, 2003), il n'est pas étonnant de voir une augmentation significative de ces cellules au niveau des ganglions lymphatiques cervicaux et du SNC.

Il est possible que les cellules T_{Reg} ou les CPA infectées soient responsables de la conversion de cellules T naïves en nouvelles cellules iT_{Reg} FOXP3⁻ (T_R1) (Dieckmann *et al.*, 2002; Jonuleit *et al.*, 2002). Par contre, si les nT_{Reg} sont de puissants inhibiteurs non spécifiques, qui agissent même en absence de restimulation de leur TCR, les iT_{Reg} eux nécessitent une telle restimulation pour causer l'inhibition (Qiao *et al.*, 2007). Alors que les nT_{Reg} agissent surtout par contact direct, les cellules converties elles effectuent leur

suppression par la sécrétion de l'IL-10 ou de TGF- β . Ainsi, à l'instar du FIPV, qui induit une déplétion des cellules T suite à l'infection des macrophages et possiblement des cellules dendritiques, MHV-A59 pourrait induire une lymphopénie et une inhibition de la prolifération via la sécrétion accrue d'une cytokine immunosuppressive (Dean *et al.*, 2003).

5.4.3 *Lymphoprolifération croisée*

Les CPA jouent un rôle vital dans l'établissement d'une réponse immunitaire acquise. La présentation d'antigènes aux lymphocytes T par ces cellules, dans les organes lymphoïdes, permet leur activation et surtout l'expansion des clones T réactifs. Ces CPA sont aussi capables, de rendre inactifs les clones auto-réactifs, comme lorsqu'ils sont en présence d'antigènes du soi. Il est donc possible que, suite à l'infection des CPA par MHV-A59, celles-ci deviennent incapables de stimuler les cellules T et même les rendent anergiques. Suite à l'infection par MHV-JHM, une prolifération normale n'est pas rétablie par l'ajout de CPA saines (de Souza et Smith, 1991). La prolifération est par contre supérieure à la normale avec les splénocytes de souris qui sont déplétées de leurs macrophages avant l'infection par MHV-A59 (Wijburg *et al.*, 1997).

Afin de vérifier l'hypothèse que l'inhibition est directement liée au CPA plutôt qu'aux lymphocytes T eux-mêmes, un test de prolifération croisée a été effectué (Figure 41). En accord avec cette hypothèse, la prolifération des lymphocytes T fut réduite en présence de CPA provenant de souris infectées. Par contre l'incapacité des cellules T à répondre à une stimulation était aussi présente lorsque les lymphocytes T de souris infectées ont été mis en présence de CPA de souris témoins. Ces résultats ont reproduit ce qui est observé tant avec JHM (de Souza et Smith, 1991) qu'avec A59 (Wijburg *et al.*, 1997), et ont confirmé l'état anergique des cellules T isolées de souris infectées. Cette anergie fut d'ailleurs renversée *in vitro* en présence d'IL-2 tout comme l'anergie produite par une activation inadéquate (Schwartz, 2003). Si les CPA de souris infectées ne semblaient pas pouvoir induire la prolifération normale des lymphocytes T, elles ne semblaient pas l'inhiber. En effet, la stimulation employant l' α CD28, contournant la nécessité des CPA, a produit une prolifération normale des lymphocytes T de souris témoins, même en présence de CPA de

souris infectées. Par contre, l'effet des CPA est demeuré significatif, même en stimulation avec IL-2rh car en nombres égaux, les CPA de souris infectées ont permis une moins bonne prolifération.

Étonnamment, les lymphocytes T des souris infectées ont déjà subi, avant l'isolement, une altération qui inhibe leur prolifération. L'effet est-il indirect via des cytokines sécrétées? Cet effet est-il par contact direct, suite à l'infection des CPA? Dans un modèle murin d'ACV (*Middle Cerebral Artery Occlusion; MCAO*), la rate perd de façon significative et très rapidement près de 80 % de sa cellularité, mais une sous-population est parvenu à augmenter, les cellules T régulatrices FOXP3⁺, responsables des problèmes immunitaires associés à ce modèle et à l'ACV (Offner *et al.*, 2006). La présence accrue de telles cellules parmi les splénocytes des souris infectées pourrait expliquer leur incapacité à proliférer et l'infection des CPA pourrait mener à l'induction de nouvelles cellules régulatrices suite à la stimulation *in vitro*.

5.4.4 Cytokines et immunosuppression

Différentes cytokines exercent un rôle immunosuppresseur dans certains contextes. L'IL-4 par exemple stimule la prolifération des cellules T de type T_{H2}, mais inhibe la prolifération des cellules T de type T_{H1}. L'IL-6 par contre stimule la prolifération des T_{FH} en coopération avec l'IL-21 ou la prolifération des cellules T_{H17} avec le TGF-β₁. Les cytokines IL-10 et TGF-β₁ sont par ailleurs des produits associés aux cellules T_{Reg} dans leur action suppressive ou encore dans l'induction de la transformation de nouvelles cellules régulatrices. Puisque la réponse antivirale est généralement de type T_{H1}, la mesure de l'expression de l'ARNm de la cytokine IL-4 a été incluse dans l'analyse de la transcription suite à l'infection par MHV-A59. Comme les résultats (Figure 42) montrent qu'il y a eu seulement augmentation de la transcription pour le TGF-β₁ et pas pour l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6 ni l'IL-10 il semble peu probable qu'un déséquilibre vers les profils T_{H2} ou T_{H17} ait été impliqué dans l'immunosuppression observée. Cependant, les cytokines IL-2 et IL-6 produites dans la rate ont été réduites en concentration suite à l'infection par MHV-A59. Comme il a été proposé dans la section 4, les cellules stimulées semblent avoir produit de

moindres quantités d'IL-2, mais en demeurant capables de proliférer lorsque de l'IL-2 exogène était ajouté. La diminution de l'IL-6 rend aussi peu probable la différenciation des lymphocytes T de la rate en T_{FH} ou encore en T_{H17}.

5.4.4.1 Le facteur de croissance transformant

Le TGF- β_1 est produit sous forme d'une grande molécule précurseur contenant un propeptide en plus du TGF- β_1 comme tel. Avant la sécrétion, le propeptide est clivé mais demeure lié au TGF- β_1 par des liens non covalents. Le TGF- β_1 est ensuite séquestré par une protéine associée à la latence (*latency associated peptide*: LAP). Le TGF- β_1 possédant une très forte affinité pour son récepteur, ce processus de séquestration permet une forme supplémentaire de régulation. Plusieurs facteurs peuvent libérer le TGF- β_1 actif incluant des protéases, des intégrines, un pH plus acide, et des espèces réactives de l'oxygène. Une fois libéré le TGF- β_1 lie la chaîne III de son récepteur qui le transfère sur la portion active composée de chaînes de type I et II. Un récepteur abondant sur les cellules endothéliales, l'endogline (CD105) peut aussi accomplir ce rôle d'attachement et de transport vers les chaînes I et II du récepteur. Malheureusement alors que l'induction massive de transcription de l'ARNm du TGF- β_1 devrait être suivie d'une production accrue de la protéine TGF- β_1 les résultats présentés (Figure 43,45) montrent qu'il n'en fut rien.

En effet, les homogénats de rates et le sérum de souris infectées ne contenaient pas plus de TGF- β_1 que ceux des souris témoins. Il ne semble pas y avoir eu ni augmentation de TGF- β_1 actif dans le sérum ni même une augmentation de TGF- β_1 latent. Cependant un faible pourcentage de lymphocytes T et d'autres splénocytes contenaient du TGF- β_1 . Est-ce cependant suffisant pour expliquer la diminution souvent très importante de prolifération des splénocytes de souris infectées? Si oui alors les facteurs ciblés par le TGF- β_1 devraient être affectés suite à l'infection des souris par MHV-A59. Il est connu que suite à la liaison du TGF- β_1 à son récepteur celui-ci active des facteurs de transcription nommés Smad2, 3 et 4 qui forment ensemble un complexe régulant le programme de transcription de la cellule cible. Il en résulte entre autres chez les lymphocytes T en une diminution de transcription des facteurs GATA-3, T-bet et Stat4 en plus de l'IFN- γ . Lors de l'infection par MHV-A59

cependant ces transcrits ont été au contraire augmentés de façon très significative dans les splénocytes. Compte tenu de la diversité de cellules exprimant GATA-3 et T-bet cela n'est pas étonnant. De plus, T-bet, exprimé par les cellules de la réponse de type T_H1 tout comme les lymphocytes B et les cellules dendritiques fut largement plus augmenté (2 à 7 fois) par rapport à GATA-3 qui est lui habituellement produit par les cellules de la réponse de type T_H2 , mais aussi par les lymphocytes T fraîchement activés. Le facteur T-bet est aussi associé à la conversion des lymphocytes B en producteurs d'IgG2a (Peng *et al.*, 2002) qui sont largement augmentés lors de l'infection par MHV-A59 sans toutefois que les anticorps produits ne soient spécifiques du virus (Lardans *et al.*, 1996a). De plus, si la production de l'IFN- γ fut accrue, comme l'a laissé entendre l'accroissement des transcrits (Figure 47), il est possible que son effet puisse contrecarrer l'influence du TGF- β_1 . En effet l'IFN- γ induit via son récepteur l'activité du facteur Smad7 qui bloque la signalisation par le récepteur du TGF- β_1 .

5.4.5 Synthèse

Un des mécanisme les plus direct de la suppression des lymphocytes T par un virus, l'infection lytique ou paralysante, n'a pas été employée par MHV-A59. Même en présence, *in vitro*, de très grandes quantité de virus les lymphocytes T n'ont pas produit de nouvelles particules et il ne s'y est pas produit de transcription du génome viral. Ainsi l'infection directe des lymphocytes T na pas été mis en cause dans l'immunosuppression induite suite à l'infection par MHV-A59. Les interférons de type I peuvent produire une lymphopénie telle que celle qui a été observée suite à l'infection par MHV-A59. Malheureusement les souris déficientes en récepteur de l'interféron de type I (IFNAR^{-/-}) infectées par MHV-A59 n'ont pas survécus plus de 3 jours.

Il a été observé que les cellules régulatrices ne prolifèrent plus, tout comme elles ne produisent pas d'IL-2 lors de la stimulation par le TCR et CD28 *in vitro* (Itoh *et al.*, 1999; Thornton et Shevach, 1998). Ces cellules prolifèrent avec l'ajout d'IL-2, mais après la phase d'expansion, elles conservent leur phénotype anergique. L'effet est encore plus important lorsque la stimulation est effectuée par un peptide et des CPA de la rate (Gavin *et al.*, 2002).

Le PMA et l'ionomycine contournent ce blocage de la prolifération. L'immunosuppression induite suite à l'infection par MHV-A59 ressemble donc en plusieurs points à une anergie des lymphocytes T.

Malgré une perte de plus de la moitié des splénocytes et spécifiquement des lymphocytes de la rate le maintien dans cet organe des T_{reg} semble indiquer un rôle potentiel pour ces cellules. De plus ces T_{reg} ont augmenté dans les ganglions lymphatiques cervicaux et se sont infiltré au SNC. Il est aussi possible que les CPA induisent elles-mêmes cette anergie. En effet dans un test de prolifération croisée les CPA de souris infectées ont induit une prolifération réduite des lymphocytes de souris témoins et inversement les CPA de souris témoins ne sont pas parvenu à induire une prolifération normale des lymphocytes T de souris infectée. Ainsi bien que les lymphocytes T aient déjà été affecté dans leur prolifération, les CPA ont contribué en partie à cette immunosuppression induite suite à l'infection par MHV-A59. Alors que les nT_{reg} agissent surtout par contact direct, les cellules converties elles effectuent leur suppression par la sécrétion de l'IL-10, l'IL-35 ou de TGF- β . Il est donc possible que des cytokines immunosuppressives participent à l'inhibition de la prolifération des cellules issues de souris infectées.

La transcription de cytokines telles l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10 n'a pas été induite suite à l'infection. Par contre, malgré une très grande augmentation de la transcription du gène du TGF- β_1 il ne s'est pas ensuivit directement une production forte de TGF- β_1 . Aucune augmentation significative n'a été détectée dans le sérum ni dans les extraits de rates des souris infectées. Par contre des lymphocytes T et d'autres splénocytes, possiblement des cellules dendritiques, contenaient plus souvent de ce TGF- β_1 chez les souris infectées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

6 MODÈLE PROPOSÉ DE L'IMMUNOSUPPRESSION INDUITE PAR LE CORONAVIRUS MURIN DE SOUCHE

6.1 Brève introduction

À l'instar du virus de la rougeole, le MHV de souche A59 parvient à induire une immunosuppression transitoire, mais généralisée et surtout non restreinte à une spécificité. Cette immunosuppression s'accompagne d'une lymphopénie touchant plusieurs types cellulaires à la fois. Une autre particularité d'intérêt partagée par les deux virus, le récepteur cellulaire peut, dans certaines conditions encore peu définies, induire un signal d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T. Effectivement, CEACAM1a, la molécule employée par MHV lors de l'infection est associée à différentes conditions immunologiques.

Bien que CEACAM1 soit très abondamment distribué dans les tissus (Kuespert *et al.*, 2006), les lymphocytes T ont la particularité, tant chez l'humain (Donda *et al.*, 2000; Kammerer *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1999) que chez la souris, de ne l'exprimer en surface que suite à leur activation (Nakajima *et al.*, 2002). CEACAM1 est aussi en mesure d'inhiber la croissance tumorale (Turbide *et al.*, 1997) et sa surexpression inhibe la colite (Nagaishi *et al.*, 2006). Dans la réponse immunitaire CEACAM1 inhibe aussi la réaction d'hypersensibilité retardée (Turner *et al.*, 2004), la différenciation des lymphocytes T en T_H1 et la production d'IFN- γ suite à la liaison par un anticorps ou la protéine S du MHV (Iijima *et al.*, 2004). CEACAM1 est aussi capable de s'associer directement à l'IL-2R et ainsi inhiber son activité (Chen et Shively, 2004).

De fait, le récepteur cellulaire de MHV-A59 appartient à un groupe de molécules non seulement reconnues dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire, mais aussi dans la régulation, positive ou négative, de certains types cellulaires appartenant à la réponse cellulaire. Il est donc possible que la liaison de CEACAM1 à la surface des cellules du système immunitaire, voir les lymphocytes T eux-mêmes, par la protéine S en surface des virus lors de la virémie puisse mener à l'inhibition non spécifique de la réponse immunitaire. Une façon de vérifier cette hypothèse est de mettre en contact des splénocytes ou des lymphocytes T fonctionnels avec le virus lors d'une expérience de prolifération.

6.2 Procédure expérimentale

Trois expérimentations préliminaires différentes ont été accomplies de la manière suivante. Dans tous les cas, des splénocytes ont été extraits de souris saines, c'est-à-dire n'ayant jamais été injectées avec du virus. Lorsque mentionné des lymphocytes T ont été purifiés de cette source de splénocytes.

Dans la première expérimentation les splénocytes ont ensuite été mis en contact avec du milieu de culture, un lysat de cellules DBT ou un lysat de cellules DBT infectées quelques minutes avant l'ajout des mitogènes pour un test d'incorporation de [³H] thymidine.

Dans la seconde expérimentation un surnageant de culture de cellules DBT et de cellules DBT infectées ont été concentrés d'un facteur 10 avant d'être mis en contact avec des splénocytes ou des cellules T une heure avant la stimulation.

Dans la troisième et dernière expérimentation, des splénocytes et lymphocytes T ont d'abord été preconditionnés, pour induire l'expression de CEACAM1, pour 72 heures. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 5 heures avec un mélange de virus et d'anticorps neutralisant (α MHV) ou témoin (α 229E). Finalement, les mitogènes ont été ajoutés pour la prolifération de trois jours.

6.3 Résultats

L'utilisation d'un lysat de cellules DBT saines n'a pas affecté la prolifération des splénocytes et a fourni un témoin plus adéquat pour la prolifération des cellules en présence d'un lysat de cellules DBT infectées (Figure 49). Suite à la stimulation par la ConA, les cellules en présence du lysat infecté ont proliféré à environ 80 % des cellules en présence du lysat non infecté (Figure 49, $p < 0,001$). Avec une stimulation par l' α CD3 seul, les cellules en présence du lysat de cellules infectées n'ont atteint qu'environ 75 % de la prolifération des cellules en présence de lysat de DBT non infecté (Figure 49, $p < 0,001$). Avec une stimulation par l' α CD3 et l' α CD28, les cellules en présence du lysat de cellules infectées n'ont atteint qu'environ 80 % de la prolifération des cellules en présence de lysat

de DBT non infecté (Figure 49, $p < 0,01$). Lorsque stimulées par l'IL-2 en plus de l' α CD3 les proliférations ont été similaires en présence des lysats infectés ou non (Figure 49).

En présence d'un surnageant concentré de cellules DBT infectées ou non les splénocytes et les lymphocytes T semblent avoir proliféré différemment, mais sans que cela ne soit statistiquement significatif (Figure 50). Une seule exception, la stimulation avec les anticorps α CD3 et α CD28 qui ont induit des proliférations qui ont différé de 25 % pour les splénocytes (Figure 50). Les très faibles proliférations, particulièrement des splénocytes, et les grands écarts-types qui les accompagnent (Figure 50) portent à croire qu'il y ait un doute sur la validité de ces résultats. Malgré un préconditionnement visant à augmenter le nombre de cellules exposant CEACAM1 à leur surface les proliférations obtenues ne semblent pas avoir suivies une tendance quelconque (Figure 51).

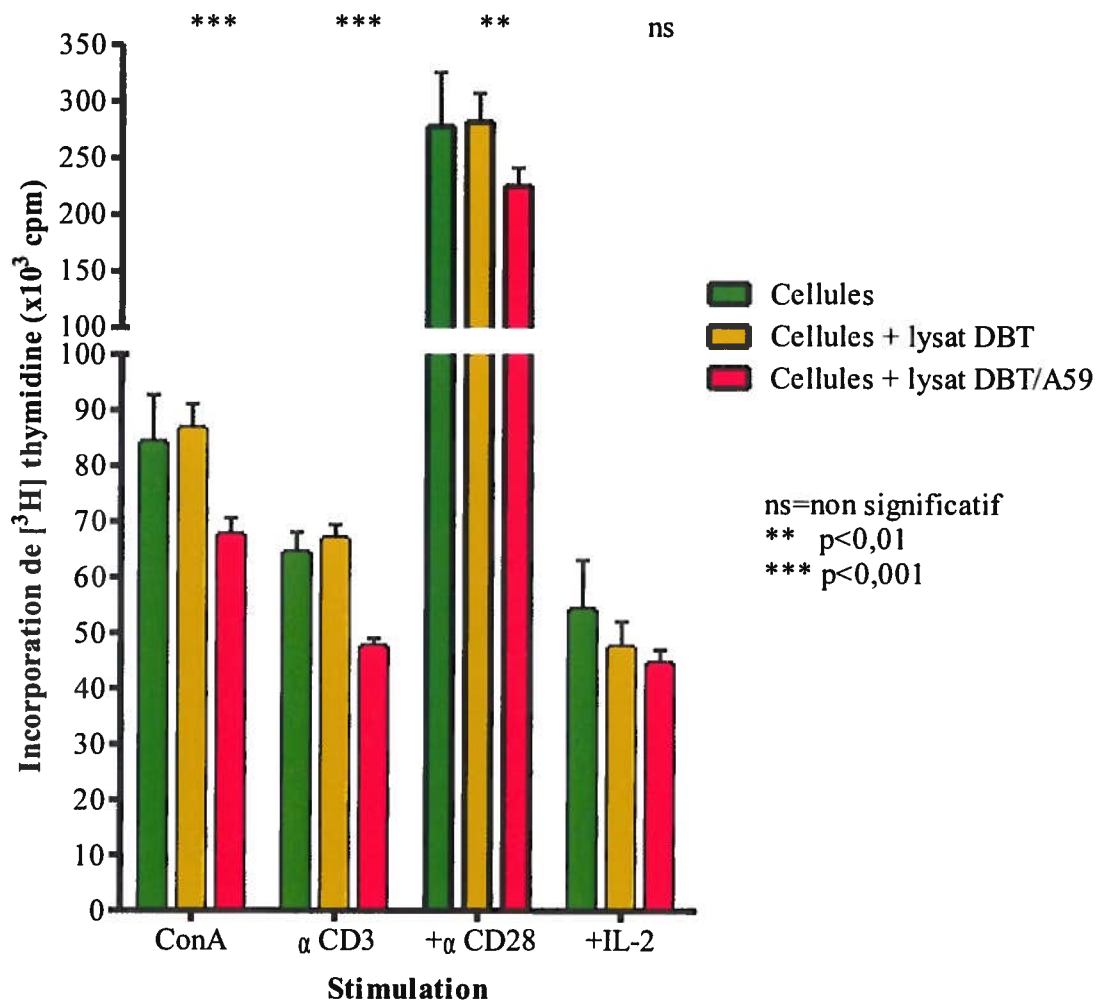


Figure 49: Prolifération de splénocytes en présence de lysats de cultures de cellules susceptibles infectées par MHV-A59.

Prolifération de splénocytes de souris saines stimulées avec la concanavaleine A (ConA) l' α CD3 et l' α CD28, l' α CD3 et l'IL-2rh et le PMA avec ionomycine en présence de lysats de cellules DBT infectées (■) ou non (■) ou sans lysat (■). Les moyennes des comptes de [³H] thymidine incorporée dans les puits sont accompagnées de leurs écarts-types respectifs (n=12 pour toutes les stimulations sauf n=8 pour la ConA).

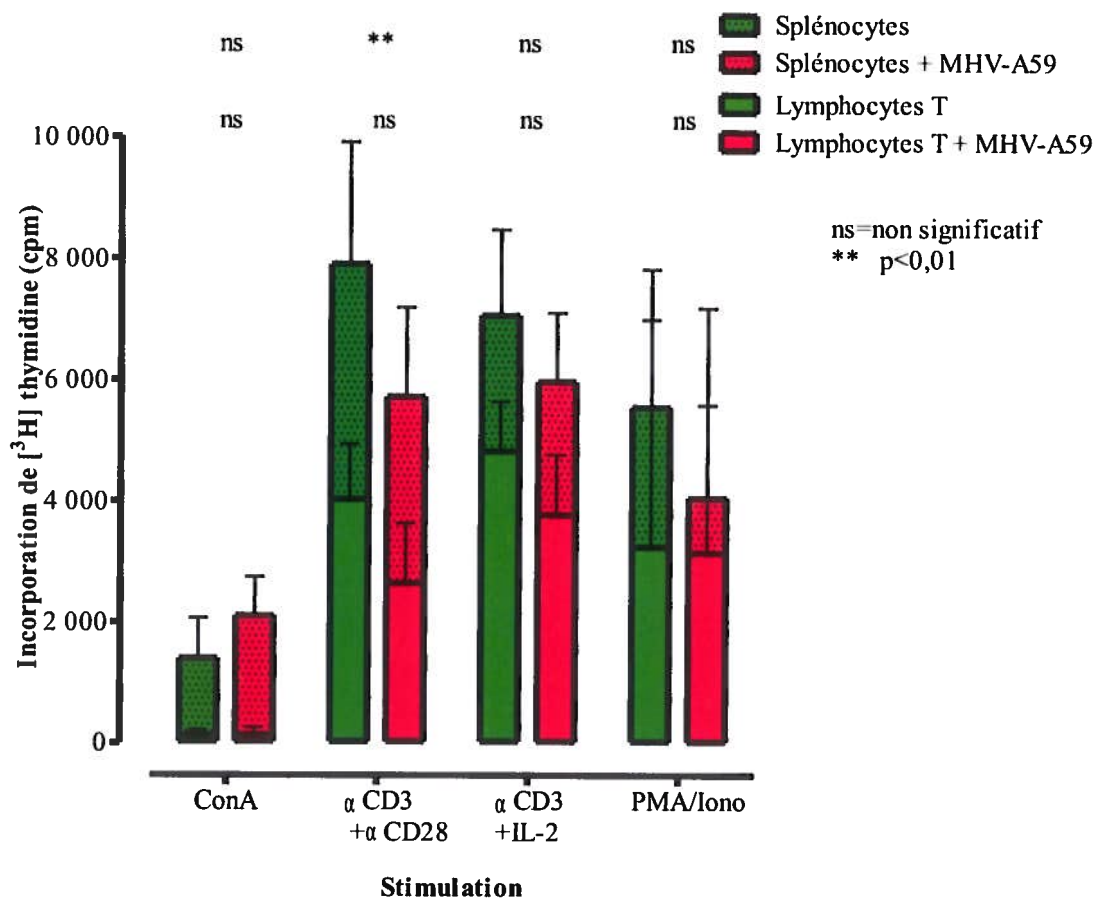


Figure 50: Prolifération de splénocytes et de lymphocytes T en présence de MHV-A59 concentré.

Prolifération de splénocytes (■) et de lymphocytes T (■) de souris saines stimulées avec la concanavaleine A (ConA) l'αCD3 et l'αCD28, l'αCD3 et l'IL-2rh et le PMA avec ionomycine en présence de surnageant concentré de cultures de cellules DBT infectées (■) ou non (■). Les moyennes des comptes de [³H] thymidine incorporée dans les puits sont accompagnées de leurs écarts-types respectifs (n=12 et 30 puits pour sans et avec virus respectivement pour toutes les stimulations sauf n=6 et 15 puits pour la ConA).

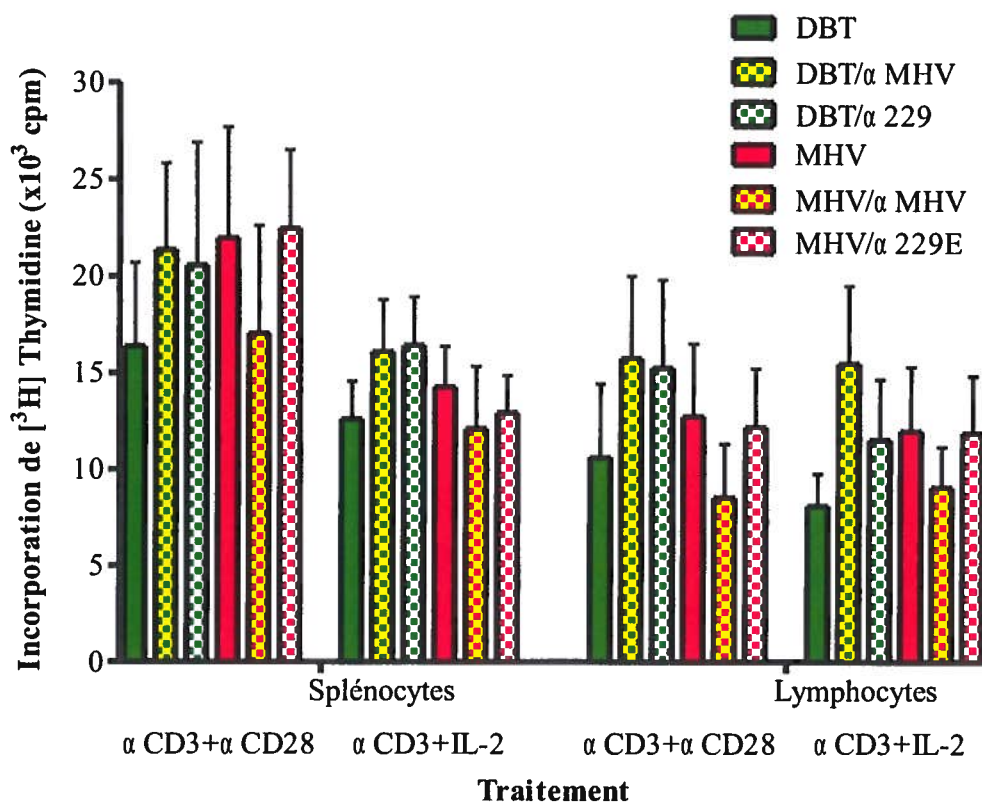














Figure 51: Prolifération de splénocytes et de lymphocytes T en présence de MHV-A59 et d'anticorps neutralisants.

Prolifération de splénocytes (gauche) et de lymphocytes T (droite) de souris saines stimulées avec l'αCD3 et l'αCD28, l'αCD3 et l'IL-2rh suite à un contact de 5 heures avec une solution de virus MHV-A59 (MHV   ) ou de milieu de culture (DBT   ) et d'anticorps neutralisants (αMHV  ) ou témoins (α229E  ) ou sans anticorps ( ). Les moyennes des comptes de [³H] thymidine incorporée dans les puits sont accompagnées de leurs écarts-types respectifs (n=15 puits pour toutes les stimulations).

6.4 Discussion

6.4.1 *Immunosuppression par MHV-A59*

Plusieurs virus induisent une immunosuppression, qu'elle soit transitoire ou plus permanente. Diverses stratégies sont possibles et certains virus comme celui de la rougeole, en exploitent plusieurs. Ainsi, le virus peut infecter certains types cellulaires, les détruire tout simplement ou altérer leurs fonctions d'élimination du virus (p.ex. CTL, macrophages) ou affecter les signaux qu'ils transmettent (p.ex. T_H , cellules dendritiques). Sans infecter les cellules, certaines protéines virales peuvent lier des récepteurs membranaires et exercer, parfois à distance, une action activatrice ou inhibitrice selon les cas.

Il est possible que MHV-A59, via la protéine S et son récepteur cellulaire, CEACAM1, parvienne à altérer les fonctions de certaines cellules du système immunitaire de façon transitoire et non spécifiques. Cette stratégie pourrait permettre ou du moins faciliter l'établissement d'une infection persistante en ralentissant ou en limitant une réponse immunitaire robuste. Pour cela, il est essentiel que le récepteur du virus ait un lien important avec les cellules et molécules impliquées dans la réponse immunitaire. Une hypothèse à vérifier, mais avec plusieurs fondements. Une bactérie, *N. gonorrhoeae* n'infecte pas les lymphocytes T ni n'est phagocytée par celles-ci, mais demeure en surface et recrute en provenance des compartiments intracellulaires vers la surface le récepteur CEACAM1 (Lee *et al.*, 2008). Suite à l'activation du TCR de ces cellules T, la molécule CEACAM liée par la bactérie prévient la phosphorylation normale de la kinase Zap70 qui ne transmet plus le signal d'activation à l'intérieur de la cellule (Lee *et al.*, 2008).

6.4.2 *Le récepteur cellulaire de MHV-A59*

Le récepteur CEACAM1 est exprimé sur l'épithélium, l'endothélium des vaisseaux sanguins, les granulocytes, les macrophages, et même les cellules T, B, et NK (Cournoyer *et al.*, 1988; Coutelier *et al.*, 1994; Godfraind *et al.*, 1995b; Moller *et al.*, 1996; Odin *et al.*, 1988; Svenberg, 1976). Bien que les molécules de la famille des CEA sont surtout impliquées dans l'adhésion cellulaire (Beauchemin *et al.*, 1999), CEACAM1 est aussi une

molécule régulatrice de la réponse immunitaire. Chez la souris, CEACAM1 est composé de 2 ou 4 domaines extracellulaires et d'une extrémité intracytoplasmique longue (L) ou courte (S). L'extrémité intracytoplasmique longue contient des sites « Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif » (ITIM) potentiels (Chen *et al.*, 2001) alors que l'extrémité courte n'en contient aucun (Kuespert *et al.*, 2006). La majorité des cellules expriment les formes L et S dans un ratio de 3:1 (Singer *et al.*, 2002) qui varie selon les cellules, leur phase de croissance et leur état d'activation (Greicius *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2000). En surface CEACAM peut se retrouver sous forme de monomères ou de dimères (homo et hétéro). Ces différentes combinaisons d'isoformes pourraient expliquer les résultats contrastants obtenus en stimulation de CEACAM1 sur différents types de cellules (Singer *et al.*, 2000; Turbide *et al.*, 1997). L'isoforme L transmet en général un signal inhibiteur (Gray-Owen et Blumberg, 2006) et l'effet prédominant de la coexpression de L et S dans les cellules Jurkat est inhibiteur (Chen *et al.*, 2004). La forme 4L est encore plus efficace que la forme 2L dans l'inhibition de la prolifération et de la production d'IL-2 (Chen et Shively, 2004) en plus d'être responsable de la diminution du nombre de cellules dans le thymus, dans la rate et dans les ganglions mésentériques (Nagaishi *et al.*, 2006). Par contre, la surexpression de CEACAM1-2L inhibe la différenciation et la sécrétion de cytokines des réponses de type T_H1 et T_H2 (Nagaishi *et al.*, 2006).

Le mécanisme d'action de CEACAM1 est encore peu connu, mais il semble bien que CEACAM1-L agisse via des sites ITIM (Nagaishi *et al.*, 2006). Dans un modèle proposé, l'engagement du complexe TCR-CD3 entraîne l'activation de différents membres de la famille des kinases Src (Abram et Lowell, 2007). Ces kinases procèdent alors à la phosphorylation des ITAM contenus dans les immunorécepteurs (Abram et Lowell, 2007). Ces ITAM lorsque phosphorylés forment un site d'ancrage pour Zap70 (Abram et Lowell, 2007). Le recrutement de Zap70 mène à son activation et à la phosphorylation de plusieurs autres molécules en cascade (Abram et Lowell, 2007). Il en résulte entre autres la production de l'IL-2 par les lymphocytes T mais aussi la translocation des CEACAM1 intracellulaires vers la surface. La liaison de CEACAM1 par un ligand entraîne sa phosphorylation, ce qui recrute et active les molécules adaptatrices SHP-1 et 2 (*tyrosine phosphatase SRC homology 2 (SH2)-domain-containing protein tyrosine phosphatase*)

(Boulton et Gray-Owen, 2002; Lee *et al.*, 2008). Ces dernières agissent ensuite par inhibition de la phosphorylation de CD3 ζ et Zap70 (Lee *et al.*, 2008) et donc de leur fonction. L'action de CEACAM1 est temporaire et la diminution de son expression permet un retour à la normale.

6.4.2.1 CEACAM et kinases

Zap70 serait la cible de l'action inhibitrice de CEACAM1 et il est fort probable que les effets de l'infection par MHV-A59 soient liés aux fonctions de cette kinase. Ainsi, les souris Zap70^{-/-} n'ont plus dans le thymus de cellules CD4⁺ et CD8⁺ « simple positives » et accumulent des cellules « doubles positives » (Negishi *et al.*, 1995). En fait, ce modèle est quelque peu trop radical pour bien illustrer la fonction de Zap70 dans le thymus. Des études plus récentes et précises ont mis en évidence comment les sélections positive et négative dépendent étroitement de Zap70 (Berg et Kang, 2001). La perte de Zap70 augmente surtout l'apoptose (mort par « négligence »), mais diminue aussi la progression du cycle cellulaire, particulièrement à l'étape « double positive » (Palacios et Weiss, 2007). Selon un modèle proposé, le signal du pré-TCR dépendant de Syk induit l'expression de Zap70 qui remplace Syk (Palacios et Weiss, 2007). Le signal pré-TCR/Zap70 permet ensuite la progression de l'étape « double négative » vers l'étape « double positive » (Palacios et Weiss, 2007). La maturation des lymphocytes B est aussi liée à Zap70, mais de façon moins importante, la molécule Syk pouvant compenser, en partie (Hivroz, 2005).

6.4.2.2 CEACAM et le facteur de croissance transformant

Les résultats sur les liens qui pourraient exister entre CEACAM1 et le TGF- β_1 sont très peu nombreux et parfois indirects, mais il est important d'en faire ici un bref résumé. En premier lieu, TGF- β_1 induit l'expression de membres de la famille des CEA dans une lignée de carcinome de colon humain (Chakrabarty, 1992). Cette expression est stable et prolongée et persiste deux semaines après le retrait du TGF- β_1 du milieu de culture (Chakrabarty, 1992). Une molécule de la même famille que CEACAM, soit PSG17 (et trois PSG humains), induit quant à elle la production de l'IL-10 et de TGF- β_1 (Ha *et al.*, 2005).

CEACAM1 finalement stimule l'expression de l'endogline (CD105) (Muenzner *et al.*, 2005), une molécule très abondamment exprimée (Fonsatti *et al.*, 2001) mais surtout le ligand le plus abondant du TGF- β_1 (Cheifetz et Moscarello, 1985).

6.4.3 Prolifération et virus

Si la liaison de la protéine S du virus au récepteur CEACAM1 est suffisante à l'inhibition des lymphocytes T alors la prolifération de ces dernières devrait être réduite lorsqu'en contact avec du virus. Malgré un premier résultat encourageant en ce sens (Figure 49) il n'a pas été possible de reproduire l'effet une seconde fois. Cependant, les résultats ont été plus prononcés en utilisant un lysat de cellules infectées plutôt qu'un surnageant (données non montrées), sûrement parce qu'à titres infectieux égaux le lysat contient en plus des protéines S libres pouvant lier CEACAM1.

Puisque très peu de lymphocytes T expriment CEACAM1, une méthodologie visant à maximiser son expression serait à même d'augmenter la reproductibilité des résultats. Plusieurs recherches ont permis de maximiser l'expression de CEACAM1 en surface des lymphocytes T humains (Donda *et al.*, 2000; Kammerer *et al.*, 1998; Moller *et al.*, 1996) par le préconditionnement avec une dose sous-optimale, n'induisant pas la prolifération, de l'IL-2. Malheureusement, une telle préparation n'a pas donné les résultats escomptés (Figure 51). Cela n'est toutefois pas si étonnant si l'on tient compte que dans une expérience similaire avec *N. gonorrhoeae* (Boulton et Gray-Owen, 2002) il n'a été possible d'inhiber la prolifération des lymphocytes T humains que lorsque la MOI a atteint 50 et plus. Dans les expériences avec MHV-A59 la MOI n'a malheureusement été que de 1 (Figure 49, Figure 51) ou au maximum de 10 (Figure 50). L'efficacité supérieure du lysat de cellules infectées est en accord avec cette expérience bactérienne. En fait il est possible que le seuil à atteindre dépasse pour un virus la MOI de 50 trouvé chez la bactérie. Un seuil qui sera techniquement très difficile voire impossible à atteindre.

6.4.4 Modèle proposé

À la lumière des résultats de la présente recherche ainsi que des divers travaux sur CEACAM1 et Zap70, un modèle est proposé afin d'expliquer les mécanismes de

l'immunosuppression par MHV-A59 (Figure 52). En bref, la protéine S de MHV-A59 présente en surface des CPA infectées ou sous forme libre, induit lors du contact CPA-lymphocyte T un signal via CEACAM1. Ce signal a pour principal effet d'inhiber l'activation de Zap70 et la transduction du signal du complexe TCR-CD3, résultant en une forme d'anergie des lymphocytes T qui n'est renversée que par l'ajout d'agents capables de stimuler la prolifération de ces cellules par des voies indépendantes de Zap70, comme c'est le cas pour l'IL-2 et PMA/Iono. De plus, dans le thymus et dans la moelle osseuse, cette inhibition résulte en une maturation abortive des lymphocytes. Il en résulte une lymphopénie caractérisée par une réduction simultanée des lymphocytes T et B mais particulièrement la disparition des thymocytes $CD4^+CD8^+$ « doubles positives » faute du signal positif de sélection leur permettant de survivre. Ce modèle pourrait donc expliquer la perte des lymphocytes avec présence d'apoptose surtout dans le thymus. Les données sur le sujet sont encore peu nombreuses, mais il est possible qu'un tel mécanisme puisse agir sur les CPA, n'altérant pas leur capacité de présentation d'antigène, mais rendant ceux-ci tolérogéniques, ce qui résulterait en la conversion de cellules T en cellules régulatrices. Effectivement, les cellules dendritiques immatures présentant un antigène à un lymphocyte T plutôt que d'en induire l'activation, comme le ferait une cellule dendritique mature, transforme cette cellule T en cellules régulatrices. Si la liaison de CEACAM1 sur les lymphocytes B induit un effet inhibiteur, l'effet sur les cellules dendritiques, qui n'expriment pas d'autres molécules CEACAM que CEACAM1, est plus incertain (Gray-Owen et Blumberg, 2006).

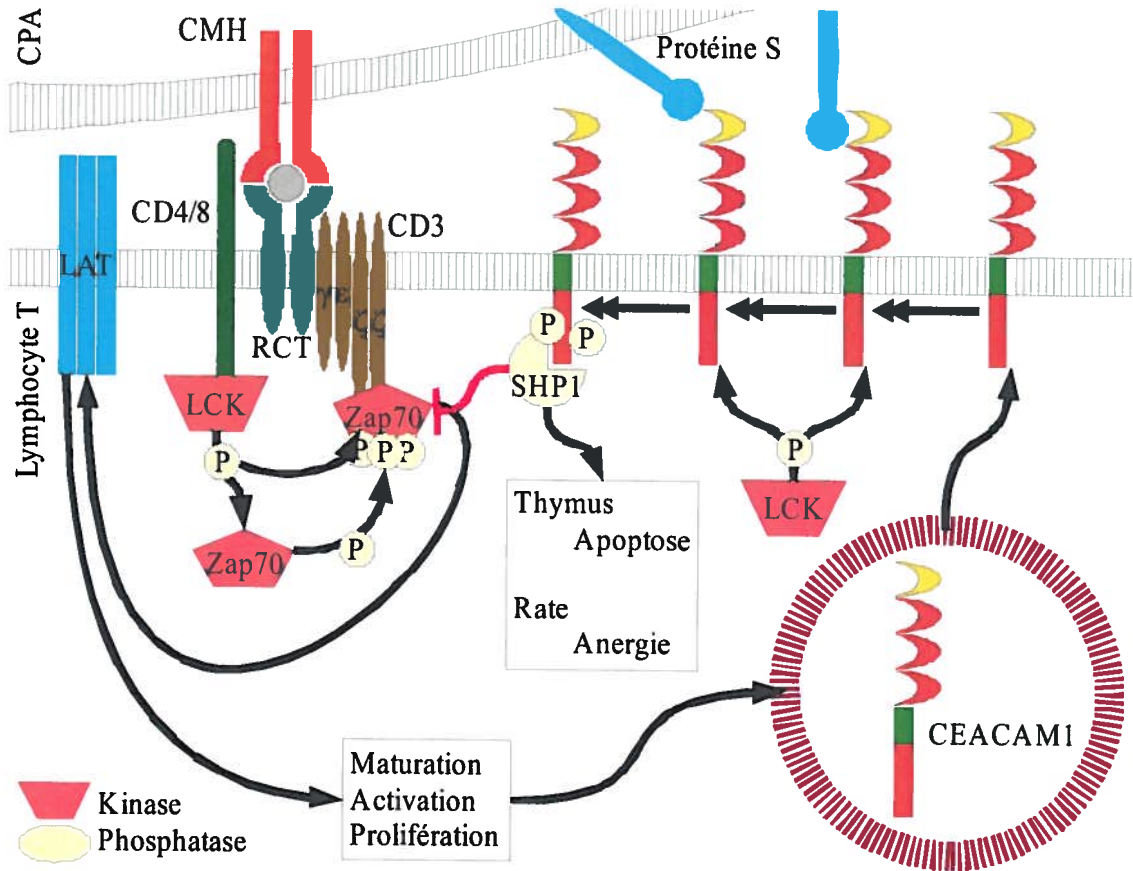


Figure 52: Modèle proposé de mécanisme d'immunosuppression suite à l'infection par MHV-A59

L'activation des lymphocytes T ou des cellules dendritiques entraîne la translocation de CEACAM1 en surface. La liaison de CEACAM1 par une autre molécule CEACAM1 ou la protéine S de MHV-A59, libre ou associée à la membrane d'une cellule infectée, provoque une inhibition de la signalisation intracellulaire des récepteurs employant Zap70. CEACAM1 par son action, transitoire, sur Zap70, entraîne des troubles du système immunitaire tels que l'arrêt de la maturation des lymphocytes B et T et l'anergie de ces dernières. Adapté de (Gray-Owen et Blumberg, 2006).

7 CONCLUSION

Chez les souris susceptibles, l'infection avec les MHV neurovirulents induit une maladie biphasique. La phase aiguë est caractérisée par une encéphalite accompagnée d'une hépatite modérée à sévère. La phase chronique est caractérisée par une maladie de démyélinisation du SNC avec diverses invalidités. La matière blanche du SNC est alors atteinte de plaques de démyélinisation accompagnées de l'infiltration et de l'activation de macrophages et microglies. Cette infection du SNC par MHV induit aussi une involution thymique (JHM: (Lavi *et al.*, 1990), A59: (Cray *et al.*, 1993; Lavi *et al.*, 1990)) et splénique (A59: (Cray *et al.*, 1993)) accompagnée d'une lymphopénie (JHM: (Lavi *et al.*, 1990), A59: (Cray *et al.*, 1993; Lavi *et al.*, 1990)) touchant entre autres les lymphocytes T et B (JHM: (Lavi *et al.*, 1990), A59: (Lavi *et al.*, 1990)) mais aussi les macrophages (JHM: (Lavi *et al.*, 1990), A59: (Lavi *et al.*, 1990), Inconnue: (Dempsey *et al.*, 1986)). Au thymus les cellules immatures CD4⁺CD8⁺ sont particulièrement touchées (A59: (Godfraind *et al.*, 1995a)). L'involution tout comme la diminution de la prolifération avec des mitogènes tels la ConA (JHM: (de Souza et Smith, 1991; de Souza *et al.*, 1991), A59: (Cray *et al.*, 1993; Even *et al.*, 1995), Inconnue: (Cook-Mills *et al.*, 1992)) et l' α CD3 (A59: (Cray *et al.*, 1993)) qui l'accompagne sont transitoire (JHM: (Smith *et al.*, 1987b), A59: (Cray *et al.*, 1993)). Cette diminution est caractérisée par une production réduite de l'IL-2 (JHM: (de Souza *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1987b), A59: (Even *et al.*, 1995)) et de l'IFN- γ (JHM: (de Souza *et al.*, 1991)). Il a été montré que la persistance était nécessaire au développement de la maladie démyélinisante (JHM: (Stohlman *et al.*, 1982)), toutefois la présence et le rôle de l'immunosuppression dans l'établissement de cette persistance n'ont été qu'effleurés jusqu'à présent. Nous nous proposons donc de vérifier les caractéristiques de l'immunosuppression lors de l'infection par MHV-A59 et son importance durant l'infection persistante associée à une maladie démyélinisante du SNC.

7.1 Conclusions principales

Chapitre 3. Établir les paramètres lors d'une infection virale persistante du SNC avec maladie de démyélinisation.

L'infection par l'injection de 450 UFP produit une infection aiguë peu mortelle du SNC accompagnée d'une infection hépatique de courte durée, mais productive. Le virus

persiste dans le SNC sous forme d'ARN et surtout d'ARNm. Cette infection aiguë est aussi liée à une involution thymique importante et splénique variable. Ces altérations morphologiques s'accompagnent de pertes de cellules importantes tant en lymphocytes T et B, mais sûrement aussi en d'autres types tels que les cellules dendritiques et les macrophages. Cette perte cellulaire s'accompagne d'une diminution de prolifération *in vitro* qui se résorbe avec le passage en phase chronique ou une prolifération normale est de nouveau observée. Les lésions de démyélinisation accompagnées d'infiltration de macrophages et microglies se produisent lors de la phase chronique alors que le virus infectieux n'est plus détecté.

Chapitre 4. Caractériser les paramètres de la réponse immunitaire induite par l'infection avec MHV-A59.

Malgré la présence de lymphocytes T activés, ceux-ci ne prolifèrent que peu ou pas en présence d'antigènes viraux. L'inhibition de la prolifération, qui n'est pas corrélée à la lymphopénie, s'accroît avec la dose virale employée pour l'infection et est présente tant au SNC qu'à la rate. Cet effet immunosuppresseur est transitoire, mais résiste à de fortes doses de stimulations. Les stimulations par les récepteurs CD3 et CD28 ou par le complexe TCR-CD3 par un antigène présenté par une CPA via le CMH (cellules de souris 2.102 tg) n'induisent pas une prolifération comparable aux cellules de souris témoins. Cependant, les stimulations via les récepteurs CD3 et IL-2R ou par les inducteurs pharmacologiques PMA et ionomycine rétablissent la prolifération normale. Les CPA des souris infectées produisent une inhibition de la prolifération des lymphocytes T de souris saines tandis que l'ajout de CPA de souris témoins ne rétablit pas la prolifération normale des lymphocytes T de souris infectées. Même une grande quantité de cellules dendritiques de souris saines ne parvient pas à forcer une prolifération normale. La prolifération des lymphocytes T CD4⁺ est la plus touchée, mais celles-ci semblent tout de même collaborer avec les lymphocytes B pour induire une commutation de classe des anticorps très rapidement lors de l'infection. Toutefois les IgG2a anti-MHV, normalement produit contre une infection virale, sont quasiment absents avec de forts titres d'IgG2b et d'IgG3.

Chapitre 5. Identifier les mécanismes de l'immunosuppression induite par l'infection avec MHV-A59.

Alors que les lymphocytes T ne semblent pas infectés de façon productive, les splénocytes totaux ne semblent pas exempts d'infection. Les lymphocytes T régulateurs FOXP3⁺ sont quelque peu augmentés, particulièrement dans les ganglions lymphatiques cervicaux, et dans le SNC, mais leur action n'est pas via la sécrétion d'IL-10. La transcription du TGF- β_1 est augmentée à la rate, mais il n'en résulte pas une plus grande production à la rate ni une plus grande sécrétion dans le sang. Il en est de même *in vitro* suite à la stimulation des splénocytes par les divers mitogènes. Malgré tout un nombre accru de lymphocytes, mais aussi d'autres splénocytes contiennent du TGF- β_1 suite à l'infection par MHV-A59. Cet accroissement tant chez les lymphocytes T que les CPA pourrait expliquer tant la faible prolifération des premières que l'induction d'une inhibition par les secondes.

Chapitre 6. Proposer un modèle pouvant expliquer l'immunosuppression induite par MHV-A59.

L'inhibition de la prolifération associée à l'infection par MHV-A59 possède plusieurs similarités avec l'anergie induite en laboratoire. En effet, tout comme l'anergie, cette immunosuppression virale se manifeste par une réponse proliférative diminuée tant en présence de stimulations globales (ConA, CD3) que spécifiques (souris 2.102 tg). L'anergie, tout comme l'immunosuppression induite par MHV-A59, résulte en une sécrétion réduite de l'IL-2, mais n'affecte pas le signal via le récepteur de l'IL-2 et est même renversée par l'ajout d'IL-2 exogène. Donc, au contraire de certains autres virus qui induisent une immunosuppression par des mécanismes plus permanents comme l'apoptose des cellules T (p.ex. VIH), MHV-A59 induit une sorte d'anergie dont les particularités rappellent plutôt l'infection par le virus de la rougeole. Ces deux virus partagent d'ailleurs la caractéristique d'infecter leurs cellules cibles via des récepteurs qui, entre autres, jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire. Le récepteur du MHV, CEACAM1, est un membre d'une famille de molécules d'adhésion qui possède aussi la capacité d'induire ou d'inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Selon le modèle proposé, la

liaison de CEACAM1 par des protéines S, sous forme libre ou en surface de virions ou des CPA, permettrait l'activation de ce récepteur et l'inhibition du signal initié par le complexe TCR-CD3 via l'inhibition de Zap70. Toute stimulation agissant en aval de Zap70 ou via une autre voie de signalisation serait alors effective. De plus, cette activation dépendrait de la durée d'activation de CEACAM1 et provoquerait aussi la lymphopénie en limitant la production du thymus et de la moelle osseuse par l'arrêt de la maturation des lymphocytes.

Un tel modèle pourrait être vérifié entre autres par l'inhibition de la prolifération de cellules de souris saines en présence de virus et de divers mitogènes et anticorps neutralisants ou non. Malheureusement si quelques expérimentations semblent donner des résultats intéressants il est trop tôt pour conclure, la reproductibilité des résultats n'étant pas encore assurée. Il est clair cependant qu'à titres infectieux égaux un lysat infectieux semble plus efficace qu'un surnageant infectieux. Par contre, la concentration de l'un comme de l'autre semble aussi concentrer des facteurs inconnus, mais toxiques.

Le contact entre le virus et les cellules doit se faire avant l'ajout des agents mitogènes qui autrement semblent agir selon leur efficacité normale. Finalement si l'on en croit les travaux portant sur des bactéries induisant une immunosuppression via le récepteur CEACAM1a employé aussi par MHV (Boulton et Gray-Owen, 2002), une MOI élevée (plus de 50) pourrait s'avérer un facteur vital entre l'activation et l'immunosuppression induite via ce récepteur. Malheureusement il est ici extrêmement difficile d'atteindre ce niveau élevé de concentration virale sans induire d'autres effets toxiques qui ne sont aucunement liés au virus (Figure 50).

7.2 Sommaire des contributions

Ce travail de recherche a porté sur la caractérisation des conséquences de l'infection par MHV-A59, suite à l'injection d'une dose virale précise administrée par voie i.c. à des souris C57BL/6 femelles de 28-25 jours d'âge. Beaucoup de travaux par le passé sur l'immunosuppression ont été effectués soit suite à une infection par un MHV de souche inconnue résultant d'une contamination accidentelle des animaux ou de la souche JHM. La littérature rapporte d'ailleurs les caractéristiques de l'infection du SNC par la souche JHM

comme étant celles des MHV neurovirulents, généralisation à éviter. Les modulations de la réponse immunitaire par MHV telle que rapportée dans la littérature concerne le plus souvent des injections par voie i.p. surtout et dans une grande variété de doses selon les publications.

Pour la première fois, la prolifération suite à la stimulation via les voies normales de présentation antigénique a été explorée lors de l'infection aiguë. Non seulement des antigènes viraux ont été employés dans le but d'induire une prolifération, mais surtout des lymphocytes T spécifiques d'un peptide non relié au MHV ont été employés dans ce but. En plus, des CPA de souris infectées ont été employées en présence de cellules T de souris témoins pour montrer leur capacité à induire une telle immunosuppression, et ce, malgré une forte présence de cellules dendritiques pour chaque lymphocyte T. La dose virale pour l'infection a aussi été liée avec le degré d'immunosuppression observé, fournissant entre autres une explication des divergences entre les résultats obtenus depuis les trente dernières années.

Tout aussi nouveau dans cette recherche, l'implication de mécanismes de régulation du système immunitaire a été étudiée dans l'immunosuppression suite à l'infection par MHV-A59. Des cellules T_{REG} ont été identifiées dans les ganglions lymphatiques cervicaux, mais aussi dans le SNC, et ce, dès 7 jpi. D'ailleurs, l'observation de l'immunosuppression n'a pas été limitée à la rate, mais elle fut aussi étudiée avec les lymphocytes T infiltrant du SNC. Le rôle de l'IL-10 a été exclu par la quantification de l'ARNm par RT-qPCR, mais aussi par le blocage *in vivo* de son récepteur, ce qui n'a pas entraîné de modification importante de l'immunosuppression des splénocytes stimulés. Une nouveauté importante, la possibilité que le TGF- β_1 soit seul impliqué dans l'immunosuppression suite à l'infection par MHV-A59 a été explorée, par la quantification en RT-qPCR, mais aussi directement via le dosage à la rate, dans le sérum et dans les surnageants de splénocytes stimulés *in vitro*.

Bien que la réduction de production de l'IL-2 ait déjà été décrite, rien n'indiquait s'il s'agissait d'une interruption de transcription ou d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnel. L'absence de transcription du gène de l'IL-2 a été confirmée ici en plus de la capacité de l'IL-2 exogène de rétablir une prolifération normale lorsque combiné à l' α -CD3. Il s'agit aussi de la première démonstration de ce même pouvoir de la combinaison

PMA/Iono et une première indication sur la localisation intracellulaire d'un arrêt de la transmission du signal moléculaire d'activation de la prolifération. Bien que peu concluant, l'expérimentation avec un traitement à l'IL-2, employées dans d'autres modèles expérimentaux, est une première avec l'infection par MHV.

Ces travaux ont aussi poussé plus à fond l'étude des splénocytes de souris infectées par les marquages CD25, CD69, CD28 ou le suivi des divisions avec le CFSE. Bien que la persistance de l'ARN viral ne soit pas un fait nouveau, elle a été observée jusqu'à un an après l'infection, il s'agit de la première fois qu'un ARNm viral a été spécifiquement détecté lors de la persistance. Les forts titres d'IgG2a induits par le virus est un fait connu depuis longtemps tout comme leur absence de reconnaissance du virus. Par contre la présence rapide d'IgG2b et d'IgG3 et de façon plus transitoire d'IgG1 n'était jusqu'à présent pas connu.

Finalement, un modèle d'action du virus pour induire une immunosuppression transitoire, mais non spécifique d'un antigène a été proposé. Des tests préliminaires ont même fourni des résultats intéressants, mais qu'il faudra toutefois confirmer et approfondir.

7.3 Futures recherches

La vérification du lien entre l'immunosuppression et la persistance virale tout comme du modèle d'immunosuppression proposé ici nécessitera le développement de certains outils. En effet, si les anticorps monoclonaux contre différentes molécules et isoformes des membres de la famille CEACAM sont disponibles chez l'humain ceux-ci ne sont pas disponibles chez la souris, un seul existant à ce jour (Dveksler *et al.*, 1991). L'étude du rôle de CEACAM1a dans l'immunosuppression par MHV-A59 nécessitera des anticorps monoclonaux capables de distinguer entre les isoformes et l'état d'activation de CEACAM1. Des outils de détection de Zap70, actif comme inactif, sont déjà disponibles commercialement tout comme divers modèles de souris transgéniques, permettant d'étudier le rôle de cette molécule de signalisation dans l'inhibition induite tant *in vitro* qu'*in vivo*. Pour la détection des effets de MHV-A59 *in vivo* il serait plus que souhaitable de pouvoir détecter les cellules infectées par le virus même sans production de nouvelles particules virales. L'anticorps ciblant la protéine S et couplé au FITC qui a été développé ici pourra

être utilisé et sera utile si le marquage non spécifique observé dans les splénocytes mais absent des cellules WEHI testées peut être éliminé.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- 't Hart, B.A., et Amor, S. 2003. The use of animal models to investigate the pathogenesis of neuroinflammatory disorders of the central nervous system. *Curr. Opin. Neurol.* **16**: 375-383.
- Abraham, S., Kienzle, T.E., Lapps, W., et Brian, D.A. 1990a. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. *Virology* **176**: 296-301.
- Abraham, S., Kienzle, T.E., Lapps, W.E., et Brian, D.A. 1990b. Sequence and expression analysis of potential nonstructural proteins of 4.9, 4.8, 12.7, and 9.5 kDa encoded between the spike and membrane protein genes of the bovine coronavirus. *Virology* **177**: 488-495.
- Abram, C.L., et Lowell, C.A. 2007. Convergence of immunoreceptor and integrin signaling.. *Immunol. Rev.* **218**: 29-44.
- Abramsky, O., Teitelbaum, D., et Arnon, R. 1977. Effect of a synthetic polypeptide (COP 1) on patients with multiple sclerosis and with acute disseminated encephalomyelitis. Preliminary report. *J. Neurol. Sci.* **31**: 433-438.
- Acheson, E.D., Bachrach, C.A., et Wright, F.M. 1960. Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables. *Acta Psychiatr Scand Suppl* **35**: 132-147.
- Adami, C., Pooley, J., Glomb, J., Stecker, E., Fazal, F., Fleming, J.O. et al. 1995. Evolution of mouse hepatitis virus (MHV) during chronic infection: quasispecies nature of the persisting MHV RNA. *Virology* **209**: 337-346.
- Ahmed, R., et Gray, D. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**: 54-60.
- Ahmed, R., King, C.C., et Oldstone, M.B. 1987. Virus-lymphocyte interaction: T cells of the helper subset are infected with lymphocytic choriomeningitis virus during persistent infection in vivo. *J. Virol.* **61**: 1571-1576.
- Akbar, A.N., Vukmanovic-Stejic, M., Taams, L.S., et Macallan, D.C. 2007. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery.. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 231-237.
- Alekseev, K.P., Vlasova, A.N., Jung, K., Hasoksuz, M., Zhang, X., Halpin, R. et al. 2008. Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. *J. Virol.* **82**: 12422-12431.

- Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hämmerling, G.J., et Arnold, B. 1998. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* **282**: 1338-1341.
- Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R. et al. 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* **19**: 345-354.
- Allen, I.V., et McKeown, S.R. 1979. A histological, histochemical and biochemical study of the macroscopically normal white matter in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **41**: 81-91.
- Allen, I.V., McQuaid, S., Mirakhur, M., et Nevin, G. 2001. Pathological abnormalities in the normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* **22**: 141-144.
- Almazán, F., González, J.M., Péntzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Durán, J. et al. 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 5516-5521.
- Amon, W., et Farrell, P.J. 2005. Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev. Med. Virol.* **15**: 149-156.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., et Stein, H. 1995. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* **85**: 744-750.
- Andersen, O., Lygner, P.E., Bergström, T., Andersson, M., et Vahlne, A. 1993. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J. Neurol.* **240**: 417-422.
- Angulo, M.C., Kozlov, A.S., Charpak, S., et Audinat, E. 2004. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci.* **24**: 6920-6927.
- Annacker, O., Asseman, C., Read, S., et Powrie, F. 2003. Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis. *J. Autoimmun.* **20**: 277-279.
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T.C., Cumano, A., et Bandeira, A. 2001. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* **166**: 3008-3018.
- Appel, M.. 1987. Canine coronavirus. *Dans Virus infections of carnivores. Éditeur: Appel, M. Virus infections of carnivores, Elsevier Science Publishers, pp. 115-122.*
- Arbour, N., Cote, G., Lachance, C., Tardieu, M., Cashman, N.R., et Talbot, P.J. 1999a. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *J. Virol.* **73**: 3338-3350.

- Arbour, N., Day, R., Newcombe, J., et Talbot, P.J. 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J. Virol.* **74**: 8913-8921.
- Arbour, N., Ekande, S., Cote, G., Lachance, C., Chagnon, F., Tardieu, M. et al. 1999b. Persistent infection of human oligodendrocytic and neuroglial cell lines by human coronavirus 229E. *J. Virol.* **73**: 3326-3337.
- Arbour, N., et Talbot, P.J. 1998. Persistent infection of neural cell lines by human coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**: 575-581.
- Armstrong, R.C., Redwine, J.M., et Messersmith, D.J.. 2005. Coronavirus-induced demyelination and spontaneous remyelination: Growth factor expression and function. *Dans Experimental models of multiple sclerosis. Éditeur: Lavi, E., et Constantinescu, C.S. Experimental models of multiple sclerosis, Springer, pp. 793-803.*
- Arnason, B.G., Jankovic, B.D., Waksman, B.H., et Wennersten, C. 1962. Role of the thymus in immune reactions in rats. II. Suppressive effect of thymectomy at birth on reactions of delayed (cellular) hypersensitivity and the circulating small lymphocyte. *J. Exp. Med.* **116**: 177-186.
- Arneborn, P., et Biberfeld, G. 1983. T-lymphocyte subpopulations in relation to immunosuppression in measles and varicella. *Infect. Immun.* **39**: 29-37.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., et Kourilsky, P. 1999. A direct estimate of the human alpha beta T cell receptor diversity. *Science* **286**: 958-961.
- Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., et Sakaguchi, S. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* **184**: 387-396.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., et Powrie, F. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **190**: 995-1004.
- Atkins, G.J., McQuaid, S., Morris-Downes, M.M., Galbraith, S.E., Amor, S., Cosby, S.L. et al. 2000. Transient virus infection and multiple sclerosis. *Rev. Med. Virol.* **10**: 291-303.
- Aversa, G., Carballido, J., Punnonen, J., Chang, C.C., Hauser, T., Cocks, B.G. et al. 1997. SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunol. Cell Biol.* **75**: 202-205.
- Avota, E., Avots, A., Niewiesk, S., Kane, L.P., Bommhardt, U., ter Meulen, V. et al. 2001. Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat. Med.* **7**: 725-731.

- Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P.S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A. et al. 2007. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* **8**: 1380-1389.
- Bachmann, M.F., et Oxenius, A. 2007. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.* **8**: 1142-1148.
- Bachmann, M.F., Kündig, T.M., Kalberer, C.P., Hengartner, H., et Zinkernagel, R.M. 1994. How many specific B cells are needed to protect against a virus?. *J. Immunol.* **152**: 4235-4241.
- Bachmann, M.F., Schorle, H., Kühn, R., Müller, W., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. et al. 1995. Antiviral immune responses in mice deficient for both interleukin-2 and interleukin-4. *J. Virol.* **69**: 4842-4846.
- Baecher-Allan, C., Wolf, E., et Hafler, D.A. 2006. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J. Immunol.* **176**: 4622-4631.
- Bahl, K., Kim, S.K., Calcagno, C., Ghersi, D., Puzone, R., Celada, F. et al. 2006. IFN-induced attrition of CD8 T cells in the presence or absence of cognate antigen during the early stages of viral infections. *J. Immunol.* **176**: 4284-4295.
- Bailey, O.T., Pappenheimer, A.M., Cheever, S.F., et Daniels, J.B. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. II Pathology. *J. Exp. Med.* **90**: 195-212.
- Bang, F.B., et Warwick, A. 1960. Mouse macrophages as host cells for the mouse hepatitis virus and the genetic basis of their susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **46**: 1065-1075.
- Barac-Latas, V., Suchanek, G., Breitschopf, H., Stuehler, A., Wege, H., et Lassmann, H. 1997. Patterns of oligodendrocyte pathology in coronavirus-induced subacute demyelinating encephalomyelitis in the Lewis rat. *Glia* **19**: 1-12.
- Barker, C.F., et Billingham, R.E. 1977. Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* **25**: 1-54.
- Barkhof, F., Scheltens, P., Frequin, S.T., Nauta, J.J., Tas, M.W., Valk, J. et al. 1992. Relapsing-remitting multiple sclerosis: sequential enhanced MR imaging vs clinical findings in determining disease activity. *AJR Am J Roentgenol* **159**: 1041-1047.
- Barnett, E.M., et Perlman, S. 1993. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology* **194**: 185-191.
- Barnett, M.H., et Prineas, J.W. 2004. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann. Neurol.* **55**: 458-468.

- Barthold, S.W., Smith, A.L., Lord, P.F., Bhatt, P.N., Jacoby, R.O., et Main, A.J. 1982. Epizootic coronaviral typhlocolitis in suckling mice. *Lab. Anim. Sci.* **32**: 376-383.
- Baxter, A.G. 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis.. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 904-912.
- Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F. et al. 1999. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.* **252**: 243-249.
- Bechmann, I., Priller, J., Kovac, A., Böntert, M., Wehner, T., Klett, F.F. et al. 2001. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur. J. Neurosci.* **14**: 1651-1658.
- Bechmann, I., Steiner, B., Gimsa, U., Mor, G., Wolf, S., Beyer, M. et al. 2002. Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. *J. Neuroimmunol.* **132**: 60-65.
- Belshaw, R., Gardner, A., Rambaut, A., et Pybus, O.G. 2008. Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* **23**: 188-193.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H., et Cohen, I.R. 1981. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **11**: 195-199.
- Béné, M.C. 2006. What is ZAP-70?. *Cytometry B Clin Cytom* **70**: 204-208.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L. et al. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.. *Nat. Genet.* **27**: 20-21.
- Berg, L.J., et Kang, J. 2001. Molecular determinants of TCR expression and selection. *Curr. Opin. Immunol.* **13**: 232-241.
- Bergmann, C.C., Altman, J.D., Hinton, D., et Stohlman, S.A. 1999. Inverted immunodominance and impaired cytolytic function of CD8+ T cells during viral persistence in the central nervous system. *J. Immunol.* **163**: 3379-3387.
- Bergmann, C.C., Lane, T.E., et Stohlman, S.A. 2006. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 121-132.
- Bergmann, C.C., Lane, T.E., et Stohlman, S.A.. 2008. The Immune Response to Coronaviruses. *Dans Nidoviruses. Éditeur: Perlman, S., Gallagher, T., et Snijder, E.J. Nidoviruses, ASM Press, pp. 339-349.*
- Bettelli, E. 2007. Building different mouse models for human MS.. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1103**: 11-18.

- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H.L., Linington, C., Sobel, R.A., et Kuchroo, V.K. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* **197**: 1073-1081.
- Bettini, M., et Vignali, D.A. 2009. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* : .
- Beverly, B., Kang, S.M., Lenardo, M.J., et Schwartz, R.H. 1992. Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int. Immunol.* **4**: 661-671.
- Bhatt, P.N., Jacoby, R.O., et Jonas, A.M. 1977. Respiratory infection in mice with sialodacryoadenitis virus, a coronavirus of rats. *Infect. Immun.* **18**: 823-827.
- Bhattacharyya, S., Ghosh, S., Jhonson, P.L., Bhattacharya, S.K., et Majumdar, S. 2001. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infect. Immun.* **69**: 1499-1507.
- Binns, M.M., Bournsnel, M.E., Cavanagh, D., Pappin, D.J., et Brown, T.D. 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *J. Gen. Virol.* **66 (Pt 4)**: 719-726.
- Bishop, S.A., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A., et Stokes, C.R. 1993. Programmed cell death (apoptosis) as a mechanism of cell death in peripheral blood mononuclear cells from cats infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Clin. Exp. Immunol.* **93**: 65-71.
- Blau, D.M., Turbide, C., Tremblay, M., Olson, M., Letourneau, S., Michaliszyn, E. et al. 2001. Targeted disruption of the Ceacam1 (MHVR) gene leads to reduced susceptibility of mice to mouse hepatitis virus infection. *J. Virol.* **75**: 8173-8186.
- Bloom, B.R., Salgame, P., et Diamond, B. 1992. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol. Today* **13**: 131-136.
- Bø, L., Vedeler, C.A., Nyland, H., Trapp, B.D., et Mørk, S.J. 2003a. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult. Scler.* **9**: 323-331.
- Bø, L., Vedeler, C.A., Nyland, H.I., Trapp, B.D., et Mørk, S.J. 2003b. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**: 723-732.
- Bonavia, A., Arbour, N., Yong, V.W., et Talbot, P.J. 1997. Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *J. Virol.* **71**: 800-806.
- Bonyhadi, M.L., Rabin, L., Salimi, S., Brown, D.A., Kosek, J., McCune, J.M. et al. 1993. HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature* **363**: 728-732.

- Booth, C.M., Matukas, L.M., Tomlinson, G.A., Rachlis, A.R., Rose, D.B., Dwosh, H.A. et al. 2003. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA* **289**: 2801-2809.
- Bornstein, M.B., Miller, A., Slagle, S., Weitzman, M., Crystal, H., Drexler, E. et al. 1987. A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **317**: 408-414.
- Borrow, P., et Oldstone, M.B. 1995. Measles virus-mono-nuclear cell interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **191**: 85-100.
- Borrow, P., Evans, C.F., et Oldstone, M.B. 1995. Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression. *J. Virol.* **69**: 1059-1070.
- Borrow, P., Tishon, A., et Oldstone, M.B. 1991. Infection of lymphocytes by a virus that aborts cytotoxic T lymphocyte activity and establishes persistent infection. *J. Exp. Med.* **174**: 203-212.
- Boucher, A., Desforages, M., Duquette, P., et Talbot, P.J. 2007. Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol.* **123**: 258-267.
- Boulton, I.C., et Gray-Owen, S.D. 2002. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat. Immunol.* **3**: 229-236.
- Bouneaud, C., Kourilsky, P., et Bousso, P. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* **13**: 829-840.
- Bournsnel, M.E., Binns, M.M., et Brown, T.D. 1985a. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: three open reading frames in the 5' 'unique' region of mRNA D. *J. Gen. Virol.* **66 (Pt 10)**: 2253-2258.
- Bournsnel, M.E., Binns, M.M., Foulds, I.J., et Brown, T.D. 1985b. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* **66 (Pt 3)**: 573-580.
- Bournsnel, M.E., Brown, T.D., et Binns, M.M. 1984. Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. *Virus Res.* **1**: 303-313.
- Bournsnel, M.E., Brown, T.D., Foulds, I.J., Green, P.F., Tomley, F.M., et Binns, M.M. 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* **68 (Pt 1)**: 57-77.
- Bournsnel, M.E., et Brown, T.D. 1984. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: a 195-base open reading frame encoded by mRNA B. *Gene* **29**: 87-92.

- Boztug, K., Carson, M.J., Pham-Mitchell, N., Asensio, V.C., DeMartino, J., et Campbell, I.L. 2002. Leukocyte infiltration, but not neurodegeneration, in the CNS of transgenic mice with astrocyte production of the CXC chemokine ligand 10. *J. Immunol.* **169**: 1505-1515.
- Bradburne, A.F. 1970. Antigenic relationships amongst coronaviruses. *Arch Gesamte Virusforsch* **31**: 352-364.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brahic, M., Bureau, J., et Michiels, T. 2005. The genetics of the persistent infection and demyelinating disease caused by Theiler's virus. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 279-298.
- Brayton, C., Mähler, M., et Nicklas, W.. 2004. Viral infections. *Dans The laboratory mouse. Éditeur: Hedrich, H. The laboratory mouse, Elsevier, pp. 357-391.*
- Bridgen, A., Duarte, M., Tobler, K., Laude, H., et Ackermann, M. 1993. Sequence determination of the nucleocapsid protein gene of the porcine epidemic diarrhoea virus confirms that this virus is a coronavirus related to human coronavirus 229E and porcine transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.* **74 (Pt 9)**: 1795-1804.
- Bridgen, A., Kocherhans, R., Tobler, K., Carvajal, A., et Ackermann, M. 1998. Further analysis of the genome of porcine epidemic diarrhoea virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**: 781-786.
- Brierley, I., Boursnell, M.E., Binns, M.M., Bilimoria, B., Blok, V.C., Brown, T.D. et al. 1987. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J.* **6**: 3779-3785.
- Brooks, D.G., Lee, A.M., Elsaesser, H., McGavern, D.B., et Oldstone, M.B.A. 2008. IL-10 blockade facilitates DNA vaccine-induced T cell responses and enhances clearance of persistent virus infection. *J. Exp. Med.* **205**: 533-541.
- Brooks, D.G., Trifilo, M.J., Edelmann, K.H., Teyton, L., McGavern, D.B., et Oldstone, M.B.A. 2006. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat. Med.* **12**: 1301-1309.
- Brunet, J.F., Grollmund, L., Chatton, J., Lengacher, S., Magistretti, P.J., Villemure, J.G. et al. 2004. Early acquisition of typical metabolic features upon differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Glia* **46**: 8-17.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A. et al. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**: 68-73.

- Bryant, V.L., Ma, C.S., Avery, D.T., Li, Y., Good, K.L., Corcoran, L.M. et al. 2007. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells. *J. Immunol.* **179**: 8180-8190.
- Burks, J.S., DeVald, B.L., Jankovsky, L.D., et Gerdes, J.C. 1980. Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science* **209**: 933-934.
- Byram, S.C., Carson, M.J., DeBoy, C.A., Serpe, C.J., Sanders, V.M., et Jones, K.J. 2004. CD4-positive T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation. *J. Neurosci.* **24**: 4333-4339.
- Cabirac, G.F., Murray, R.S., McLaughlin, L.B., Skolnick, D.M., Hogue, B., Dorovini-Zis, K. et al. 1995. In vitro interaction of coronaviruses with primate and human brain microvascular endothelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**: 79-88.
- Cabirac, G.F., Soike, K.F., Zhang, J.Y., Hoel, K., Butunoi, C., Cai, G.Y. et al. 1994. Entry of coronavirus into primate CNS following peripheral infection. *Microb. Pathog.* **16**: 349-357.
- Carrano, V.A., Barthold, S.W., Beck, D.S., et Smith, A.L. 1984. Alteration of viral respiratory infections of mice by prior infection with mouse hepatitis virus. *Lab. Anim. Sci.* **34**: 573-576.
- Carreno, B.M., et Collins, M. 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 29-53.
- Carson, M.J., Doose, J.M., Melchior, B., Schmid, C.D., et Ploix, C.C. 2006. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* **213**: 48-65.
- Carson, M.J., et Lo, D. 2001. Immunology. The push-me pull-you of T cell activation. *Science* **293**: 618-619.
- Carson, M.J., Reilly, C.R., Sutcliffe, J.G., et Lo, D. 1999. Disproportionate recruitment of CD8⁺ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells. *Am. J. Pathol.* **154**: 481-494.
- Carthew, P., et Sparrow, S. 1981. Murine coronaviruses: the histopathology of disease induced by intranasal inoculation. *Res. Vet. Sci.* **30**: 270-273.
- Casali, P., Rice, G.P., et Oldstone, M.B. 1984. Viruses disrupt functions of human lymphocytes. Effects of measles virus and influenza virus on lymphocyte-mediated killing and antibody production. *J. Exp. Med.* **159**: 1322-1337.
- Casetta, I., et Granieri, E. 2000. Prognosis of multiple sclerosis: environmental factors. *Neurol. Sci.* **21**: S839-42.

- Castro, R.F., et Perlman, S. 1995. CD8+ T-cell epitopes within the surface glycoprotein of a neurotropic coronavirus and correlation with pathogenicity. *J. Virol.* **69**: 8127-8131.
- CDC 1982. Subacute sclerosing panencephalitis surveillance - United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **31**: 585-588.
- CDC 2005. Lymphocytic choriomeningitis virus infection in organ transplant recipients--Massachusetts, Rhode Island, 2005. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **54**: 537-539.
- Cederbom, L., Hall, H., et Ivars, F. 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* **30**: 1538-1543.
- Cervantes-Barragan, L., Züst, R., Weber, F., Spiegel, M., Lang, K.S., Akira, S. et al. 2007. Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood* **109**: 1131-1137.
- Cerwenka, A., et Lanier, L.L. 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **1**: 41-49.
- Chai, J.G., et Lechler, R.I. 1997. Immobilized anti-CD3 mAb induces anergy in murine naive and memory CD4+ T cells in vitro. *Int. Immunol.* **9**: 935-944.
- Chakrabarty, S. 1992. Role of protein kinase C in transforming growth factor-beta 1 induction of carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma cells. *J. Cell. Physiol.* **152**: 494-499.
- Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G., et Allison, J.P. 2001. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 565-594.
- Chang, R.Y., Hofmann, M.A., Sethna, P.B., et Brian, D.A. 1994. A cis-acting function for the coronavirus leader in defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **68**: 8223-8231.
- Chany, C., Moscovici, O., Lebon, P., et Rousset, S. 1982. Association of coronavirus infection with neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* **69**: 209-214.
- Charcot, J.M. 1880. *Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière.* Delahaye et Co, Paris.
- Chatenoud, L., et Bach, J. 2006. Adaptive human regulatory T cells: myth or reality?. *J. Clin. Invest.* **116**: 2325-2327.
- Cheever, S.F., Daniels, J.B., Pappenheimer, A.M., et Bailey, O.T. 1949. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. I Isolation and biological properties of the virus. *J. Exp. Med.* **90**: 181-194.

- Cheifetz, S., et Moscarello, M.A. 1985. Effect of bovine basic protein charge microheterogeneity on protein-induced aggregation of unilamellar vesicles containing a mixture of acidic and neutral phospholipids. *Biochemistry* **24**: 1909-1914.
- Chen, C., et Shively, J.E. 2004. The cell-cell adhesion molecule carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 inhibits IL-2 production and proliferation in human T cells by association with Src homology protein-1 and down-regulates IL-2 receptor.. *J. Immunol.* **172**: 3544-3552.
- Chen, D., Iijima, H., Nagaishi, T., Nakajima, A., Russell, S., Raychowdhury, R. et al. 2004. Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 isoforms alternatively inhibit and costimulate human T cell function.. *J. Immunol.* **172**: 3535-3543.
- Chen, D.S., Asanaka, M., Yokomori, K., Wang, F., Hwang, S.B., Li, H.P. et al. 1995. A pregnancy-specific glycoprotein is expressed in the brain and serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 12095-12099.
- Chen, T., Zimmermann, W., Parker, J., Chen, I., Maeda, A., et Bolland, S. 2001. Biliary glycoprotein (BGP_a, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J. Leukoc. Biol.* **70**: 335-340.
- Chesnut, R.W., Colon, S.M., et Grey, H.M. 1982a. Antigen presentation by normal B cells, B cell tumors, and macrophages: functional and biochemical comparison. *J. Immunol.* **128**: 1764-1768.
- Chesnut, R.W., Colon, S.M., et Grey, H.M. 1982b. Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of B cell tumors and macrophages. *J. Immunol.* **129**: 2382-2388.
- Choi, S., et Schwartz, R.H. 2007. Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin. Immunol.* **19**: 140-152.
- Choudhuri, K., et van der Merwe, P.A. 2007. Molecular mechanisms involved in T cell receptor triggering.. *Semin. Immunol.* **19**: 255-261.
- Chouljenko, V.N., Foster, T.P., Lin, X., Storz, J., et Kousoulas, K.G. 2001a. Elucidation of the genomic nucleotide sequence of bovine coronavirus and analysis of cryptic leader mRNA fusion sites. *Adv. Exp. Med. Biol.* **494**: 49-55.
- Chouljenko, V.N., Lin, X.Q., Storz, J., Kousoulas, K.G., et Gorbalenya, A.E. 2001b. Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. *J. Gen. Virol.* **82**: 2927-2933.
- Chu, D.K.W., Peiris, J.S.M., Chen, H., Guan, Y., et Poon, L.L.M. 2008. Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. *J. Gen. Virol.* **89**: 1282-1287.

- Clatch, R.J., Lipton, H.L., et Miller, S.D. 1986. Characterization of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-specific delayed-type hypersensitivity responses in TMEV-induced demyelinating disease: correlation with clinical signs. *J. Immunol.* **136**: 920-927.
- Cohen, I.R. 2001. Antigenic mimicry, clonal selection and autoimmunity. *J. Autoimmun.* **16**: 337-340.
- Coley, S.E., Lavi, E., Sawicki, S.G., Fu, L., Schelle, B., Karl, N. et al. 2005. Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J. Virol.* **79**: 3097-3106.
- Collins, A.R., et Sorensen, O. 1986. Regulation of viral persistence in human glioblastoma and rhabdomyosarcoma cells infected with coronavirus OC43. *Microb. Pathog.* **1**: 573-582.
- Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J.C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B. et al. 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* **17**: 201-210.
- Collison, L.W., et Vignali, D.A.A. 2008. Interleukin-35: odd one out or part of the family?. *Immunol. Rev.* **226**: 248-262.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M. et al. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**: 566-569.
- Compston, A., et Coles, A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet* **372**: 1502-1517.
- Compston, A., et Confavreux, C.. 2006. The distribution of multiple sclerosis. *Dans Mcalpine's multiple sclerosis. Éditeur: Compston, A., Confavreux, C., Lassmann, H., McDonald, I., Miller, D., Noseworthy, J., Smith, K., et Wekerle, H. Mcalpine's multiple sclerosis, Churchill Livingstone, pp. 71-111.*
- Confavreux, C., Aimard, G., et Devic, M. 1980. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain* **103**: 281-300.
- Confavreux, C., et Compston, A.. 2006. The natural history of multiple sclerosis. *Dans Mcalpine's multiple sclerosis. Éditeur: Compston, A., Confavreux, C., Lassmann, H., McDonald, I., Miller, D., Noseworthy, J., Smith, K., et Wekerle, H. Mcalpine's multiple sclerosis, Churchill Livingstone, pp. 183-272.*
- Confavreux, C., Vukusic, S., et Adeleine, P. 2003. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* **126**: 770-782.
- Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., et Adeleine, P. 2000. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **343**: 1430-1438.

- Cook-Mills, J.M., Munshi, H.G., Perlman, R.L., et Chambers, D.A. 1992. Mouse hepatitis virus infection suppresses modulation of mouse spleen T-cell activation. *Immunology* **75**: 542-545.
- Cook, S.D., Devereux, C., Troiano, R., Bansil, S., Zito, G., Sheffet, A. et al. 1995. Combination total lymphoid irradiation and low-dose corticosteroid therapy for progressive multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **91**: 22-27.
- Corapi, W.V., Olsen, C.W., et Scott, F.W. 1992. Monoclonal antibody analysis of neutralization and antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus. *J. Virol.* **66**: 6695-6705.
- Cournoyer, D., Beauchemin, N., Boucher, D., Benchimol, S., Fuks, A., et Stanners, C.P. 1988. Transcription of genes of the carcinoembryonic antigen family in malignant and nonmalignant human tissues. *Cancer Res.* **48**: 3153-3157.
- Courtney, S.W. 2003. All About Multiple Sclerosis. Multiple Sclerosis Association of America.
- Coutelier, J.P., Coulie, P.G., Wauters, P., Heremans, H., et van der Logt, J.T. 1990. In vivo polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses.. *J. Virol.* **64**: 5383-5388.
- Coutelier, J.P., Godfraind, C., Dveksler, G.S., Wysocka, M., Cardellichio, C.B., Noel, H. et al. 1994. B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules that serve as receptors for murine coronavirus. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1383-1390.
- Coutelier, J.P., van der Logt, J.T., Heessen, F.W., Vink, A., et van Snick, J. 1988. Virally induced modulation of murine IgG antibody subclasses.. *J. Exp. Med.* **168**: 2373-2378.
- Coutelier, J.P., van der Logt, J.T., Heessen, F.W., Warnier, G., et Van Snick, J. 1987. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J. Exp. Med.* **165**: 64-69.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., et Avrameas, S. 1995. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 812-818.
- Crawford, D.H., et Ando, I. 1986. EB virus induction is associated with B-cell maturation. *Immunology* **59**: 405-409.
- Cray, C., Mateo, M.O., et Altman, N.H. 1993. In vitro and long-term in vivo immune dysfunction after infection of BALB/c mice with mouse hepatitis virus strain A59. *Lab. Anim. Sci.* **43**: 169-174.
- Cross, A.H., McCarron, R., McFarlin, D.E., et Raine, C.S. 1987. Adoptively transferred acute and chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis in the PL/J mouse and

- observations on altered pathology by intercurrent virus infection. *Lab. Invest.* **57**: 499-512.
- Cserr, H.F., DePasquale, M., Harling-Berg, C.J., Park, J.T., et Knopf, P.M. 1992. Afferent and efferent arms of the humoral immune response to CSF-administered albumins in a rat model with normal blood-brain barrier permeability. *J. Neuroimmunol.* **41**: 195-202.
- Cserr, H.F., et Knopf, P.M. 1992. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol. Today* **13**: 507-512.
- Cui, W., Fan, Y., Wu, W., Zhang, F., Wang, J., et Ni, A. 2003. Expression of lymphocytes and lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **37**: 857-859.
- Daniel, C., et Talbot, P.J. 1987. Physico-chemical properties of murine hepatitis virus, strain A 59. Brief report. *Arch. Virol.* **96**: 241-248.
- Daniel, C., Lamarre, A., et Talbot, P.J. 1994. Increased viral titers and enhanced reactivity of antibodies to the spike glycoprotein of murine coronavirus produced by infection at pH 6. *J. Virol. Methods* **50**: 237-244.
- Das Sarma, J., Fu, L., Tsai, J.C., Weiss, S.R., et Lavi, E. 2000. Demyelination determinants map to the spike glycoprotein gene of coronavirus mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **74**: 9206-9213.
- De Albuquerque, N., Baig, E., Ma, X., Zhang, J., He, W., Rowe, A. et al. 2006. Murine hepatitis virus strain 1 produces a clinically relevant model of severe acute respiratory syndrome in A/J mice. *J. Virol.* **80**: 10382-10394.
- de Campos-Lima, P.O., Gavioli, R., Zhang, Q.J., Wallace, L.E., Dolcetti, R., Rowe, M. et al. 1993. HLA-A11 epitope loss isolates of Epstein-Barr virus from a highly A11+ population. *Science* **260**: 98-100.
- de Groot-Mijnes, J.D.F., van Dun, J.M., van der Most, R.G., et de Groot, R.J. 2005. Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *J. Virol.* **79**: 1036-1044.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., et Scheffold, A. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* **34**: 2480-2488.
- de la Torre, J.C., et Oldstone, M.B. 1996. Anatomy of viral persistence: mechanisms of persistence and associated disease. *Adv. Virus Res.* **46**: 311-343.
- de Souza, M.S., et Smith, A.L. 1991. Characterization of accessory cell function during acute infection of BALB/cByJ mice with mouse hepatitis virus (MHV), strain JHM. *Lab. Anim. Sci.* **41**: 112-118.

- de Souza, M.S., Smith, A.L., et Bottomly, K. 1991. Infection of BALB/cByJ mice with the JHM strain of mouse hepatitis virus alters in vitro splenic T cell proliferation and cytokine production. *Lab. Anim. Sci.* **41**: 99-105.
- de Vos, A.F., van Meurs, M., Brok, H.P., Boven, L.A., Hintzen, R.Q., van der Valk, P. et al. 2002. Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* **169**: 5415-5423.
- Dea, S., Michaud, L., et Milane, G. 1995. Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Québec. *J. Gen. Virol.* **76 (Pt 5)**: 1263-1270.
- Dean, G.A., Olivry, T., Stanton, C., et Pedersen, N.C. 2003. In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Vet. Microbiol.* **97**: 1-12.
- Decaro, N., et Buonavoglia, C. 2008. An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathobiology. *Vet. Microbiol.* : doi:10.1016/j.vetmic.2008.06.007.
- Deli, M.A., Abrahám, C.S., Kataoka, Y., et Niwa, M. 2005. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25**: 59-127.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., et Roitt, I.M. 2006. *Roitt's Essential Immunology*. Blackwell Publishing.
- Dempsey, W.L., Smith, A.L., et Morahan, P.S. 1986. Effect of inapparent murine hepatitis virus infections on macrophages and host resistance. *J. Leukoc. Biol.* **39**: 559-565.
- Descôteaux, J.P., Lussier, G., Berthiaume, L., Alain, R., Seguin, C., et Trudel, M. 1985. An enteric coronavirus of the rabbit: detection by immunoelectron microscopy and identification of structural polypeptides. *Arch. Virol.* **84**: 241-250.
- Di Cesare, A., Di Meglio, P., et Nestle, F.O. 2009. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **129**: 1339-1350.
- Dieckmann, D., Bruett, C.H., Ploettner, H., Lutz, M.B., et Schuler, G. 2002. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **196**: 247-253.
- Donda, A., Mori, L., Shamshiev, A., Carena, I., Mottet, C., Heim, M.H. et al. 2000. Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response. *Eur. J. Immunol.* **30**: 2593-2603.
- Dong Kim, K., Zhao, J., Auh, S., Yang, X., Du, P., Tang, H. et al. 2007. Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat. Med.* **13**: 1248-1252.

- Dong, C. 2008. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 337-348.
- Downs, W.G. 1982. The Rockefeller Foundation virus program: 1951-1971 with update to 1981. *Annu. Rev. Med.* **33**: 1-29.
- Doyle, L.P., et Hutchings, L.M. 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **108**: 257-259.
- Duarte, M., Tobler, K., Bridgen, A., Rasschaert, D., Ackermann, M., et Laude, H. 1994. Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. *Virology* **198**: 466-476.
- Dulbecco, R., et Vogt, M. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* **99**: 167-182.
- Dumas, M., et Jauberteau-Marchan, M.O. 2000. The protective role of Langerhans' cells and sunlight in multiple sclerosis. *Med. Hypotheses* **55**: 517-520.
- Duthoit, C.T., Mekala, D.J., Alli, R.S., et Geiger, T.L. 2005. Uncoupling of IL-2 signaling from cell cycle progression in naive CD4+ T cells by regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **174**: 155-163.
- Dveksler, G.S., Dieffenbach, C.W., Cardellichio, C.B., McCuaig, K., Pensiero, M.N., Jiang, G.S. et al. 1993. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J. Virol.* **67**: 1-8.
- Dveksler, G.S., Pensiero, M.N., Cardellichio, C.B., Williams, R.K., Jiang, G.S., Holmes, K.V. et al. 1991. Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV. *J. Virol.* **65**: 6881-6891.
- Dye, C., et Siddell, S.G. 2005. Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146. *J. Gen. Virol.* **86**: 2249-2253.
- Dyment, D.A., Ebers, G.C., et Sadovnick, A.D. 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **3**: 104-110.
- Edan, G., Miller, D., Clanet, M., Confavreux, C., Lyon-Caen, O., Lubetzki, C. et al. 1997. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **62**: 112-118.
- Ehrlich, P. Partial cell functions. [En ligne] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/ehrlich-lecture.pdf. (Page consultée le 2 juillet 2008).

- Encinas, J.A., Weiner, H.L., et Kuchroo, V.K. 1996. Inheritance of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **45**: 655-669.
- Erles, K., Toomey, C., Brooks, H.W., et Brownlie, J. 2003. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology* **310**: 216-223.
- Ermisch, A. 1992. Peptide receptors of the blood-brain barrier and substrate transport into the brain. *Prog. Brain Res.* **91**: 155-161.
- Espinosa, É., et Chillet, P. 2006. *Immunologie*. Ellipses Édition Marketing, Paris.
- Eugenín, E.A., Eckardt, D., Theis, M., Willecke, K., Bennett, M.V., et Saez, J.C. 2001. Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 4190-4195.
- Evans, C.F., Horwitz, M.S., Hobbs, M.V., et Oldstone, M.B. 1996. Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **184**: 2371-2384.
- Even, C., Rowland, R.R., et Plogemann, P.G. 1995. Mouse hepatitis virus infection of mice causes long-term depletion of lactate dehydrogenase-elevating virus-permissive macrophages and T lymphocyte alterations. *Virus Res.* **39**: 355-364.
- Eylar, E.H., Caccam, J., Jackson, J.J., Westall, F.C., et Robinson, A.B. 1970. Experimental allergic encephalomyelitis: synthesis of disease-inducing site of the basic protein. *Science* **168**: 1220-1223.
- Fahlén, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S.D., Coffman, R.L., Flavell, R.A. et al. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **201**: 737-746.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R. et al. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**: 1206-1212.
- Faria, A.M.C., et Weiner, H.L. 2005. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* **206**: 232-259.
- Farr, A.G., et Rudensky, A. 1998. Medullary thymic epithelium: a mosaic of epithelial "self"? *J. Exp. Med.* **188**: 1-4.
- Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., et McHeyzer-Williams, M.G. 2009. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* **30**: 324-335.
- Felsenstein, J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package, ver. 3.6. [En ligne] <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>. (Page consultée le 2 juillet 2008).

- Ferguson, B., Matyszak, M.K., Esiri, M.M., et Perry, V.H. 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* **120** (Pt 3): 393-399.
- Fesel, C., et Coutinho, A. 1998. Dynamics of serum IgM autoreactive repertoires following immunization: strain specificity, inheritance and association with autoimmune disease susceptibility. *Eur. J. Immunol.* **28**: 3616-3629.
- Filion, M.C., Bradley, A.J., Devine, D.V., Décary, F., et Chartrand, P. 1995. Autoreactive T cells in healthy individuals show tolerance in vitro with characteristics similar to but distinct from clonal anergy. *Eur. J. Immunol.* **25**: 3123-3127.
- Fishman, P.S., Gass, J.S., Swoveland, P.T., Lavi, E., Highkin, M.K., et Weiss, S.R. 1985. Infection of the basal ganglia by a murine coronavirus. *Science* **229**: 877-879.
- Fleming, J.O., el Zaatari, F.A., Gilmore, W., Berne, J.D., Burks, J.S., Stohlman, S.A. et al. 1988. Antigenic assessment of coronaviruses isolated from patients with multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* **45**: 629-633.
- Fleming, J.O., Houtman, J.J., Alaca, H., Hinze, H.C., McKenzie, D., Aiken, J. et al. 1993. Persistence of viral RNA in the central nervous system of mice inoculated with MHV-4. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**: 327-332.
- Fleming, J.O., Trousdale, M.D., el-Zaatari, F.A., Stohlman, S.A., et Weiner, L.P. 1986. Pathogenicity of antigenic variants of murine coronavirus JHM selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.* **58**: 869-875.
- Flory, E., Pfeleiderer, M., Stuhler, A., et Wege, H. 1993. Induction of protective immunity against coronavirus-induced encephalomyelitis: evidence for an important role of CD8+ T cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1757-1761.
- Fonsatti, E., Del Vecchio, L., Altomonte, M., Sigalotti, L., Nicotra, M.R., Coral, S. et al. 2001. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J. Cell. Physiol.* **188**: 1-7.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., et Rudensky, A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**: 330-336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., et Rudensky, A.Y. 2005a. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **6**: 1142-1151.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., et Rudensky, A.Y. 2005b. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**: 329-341.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., et Rudensky, A.Y. 2005c. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**: 329-341.

- Fouchier, R.A.M., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G.J.J., van den Hoogen, B.G. et al. 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* **423**: 240.
- Frauwirth, K.A., et Thompson, C.B. 2002. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* **109**: 295-299.
- Freund, J., et McDermott, K. 1942. Sensitisation to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exp Biol* **49**: 548-553.
- Freund, J., Stern, E.R., et Pisini, T.M. 1947. Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J. Immunol.* **57**: 179-194.
- Fritz, R.B., Chou, C.H., et McFarlin, D.E. 1983. Induction of experimental allergic encephalomyelitis in PL/J and (SJL/J x PL/J)F1 mice by myelin basic protein and its peptides: localization of a second encephalitogenic determinant. *J. Immunol.* **130**: 191-194.
- Frohman, E.M. 2003. Multiple sclerosis. *Med. Clin. North Am.* **87**: 867-97, viii-ix.
- Frohman, E.M., Racke, M.K., et Raine, C.S. 2006. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N. Engl. J. Med.* **354**: 942-955.
- Fujinami, R.S., et Oldstone, M.B. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**: 1043-1045.
- Furlan, R., Rovaris, M., Martinelli Boneschi, F., Khademi, M., Bergami, A., Gironi, M. et al. 2005. Immunological patterns identifying disease course and evolution in multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* **165**: 192-200.
- Fuse, S., Molloy, M.J., et Usherwood, E.J. 2008. Immune responses against persistent viral infections: possible avenues for immunotherapeutic interventions. *Crit. Rev. Immunol.* **28**: 159-183.
- Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J., et Perlman, S. 1992. Cell receptor-independent infection by a neurotropic murine coronavirus. *Virology* **191**: 517-522.
- Gallucci, S., Lolkema, M., et Matzinger, P. 1999. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* **5**: 1249-1255.
- Gately, M.K., Desai, B.B., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., Podlaski, F.J. et al. 1991. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* **147**: 874-882.
- Gavin, M.A., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A., et Rudensky, A. 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **3**: 33-41.

- Gavin, M.A., Rasmussen, J.P., Fontenot, J.D., Vasta, V., Manganiello, V.C., Beavo, J.A. et al. 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* **445**: 771-775.
- Genain, C.P., Nguyen, M.H., Letvin, N.L., Pearl, R., Davis, R.L., Adelman, M. et al. 1995. Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J. Clin. Invest.* **96**: 2966-2974.
- Gendelman, H.E., Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Kennedy, P.G., Ghotbi, Z., Clements, J.E. et al. 1986. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.* **58**: 67-74.
- Germain, R.N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 309-322.
- Gershon, R.K., et Kondo, K. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* **21**: 903-914.
- Ghasemlou, N., Jeong, S.Y., Lacroix, S., et David, S. 2007. T cells contribute to lysophosphatidylcholine-induced macrophage activation and demyelination in the CNS. *Glia* **55**: 294-302.
- Gibbons, J.L., Miller, H.G., et Stanton, J.B. 1956. Para-infectious encephalomyelitis and related syndromes; a critical review of the neurological complications of certain specific fevers. *Q. J. Med.* **25**: 427-505.
- Gilden, D.H. 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **4**: 195-202.
- Gilmore, W., Correale, J., et Weiner, L.P. 1994. Coronavirus induction of class I major histocompatibility complex expression in murine astrocytes is virus strain specific. *J. Exp. Med.* **180**: 1013-1023.
- Godfraind, C., et Coutelier, J.P. 1998. Morphological analysis of mouse hepatitis virus A59-induced pathology with regard to viral receptor expression. *Histol. Histopathol.* **13**: 181-199.
- Godfraind, C., Havaux, N., Holmes, K.V., et Coutelier, J.P. 1997. Role of virus receptor-bearing endothelial cells of the blood-brain barrier in preventing the spread of mouse hepatitis virus-A59 into the central nervous system. *J. Neurovirol.* **3**: 428-434.
- Godfraind, C., Holmes, K.V., et Coutelier, J.P. 1995a. Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A59 in BALB/c mice. *J. Virol.* **69**: 6541-6547.
- Godfraind, C., Holmes, K.V., et Coutelier, J.P. 1998. Role of mouse hepatitis virus-A59 receptor Bgpl α expression in virus-induced pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**: 569-574.

- Godfraind, C., Langreth, S.G., Cardellichio, C.B., Knobler, R., Coutelier, J.P., Dubois-Dalcq, M. et al. 1995b. Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab. Invest.* **73**: 615-627.
- Gold, R., Linington, C., et Lassmann, H. 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* **129**: 1953-1971.
- Goldrath, A.W., et Bevan, M.J. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* **402**: 255-262.
- Gomaa, M.H., Barta, J.R., Ojkic, D., et Yoo, D. 2008. Complete genomic sequence of turkey coronavirus. *Virus Res.* **135**: 237-246.
- Gombold, J.L., Sutherland, R.M., Lavi, E., Paterson, Y., et Weiss, S.R. 1995. Mouse hepatitis virus A59-induced demyelination can occur in the absence of CD8+ T cells. *Microb. Pathog.* **18**: 211-221.
- Gondek, D.C., Lu, L., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., et Noelle, R.J. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* **174**: 1783-1786.
- Gonzalez-Scarano, F. 2002. Viral Persistence. *Dans* Viral pathogenesis and immunity. *Éditeur*: Nathanson, N. Viral pathogenesis and immunity, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 114-129.
- Goto, N., Hirano, N., Aiuchi, M., Hayashi, T., et Fujiwara, K. 1977. Nasoencephalopathy of mice infected intranasally with a mouse hepatitis virus, JHM strain. *Jpn. J. Exp. Med.* **47**: 59-70.
- Gough, R.E., Drury, S.E., Culver, F., Britton, P., et Cavanagh, D. 2006. Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazona viridigenalis* Cassin). *Avian Pathol.* **35**: 122-126.
- Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L.P., Hood, L., et Zaller, D.M. 1993. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* **72**: 551-560.
- Graca, L., Thompson, S., Lin, C., Adams, E., Cobbold, S.P., et Waldmann, H. 2002. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J. Immunol.* **168**: 5558-5565.
- Gray-Owen, S.D., et Blumberg, R.S. 2006. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 433-446.
- Green, E.A., et Flavell, R.A. 1999. The initiation of autoimmune diabetes. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 663-669.

- Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H., et Flavell, R.A. 2003. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 10878-10883.
- Greene, H.S.N. 1947. The Use of the Mouse Eye in Transplantation Experiments. *Cancer Research* **7**: 491-501.
- Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Obrink, B., et Singer, B.B. 2003. CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J. Leukoc. Biol.* **74**: 126-134.
- Greig, A.S., Mitchell, D., Corner, A.H., Bannister, G.L., Meads, E.B., et Julian, R.J. 1962. A Hemagglutinating Virus Producing Encephalomyelitis in Baby Pigs. *Can J Comp Med Vet Sci* **26**: 49-56.
- Griffin, D.E. 1995. Immune responses during measles virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **191**: 117-134.
- Griffin, D.E.. 2002. Virus-Induced Immunosuppression. *Dans Viral pathogenesis and immunity. Éditeur: Nathanson, N. Viral pathogenesis and immunity, Lippincott Williams & Wilkins*, pp. 82-95.
- Griffin, D.E. 2003. Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 493-502.
- Griffin, D.E., et Ward, B.J. 1993. Differential CD4 T cell activation in measles. *J. Infect. Dis.* **168**: 275-281.
- Griffin, D.E., Ward, B.J., Jauregui, E., Johnson, R.T., et Vaisberg, A. 1989. Immune activation in measles. *N. Engl. J. Med.* **320**: 1667-1672.
- Grogan, J.L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D.A., Sedat, J.W., et Locksley, R.M. 2001. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* **14**: 205-215.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., et Ley, T.J. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* **104**: 2840-2848.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E. et al. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**: 737-742.
- Gruslin, E. 2002. Activation de lymphocytes auto-réactifs spécifiques à la protéine basique de la myéline suite à l'infection par le coronavirus murin. Mémoire de maîtrise, INRS - Institut Armand-Frappier.

- Gruslin, E., Moisan, S., St-Pierre, Y., Desforges, M., et Talbot, P.J. 2005. Transcriptome profile within the mouse central nervous system and activation of myelin-reactive T cells following murine coronavirus infection. *J. Neuroimmunol.* **162**: 60-70.
- Grzybicki, D.M., Kwack, K.B., Perlman, S., et Murphy, S.P. 1997. Nitric oxide synthase type II expression by different cell types in MHV-JHM encephalitis suggests distinct roles for nitric oxide in acute versus persistent virus infection. *J. Neuroimmunol.* **73**: 15-27.
- Gu, J., Gong, E., Zhang, B., Zheng, J., Gao, Z., Zhong, Y. et al. 2005. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J. Exp. Med.* **202**: 415-424.
- Guy, J.S., Breslin, J.J., Breuhaus, B., Vivrette, S., et Smith, L.G. 2000. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4523-4526.
- Ha, C.T., Waterhouse, R., Wessells, J., Wu, J.A., et Dveksler, G.S. 2005. Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2, and TGF-beta1. *J. Leukoc. Biol.* **77**: 948-957.
- Haagmans, B.L., Egberink, H.F., et Horzinek, M.C. 1996. Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *J. Virol.* **70**: 8977-8983.
- Haks, M.C., Pépin, E., van den Brakel, J.H.N., Smeele, S.A.A., Belkowski, S.M., Kessels, H.W.H.G. et al. 2002. Contributions of the T cell receptor-associated CD3gamma-ITAM to thymocyte selection. *J. Exp. Med.* **196**: 1-13.
- Hammond, S.R., English, D.R., et McLeod, J.G. 2000. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain* **123 (Pt 5)**: 968-974.
- Hamre, D., et Procknow, J.J. 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**: 190-193.
- Han, H.S., et Suk, K. 2005. The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. *Curr Neurovasc Res* **2**: 409-423.
- Hangartner, L., Zinkernagel, R.M., et Hangartner, H. 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 231-243.
- Harder, T.C., Kenter, M., Vos, H., Siebelink, K., Huisman, W., van Amerongen, G. et al. 1996. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* **77 (Pt 3)**: 397-405.
- Hargreaves, R.G., Borthwick, N.J., Gilardini Montani, M.S., Piccolella, E., Carmichael, P., Lechler, R.I. et al. 1997. Dissociation of T cell anergy from apoptosis by blockade of Fas/Apo-1 (CD95) signaling. *J. Immunol.* **158**: 3099-3107.

- Haring, J., et Perlman, S. 2001. Mouse hepatitis virus. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 462-466.
- Haring, J.S., Pewe, L.L., et Perlman, S. 2001. High-magnitude, virus-specific CD4 T-cell response in the central nervous system of coronavirus-infected mice. *J. Virol.* **75**: 3043-3047.
- Harris, D.P., Goodrich, S., Gerth, A.J., Peng, S.L., et Lund, F.E. 2005. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *J. Immunol.* **174**: 6781-6790.
- Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M. et al. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* **1**: 475-482.
- Hartung, H., Gonsette, R., König, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S.P. et al. 2002. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* **360**: 2018-2025.
- Hasoksuz, M., Alekseev, K., Vlasova, A., Zhang, X., Spiro, D., Halpin, R. et al. 2007. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. *J. Virol.* **81**: 4981-4990.
- Hawrylowicz, C.M., et O'Garra, A. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 271-283.
- Hayakawa, K., Asano, M., Shinton, S.A., Gui, M., Allman, D., Stewart, C.L. et al. 1999. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* **285**: 113-116.
- Hayashi, R.J., Loh, D.Y., Kanagawa, O., et Wang, F. 1998. Differences between responses of naive and activated T cells to anergy induction. *J. Immunol.* **160**: 33-38.
- Hayes, C.E. 2000. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc* **59**: 531-535.
- He, R., Dobie, F., Ballantine, M., Leeson, A., Li, Y., Bastien, N. et al. 2004. Analysis of multimerization of the SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 476-483.
- Head, J.R., et Griffin, W.S. 1985. Functional capacity of solid tissue transplants in the brain: evidence for immunological privilege. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **224**: 375-387.
- Heemskerk, M.H., Schoemaker, H.M., Spaan, W.J., et Boog, C.J. 1995. Predominance of MHC class II-restricted CD4+ cytotoxic T cells against mouse hepatitis virus A59. *Immunology* **84**: 521-527.

- Hemmila, E., Turbide, C., Olson, M., Jothy, S., Holmes, K.V., et Beauchemin, N. 2004. Ceacam1a^{-/-} mice are completely resistant to infection by murine coronavirus mouse hepatitis virus A59. *J. Virol.* **78**: 10156-10165.
- Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., et Rickinson, A. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 8479-8483.
- Henle, G., et Henle, W. 1970. Observations on childhood infections with the Epstein-Barr virus. *J. Infect. Dis.* **121**: 303-310.
- Henle, G., Henle, W., et Diehl, V. 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **59**: 94-101.
- Herman, A.E., Freeman, G.J., Mathis, D., et Benoist, C. 2004. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J. Exp. Med.* **199**: 1479-1489.
- Herndon, R.M., Price, D.L., et Weiner, L.P. 1977. Regeneration of oligodendroglia during recovery from demyelinating disease. *Science* **195**: 693-694.
- Hickey, W.F. 1991. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol.* **1**: 97-105.
- Hickey, W.F., et Kimura, H. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* **239**: 290-292.
- Hierholzer, J.C., Broderick, J.R., et Murphy, F.A. 1979. New strain of mouse hepatitis virus as the cause of lethal enteritis in infant mice. *Infect. Immun.* **24**: 508-522.
- Hirano, N., Fujiwara, K., Hino, S., et Matumoto, M. 1974. Replication and plaque formation of mouse hepatitis virus (MHV-2) in mouse cell line DBT culture. *Arch Gesamte Virusforsch* **44**: 298-302.
- Hirano, N., Murakami, T., Taguchi, F., Fujiwara, K., et Matumoto, M. 1981. Comparison of mouse hepatitis virus strains for pathogenicity in weanling mice infected by various routes. *Arch. Virol.* **70**: 69-73.
- Hivroz, C. 2005. [Everything you ever wanted to know about ZAP-70]. *Med Sci (Paris)* **21**: 150-155.
- Ho, M.K., et Springer, T.A. 1982. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **128**: 1221-1228.

- Hofmann, M.A., Chang, R.Y., Ku, S., et Brian, D.A. 1993. Leader-mRNA junction sequences are unique for each subgenomic mRNA species in the bovine coronavirus and remain so throughout persistent infection. *Virology* **196**: 163-171.
- Hohdatsu, T., Nakamura, M., Ishizuka, Y., Yamada, H., et Koyama, H. 1991. A study on the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline macrophages by monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* **120**: 207-217.
- Holmes, K.V.. 2001. Coronaviruses. *Dans Field's virology. Éditeur: Knipe, D.M., et Howley, P.M. Field's virology, Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 1187-1203.*
- Homberger, F.R. 1997. Enterotropic mouse hepatitis virus. *Lab. Anim.* **31**: 97-115.
- Horak, I., Lohler, J., Ma, A., et Smith, K.A. 1995. Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. *Immunol. Rev.* **148**: 35-44.
- Hori, S., Nomura, T., et Sakaguchi, S. 2003a. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.. *Science* **299**: 1057-1061.
- Hori, S., Nomura, T., et Sakaguchi, S. 2003b. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**: 1057-1061.
- Houtman, J.J., et Fleming, J.O. 1996a. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J. Neurovirol.* **2**: 361-376.
- Houtman, J.J., et Fleming, J.O. 1996b. Dissociation of demyelination and viral clearance in congenitally immunodeficient mice infected with murine coronavirus JHM. *J. Neurovirol.* **2**: 101-110.
- Hovanec, D.L., et Flanagan, T.D. 1983. Detection of antibodies to human coronaviruses 229E and OC43 in the sera of multiple sclerosis patients and normal subjects. *Infect. Immun.* **41**: 426-429.
- Hsu, D.H., de Waal Malefyt, R., Fiorentino, D.F., Dang, M.N., Vieira, P., de Vries, J. et al. 1990. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* **250**: 830-832.
- Hudson, C.B., et Beaudette, F.R. 1932. Infection of the cloaca with the virus of infectious bronchitis. *Science* **76**: 34.
- Hundt, M., Tabata, H., Jeon, M., Hayashi, K., Tanaka, Y., Krishna, R. et al. 2006. Impaired activation and localization of LAT in anergic T cells as a consequence of a selective palmitoylation defect. *Immunity* **24**: 513-522.
- Hutter, C.D., et Laing, P. 1996. Multiple sclerosis: sunlight, diet, immunology and aetiology. *Med. Hypotheses* **46**: 67-74.

- ICTV 2005. Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Ignatowicz, L., Kappler, J., et Marrack, P. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* **84**: 521-529.
- Ignatowicz, L., Rees, W., Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kushnir, E., Kappler, J. et al. 1997. T cells can be activated by peptides that are unrelated in sequence to their selecting peptide. *Immunity* **7**: 179-186.
- Iijima, H., Neurath, M.F., Nagaishi, T., Glickman, J.N., Nieuwenhuis, E.E., Nakajima, A. et al. 2004. Specific regulation of T helper cell 1-mediated murine colitis by CEACAM1. *J. Exp. Med.* **199**: 471-482.
- Innes, J.R.M. 1951. Experimental "allergic" encephalitis: attempts to produce the disease in sheep and goats. *J. Comp. Pathol.* **61**: 241-250.
- Ioannou, Y., et Isenberg, D.A. 2000. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum.* **43**: 1431-1442.
- Ireland, Derek D C and Stohlman, Stephen A and Hinton, David R and Atkinson, Roscoe and Bergmann, Cornelia C 2008. Type I interferons are essential in controlling neurotropic coronavirus infection irrespective of functional CD8 T cells. *J. Virol.* **82**: 300-310.
- Irving, B.A., Chan, A.C., et Weiss, A. 1993. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J. Exp. Med.* **177**: 1093-1103.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. et al. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* **162**: 5317-5326.
- Jacoby, R.O., Bhatt, P.N., et Jonas, A.M. 1975. Pathogenesis of sialodacryoadenitis in gnotobiotic rats. *Vet. Pathol.* **12**: 196-209.
- Jacomy, H., et Talbot, P.J. 2003. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* **315**: 20-33.
- Jenkins, M.K., Chen, C.A., Jung, G., Mueller, D.L., et Schwartz, R.H. 1990. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* **144**: 16-22.
- Jenkins, M.K., et Schwartz, R.H. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **165**: 302-319.

- Jenkins, M.K., Pardoll, D.M., Mizuguchi, J., Chused, T.M., et Schwartz, R.H. 1987. Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 5409-5413.
- Jiang, H., Zhang, S.I., et Pernis, B. 1992. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* **256**: 1213-1215.
- Jiang, J., Lau, L.L., et Shen, H. 2003. Selective depletion of nonspecific T cells during the early stage of immune responses to infection.. *J. Immunol.* **171**: 4352-4358.
- Johnson-Lussenburg, C.M., et Zheng, Q. 1987. Coronavirus and multiple sclerosis: results of a case/control longitudinal serological study. *Adv. Exp. Med. Biol.* **218**: 421-429.
- Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P. et al. 1995. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* **45**: 1268-1276.
- Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P. et al. 1998. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* **50**: 701-708.
- Johnson, R.T. 1994. The virology of demyelinating diseases. *Ann. Neurol.* **36 Suppl**: S54-60.
- Jonassen, C.M., Kofstad, T., Larsen, I., Løvland, A., Handeland, K., Follestad, A. et al. 2005. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Gen. Virol.* **86**: 1597-1607.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J., et Enk, A.H. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.* **196**: 255-260.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., et Enk, A.H. 2001. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* **22**: 394-400.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M. et al. 2007. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* **10**: 331-339.
- Kabat, E.A., Wolf, A., et Bezer, A.E. 1946a. Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Brain Tissue With Adjuvants. *Science* **104**: 362-363.

- Kabat, E.A., Wolf, A., et Bezer, A.E. 1946b. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *The Journal of Experimental Medicine* **85**: 117-130.
- Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B.B., Luo, J.S., et von Kleist, S. 1998. Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **28**: 3664-3674.
- Kappler, J.W., Roehm, N., et Murrack, P. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* **49**: 273-280.
- Karpus, W.J., Pope, J.G., Peterson, J.D., Dal Canto, M.C., et Miller, S.D. 1995. Inhibition of Theiler's virus-mediated demyelination by peripheral immune tolerance induction. *J. Immunol.* **155**: 947-957.
- Katz-Levy, Y., Neville, K.L., Padilla, J., Rahbe, S., Begolka, W.S., Girvin, A.M. et al. 2000. Temporal development of autoreactive Th1 responses and endogenous presentation of self myelin epitopes by central nervous system-resident APCs in Theiler's virus-infected mice. *J. Immunol.* **165**: 5304-5314.
- Kaufmann, S.H.E. 2008. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat. Immunol.* **9**: 705-712.
- Kearley, J., Barker, J.E., Robinson, D.S., et Lloyd, C.M. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J. Exp. Med.* **202**: 1539-1547.
- Keith, A.B., Arnon, R., Teitelbaum, D., Caspary, E.A., et Wisniewski, H.M. 1979. The effect of Cop 1, a synthetic polypeptide, on chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *J. Neurol. Sci.* **42**: 267-274.
- Kenyon, A.J. 1983. Delayed wound healing in mice associated with viral alteration of macrophages. *Am. J. Vet. Res.* **44**: 652-656.
- Kerdiles, Y.M., Sellin, C.I., Druelle, J., et Horvat, B. 2006. Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins. *Rev. Med. Virol.* **16**: 49-63.
- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S., et Ramsdell, F. 2003a. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4**: 337-342.
- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S., et Ramsdell, F. 2003b. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4**: 337-342.
- Kida, S., Weller, R.O., Zhang, E.T., Phillips, M.J., et Iannotti, F. 1995. Anatomical pathways for lymphatic drainage of the brain and their pathological significance. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **21**: 181-184.

- Kienzle, T.E., Abraham, S., Hogue, B.G., et Brian, D.A. 1990. Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin-esterase protein. *J. Virol.* **64**: 1834-1838.
- Kindler, V., Matthes, T., Jeannin, P., et Zubler, R.H. 1995. Interleukin-2 secretion by human B lymphocytes occurs as a late event and requires additional stimulation after CD40 cross-linking. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1239-1243.
- King, C. 2009. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat. Rev. Immunol.* **9**: 757-766.
- King, C.C., Jamieson, B.D., Reddy, K., Bali, N., Concepcion, R.J., et Ahmed, R. 1992. Viral infection of the thymus. *J. Virol.* **66**: 3155-3160.
- Kipar, A., Meli, M.L., Failing, K., Euler, T., Gomes-Keller, M.A., Schwartz, D. et al. 2006. Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **112**: 141-155.
- Kisielow, P., Blüthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M., et von Boehmer, H. 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* **333**: 742-746.
- Kita, H., Mackay, I.R., Van De Water, J., et Gershwin, M.E. 2001. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* **120**: 1485-1501.
- Klein, L., Khazaie, K., et von Boehmer, H. 2003. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 8886-8891.
- Klenerman, P., Hengartner, H., et Zinkernagel, R.M. 1997. A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature* **390**: 298-301.
- Knobler, R.L., Haspel, M.V., et Oldstone, M.B. 1981. Mouse hepatitis virus type 4 (JHM strains). induced fatal central nervous system disease. I. genetic control and murine neuron as the susceptible site of disease. *J. Exp. Med.* **153**: 832-843.
- Knobler, R.L., Lampert, P.W., et Oldstone, M.B. 1982. Virus persistence and recurring demyelination produced by a temperature-sensitive mutant of MHV-4. *Nature* **298**: 279-280.
- Knobler, R.L., Taylor, B.A., Wooddell, M.K., Beamer, W.G., et Oldstone, M.B. 1984a. Host genetic control of mouse hepatitis virus type-4 (JHM strain) replication. II. The gene locus for susceptibility is linked to the Svp-2 locus on mouse chromosome 7. *Exp. Clin. Immunogenet.* **1**: 217-222.
- Knobler, R.L., Tunison, L.A., et Oldstone, M.B. 1984b. Host genetic control of mouse hepatitis virus type 4 (JHM strain) replication. I. Restriction of virus amplification and spread in macrophages from resistant mice. *J. Gen. Virol.* **65 (Pt 9)**: 1543-1548.

- Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M., et Tobler, K. 2001. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* **23**: 137-144.
- Koh, D.R., Fung-Leung, W.P., Ho, A., Gray, D., Acha-Orbea, H., et Mak, T.W. 1992. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8⁻ mice. *Science* **256**: 1210-1213.
- Kollias, G., Douni, E., Kassiotis, G., et Kontoyiannis, D. 1999. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann. Rheum. Dis.* **58** **Suppl 1**: 132-9.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., et Takada, K. 1999. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* **73**: 9827-9831.
- Kornek, B., Storch, M.K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T. et al. 2000. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am. J. Pathol.* **157**: 267-276.
- Kraft, L. 1982. Viral diseases of the digestive system. *Dans* The mouse in biomedical research, vol. ii, diseases. *Éditeur*: Foster, H.L., Small, J.D., et Fox, J.G. The mouse in biomedical research, vol. ii, diseases, Academic Press, pp. 159-191.
- Kuespert, K., Pils, S., et Hauck, C.R. 2006. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 565-571.
- Kullberg, M.C., Hay, V., Cheever, A.W., Mamura, M., Sher, A., Letterio, J.J. et al. 2005. TGF- β 1 production by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *Eur. J. Immunol.* **35**: 2886-2895.
- Kumanishi, T. 1967. Brain tumors induced with Rous sarcoma virus, Schmidt-Ruppin strain. I. Induction of brain tumors in adult mice with Rous chicken sarcoma cells. *Jpn. J. Exp. Med.* **37**: 461-474.
- Kündig, T.M., Schorle, H., Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., et Horak, I. 1993. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* **262**: 1059-1061.
- Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., et Sakaguchi, S. 2000. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol.* **12**: 1145-1155.
- Kurtzke, J.F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 382-427.

- Kurtzke, J.F., Dean, G., et Botha, D.P. 1970. A method for estimating the age at immigration of white immigrants to South Africa, with an example of its importance. *S. Afr. Med. J.* **44**: 663-669.
- Kurtzke, J.F., Delasnerie-Lauprêtre, N., et Wallin, M.T. 1998. Multiple sclerosis in North African migrants to France. *Acta Neurol. Scand.* **98**: 302-309.
- Kutzelnigg, A., et Lassmann, H. 2005. Cortical lesions and brain atrophy in MS. *J. Neurol. Sci.* **233**: 55-59.
- Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C.F., Stadelmann, C., Brück, W., Rauschka, H., Bergmann, M. et al. 2005. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* **128**: 2705-2712.
- Kyuwa, S., Yamaguchi, K., Toyoda, Y., et Fujiwara, K. 1991. Induction of self-reactive T cells after murine coronavirus infection. *J. Virol.* **65**: 1789-1795.
- Laatsch, R.H., Kies, M.W., Gordon, S., et Alvord, E.C.J. 1962. The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J. Exp. Med.* **115**: 77-88.
- Lai, M.M., et Holmes, K.V. 2001. Coronaviridae: The Viruses and Their Replication. *Dans Field's virology. Éditeur: Knipe, D.M., et Howley, P.M. Field's virology, Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 1163-1185.*
- Laichalk, L.L., et Thorley-Lawson, D.A. 2005. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* **79**: 1296-1307.
- Lamontagne, L., et Jolicoeur, P. 1991. Mouse hepatitis virus 3-thymic cell interactions correlating with viral pathogenicity. *J. Immunol.* **146**: 3152-3159.
- Lamontagne, L., et Jolicoeur, P. 1994. Low-virulent mouse hepatitis viruses exhibiting various tropisms in macrophages, T and B cell subpopulations, and thymic stromal cells. *Lab. Anim. Sci.* **44**: 17-24.
- Lampert, P.W., Sims, J.K., et Kniazeff, A.J. 1973. Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies. *Acta Neuropathol.* **24**: 76-85.
- Lane, T.E., Asensio, V.C., Yu, N., Paoletti, A.D., Campbell, I.L., et Buchmeier, M.J. 1998. Dynamic regulation of alpha- and beta-chemokine expression in the central nervous system during mouse hepatitis virus-induced demyelinating disease. *J. Immunol.* **160**: 970-978.
- Lane, T.E., Fox, H.S., et Buchmeier, M.J. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase-2 reduces the severity of mouse hepatitis virus-induced demyelination: implications for NOS2/NO regulation of chemokine expression and inflammation. *J. Neurovirol.* **5**: 48-54.

- Lanoue, A., Bona, C., von Boehmer, H., et Sarukhan, A. 1997. Conditions that induce tolerance in mature CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **185**: 405-414.
- Lanza, I., Brown, I.H., et Paton, D.J. 1992. Pathogenicity of concurrent infection of pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus. *Res. Vet. Sci.* **53**: 309-314.
- Lapps, W., Hogue, B.G., et Brian, D.A. 1987. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* **157**: 47-57.
- Lardans, V., Godfraind, C., van der Logt, J.T., Heessen, W.A., Gonzalez, M.D., et Coutelier, J.P. 1996a. Polyclonal B lymphocyte activation induced by mouse hepatitis virus A59 infection. *J. Gen. Virol.* **77 (Pt 5)**: 1005-1009.
- Lardans, V., Godfraind, C., van der Logt, J.T., Heessen, W.A., Gonzalez, M.D., et Coutelier, J.P. 1996b. Polyclonal B lymphocyte activation induced by mouse hepatitis virus A59 infection. *J. Gen. Virol.* **77 (Pt 5)**: 1005-1009.
- Larsson-Sciard, E.L., Dethlefs, S., et Brahic, M. 1997. In vivo administration of interleukin-2 protects susceptible mice from Theiler's virus persistence. *J. Virol.* **71**: 797-799.
- Lassmann, H., Brück, W., et Lucchinetti, C.F. 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* **17**: 210-218.
- Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Li, K.S.M., Huang, Y., Tsoi, H., Wong, B.H.L. et al. 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 14040-14045.
- Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Li, K.S.M., Huang, Y., Wang, M., Lam, C.S.F. et al. 2007. Complete genome sequence of bat coronavirus HKU2 from Chinese horseshoe bats revealed a much smaller spike gene with a different evolutionary lineage from the rest of the genome. *Virology* **367**: 428-439.
- Lavi, E., Fishman, P.S., Highkin, M.K., et Weiss, S.R. 1988. Limbic encephalitis after inhalation of a murine coronavirus. *Lab. Invest.* **58**: 31-36.
- Lavi, E., Gilden, D.H., Highkin, M.K., et Weiss, S.R. 1984a. MHV-A59 pathogenesis in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* **173**: 237-245.
- Lavi, E., Gilden, D.H., Highkin, M.K., et Weiss, S.R. 1984b. Persistence of mouse hepatitis virus A59 RNA in a slow virus demyelinating infection in mice as detected by in situ hybridization. *J. Virol.* **51**: 563-566.
- Lavi, E., Gilden, D.H., Highkin, M.K., et 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., et Weiss, S.R. 1984c. Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus. *Neurology* **34**: 597-603.
- Lavi, E., Murray, E.M., Makino, S., Stohlman, S.A., Lai, M.M., et Weiss, S.R. 1990. Determinants of coronavirus MHV pathogenesis are localized to 3' portions of the genome as determined by ribonucleic acid-ribonucleic acid recombination. *Lab. Invest.* **62**: 570-578.
- Lavi, E., Suzumura, A., Hirayama, M., Highkin, M.K., Dambach, D.M., Silberberg, D.H. et al. 1987. Coronavirus mouse hepatitis virus (MHV)-A59 causes a persistent, productive infection in primary glial cell cultures. *Microb. Pathog.* **3**: 79-86.
- Lee, H.S.W., Ostrowski, M.A., et Gray-Owen, S.D. 2008. CEACAM1 dynamics during neisseria gonorrhoeae suppression of CD4+ T lymphocyte activation. *J. Immunol.* **180**: 6827-6835.
- Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G.M. et al. 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1986-1994.
- Leibowitz, U., Alter, M., et Halpern, L. 1964a. Clinical studies of multiple sclerosis in Israel. 3. Clinical course and prognosis related to age at onset. *Neurology* **14**: 926-932.
- Leibowitz, U., Halpern, L., et Alter, M. 1964b. Clinical studies of multiple sclerosis in Israel. I. A clinical analysis based on a country-wide survey. *Arch. Neurol.* **10**: 502-512.
- Lennon, V.A., Wilks, A.V., et Carnegie, P.R. 1970. Immunologic properties of the main encephalitogenic peptide from the basic protein of human myelin. *J. Immunol.* **105**: 1223-1230.
- Leparc-Goffart, I., Hingley, S.T., Chua, M.M., Jiang, X., Lavi, E., et Weiss, S.R. 1997. Altered pathogenesis of a mutant of the murine coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in the spike protein. *Virology* **239**: 1-10.
- Leray, D., Dupuy, C., et Dupuy, J.M. 1982. Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. IV. MHV3-induced immunodepression. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **23**: 539-547.
- Letourneur, F., et Klausner, R.D. 1992. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* **255**: 79-82.
- Levine, S., et Saltzman, A. 1986. Regional suppression, therapy after onset and prevention of relapses in experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone. *J. Neuroimmunol.* **13**: 175-181.

- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G. et al. 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* **375**: 685-688.
- Li, Q., Spriggs, M.K., Kovats, S., Turk, S.M., Comeau, M.R., Nepom, B. et al. 1997. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J. Virol.* **71**: 4657-4662.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H. et al. 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**: 676-679.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L. et al. 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.* **180**: 5916-5926.
- Lin, M.T., Hinton, D.R., Marten, N.W., Bergmann, C.C., et Stohlman, S.A. 1999. Antibody prevents virus reactivation within the central nervous system. *J. Immunol.* **162**: 7358-7368.
- Lin, M.T., Hinton, D.R., Parra, B., Stohlman, S.A., et van der Veen, R.C. 1998. The role of IL-10 in mouse hepatitis virus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Virology* **245**: 270-280.
- Lin, M.T., Stohlman, S.A., et Hinton, D.R. 1997. Mouse hepatitis virus is cleared from the central nervous systems of mice lacking perforin-mediated cytotoxicity. *J. Virol.* **71**: 383-391.
- Lindsley, M.D., Patick, A.K., Prayoonwiwat, N., et Rodriguez, M. 1992. Coexpression of class I major histocompatibility antigen and viral RNA in central nervous system of mice infected with Theiler's virus: a model for multiple sclerosis. *Mayo Clin. Proc.* **67**: 829-838.
- Linnington, C., et Lassmann, H. 1987. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J. Neuroimmunol.* **17**: 61-69.
- Lipton, H.L. 1975. Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. *Infect. Immun.* **11**: 1147-1155.
- Lipton, H.L., et Gilden, D.H. 1996. Viral diseases of the central nervous system: persistent infections. *Dans* *Viral pathogenesis. Éditeur: Nathanson, N. Viral pathogenesis, Lippincott-Raven*, pp. 853-867.
- Lipton, H.L., Liang, Z., Hertzler, S., et Son, K. 2007. A specific viral cause of multiple sclerosis: one virus, one disease. *Ann. Neurol.* **61**: 514-523.

- Lipton, M.M., et Freund, J. 1952. Encephalomyelitis in the rat following intracutaneous injection of central nervous system tissue with adjuvant. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **81**: 260-261.
- Liu, W.S., et Heckman, C.A. 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell. Signal.* **10**: 529-542.
- Lo, D., Feng, L., Li, L., Carson, M.J., Crowley, M., Pauza, M. et al. 1999. Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunol. Rev.* **169**: 225-239.
- Lohmann, T., Leslie, R.D., et Londei, M. 1996. T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J. Autoimmun.* **9**: 385-389.
- Lovett-Racke, A.E., Trotter, J.L., Lauber, J., Perrin, P.J., June, C.H., et Racke, M.K. 1998. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *J. Clin. Invest.* **101**: 725-730.
- Lublin, F.D., Lavasa, M., Viti, C., et Knobler, R.L. 1987. Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **45**: 122-128.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., et Lassmann, H. 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* **47**: 707-717.
- Lumsden, C.E. 1949. Experimental allergic encephalomyelitis. *Brain* **72**: 198-226.
- Lyakh, L., Ghosh, P., et Rice, N.R. 1997. Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2475-2484.
- Mackay, I.R. 2000. Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. *Bmj* **321**: 93-96.
- MacNamara, K.C., Chua, M.M., Nelson, P.T., Shen, H., et Weiss, S.R. 2005. Increased epitope-specific CD8+ T cells prevent murine coronavirus spread to the spinal cord and subsequent demyelination. *J. Virol.* **79**: 3370-3381.
- Magram, J., Connaughton, S.E., Warrier, R.R., Carvajal, D.M., Wu, C.Y., Ferrante, J. et al. 1996. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* **4**: 471-481.
- Mahnke, K., Bedke, T., et Enk, A.H. 2007. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell. Immunol.* **250**: 1-13.

- Mallucci, L. 1965. Observations on the growth of mouse hepatitis virus (MHV-3) in mouse macrophages. *Virology* **25**: 30-37.
- Maloy, K.J., Burkhart, C., Junt, T.M., Odermatt, B., Oxenius, A., Piali, L. et al. 2000. CD4(+) T cell subsets during virus infection. Protective capacity depends on effector cytokine secretion and on migratory capability. *J. Exp. Med.* **191**: 2159-2170.
- Maloy, K.J., et Powrie, F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* **2**: 816-822.
- Manchester, M., Smith, K.A., Eto, D.S., Perkin, H.B., et Torbett, B.E. 2002. Targeting and hematopoietic suppression of human CD34+ cells by measles virus. *J. Virol.* **76**: 6636-6642.
- Marelli-Berg, F.M., et Lechler, R.I. 1999. Antigen presentation by parenchymal cells: a route to peripheral tolerance?. *Immunol. Rev.* **172**: 297-314.
- Margolis, F.J., Wilson, J.L., et Top, F.H. 1943. Postrubella encephalomyelitis. *J. Pediatr.* **23**: 158-165.
- Marie, J.C., Kehren, J., Trescol-Biémont, M.C., Evlashev, A., Valentin, H., Walzer, T. et al. 2001. Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses. *Immunity* **14**: 69-79.
- Marie, J.C., Saltel, F., Escola, J., Jurdic, P., Wild, T.F., et Horvat, B. 2004. Cell surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression. *J. Virol.* **78**: 11952-11961.
- Marra, M.A., Jones, S.J., Astell, C.R., Holt, R.A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y.S. et al. 2003a. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**: 1399-1404.
- Marra, M.A., Jones, S.J.M., Astell, C.R., Holt, R.A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y.S. et al. 2003b. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**: 1399-1404.
- Marrie, R.A., Wolfson, C., Sturkenboom, M.C., Gout, O., Heinzlef, O., Rouillet, E. et al. 2000. Multiple sclerosis and antecedent infections: a case-control study. *Neurology* **54**: 2307-2310.
- Marten, N.W., Stohlman, S.A., Atkinson, R.D., Hinton, D.R., Fleming, J.O., et Bergmann, C.C. 2000a. Contributions of CD8+ T cells and viral spread to demyelinating disease. *J. Immunol.* **164**: 4080-4088.
- Marten, N.W., Stohlman, S.A., et Bergmann, C.C. 2000b. Role of viral persistence in retaining CD8(+) T cells within the central nervous system. *J. Virol.* **74**: 7903-7910.

- Marten, N.W., Stohlman, S.A., et Bergmann, C.C. 2001. MHV infection of the CNS: mechanisms of immune-mediated control. *Viral Immunol.* **14**: 1-18.
- Massa, P.T., Dörries, R., et ter Meulen, V. 1986. Viral particles induce Ia antigen expression on astrocytes. *Nature* **320**: 543-546.
- Matloubian, M., Kolhekar, S.R., Somasundaram, T., et Ahmed, R. 1993. Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **67**: 7340-7349.
- Matsumoto, Y., et Fujiwara, M. 1987. Absence of donor-type major histocompatibility complex class I antigen-bearing microglia in the rat central nervous system of radiation bone marrow chimeras. *J. Neuroimmunol.* **17**: 71-82.
- Matthews, A.E., Lavi, E., Weiss, S.R., et Paterson, Y. 2002a. Neither B cells nor T cells are required for CNS demyelination in mice persistently infected with MHV-A59. *J. Neurovirol.* **8**: 257-264.
- Matthews, A.E., Weiss, S.R., et Paterson, Y. 2002b. Murine hepatitis virus--a model for virus-induced CNS demyelination. *J. Neurovirol.* **8**: 76-85.
- Mattia, E., Ceridono, M., Chichiarelli, S., et D'Erme, M. 1999. Interactions of Epstein-Barr virus origins of replication with nuclear matrix in the latent and in the lytic phases of viral infection. *Virology* **262**: 9-17.
- Mauch, E., Kornhuber, H.H., Krapf, H., Fetzer, U., et Laufen, H. 1992. Treatment of multiple sclerosis with mitoxantrone. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **242**: 96-102.
- McAlpine, D., et Compston, N. 1952. Some aspects of the natural history of disseminated sclerosis. *Q. J. Med.* **21**: 135-167.
- McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M. et al. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**: 311-323.
- McIntosh, K., Becker, W.B., et Chanock, R.M. 1967a. Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **58**: 2268-2273.
- McIntosh, K., Chao, R.K., Krause, H.E., Wasil, R., Mocega, H.E., et Mufson, M.A. 1974. Coronavirus infection in acute lower respiratory tract disease of infants. *J. Infect. Dis.* **130**: 502-507.
- McIntosh, K., Dees, J.H., Becker, W.B., Kapikian, A.Z., et Chanock, R.M. 1967b. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **57**: 933-940.

- McNally, J.M., Zarozinski, C.C., Lin, M.Y., Brehm, M.A., Chen, H.D., et Welsh, R.M. 2001. Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses.. *J. Virol.* **75**: 5965-5976.
- McNeill, A., Spittle, E., et Backstrom, B.T. 2007. Partial depletion of CD69(Low)-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. *Scandinavian Journal of Immunology* **65**: 63-69.
- Mechnikov, I.. On the Present State of the Question of Immunity in Infectious Diseases. [En ligne] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikov-lecture.html. (Page consultée le 2 juillet 2008).
- Medawar, P.W. 1948. Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* **29**: 58-69.
- Medzhitov, R., et Janeway, C.A.J. 1998. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin. Immunol.* **10**: 351-353.
- Melchior, B., Puntambekar, S., et Carson, M. 2006. Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochemistry International* **49**: 145-153.
- Mellor, A.L., et Munn, D.H. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 762-774.
- Mempel, T.R., Pittet, M.J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H. et al. 2006. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* **25**: 129-141.
- Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., et Ben-Nun, A. 1995. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1951-1959.
- Mihindukulasuriya, K.A., Wu, G., St Leger, J., Nordhausen, R.W., et Wang, D. 2008. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J. Virol.* **82**: 5084-5088.
- Millefiorini, E., Gasperini, C., Pozzilli, C., D'Andrea, F., Bastianello, S., Trojano, M. et al. 1997. Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome. *J. Neurol.* **244**: 153-159.
- Miller, A., Spada, V., Beerkircher, D., et Kreitman, R.R. 2008. Long-term (up to 22 years), open-label, compassionate-use study of glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **14**: 494-499.

- Miller, D.J., Bright, J.J., Sriram, S., et Rodriguez, M. 1997a. Successful treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with a monoclonal natural autoantibody. *J. Neuroimmunol.* **75**: 204-209.
- Miller, D.J., Sanborn, K.S., Katzmann, J.A., et Rodriguez, M. 1994. Monoclonal autoantibodies promote central nervous system repair in an animal model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **14**: 6230-6238.
- Miller, S.D., Vanderlugt, C.L., Begolka, W.S., Pao, W., Yauch, R.L., Neville, K.L. et al. 1997b. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* **3**: 1133-1136.
- Mills, K.H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 841-855.
- Minghetti, L., Polazzi, E., Nicolini, A., Greco, A., et Levi, G. 1999. Possible role of microglial prostanoids and free radicals in neuroprotection and neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* **468**: 109-119.
- Miyara, M., et Sakaguchi, S. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in Molecular Medicine* **13**: 108-116.
- Mo, H., Zeng, G., Ren, X., Li, H., Ke, C., Tan, Y. et al. 2006. Longitudinal profile of antibodies against SARS-coronavirus in SARS patients and their clinical significance. *Respirology* **11**: 49-53.
- Moller, M.J., Kammerer, R., Grunert, F., et von Kleist, S. 1996. Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. *Int. J. Cancer* **65**: 740-745.
- Morales, V.M., Christ, A., Watt, S.M., Kim, H.S., Johnson, K.W., Utku, N. et al. 1999. Regulation of human intestinal intraepithelial lymphocyte cytolytic function by biliary glycoprotein (CD66a). *J. Immunol.* **163**: 1363-1370.
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C., et Moretta, A. 2001. Immunobiology of human NK cells. *Transplant. Proc.* **33**: 60-61.
- Morgan, I.M. 1947. Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey nervous tissue. *J. Exp. Med.* **85**: 131-140.
- Morgan, M.E., van Bilsen, J.H.M., Bakker, A.M., Heemskerk, B., Schilham, M.W., Hartgers, F.C. et al. 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* **66**: 13-20.
- Mori, I., Nishiyama, Y., Yokochi, T., et Kimura, Y. 2005. Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J. Neurovirol.* **11**: 129-137.

- Morris-Downes, M.M., McCormack, K., Baker, D., Sivaprasad, D., Natkunarajah, J., et Amor, S. 2002. Encephalitogenic and immunogenic potential of myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte-specific glycoprotein (OSP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in ABH and SJL mice. *J. Neuroimmunol.* **122**: 20-33.
- Morrison, L.R. 1947. Disseminated encephalomyelitis experimentally produced by the use of homologous antigen. *Arch Neurol Psychiat* **58**: 391-416.
- Moss, W.J., Ryon, J.J., Monze, M., et Griffin, D.E. 2002. Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. *J. Infect. Dis.* **186**: 879-887.
- Muenzner, P., Rohde, M., Kneitz, S., et Hauck, C.R. 2005. CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **170**: 825-836.
- Muller, R. 1951. Course and prognosis of disseminated sclerosis in relation to age of onset. *AMA Arch Neurol Psychiatry* **66**: 561-570.
- Murphy, F.A.. 2002. Historical Roots. *Dans Viral pathogenesis and immunity. Éditeur: Nathanson, N. Viral pathogenesis and immunity, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 3-11.*
- Murray, R.S., Brown, B., Brian, D., et Cabirac, G.F. 1992a. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* **31**: 525-533.
- Murray, R.S., Cai, G.Y., Hoel, K., Zhang, J.Y., Soike, K.F., et Cabirac, G.F. 1992b. Coronavirus infects and causes demyelination in primate central nervous system. *Virology* **188**: 274-284.
- Murray, R.S., Cai, G.Y., Soike, K.F., et Cabirac, G.F. 1997. Further observations on coronavirus infection of primate CNS. *J. Neurovirol.* **3**: 71-75.
- Murray, T.J. 2005. *Multiple Sclerosis: The History of a Disease.* Demos Medical Publishing, New York.
- Mustelin, T. 1994. T cell antigen receptor signaling: three families of tyrosine kinases and a phosphatase. *Immunity* **1**: 351-356.
- Mustelin, T., et Taskén, K. 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem. J.* **371**: 15-27.
- Myint, S.H. 1994. Human Coronaviruses: A Brief Review. *Reviews in Medical Virology* **4**: 35-46.

- Nabeshima, S., Murata, M., Kikuchi, K., Ikematsu, H., Kashiwagi, S., et Hayashi, J. 2002. A reduction in the number of peripheral CD28+CD8+T cells in the acute phase of influenza. *Clin. Exp. Immunol.* **128**: 339-346.
- Nagaishi, T., Pao, L., Lin, S., Iijima, H., Kaser, A., Qiao, S. et al. 2006. SHP1 phosphatase-dependent T cell inhibition by CEACAM1 adhesion molecule isoforms. *Immunity* **25**: 769-781.
- Nakajima, A., Iijima, H., Neurath, M.F., Nagaishi, T., Nieuwenhuis, E.E., Raychowdhury, R. et al. 2002. Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. *J. Immunol.* **168**: 1028-1035.
- Nakamura, K., Kitani, A., et Strober, W. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **194**: 629-644.
- Nash, T.C., et Buchmeier, M.J. 1996. Spike glycoprotein-mediated fusion in biliary glycoprotein-independent cell-associated spread of mouse hepatitis virus infection. *Virology* **223**: 68-78.
- Nathanson, N., et Martin, J.R. 1979. The epidemiology of poliomyelitis: enigmas surrounding its appearance, epidemicity, and disappearance. *Am. J. Epidemiol.* **110**: 672-692.
- Nathanson, N., et Miller, A. 1978. Epidemiology of multiple sclerosis: critique of the evidence for a viral etiology. *Am. J. Epidemiol.* **107**: 451-461.
- National Research Council, C.O.I.D.O.M.A.R. 1991. *Infectious Diseases of Mice and Rats.* Academic Press.
- Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S. et al. 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* **376**: 435-438.
- Nemazee, D.A., et Bürki, K. 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* **337**: 562-566.
- Neumann, H. 2001. Control of glial immune function by neurons. *Glia* **36**: 191-199.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D.H., et Young, L.S. 1997. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J. Pathol.* **182**: 151-159.
- Niller, H.H., Wolf, H., et Minarovits, J. 2008. Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity* **41**: 298-328.

- Njenga, M.K., Marques, C., et Rodriguez, M. 2004. The role of cellular immune response in Theiler's virus-induced central nervous system demyelination. *J. Neuroimmunol.* **147**: 73-77.
- Nocentini, G., Giunchi, L., Ronchetti, S., Krausz, L.T., Bartoli, A., Moraca, R. et al. 1997. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 6216-6221.
- Noseworthy, J.H., Hopkins, M.B., Vandervoort, M.K., Karlik, S.J., Lee, D.H., Penman, M. et al. 1993. An open-trial evaluation of mitoxantrone in the treatment of progressive MS. *Neurology* **43**: 1401-1406.
- Nossal, G.J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* **76**: 229-239.
- Nossal, G.J., et Pike, B.L. 1980. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 1602-1606.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L. et al. 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* **29**: 138-149.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D. et al. 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* **325**: 1001-1005.
- Nuttall, P.A., et Harrap, K.A. 1982. Isolation of a coronavirus during studies on puffinosis, a disease of the Manx shearwater (*Puffinus puffinus*). *Arch. Virol.* **73**: 1-13.
- O'Garra, A., et Vieira, P. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 425-428.
- O'Shea, J.J., Ma, A., et Lipsky, P. 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 37-45.
- Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, C.S., Krammer, P.H., et Suri-Payer, E. 2007. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J. Immunol.* **179**: 3578-3587.
- Odin, P., Asplund, M., Busch, C., et Obrink, B. 1988. Immunohistochemical localization of cellCAM 105 in rat tissues: appearance in epithelia, platelets, and granulocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **36**: 729-739.
- Offner, H., Subramanian, S., Parker, S., Wang, C., Afentoulis, M., Lewis, A. et al. 2006. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *Journal of Immunology* **176**: 6523-6531.

- Ohara, Y., Stein, S., Fu, J.L., Stillman, L., Klamon, L., et Roos, R.P. 1988. Molecular cloning and sequence determination of DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis viruses. *Virology* **164**: 245-255.
- Ohnishi, E., Iwata, T., Inouye, S., Kurata, T., et Sairenji, T. 1997. Interleukin-4 production in Epstein-Barr virus-transformed B cell lines from peripheral mononuclear cells of patients with atopic dermatitis. *J. Interferon Cytokine Res.* **17**: 597-602.
- Ohtsuka, N., et Taguchi, F. 1997. Mouse susceptibility to mouse hepatitis virus infection is linked to viral receptor genotype. *J. Virol.* **71**: 8860-8863.
- Ohtsuka, N., Yamada, Y.K., et Taguchi, F. 1996. Difference in virus-binding activity of two distinct receptor proteins for mouse hepatitis virus. *J. Gen. Virol.* **77 (Pt 8)**: 1683-1692.
- Ohtsuki, S. 2004. New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 1489-1496.
- Okada, H., Sato, T.A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T. et al. 2001. Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch. Virol.* **146**: 859-874.
- Oldstone, M.B. 1989. Viral persistence. *Cell* **56**: 517-520.
- Oldstone, M.B.A. 2006. Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions.. *Virology* **344**: 111-118.
- Oleszak, E.L., Chang, J.R., Friedman, H., Katsetos, C.D., et Platsoucas, C.D. 2004. Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 174-207.
- Olitsky, P.K., et Yager, R.H. 1949. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J. Exp. Med.* **90**: 213-224.
- Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., et Mathieu, C. 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* **11**: 305-312.
- Owens, T., Wekerle, H., et Antel, J. 2001. Genetic models for CNS inflammation. *Nat. Med.* **7**: 161-166.
- Ozden, S., Tangy, F., Chamorro, M., et Brahic, M. 1986. Theiler's virus genome is closely related to that of encephalomyocarditis virus, the prototype cardiovirus. *J. Virol.* **60**: 1163-1165.
- Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kraj, P., et Ignatowicz, L. 2006. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity* **25**: 249-259.

- Pacholczyk, R., Kern, J., Singh, N., Iwashima, M., Kraj, P., et Ignatowicz, L. 2007. Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3⁺ regulatory T cells.. *Immunity* **27**: 493-504.
- Pagenstecher, A., Lassmann, S., Carson, M.J., Kincaid, C.L., Stalder, A.K., et Campbell, I.L. 2000. Astrocyte-targeted expression of IL-12 induces active cellular immune responses in the central nervous system and modulates experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **164**: 4481-4492.
- Palacios, E.H., et Weiss, A. 2007. Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *J. Exp. Med.* **204**: 1703-1715.
- Palma, J.P., Yauch, R.L., Lang, S., et Kim, B.S. 1999. Potential role of CD4⁺ T cell-mediated apoptosis of activated astrocytes in Theiler's virus-induced demyelination. *J. Immunol.* **162**: 6543-6551.
- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A. et al. 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* **125**: 775-784.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., et Lenardo, M.J. 2007. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells.. *Nat. Immunol.* **8**: 1353-1362.
- Panelius, M. 1969. Studies on epidemiological, clinical and etiological aspects of multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand. Suppl* **39**: 1-82.
- Panitch, H.S. 1994. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **36 Suppl**: S25-8.
- Pape, K.A., Merica, R., Mondino, A., Khoruts, A., et Jenkins, M.K. 1998. Direct evidence that functionally impaired CD4⁺ T cells persist in vivo following induction of peripheral tolerance. *J. Immunol.* **160**: 4719-4729.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y. et al. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.. *Nat. Immunol.* **6**: 1133-1141.
- Parker, D.C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 331-360.
- Parker, J.C., Cross, S.S., et Rowe, W.P. 1970. Rat coronavirus (RCV): a prevalent, naturally occurring pneumotropic virus of rats. *Arch Gesamte Virusforsch* **31**: 293-302.
- Parra, B., Hinton, D.R., Marten, N.W., Bergmann, C.C., Lin, M.T., Yang, C.S. et al. 1999. IFN-gamma is required for viral clearance from central nervous system oligodendroglia. *J. Immunol.* **162**: 1641-1647.

- Pasick, J.M., et Dales, S. 1991. Infection by coronavirus JHM of rat neurons and oligodendrocyte-type-2 astrocyte lineage cells during distinct developmental stages. *J. Virol.* **65**: 5013-5028.
- Paterson, P.Y. 1960. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J. Exp. Med.* **111**: 119-136.
- Paul, W.E. 2008. *Fundamental immunology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Pavelko, K.D., van Engelen, B.G., et Rodriguez, M. 1998. Acceleration in the rate of CNS remyelination in lysolecithin-induced demyelination.. *J. Neurosci.* **18**: 2498-2505.
- Peacock, C.D., Kim, S., et Welsh, R.M. 2003. Attrition of virus-specific memory CD8+ T cells during reconstitution of lymphopenic environments.. *J. Immunol.* **171**: 655-663.
- Pearson, J., et Mims, C.A. 1985. Differential susceptibility of cultured neural cells to the human coronavirus OC43. *J. Virol.* **53**: 1016-1019.
- Pedersen, N.C. 1976. Morphologic and physical characteristics of feline infectious peritonitis virus and its growth in autochthonous peritoneal cell cultures. *Am. J. Vet. Res.* **37**: 567-572.
- Pedersen, N.C., Boyle, J.F., Floyd, K., Fudge, A., et Barker, J. 1981. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.* **42**: 368-377.
- Pedersen, N.C., Ward, J., et Mengeling, W.L. 1978. Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species. *Arch. Virol.* **58**: 45-53.
- Peiris, J.S.M., Lai, S.T., Poon, L.L.M., Guan, Y., Yam, L.Y.C., Lim, W. et al. 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**: 1319-1325.
- Pellerin, L., et Magistretti, P.J. 2004. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* **10**: 53-62.
- Peng, S.L., Szabo, S.J., et Glimcher, L.H. 2002. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 5545-5550.
- Pensaert, M., Callebaut, P., et Vergote, J. 1986. Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet Q* **8**: 257-261.
- Pensaert, M.B., et de Bouck, P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* **58**: 243-247.
- Perez, V.L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X.X., Strom, T.B., et Abbas, A.K. 1997. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* **6**: 411-417.

- Perlman, S. 1998. Pathogenesis of coronavirus-induced infections. Review of pathological and immunological aspects. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**: 503-513.
- Perlman, S., et Dandekar, A.A. 2005. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 917-927.
- Perlman, S., et Ries, D. 1987. The astrocyte is a target cell in mice persistently infected with mouse hepatitis virus, strain JHM. *Microb. Pathog.* **3**: 309-314.
- Permar, S.R., Moss, W.J., Ryon, J.J., Douek, D.C., Monze, M., et Griffin, D.E. 2003. Increased thymic output during acute measles virus infection. *J. Virol.* **77**: 7872-7879.
- Perry, V.H. 1998. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J. Neuroimmunol.* **90**: 113-121.
- Peterson, E.H., et Hymass, T.A. 1951. Antibiotic in treatment of unfamiliar turkey disease. *Poult. Sci.* **30**: 466-468.
- Pette, M., Fujita, K., Wilkinson, D., Altmann, D.M., Trowsdale, J., Giegerich, G. et al. 1990. Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 7968-7972.
- Pettinelli, C.B., Fritz, R.B., Chou, C.H., et McFarlin, D.E. 1982. Encephalitogenic activity of guinea pig myelin basic protein in the SJL mouse. *J. Immunol.* **129**: 1209-1211.
- Pétursson, G., Nathanson, N., Georgsson, G., Panitch, H., et Pálsson, P.A. 1976. Pathogenesis of visna. I. Sequential virologic, serologic, and pathologic studies. *Lab. Invest.* **35**: 402-412.
- Pevear, D.C., Calenoff, M., Rozhon, E., et Lipton, H.L. 1987. Analysis of the complete nucleotide sequence of the picornavirus Theiler's murine encephalomyelitis virus indicates that it is closely related to cardioviruses. *J. Virol.* **61**: 1507-1516.
- Pewe, L., Heard, S.B., Bergmann, C., Dailey, M.O., et Perlman, S. 1999. Selection of CTL escape mutants in mice infected with a neurotropic coronavirus: quantitative estimate of TCR diversity in the infected central nervous system. *J. Immunol.* **163**: 6106-6113.
- Pflanz, S., Timans, J.C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J. et al. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* **16**: 779-790.
- Phillips, J.J., Chua, M.M., Lavi, E., et 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.
- Piazza, M. 1969. *Experimental Viral Hepatitis*. Charles C. Thomas.

- Piccirillo, C.A., et Shevach, E.M. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* **167**: 1137-1140.
- Pillai, V., Ortega, S.B., Wang, C.K., et Karandikar, N.J. 2007. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin. Immunol.* **123**: 18-29.
- Planz, O., Seiler, P., Hengartner, H., et Zinkernagel, R.M. 1996. Specific cytotoxic T cells eliminate B cells producing virus-neutralizing antibodies [corrected]. *Nature* **382**: 726-729.
- Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H. et al. 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**: 899-910.
- Porakishvili, N., Mageed, R., Jamin, C., Pers, J.O., Kulikova, N., Renaudineau, Y. et al. 2001. Recent progress in the understanding of B-cell functions in autoimmunity. *Scand. J. Immunol.* **54**: 30-38.
- Poser, S., Raun, N.E., et Poser, W. 1982. Age at onset, initial symptomatology and the course of multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **66**: 355-362.
- Poutanen, S.M., Low, D.E., Henry, B., Finkelstein, S., Rose, D., Green, K. et al. 2003. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1995-2005.
- Prineas, J.W., Kwon, E.E., Cho, E.S., Sharer, L.R., Barnett, M.H., Oleszak, E.L. et al. 2001. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **50**: 646-657.
- Protein Lounge. T-cell receptor signaling. [En ligne] www.proteinlounge.com. (Page consultée le 27 février 2007).
- Qiao, M., Thornton, A.M., et Shevach, E.M. 2007. CD4+ CD25+ [corrected] regulatory T cells render naive CD4+ CD25- T cells anergic and suppressive. *Immunology* **120**: 447-455.
- Quill, H., et Schwartz, R.H. 1987. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J. Immunol.* **138**: 3704-3712.
- Racaniello, V.R.. 2001. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. *Dans Field's virology. Éditeur: Knipe, D.M., et Howley, P.M. Field's virology, Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 529-566.*
- Ramsdell, F., Lantz, T., et Fowlkes, B.J. 1989. A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* **246**: 1038-1041.

- Ransohoff, R.M. 2006. A mighty mouse: building a better model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **116**: 2313-2316.
- Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., et Kidd, G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 569-581.
- Ranzenhofer, E.R., Lipton, M.M., et Steigman, A.J. 1958. Effect of homologous spinal cord in Freund's adjuvant on cockerel comb, testicular and body growth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **99**: 280-282.
- Ravel, K., Castelle, C., Defrance, T., Wild, T.F., Charron, D., Lotteau, V. et al. 1997. Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J. Exp. Med.* **186**: 269-278.
- Razvi, E.S., Jiang, Z., Woda, B.A., et Welsh, R.M. 1995. Lymphocyte apoptosis during the silencing of the immune response to acute viral infections in normal, lpr, and Bcl-2-transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **147**: 79-91.
- Read, S., Malmström, V., et Powrie, F. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **192**: 295-302.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., et Abbas, A.K. 1999. Genetic models of abnormal apoptosis in lymphocytes. *Immunol. Rev.* **169**: 273-282.
- Reinke, E., et Fabry, Z. 2006. Breaking or making immunological privilege in the central nervous system: The regulation of immunity by neuropeptides. *Immunology Letters* **104**: 102-109.
- Rempel, J.D., Murray, S.J., Meisner, J., et Buchmeier, M.J. 2004. Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis. *Virology* **318**: 381-392.
- Resta, S., Luby, J.P., Rosenfeld, C.R., et Siegel, J.D. 1985. Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science* **229**: 978-981.
- Revesz, T., Kidd, D., Thompson, A.J., Barnard, R.O., et McDonald, W.I. 1994. A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* **117 (Pt 4)**: 759-765.
- Ridge, S.C., Sloboda, A.E., McReynolds, R.A., Levine, S., Oronsky, A.L., et Kerwar, S.S. 1985. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **35**: 35-42.
- Rioux, J.D., et Abbas, A.K. 2005. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature* **435**: 584-589.
- Riski, H., et Hovi, T. 1980. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold. *J. Med. Virol.* **6**: 259-265.

- Riski, H., Hovi, T., et Frick, M.H. 1980. Carditis associated with coronavirus infection. *Lancet* **2**: 100-101.
- Ritter, M.R., Banin, E., Moreno, S.K., Aguilar, E., Dorrell, M.I., et Friedlander, M. 2006. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J. Clin. Invest.* **116**: 3266-3276.
- Rivers, T.M., et Schwentker, F.F. 1935. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *The Journal of Experimental Medicine* **61**: 689-702.
- Rivers, T.M., Sprunt, D.H., et Berry, G.P. 1933. Observations on attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J. Exp. Med* **58**: 39-53.
- Robb, R.J., Munck, A., et Smith, K.A. 1981. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *J. Exp. Med.* **154**: 1455-1474.
- Roberts, J.L., Sharrow, S.O., et Singer, A. 1990. Clonal deletion and clonal anergy in the thymus induced by cellular elements with different radiation sensitivities. *J. Exp. Med.* **171**: 935-940.
- Rocha, B., Grandien, A., et Freitas, A.A. 1995. Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **181**: 993-1003.
- Rocha, B., Tanchot, C., et Von Boehmer, H. 1993. Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen. *J. Exp. Med.* **177**: 1517-1521.
- Rock, D.L., et Fraser, N.W. 1983. Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nature* **302**: 523-525.
- Rodriguez, M. 1991. Immunoglobulins stimulate central nervous system remyelination: electron microscopic and morphometric analysis of proliferating cells. *Lab. Invest.* **64**: 358-370.
- Rodriguez, M., et Lindsley, M.D. 1992. Immunosuppression promotes CNS remyelination in chronic virus-induced demyelinating disease. *Neurology* **42**: 348-357.
- Rodriguez, M., Leibowitz, J.L., et Lampert, P.W. 1983. Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus-induced encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* **13**: 426-433.
- Roncador, G., Brown, P.J., Maestre, L., Hue, S., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Ling, K. et al. 2005. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur. J. Immunol.* **35**: 1681-1691.
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., et Levings, M.K. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* **182**: 68-79.

- Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P. et al. 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome.. *Science* **300**: 1394-1399.
- Roth-Cross, J.K., Martínez-Sobrido, L., Scott, E.P., García-Sastre, A., et Weiss, S.R. 2007. Inhibition of the alpha/beta interferon response by mouse hepatitis virus at multiple levels.. *J. Virol.* **81**: 7189-7199.
- Rowe, C.L., Baker, S.C., Nathan, M.J., et Fleming, J.O. 1997. Evolution of mouse hepatitis virus: detection and characterization of spike deletion variants during persistent infection. *J. Virol.* **71**: 2959-2969.
- Rudick, R.A., Stuart, W.H., Calabresi, P.A., Confavreux, C., Galetta, S.L., Radue, E. et al. 2006. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**: 911-923.
- Runmarker, B., et Andersen, O. 1995. Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis. *Brain* **118 (Pt 1)**: 253-261.
- Ryon, J.J., Moss, W.J., Monze, M., et Griffin, D.E. 2002. Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 994-1003.
- Sadlack, B., Löhler, J., Schorle, H., Klebb, G., Haber, H., Sickel, E. et al. 1995. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells.. *Eur. J. Immunol.* **25**: 3053-3059.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C., et Horak, I. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene.. *Cell* **75**: 253-261.
- Saha, K., Yuen, P.H., et Wong, P.K. 1994. Murine retrovirus-induced depletion of T cells is mediated through activation-induced death by apoptosis. *J. Virol.* **68**: 2735-2740.
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **22**: 531-562.
- Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.. *Nat. Immunol.* **6**: 345-352.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., et Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**: 1151-1164.
- Sakaguchi, S., Wing, K., et Miyara, M. 2007. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* **37 Suppl 1**: S116-23.

- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., et Ono, M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**: 775-787.
- Salmi, A., Ziola, B., Hovi, T., et Reunanen, M. 1982. Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* **32**: 292-295.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A. et al. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**: 431-440.
- Sangster, M.Y., Topham, D.J., D'Costa, S., Cardin, R.D., Marion, T.N., Myers, L.K. et al. 2000. Analysis of the virus-specific and nonspecific B cell response to a persistent B-lymphotropic gammaherpesvirus. *J. Immunol.* **164**: 1820-1828.
- Sarma, J.D., Fu, L., Hingley, S.T., et Lavi, E. 2001. Mouse hepatitis virus type-2 infection in mice: an experimental model system of acute meningitis and hepatitis. *Exp. Mol. Pathol.* **71**: 1-12.
- Sartori, A., Ma, X., Gri, G., Showe, L., Benjamin, D., et Trinchieri, G. 1997. Interleukin-12: an immunoregulatory cytokine produced by B cells and antigen-presenting cells. *Methods* **11**: 116-127.
- Sauter, B., Albert, M.L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., et Bhardwaj, N. 2000. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **191**: 423-434.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., et Siddell, S.G. 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of Virology* **81**: 20-29.
- Schindler, L., Klimetzek, V., et Kirchner, H. 1983. Bone-marrow derived macrophages as targets for the replication of mouse hepatitis virus type 3. *Immunol. Lett.* **7**: 107-110.
- Schlender, J., Schnorr, J.J., Spielhoffer, P., Cathomen, T., Cattaneo, R., Billeter, M.A. et al. 1996. Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 13194-13199.
- Schluesener, H.J., et Wekerle, H. 1985. Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations. *J. Immunol.* **135**: 3128-3133.
- Schluesener, H.J., Sobel, R.A., Linington, C., et Weiner, H.L. 1987. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J. Immunol.* **139**: 4016-4021.
- Schneider-Schaulies, S., et Dittmer, U. 2006. Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression. *J. Gen. Virol.* **87**: 1423-1438.

- Scholz, C., Patton, K.T., Anderson, D.E., Freeman, G.J., et Hafler, D.A. 1998. Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J. Immunol.* **160**: 1532-1538.
- Schousboe, A., Sarup, A., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., et Larsson, O.M. 2004. Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem. Int.* **45**: 521-527.
- Schultze, J.L., Michalak, S., Lowne, J., Wong, A., Gilleece, M.H., Gribben, J.G. et al. 1999. Human non-germinal center B cell interleukin (IL)-12 production is primarily regulated by T cell signals CD40 ligand, interferon gamma, and IL-10: role of B cells in the maintenance of T cell responses. *J. Exp. Med.* **189**: 1-12.
- Schwartz, R.H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 305-334.
- Schwartz, R.H. 2005. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat. Immunol.* **6**: 327-330.
- Schwartz, T., Fu, L., et Lavi, E. 2002. Differential induction of apoptosis in demyelinating and nondemyelinating infection by mouse hepatitis virus. *J. Neurovirol.* **8**: 392-399.
- Schwentker, F.F., et Rivers, T.M. 1934. The antibody response of rabbits to injections of emulsions and extracts of homologous brain. *The Journal of Experimental Medicine* **60**: 559-574.
- Semana, G., Gausling, R., Jackson, R.A., et Hafler, D.A. 1999. T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J. Autoimmun.* **12**: 259-267.
- Sempere, J.M., Soriano, V., et Benito, J.M. 2007. T regulatory cells and HIV infection. *AIDS Rev* **9**: 54-60.
- Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., Russell, J.H., et Loh, D.Y. 1988. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* **336**: 73-76.
- Sharpee, R.L., Mebus, C.A., et Bass, E.P. 1976. Characterization of a calf diarrheal coronavirus. *Am. J. Vet. Res.* **37**: 1031-1041.
- Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 389-400.
- Shi, F.D., Wang, H.B., Li, H., Hong, S., Taniguchi, M., Link, H. et al. 2000. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat. Immunol.* **1**: 245-251.
- Sibley, W.A., Bamford, C.R., et Clark, K. 1985. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* **1**: 1313-1315.

- Sicotte, N.L., Liva, S.M., Klutch, R., Pfeiffer, P., Bouvier, S., Odesa, S. et al. 2002. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann. Neurol.* **52**: 421-428.
- Siddell, S., et Snijder, E.J.. 2008. An Introduction to Nidoviruses. *Dans Nidoviruses. Éditeur: Perlman, S., Gallagher, T., et Snijder, E.J. Nidoviruses, ASM Press, pp. 1-13.*
- Singer, B.B., Scheffrahn, I., et Obrink, B. 2000. The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation.. *Cancer Res.* **60**: 1236-1244.
- Singer, B.B., Scheffrahn, I., Heymann, R., Sigmundsson, K., Kammerer, R., et Obrink, B. 2002. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J. Immunol.* **168**: 5139-5146.
- Smith, A.L., Barthold, S.W., et Beck, D.S. 1987a. Intranasally administered alpha/beta interferon prevents extension of mouse hepatitis virus, strain JHM, into the brains of BALB/cByJ mice. *Antiviral Res.* **8**: 239-245.
- Smith, A.L., Bottomly, K., et Winograd, D.F. 1987b. Altered splenic T cell function of BALB/cByJ mice infected with mouse hepatitis virus or Sendai virus. *J. Immunol.* **138**: 3426-3430.
- Smith, A.L., Winograd, D.F., et de Souza, M.S. 1991. In vitro splenic T cell responses of diverse mouse genotypes after oronasal exposure to mouse hepatitis virus, strain JHM. *Lab. Anim. Sci.* **41**: 106-111.
- Smith, M.S., Click, R.E., et Plagemann, P.G. 1984. Control of mouse hepatitis virus replication in macrophages by a recessive gene on chromosome 7. *J. Immunol.* **133**: 428-432.
- Snapper, C.M., et Paul, W.E. 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**: 944-947.
- Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L.M. et al. 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* **331**: 991-1004.
- Sojka, D.K., Huang, Y., et Fowell, D.J. 2008. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* **124**: 13-22.
- Soldan, S.S., et Jacobson, S. 2001. Role of viruses in etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Adv. Virus Res.* **56**: 517-555.

- Sorensen, O., Collins, A., Flintoff, W., Ebers, G., et Dales, S. 1986. Probing for the human coronavirus OC43 in multiple sclerosis. *Neurology* **36**: 1604-1606.
- Soroosh, P., et Doherty, T.A. 2009. Th9 and allergic disease. *Immunology* **127**: 450-458.
- Sospedra, M., et Martin, R. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 683-747.
- Spackman, D., et Cameron, I.R. 1983. Isolation of infectious bronchitis virus from pheasants. *Vet. Rec.* **113**: 354-355.
- Spriggs, M.K. 1996. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 101-130.
- Spriggs, M.K., Armitage, R.J., Comeau, M.R., Strockbine, L., Farrah, T., Macduff, B. et al. 1996. The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds the HLA-DR beta chain and inhibits antigen presentation. *J. Virol.* **70**: 5557-5563.
- Sriram, S., et Steiner, I. 2005. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **58**: 939-945.
- Steiger, J., Nickerson, P.W., Steurer, W., Moscovitch-Lopatin, M., et Strom, T.B. 1995. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J. Immunol.* **155**: 489-498.
- Steiner, C.M., Rozhon, E.J., et Lipton, H.L. 1984. Relationship between host age and persistence of Theiler's virus in the central nervous system of mice. *Infect. Immun.* **43**: 432-434.
- Steinman, L. 1996. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* **85**: 299-302.
- Steinman, L. 2005. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 510-518.
- Stephens, L.A., et Mason, D. 2000. CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J. Immunol.* **165**: 3105-3110.
- Stewart, J.N., Mounir, S., et Talbot, P.J. 1992. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* **191**: 502-505.
- Stoddart, C.A., et Scott, F.W. 1989. Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *J. Virol.* **63**: 436-440.
- Stohlman, S.A., Bergmann, C.C., Lin, M.T., Cua, D.J., et Hinton, D.R. 1998. CTL effector function within the central nervous system requires CD4+ T cells. *J. Immunol.* **160**: 2896-2904.

- Stohlman, S.A., Bergmann, C.C., van der Veen, R.C., et Hinton, D.R. 1995a. Mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system. *J. Virol.* **69**: 684-694.
- Stohlman, S.A., Brayton, P.R., Fleming, J.O., Weiner, L.P., et Lai, M.M. 1982. Murine coronaviruses: isolation and characterization of two plaque morphology variants of the JHM neurotropic strain. *J. Gen. Virol.* **63**: 265-275.
- Stohlman, S.A., et Weiner, L.P. 1981. Chronic central nervous system demyelination in mice after JHM virus infection. *Neurology* **31**: 38-44.
- Stohlman, S.A., Hinton, D.R., Cua, D., Dimacali, E., Sensintaffar, J., Hofman, F.M. et al. 1995b. Tumor necrosis factor expression during mouse hepatitis virus-induced demyelinating encephalomyelitis. *J. Virol.* **69**: 5898-5903.
- Stoll, G., Jander, S., et Schroeter, M. 2002. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.* **513**: 87-113.
- Stowe, R.P., Mehta, S.K., Ferrando, A.A., Feedback, D.L., et Pierson, D.L. 2001. Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight. *Aviat Space Environ Med* **72**: 884-891.
- Stuart, G., et Krikorian, K.S. 1928. The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment. *Ann Trop Med* **22**: 327-377.
- Summers, B.A., Greisen, H.A., et Appel, M.J. 1979. Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* **46**: 1-10.
- Sun, N., Grzybicki, D., Castro, R.F., Murphy, S., et Perlman, S. 1995. Activation of astrocytes in the spinal cord of mice chronically infected with a neurotropic coronavirus. *Virology* **213**: 482-493.
- Surh, C.D., Lee, D.S., Fung-Leung, W.P., Karlsson, L., et Sprent, J. 1997. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of CD4+ T cells. *Immunity* **7**: 209-219.
- Sutherland, R.M., Chua, M.M., Lavi, E., Weiss, S.R., et 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.
- Suzuki, H., Kündig, T.M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T. et al. 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* **268**: 1472-1476.
- Suzumura, A., Lavi, E., Weiss, S.R., et Silberberg, D.H. 1986. Coronavirus infection induces H-2 antigen expression on oligodendrocytes and astrocytes. *Science* **232**: 991-993.

- Svenberg, T. 1976. Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int. J. Cancer* **17**: 588-596.
- Taguchi, F., Ikeda, T., et Shida, H. 1992. Molecular cloning and expression of a spike protein of neurovirulent murine coronavirus JHMV variant cl-2. *J. Gen. Virol.* **73** (Pt 5): 1065-1072.
- Taguchi, F., Yamaguchi, R., Makino, S., et Fujiwara, K. 1981. Correlation between growth potential of mouse hepatitis viruses in macrophages and their virulence for mice. *Infect. Immun.* **34**: 1059-1061.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M. et al. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* **10**: 1969-1980.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N. et al. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**: 303-310.
- Takano, T., Hohdatsu, T., Toda, A., Tanabe, M., et Koyama, H. 2007. TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology* **364**: 64-72.
- Tal, C., Laufer, A., et Behar, A.J. 1958. An experimental demyelinating disease in the Syrian hamster. *Br J Exp Pathol* **39**: 158-164.
- Talbot, P. 1995. Implication des virus dans la sclérose en plaques. *Médecine/sciences* **11**: 837-843.
- Talbot, P.J. 1997. Virus-induced autoimmunity in multiple sclerosis: the coronavirus paradigm. *Advances in Clinical Neurosciences* **7**: 215-233.
- Talbot, P.J., Arnold, D., et Antel, J.P. 2001. Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **253**: 247-271.
- Talbot, P.J., et Buchmeier, M.J. 1987. Catabolism of homologous murine monoclonal hybridoma IgG antibodies in mice. *Immunology* **60**: 485-489.
- Talbot, P.J., Paquette, J.S., Ciurli, C., Antel, J.P., et Ouellet, F. 1996. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **39**: 233-240.
- Tamaki, K. 1986. Heterogeneity of epidermal Thy-1-positive cells defined by lectin-binding sites. *J. Invest. Dermatol.* **86**: 222-225.

- Tan, Y., Lim, S.G., et Hong, W. 2007. Regulation of cell death during infection by the severe acute respiratory syndrome coronavirus and other coronaviruses. *Cell. Microbiol.* **9**: 2552-2561.
- Tang, Q., et Bluestone, J.A. 2006. Plasmacytoid DCs and T(reg) cells: casual acquaintance or monogamous relationship?. *Nat. Immunol.* **7**: 551-553.
- Tang, Q., et Bluestone, J.A. 2008. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* **9**: 239-244.
- Tang, X.C., Zhang, J.X., Zhang, S.Y., Wang, P., Fan, X.H., Li, L.F. et al. 2006. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J. Virol.* **80**: 7481-7490.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., et Yanagi, Y. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**: 893-897.
- Teitelbaum, D., Meshorer, A., Hirshfeld, T., Arnon, R., et Sela, M. 1971. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur. J. Immunol.* **1**: 242-248.
- Teitelbaum, D., Webb, C., Bree, M., Meshorer, A., Arnon, R., et Sela, M. 1974. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Rhesus monkeys by a synthetic basic copolymer. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **3**: 256-262.
- Theiler, M. 1937. Spontaneous encephalomyelitis of mice: a new virus disease. *J. Gen. Virol.* **68**: 705-719.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., et Siddell, S.G. 2001. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* **82**: 1273-1281.
- Thomas, L., Paterson, P.Y., et Smithwick, B. 1950. Acute disseminated encephalomyelitis following immunization with homologous brain extracts; studies on the role of a circulating antibody in the production of the condition in dogs. *J. Exp. Med.* **92**: 133-152.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., et Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- Thornton, A.M., et Shevach, E.M. 1998. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**: 287-296.
- Thornton, A.M., et Shevach, E.M. 2000. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* **164**: 183-190.

- Tiegs, S.L., Russell, D.M., et Nemazee, D. 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* **177**: 1009-1020.
- Tierney, R.J., Steven, N., Young, L.S., et Rickinson, A.B. 1994. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J. Virol.* **68**: 7374-7385.
- Tisdale, W.A. 1963. Potentiating effect of K-Virus on mouse hepatitis virus (MHV-S) in weanling mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **114**: 774-777.
- Tishon, A., Southern, P.J., et Oldstone, M.B. 1988. Virus-lymphocyte interactions. II. Expression of viral sequences during the course of persistent lymphocytic choriomeningitis virus infection and their localization to the L3T4 lymphocyte subset. *J. Immunol.* **140**: 1280-1284.
- Tobler, K., et Ackermann, M. 1995. PEDV leader sequence and junction sites. *Adv. Exp. Med. Biol.* **380**: 541-542.
- Tompkins, M.B., Nelson, P.D., English, R.V., et Novotney, C. 1991. Early events in the immunopathogenesis of feline retrovirus infections.. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **199**: 1311-1315.
- Tosato, G., Magrath, I., Koski, I., Dooley, N., et Blaese, M. 1979. Activation of suppressor T cells during Epstein-Barr-virus-induced infectious mononucleosis. *N. Engl. J. Med.* **301**: 1133-1137.
- Tourne, S., Miyazaki, T., Oxenius, A., Klein, L., Fehr, T., Kyewski, B. et al. 1997. Selection of a broad repertoire of CD4+ T cells in H-2Ma0/0 mice. *Immunity* **7**: 187-195.
- Tran, D.Q., Ramsey, H., et Shevach, E.M. 2007. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* **110**: 2983-2990.
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., et Bo, L. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **338**: 278-285.
- Tsai, C.Y., Chow, N.H., Ho, T.S., et Lei, H.Y. 1997. Intracerebral injection of myelin basic protein (MBP) induces inflammation in brain and causes paraplegia in MBP-sensitized B6 mice. *Clin. Exp. Immunol.* **109**: 127-133.
- Tsang, K.W., Ho, P.L., Ooi, G.C., Yee, W.K., Wang, T., Chan-Yeung, M. et al. 2003. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1977-1985.
- Tsunemitsu, H., el-Kanawati, Z.R., Smith, D.R., Reed, H.H., et Saif, L.J. 1995. Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3264-3269.

- Tsunoda, I., Lane, T.E., Blackett, J., et Fujinami, R.S. 2004. Distinct roles for IP-10/CXCL10 in three animal models, Theiler's virus infection, EAE, and MHV infection, for multiple sclerosis: implication of differing roles for IP-10. *Mult. Scler.* **10**: 26-34.
- Tuohy, V.K., Lu, Z.J., Sobel, R.A., Laursen, R.A., et Lees, M.B. 1988. A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **141**: 1126-1130.
- Turbide, C., Kunath, T., Daniels, E., et Beauchemin, N. 1997. Optimal ratios of biliary glycoprotein isoforms required for inhibition of colonic tumor cell growth.. *Cancer Res.* **57**: 2781-2788.
- Turner, B.C., Hemmila, E.M., Beauchemin, N., et Holmes, K.V. 2004. Receptor-dependent coronavirus infection of dendritic cells. *J. Virol.* **78**: 5486-5490.
- Tyler, K.L., et Nathanson, N.. 2001. Pathogenesis of Viral Infections. *Dans Fundamental virology. Éditeur: Knipe, D.M., et Howley, P.M. Fundamental virology, Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 199-243.*
- Unanue, E.R., et Askonas, B.A. 1968a. Persistence of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages. *J. Exp. Med.* **127**: 915-926.
- Unanue, E.R., et Askonas, B.A. 1968b. The immune response of mice to antigen in macrophages. *Immunology* **15**: 287-296.
- Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., et Strober, W. 2003. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* **18**: 415-428.
- Vabret, A., Dina, J., Brison, E., Brouard, J., et Freymuth, F. 2008. Coronavirus humains (HCoV). *Pathol. Biol.* : doi:10.1016/j.patbio.2008.02.018.
- Valentin, H., Azocar, O., Horvat, B., Williems, R., Garrone, R., Evlashev, A. et al. 1999. Measles virus infection induces terminal differentiation of human thymic epithelial cells. *J. Virol.* **73**: 2212-2221.
- Vallée, I., Tait, S.W., et Powell, P.P. 2001. African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis.. *J. Virol.* **75**: 10372-10382.
- van de Wyngaert, F.A., Beguin, C., D'Hooghe, M.B., Doms, G., Lissoir, F., Carton, H. et al. 2001. A double-blind clinical trial of mitoxantrone versus methylprednisolone in relapsing, secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* **101**: 210-216.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C. et al. 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**: 368-373.

- van Engelen, B.G., Miller, D.J., Pavelko, K.D., Hommes, O.R., et Rodriguez, M. 1994. Promotion of remyelination by polyclonal immunoglobulin in Theiler's virus-induced demyelination and in multiple sclerosis.. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **57 Suppl:** 65-68.
- van Oers, N.S., Killeen, N., et Weiss, A. 1996. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J. Exp. Med.* **183:** 1053-1062.
- Van Parijs, L., et Abbas, A.K. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* **280:** 243-248.
- Vandevelde, M., et Zurbriggen, A. 2005. Demyelination in canine distemper virus infection: a review.. *Acta Neuropathol.* **109:** 56-68.
- Vannier, P. 1990. Disorders induced by the experimental infection of pigs with the porcine respiratory coronavirus (P.R.C.V.). *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* **37:** 177-180.
- Vass, K., et Lassmann, H. 1990. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am. J. Pathol.* **137:** 789-800.
- Vennema, H., de Groot, R.J., Harbour, D.A., Dalderup, M., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M.C. et al. 1990. Immunogenicity of recombinant feline infectious peritonitis virus spike protein in mice and kittens. *Adv. Exp. Med. Biol.* **276:** 217-222.
- Vicente-Suarez, I., Takahashi, Y., Cheng, F., Horna, P., Wang, H.W., Wang, H. et al. 2007. Identification of a novel negative role of flagellin in regulating IL-10 production. *Eur. J. Immunol.* **37:** 3164-3175.
- Vieira, P., et Rajewsky, K. 1988. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur. J. Immunol.* **18:** 313-316.
- Vieira, P.L., Christensen, J.R., Minaee, S., O'Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A. et al. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells.. *J. Immunol.* **172:** 5986-5993.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., et Workman, C.J. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8:** 523-532.
- Vijgen, L., Keyaerts, E., Lemey, P., Maes, P., Van Reeth, K., Nauwynck, H. et al. 2006. Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. *J. Virol.* **80:** 7270-7274.

- Vijgen, L., Keyaerts, E., Moës, E., Thoelen, I., Wollants, E., Lemey, P. et al. 2005. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J. Virol.* **79**: 1595-1604.
- Virelizier, J.L., Virelizier, A.M., et Allison, A.C. 1976. The role of circulating interferon in the modifications of immune responsiveness by mouse hepatitis virus (MHV-3). *J. Immunol.* **117**: 748-753.
- von Herrath, M.G., et Harrison, L.C. 2003. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 223-232.
- von Pirquet, C. 1908. Das Verhalten der kautanen Tuberculinreaktion während der Masern. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **34**: 1297.
- Waksman, B.H. 1995. Multiple sclerosis. More genes versus environment. *Nature* **377**: 105-106.
- Waksman, B.H., Porter, H., Lees, M.D., Adams, R.D., et Folch, J. 1954. A study of the chemical nature of components of bovine white matter effective in producing allergic encephalomyelitis in the rabbit. *J. Exp. Med.* **100**: 451-471.
- Waldner, H., Whitters, M.J., Sobel, R.A., Collins, M., et Kuchroo, V.K. 2000. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 3412-3417.
- Walker, L.S., et Abbas, A.K. 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 11-19.
- Walker, W.S., Gatewood, J., Olivas, E., Askew, D., et Havenith, C.E. 1995. Mouse microglial cell lines differing in constitutive and interferon-gamma-inducible antigen-presenting activities for naive and memory CD4+ and CD8+ T cells. *J. Neuroimmunol.* **63**: 163-174.
- Walunas, T.L., et Bluestone, J.A. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J. Immunol.* **160**: 3855-3860.
- Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M. et al. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**: 405-413.
- Wan, Y.Y., et Flavell, R.A. 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **212**: 114-130.
- Wang, F.I., Stohlman, S.A., et Fleming, J.O. 1990. Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated. *J. Neuroimmunol.* **30**: 31-41.

- Wang, H., Mao, Y., Ju, L., Zhang, J., Liu, Z., Zhou, X. et al. 2004. Detection and monitoring of SARS coronavirus in the plasma and peripheral blood lymphocytes of patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin. Chem.* **50**: 1237-1240.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E.I.H., Huizinga, T.W.J., et Toes, R.E.M. 2007. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **37**: 129-138.
- Wange, R.L., et Samelson, L.E. 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* **5**: 197-205.
- Ward, B.J., Johnson, R.T., Vaisberg, A., Jauregui, E., et Griffin, D.E. 1990. Spontaneous proliferation of peripheral mononuclear cells in natural measles virus infection: identification of dividing cells and correlation with mitogen responsiveness. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **55**: 315-326.
- Ward, B.J., Johnson, R.T., Vaisberg, A., Jauregui, E., et Griffin, D.E. 1991. Cytokine production in vitro and the lymphoproliferative defect of natural measles virus infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **61**: 236-248.
- Watson, C.M., Davison, A.N., Baker, D., O'Neill, J.K., et Turk, J.L. 1991. Suppression of demyelination by mitoxantrone. *Int. J. Immunopharmacol.* **13**: 923-930.
- Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* **182**: 207-214.
- Weiner, L.P. 1973. Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis. *Arch. Neurol.* **28**: 298-303.
- Weiss, A., et Littman, D.R. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**: 263-274.
- Weiss, S.R. 1983. Coronaviruses SD and SK share extensive nucleotide homology with murine coronavirus MHV-A59, more than that shared between human and murine coronaviruses. *Virology* **126**: 669-677.
- Weiss, S.R., et Leibowitz, J.L.. 2008. Pathogenesis of Murine Coronavirus Infection. *Dans Nidoviruses. Éditeur: Perlman, S., Gallagher, T., et Snijder, E.J. Nidoviruses, ASM Press, pp. 259-278.*
- Weiss, S.R., et Navas-Martin, S. 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus.. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 635-664.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., et Linington, C. 1994. Animal models. *Ann. Neurol.* **36 Suppl**: S47-53.

- Wekerle, H., Linington, C., Lassmann, H., et Meyermann, R. 1986. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends in Neurosciences* **9**: 271-277.
- Weller, R.O., Kida, S., et Zhang, E.T. 1992. Pathways of fluid drainage from the brain--morphological aspects and immunological significance in rat and man. *Brain Pathol.* **2**: 277-284.
- Wesley, R.D., Woods, R.D., Hill, H.T., et Biber, J.D. 1990. Evidence for a porcine respiratory coronavirus, antigenically similar to transmissible gastroenteritis virus, in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2**: 312-317.
- Whitacre, C.C. 2001. Sex differences in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* **2**: 777-780.
- Widdowson, P.S., Farnworth, M.J., Simpson, M.G., et Lock, E.A. 1996. Influence of age on the passage of paraquat through the blood-brain barrier in rats: a distribution and pathological examination. *Hum Exp Toxicol* **15**: 231-236.
- Wijburg, O.L., Heemskerk, M.H., Boog, C.J., et Van Rooijen, N. 1997. Role of spleen macrophages in innate and acquired immune responses against mouse hepatitis virus strain A59. *Immunology* **92**: 252-258.
- Wijburg, O.L., Heemskerk, M.H., Sanders, A., Boog, C.J., et Van Rooijen, N. 1996. Role of virus-specific CD4+ cytotoxic T cells in recovery from mouse hepatitis virus infection. *Immunology* **87**: 34-41.
- Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N. et al. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* **27**: 18-20.
- Willer, C.J., Dyment, D.A., Sadovnick, A.D., Rothwell, P.M., Murray, T.J., Ebers, G.C. 2005. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ* **330**: 120.
- Willerford, D.M., Chen, J., Ferry, J.A., Davidson, L., Ma, A., et Alt, F.W. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* **3**: 521-530.
- Williams, R.K., Jiang, G.S., et Holmes, K.V. 1991. Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 5533-5536.
- Williamson, J.S., et Stohlman, S.A. 1990. Effective clearance of mouse hepatitis virus from the central nervous system requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J. Virol.* **64**: 4589-4592.
- Wilson, M.S., Taylor, M.D., Balic, A., Finney, C.A., Lamb, J.R., et Maizels, R.M. 2005. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **202**: 1199-1212.

- Wolf, S.A., Fisher, J., Bechmann, I., Steiner, B., Kwidzinski, E., et Nitsch, R. 2002. Neuroprotection by T-cells depends on their subtype and activation state. *J. Neuroimmunol.* **133**: 72-80.
- Wolfe, L.G., et Griesemer, R.A. 1966. Feline infectious peritonitis. *Pathol Vet* **3**: 255-270.
- Wolinsky, J.S., Comi, G., Filippi, M., Ladkani, D., Kadosh, S., Shifroni, G. 2002. Copaxone's effect on MRI-monitored disease in relapsing MS is reproducible and sustained. *Neurology* **59**: 1284-1286.
- Wong, R.S.M., Wu, A., To, K.F., Lee, N., Lam, C.W.K., Wong, C.K. et al. 2003. Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis.. *BMJ* **326**: 1358-1362.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Chu, C., Chan, K., Tsoi, H., Huang, Y. et al. 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia.. *J. Virol.* **79**: 884-895.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lai, K.K.Y., Huang, Y., Lee, P. et al. 2009. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J. Virol.* **83**: 908-917.
- Woo, P.C.Y., Wang, M., Lau, S.K.P., Xu, H., Poon, R.W.S., Guo, R. et al. 2007. Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J. Virol.* **81**: 1574-1585.
- Workman, C.J., Szymczak-Workman, A.L., Collison, L.W., Pillai, M.R., et Vignali, D.A.A. 2009. The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 2603-2622.
- Wu, G.F., Dandekar, A.A., Pewe, L., et Perlman, S. 2000a. CD4 and CD8 T cells have redundant but not identical roles in virus-induced demyelination. *J. Immunol.* **165**: 2278-2286.
- Wu, G.F., et Perlman, S. 1999. Macrophage infiltration, but not apoptosis, is correlated with immune-mediated demyelination following murine infection with a neurotropic coronavirus. *J. Virol.* **73**: 8771-8780.
- Wu, G.F., Pewe, L., et Perlman, S. 2000b. Coronavirus-induced demyelination occurs in the absence of inducible nitric oxide synthase. *J. Virol.* **74**: 7683-7686.
- Xue, S., Sun, N., Van Rooijen, N., et Perlman, S. 1999. Depletion of blood-borne macrophages does not reduce demyelination in mice infected with a neurotropic coronavirus. *J. Virol.* **73**: 6327-6334.
- Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K. et al. 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**: 235-247.

- Yanagi, Y., Ono, N., Tatsuo, H., Hashimoto, K., et Minagawa, H. 2002. Measles virus receptor SLAM (CD150). *Virology* **299**: 155-161.
- Yednock, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., et Karin, N. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* **356**: 63-66.
- Yin, C.C., Medeiros, L.J., Abruzzo, L.V., Jones, D., Farhood, A.I., et Thomazy, V.A. 2005. EBV-associated B- and T-cell posttransplant lymphoproliferative disorders following primary EBV infection in a kidney transplant recipient. *Am. J. Clin. Pathol.* **123**: 222-228.
- Yokomori, K., Asanaka, M., Stohlman, S.A., et Lai, M.M. 1993. A spike protein-dependent cellular factor other than the viral receptor is required for mouse hepatitis virus entry. *Virology* **196**: 45-56.
- Yokomori, K., et Lai, M.M. 1992. The receptor for mouse hepatitis virus in the resistant mouse strain SJL is functional: implications for the requirement of a second factor for viral infection. *J. Virol.* **66**: 6931-6938.
- Yoo, D., et Pei, Y. 2001. Full-length genomic sequence of bovine coronavirus (31 kb). Completion of the open reading frame 1a/1b sequences. *Adv. Exp. Med. Biol.* **494**: 73-76.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L. et al. 2009. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* **31**: 457-468.
- Yu, M.W., Lemieux, S., et Talbot, P.J. 1996. Genetic control of anti-idiotypic vaccination against coronavirus infection. *Eur. J. Immunol.* **26**: 3230-3233.
- Zehntner, S.P., Brisebois, M., Tran, E., Owens, T., et Fournier, S. 2003. Constitutive expression of a costimulatory ligand on antigen-presenting cells in the nervous system drives demyelinating disease. *FASEB J.* **17**: 1910-1912.
- Zhang, J., Guy, J.S., Snijder, E.J., Denniston, D.A., Timoney, P.J., et Balasuriya, U.B.R. 2007a. Genomic characterization of equine coronavirus. *Virology* **369**: 92-104.
- Zhang, X., et Reichart, P.A. 2007. A review of betel quid chewing, oral cancer and precancer in Mainland China. *Oral Oncol.* **43**: 424-430.
- Zhang, X., Hasoksuz, M., Spiro, D., Halpin, R., Wang, S., Vlasova, A. et al. Non publié. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation.
- Zhou, H., et Perlman, S. 2006. Preferential infection of mature dendritic cells by mouse hepatitis virus strain JHM. *J. Virol.* **80**: 2506-2514.

- Ziebuhr, J., Snijder, E.J., et Gorbalenya, A.E. 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* **81**: 853-879.
- Zinkernagel, R.M. 1992. Virus-induced acquired immune suppression by cytotoxic T cell-mediated immunopathology. *Vet. Microbiol.* **33**: 13-18.
- Zinkernagel, R.M. 1996. Immunology taught by viruses. *Science* **271**: 173-178.
- Zitzow, L.A., Rowe, T., Morken, T., Shieh, W., Zaki, S., et Katz, J.M. 2002. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets.. *J. Virol.* **76**: 4420-4429.
- Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N. et al. 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat. Neurosci.* **9**: 268-275.
- Zlokovic, B.V. 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* **28**: 202-208.

ANNEXE

Liste des communications

Présentations orales

Gabriel Marceau et Pierre Talbot. Immunomodulation by a neurovirulent murine coronavirus. 12 mai 2006. 1st Annual Neuroinflammation Symposium. Hôpital Douglas, Montréal, Canada.

Gabriel Marceau et Pierre Talbot. Immunomodulation par un coronavirus murin neurovirulent. 18 mai 2006. Colloque – Dialogues entre le système nerveux central et le système immunitaire. 74^{ème} Congrès de l'ACFAS: Le savoir trame de la modernité du 15 au 19 mai 2006. Université McGill, Montréal, Canada.

Gabriel Marceau et Pierre Talbot. Immunomodulation by a neurovirulent coronavirus. 57^{ème} Congrès Annuel de la Société Canadienne des Microbiologistes du 17 au 20 juin 2007. Université Laval, Québec, Canada.

Affiches

Gabriel Marceau et Pierre J. Talbot. Caractérisation de l'auto-immunité induite par le coronavirus murin dans un modèle de démyélinisation du système nerveux central. 3 au 5 novembre 2005. 4^{ème} Congrès Armand-Frappier. Auberge du Lac-à-l'Eau-Claire, Canada.

Gabriel Marceau et Pierre Talbot. Immunomodulation by a neurovirulent murine coronavirus. 9 au 12 juin 2006. Canadian Society for Immunology 2006 Annual Meeting. The Westin Nova Scotian Hotel, Halifax, Canada.

Gabriel Marceau et Pierre Talbot. Immunomodulation by a neurovirulent murine coronavirus. 11-12 mai 2007. 2nd Annual Neuroinflammation Symposium. Château Bromont, Bromont, Canada.

Gabriel Marceau et Pierre Talbot. Transient immunosuppression by a neurovirulent coronavirus in an animal model of MS. 10-13 décembre 2007. endMS.ca Fairmont Banffsprings, Banff, Alberta, Canada.

Gabriel Marceau, H el ene Jacomy, Marc Desforbes, Claude Daniel and Pierre J. Talbot. Transient immunosuppression by a neurovirulent coronavirus in an animal model of multiple sclerosis. 22-27 juin 2008. XIth International Nidovirus Symposium, St. Catherine's College Oxford, UK.