

Université du Québec  
 INRS- Institut Armand-Frappier

**CONTRIBUTION DU RÉPERTOIRE DES LYMPHOCYTES B-1 DANS L'INDUCTION D'UNE  
 RÉPONSE ANTIVIRALE**

Par  
 Isabelle Meunier

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

**Jury d'évaluation**

Président du Jury

Véronika von Messling

Examineur externe

Laurent Poliquin

Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal

Examineur interne

Véronika von Messling

Directeur de recherche

Alain Lamarre



## Résumé

L'interaction entre le système immunitaire et les micro-organismes est souvent représenté comme un état d'équilibre, dans lequel chacun évolue en fonction des réponses de l'autre. Les milliers de pathogènes que nous rencontrons au cours de notre vie ont évolué de façon à ne pas être reconnu par le système immunitaire afin de pouvoir à leur cycle de réplication. Souvent, cela inclue l'inhibition de différentes voies de signalisation, le blocage des molécules de présentation ou des fonctions effectrices des cellules cibles mais aussi, la variation des protéines exhibées à la surface. Par opposition, notre système immunitaire a développé plusieurs lignes de défenses afin de freiner le plus tôt possible la réplication des pathogènes avant la mise en place d'autres mécanismes plus précis. Le système immunitaire inné est composé principalement de phagocytes, de cellules NK et d'une sous-population de lymphocytes B : les lymphocytes B-1. Ces cellules sont capables de sécréter de façon spontanée des molécules d'anticorps qui peuvent reconnaître une très grande variété de pathogènes et former des complexes immuns. Il a été démontré que ces derniers étaient plus efficacement recrutés aux organes lymphoïdes et donc, que les anticorps naturels pourraient former un pont important entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

La reconnaissance d'une multitude de micro-organismes est permise grâce à la variabilité qui peut être générée dans les récepteurs de cellules effectrices du système immunitaire. Chez les lymphocytes B-1, cette diversité est concentrée dans le récepteur des lymphocytes B ainsi que dans les molécules d'immunoglobulines sécrétées. Bien que le rôle des anticorps naturels dans le cadre d'infections virales ait été caractérisé, aucune étude n'a portée directement sur l'importance de la diversité du répertoire des anticorps naturels. Nous avons alors émis comme hypothèse que pour pouvoir reconnaître une grande variété de pathogènes et pour médier leur fonction protectrice, les anticorps naturels doivent posséder un répertoire diversifié.

L'utilisation de souris transgéniques possédant des lacunes dans leur répertoire nous a révélé que la diversité du répertoire des anticorps naturels était importante pour une reconnaissance efficace des deux modèles viraux étudiés, soit le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). De plus, nous avons pu observer que seules les souris possédant un répertoire diversifié étaient capables de neutraliser le VSV. De plus, nous avons noté que les souris ayant un répertoire limité possédaient des titres viraux à la rate inférieurs à ceux des souris témoins. Ceci nous a donc indiqué, en premier lieu, que la diversité du répertoire des anticorps naturels était importante pour une reconnaissance des pathogènes ainsi que pour un recrutement rapide et efficace des pathogènes aux organes lymphoïdes, possiblement grâce à la formation de complexes immuns.

Dans un autre ordre d'idées, nous avons voulu établir un lien entre la présence et la diversité des anticorps naturels avec les réponses immunitaires adaptatives des lymphocytes T cytotoxiques et des lymphocytes B-2. Pour ce faire, des souris J<sub>H</sub>T ont été irradiées et infectées avec le LCMV afin d'évaluer la réponse cytotoxique des lymphocytes T et avec le VSV, afin d'évaluer la réponse humorale. Tout d'abord, l'analyse de la réponse des lymphocytes T cytotoxique par test de cytotoxicité cellulaire ne nous a pas permis d'établir de corrélation entre la présence des anticorps naturels et l'induction d'une meilleure réponse. Toutefois, nous avons pu observer, dans le modèle d'infection avec le VSV, qu'il y avait des titres plus élevés d'anticorps neutralisants chez les souris qui possédaient des anticorps naturels par opposition entre celles qui n'en possédaient pas.

En conclusion, ces études démontrent qu'une pleine diversité du répertoire des anticorps naturels est cruciale pour une reconnaissance efficace des pathogènes, pour une activité neutralisante ainsi que pour un recrutement rapide aux organes lymphoïdes. Suite au recrutement des particules virales vers la rate, nous avons pu observer que la réponse humorale dirigée contre le VSV était supérieure lorsqu'il y avait présence d'anticorps naturels. Étonnamment, nous n'avons pu établir de corrélation similaire avec l'induction d'une meilleure réponse cytotoxique des

lymphocytes T dans le cadre d'une infection avec le LCMV. Néanmoins, ces études démontrent bien que les anticorps naturels, par la formation de complexes immuns, permettent de faire un lien entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif, du moins, dans le cas de la réponse humorale.

---

Isabelle Meunier

---

Alain Lamarre

## Table des matières

Résumé .....	III
Table des matières .....	VI
Table des illustrations.....	X
Liste des tableaux .....	XII
Remerciements.....	XIII
Liste des abréviations .....	XV
 Introduction.....	 1
<b>Chapitre 1</b> .....	<b>5</b>
<i>Revue de littérature</i> .....	<i>5</i>
 1 Lymphocytes B-1 .....	 5
1.1 Ontogénèse des lymphocytes B-1 .....	5
1.2 Sous-populations des lymphocytes B-1 .....	7
1.3 Signaux déterminants la localisation des lymphocytes B-1 .....	8
1.4 Activation et sécrétion des anticorps naturels par les lymphocytes B-1.....	9
 2 Anticorps naturels.....	 11
2.1 Structure des immunoglobulines .....	11
2.2 Organisation des gènes des immunoglobulines.....	15
2.3 Réarrangement des gènes des immunoglobulines.....	16
2.4 Génération de la diversité du répertoire primaire .....	18
2.5 Répertoire primaire des anticorps naturels .....	21
2.6 Fonctions des anticorps naturels et effets protecteurs au cours des infections	22
 3 Lymphocytes B-2.....	 27
3.1 Récepteur des lymphocytes B-2 .....	27
3.2 Réponse immunitaire induite par les lymphocytes B-2 .....	28
 4 Lymphocytes T .....	 31
4.1 Récepteur des lymphocytes T (TCR).....	31
4.2 Réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques .....	34
 5 Modèles murins .....	 37
5.1 Souris quasi-monoclonale (QM).....	37
5.2 Souris HC1 .....	38
5.3 Souris J <sub>H</sub> T (ou J <sub>H</sub> <sup>-/-</sup> ) .....	39
5.4 Souris AID <sup>-/-</sup> .....	40
5.5 Souris RAG-1 <sup>-/-</sup> .....	41
5.6 Souris P14.....	41

6	Modèles viraux .....	43
6.1	Virus de la stomatite vésiculaire (VSV) .....	43
6.1.1	Pathogénèse du VSV .....	45
6.1.2	Réponse immunitaire générée contre le VSV .....	46
6.2	Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) .....	48
6.2.1	Pathogénèse du LCMV .....	49
6.2.2	Réponse immunitaire générée contre le LCMV .....	51
7	Hypothèse .....	53
8	Objectifs de travail.....	54
8.1	Caractérisation des souris transgéniques .....	54
8.2	Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans le recrutement aux organes lymphoïdes.....	54
8.3	Impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques.....	55
8.4	Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans l'induction de la réponse des lymphocytes B-2.....	56
<b>Chapitre 2.....</b>		<b>57</b>
<b>Matériel et méthode .....</b>		<b>57</b>
1	Lignées cellulaires .....	57
2	Production virale .....	58
2.1	Production du virus de la stomatite vésiculaire, sérotype Indiana (VSV-IND) .....	58
2.2	Production du virus de la chorioméningite lymphocytaire, sérotype WE (LCMV-WE) .....	58
3	Titration des virus .....	59
3.1	Titration de VSV-IND.....	59
3.2	Titration de LCMV-WE.....	59
4	Purification des IgM .....	61
5	Manipulation sur les souris.....	62
5.1	Typage des souris HC1 .....	62
5.2	Typage des souris P14.....	63
5.3	Infection des souris avec VSV-IND .....	63
5.4	Infection des souris avec LCMV-WE.....	64
5.5	Irradiation .....	65
5.6	Transferts adoptifs de cellules de splénocytes, de moelle osseuse et d'IgM .....	65
5.6.1	Transfert de splénocytes .....	65
5.6.2	Transfert de cellules de moelle osseuse.....	66

5.6.3 Transfert d'IgM.....	66
6 Analyse de la réponse humorale .....	66
6.1 Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-VSV-IND .....	66
6.2 Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-LCMV-WE.....	67
6.3 Quantification des IgM par ELISA.....	68
7 Analyse de la réponse cellulaire par test de cytotoxicité cellulaire .....	68
8 Caractérisation des populations cellulaires par cytométrie en flux.....	70
9 Analyse statistique.....	70
<b>Chapitre 3</b> .....	71
<b>Résultats</b> .....	71
1 Caractérisation des souris transgéniques.....	71
1.1 Quantification des populations de lymphocytes B-1 .....	71
1.2 Quantification de la production d'anticorps naturels .....	72
1.3 Caractérisation de la spécificité des anticorps naturels chez les souris transgéniques .....	74
1.4 Caractérisation de la capacité neutralisante des anticorps naturels chez les souris transgéniques .....	76
1.4.1 Titres en anticorps naturels neutralisants contre VSV-IND .....	77
1.4.2 Titres en anticorps naturels neutralisants contre LCMV-WE.....	78
2 Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans la dissémination virale.....	79
2.1 Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans la dissémination de VSV-IND et de LCMV-WE aux organes lymphoïdes.....	79
2.1.1 Recrutement de VSV-IND et de LCMV-WE vers la rate.....	79
2.1.2 Charge virale en périphérie .....	83
2.2 Rétablissement de la capacité de recrutement du virus LCMV-WE à la rate chez les souris J <sub>H</sub> T et HC1 .....	84
2.2.1 Purification des IgM de souris C57BL/6 naïves.....	85
2.2.2.1 Recrutement du virus vers la rate.....	86
2.2.2.2 Charge virale en périphérie .....	88
3 Impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques .....	90
3.1 Réponse des lymphocytes T cytotoxiques générée chez les différentes souris transgéniques .....	90
3.1.1 Activité cytotoxique des lymphocytes T chez les souris AID <sup>-/-</sup> , QM et HC1 ..	91
3.1.2 Activité cytotoxique des lymphocytes T chez la souris J <sub>H</sub> T.....	92
3.2 Impact de la présence des anticorps naturels dans l'activité cytotoxique des lymphocytes T chez la souris J <sub>H</sub> T.....	93

3.3	Optimisation de la quantité de cellules de rate de souris P14 à transférer	93
3.4	Rétablissement de l'activité cytotoxique des lymphocytes T des souris J <sub>H</sub> T par transfert d'anticorps naturels	95
4	Impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction de la réponse humorale des lymphocytes B-2	98
<b>Chapitre 4</b>		<b>102</b>
<b>Discussion</b>		<b>102</b>
1	Caractérisation des souris transgéniques	104
1.1	Quantification des populations de lymphocytes B-1	104
1.2	Quantification de la production d'anticorps naturels	105
1.3	Caractérisation de la spécificité des anticorps naturels chez les souris transgéniques	106
1.4	Caractérisation de la capacité neutralisante des anticorps naturels chez les souris transgéniques	107
2	Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans le recrutement vers les organes lymphoïdes	110
2.1	Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans le recrutement de VSV-IND et de LCMV-WE vers les organes lymphoïdes	110
2.1.1	Recrutement de VSV-IND et de LCMV-WE à la rate	111
2.1.2	Charge virale en périphérie	114
2.2	Rétablissement de la capacité de recrutement du virus LCMV-WE à la rate chez les souris J <sub>H</sub> T et HC1	115
2.2.1	Recrutement de LCMV-WE à la rate	116
2.2.2	Charge virale en périphérie	117
3	Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques	119
3.1	Réponse des lymphocytes T cytotoxiques générée chez les différentes souris transgéniques	119
3.2	Impact de la présence des anticorps naturels dans l'activité cytotoxique des lymphocytes T chez la souris J <sub>H</sub> T	121
4	Impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction de la réponse humorale des lymphocytes B-2	125
<b>Références bibliographiques</b>		<b>132</b>

## Table des illustrations

Figure 1: Développement des lymphocytes B-1 .....	7
Figure 2: Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline de type IgG. ....	12
Figure 3: Représentation schématique d'une molécule d'IgM.....	13
Figure 4: Organisation génique des chaînes lourdes et légères. ....	16
Figure 5: Réarrangement des gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines.....	18
Figure 6 : Représentation schématique du phénomène de la flexibilité jonctionnelle	19
Figure 7: Représentation schématique du mode d'action des anticorps naturels. ....	24
Figure 8: Représentation du récepteur des lymphocytes B. ....	27
Figure 9: Activation des lymphocytes B-2. ....	30
Figure 10: Organisation et réarrangement des segments géniques du TCR.....	32
Figure 11: Représentation du récepteur des lymphocytes T. ....	33
Figure 12: Représentation schématique de la chaîne lourde des immunoglobulines de la souris QM. ....	37
Figure 13: Représentation schématique de la chaîne lourde des immunoglobulines de la souris HC1. ....	38
Figure 14: Image en microscopie électronique du VSV. ....	44
Figure 15: Représentation schématique du VSV. ....	44
Figure 16: Représentation schématique de la réponse immunitaire de la souris générée contre le VSV.....	47
Figure 17: Image en microscopie électronique du LCMV. ....	48
Figure 18: Représentation schématique du LCMV. ....	49
Figure 19: Représentation schématique de la réponse immunitaire générée contre le LCMV.....	52
Figure 20: Détermination de la quantité totale d'anticorps naturels produits par les souris AID <sup>-/-</sup> , C57BL/6, QM, HC1, RAG-1 <sup>-/-</sup> et J <sub>H</sub> T. ....	73
Figure 21: Spécificité de liaison des anticorps naturels au VSV et LCMV.....	75

Figure 22: Dissémination de VSV-IND dans la rate, le foie, les reins et le sang à différents temps post-infection. ....	81
Figure 23: Dissémination de LCMV-WE dans la rate, le foie, les reins et le sang à différents temps post-infection. ....	83
Figure 24 : Immunobuvardage de type Western sur les fractions positives issues de la purification par chromatographie d'affinité de sérum de souris C57BL/6 naïves. ....	85
Figure 25 : Dissémination de LCMV-WE dans la rate, le foie, les reins et le sang à 24 heures post-infection chez des souris J <sub>H</sub> T ayant reçu des IgM purifiés. ....	87
Figure 26 : Dissémination de LCMV-WE dans la rate, le foie, les reins et le sang à 24 heures post-infection chez des souris HC1 ayant reçu des IgM purifiés. ....	88
Figure 27 : Activité cytotoxique des lymphocytes T des différentes souris transgéniques. ....	91
Figure 28 : Optimisation de la quantité de splénocytes de souris P14 à transférer à des souris J <sub>H</sub> T. ....	94
Figure 29 : Activité cytotoxique des lymphocytes T des souris J <sub>H</sub> T suite à un transfert d'IgM purifiés. ....	96
Figure 30 : Titres en anticorps neutralisants chez des souris J <sub>H</sub> T ayant reçu des anticorps naturels. ....	99
Figure 31 : Titres en anticorps neutralisants IgG chez des souris J <sub>H</sub> T ayant reçu des anticorps naturels. ....	100
Figure 32 : Survie des souris suite à l'infection avec VSV-IND. ....	101

## Liste des tableaux

Tableau 1: Estimation de la diversité combinatoire du répertoire primaire de la souris .....	21
Tableau 2 : Détermination de la proportion de lymphocytes B-1a dans la cavité péritonéale de chacune des souris transgénique des souris témoins C57BL/6. ....	72
Tableau 3: Titre en anticorps naturels neutralisant des différentes souris transgéniques. ....	77

## Remerciements

Ma maîtrise a été une grande aventure avec plusieurs joies mais aussi, plusieurs obstacles à franchir. J'ai eu la chance d'être entourée de nombreuses personnes qui ont été d'une aide ainsi que d'un support extraordinaire et que je tiens à remercier.

Bien entendu, en premier lieu, je veux remercier mon directeur de recherche, Alain Lamarre. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance dans mon projet, d'avoir considéré certaines de mes idées, d'avoir eu la patience de m'expliquer des concepts et de m'avoir laissé beaucoup de liberté dans mon projet. Le début n'a pas été facile mais je me rends compte maintenant à quel point j'ai appris davantage de cette façon.

Une autre très grande partie de ma gratitude va à notre associée de recherche, Esther Tarrab. Esther a non seulement été d'une aide technique incroyable (ce que j'aimerais en connaître autant!!!) mais aussi, d'un support moral qui m'a incité à poursuivre en recherche.

J'aimerais aussi remercier les deux étudiantes que j'ai eu la chance de superviser, Bélanda Akué et Tania Charpentier qui m'ont aidé à générer des résultats et qui m'ont appris bien des choses! De plus, je ne peux passer sous silence le support de mes nombreux collègues de laboratoire, passés et présents : Marie-Hélène Côté, Patrick Lacasse, Maude Bigras, Véronique Bougie, Emmanuel Moreau, Marie-Ève Bilodeau et Isabelle Poirier. Plus particulièrement, j'aimerais remercier Véronique et Emmanuel pour l'aide technique et pour les nombreuses conversations enrichissantes que nous avons eues. Merci aussi à Francine Lambert, Hélène Jacomy, Gabriel Marceau, Marcel Desrosiers et Louise Wilson pour avoir répondu à toutes mes questions et m'avoir donné plusieurs conseils.

Finalement, plusieurs personnes extérieures au laboratoire m'ont soutenue et je leur en suis très reconnaissante. Dans ma session de cours théoriques, j'ai eu la

chance d'étudier avec des personnes formidables avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir par la suite. De ceux-ci, je pense particulièrement à François B, Luc et PO qui ont enrichi mes nombreuses heures passées à l'institut!!!! Je remercie aussi mes parents pour leur support et leurs encouragements. Finalement, je veux aussi remercier mon copain Jean-François lui aussi pour son soutien, pour m'avoir écouté, et m'avoir réconforté dans les moments difficiles.

## Liste des abréviations

- °C : degré Celcius  
ψME : ψ-mercaptoéthanol  
μg : microgramme  
μL : microlitre  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AID : *activated induced cytidine deaminase*  
ARN<sub>m</sub> : acide ribonucléique messenger  
ATCC : American Type Culture Collection  
BCR : *B-cell receptor*  
BHK : *baby hamster kidney*  
CDR : *complementarity determining region*  
C<sub>H</sub> : constant heavy  
C<sub>L</sub> : constant light  
BLIMP-1 : *B lymphocyte-induced maturation protein 1*  
CMH I : molécule de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité  
CMH II : molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
CTL-P : précurseur des lymphocytes T cytotoxiques  
D : diversité  
ELISA : enzyme-linked immunoabsorbant assay  
Fc : fragment Fc de la molécule d'Ig (fragment cristallisable)  
GP : glycoprotéine  
HBSS : *Hank's Balance Salt Solution*  
HCl : acide chlorhydrique  
HCV : virus de l'hépatite C  
HSV : virus de l'herpès simplex  
Ig : immunoglobuline  
IgG : immunoglobuline G

IgM : immunoglobuline M  
IL : interleukine  
INF : interféron  
iv : intraveineuse  
J<sub>H</sub> : jonction *heavy*  
J<sub>L</sub> : jonction *light*  
Kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
LCMV: *lymphochoriomeningitidis virus* (virus de la chorioméningite lymphocytaire)  
LCMV-WE : virus de la chorioméningite lymphocytaire souche WE  
LPS : lipopolysaccharides  
MEM : *Modified Essential Medium*  
mL: millilitre  
mm: millimètre  
M : matrice (protéine de la matrice)  
MOI: *multiplicity of infection* (multiplicité d'infection)  
NK: natural killer  
nm: nanometre  
NP: 4-hydroxy-3-nitrophényl acétyl  
NP : nucléoprotéine  
P : palindromique  
p/v : poids /volume  
pb : paire de base  
PBS : *Phosphate Balance Solution* (tampon phosphate)  
PCR : *polymerase chain reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)  
p-i : post-infection  
Pré-B : lymphocyte précurseur B  
Pro-B : lymphocyte progéniteur B  
QM : quasimonoclonal  
RAG : *recombination-activating gene*  
RNP: ribonucléoprotéine

RSS: *recombination signal sequence*  
SG: segment génique  
SHP : *Sarc homology protein*  
SBF: sérum bovin fœtal  
TCR : *T cell receptor* (récepteur des lymphocytes T)  
TD : thymo-dépendant  
TI : thymo-indépendant  
TdT: désoxynucléotidyle transférase terminale (*terminal deoxytransferase*)  
uff : unité formatrice de foyer infectieux  
ufp : unité formatrice de plage  
v/v : volume / volume  
V<sub>H</sub> : variable *heavy*  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
V<sub>L</sub> : variable *light*  
VSV-IND : virus de la stomatite vésiculaire sérotype Indiana

## Introduction

Les infections virales sont classifiées en deux catégories selon les dommages faits aux cellules hôtes et la persistance qu'ils peuvent établir. Tout d'abord, certains virus, souvent cytopathiques, peuvent causer des infections aiguës. Ce type d'infection est caractérisé par une réplication virale rapide mais aussi, par une réponse immunitaire prompte, principalement de type humorale, qui est cruciale pour le contrôle de la virémie. Des exemples bien connus sont le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) chez la souris, le virus de l'influenza et le virus Ebola, chez l'humain. Par opposition, certains virus, généralement peu ou pas cytopathiques, ont tendance à persister chez leur hôte, causant des infections chroniques. Ce type d'infection est généralement contrôlé par une réponse de type cellulaire qui est essentielle au contrôle de la virémie mais qui réussie rarement à éliminer le virus. Chez la souris, le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) tend à persister, de même que le virus de l'hépatite C (HCV) et le virus de l'immunodéficience acquise (VIH), chez l'humain (Hangartner *et al*, 2006).

Puisque les réponses immunitaires adaptatives, médiées par les lymphocytes B-2 et T prennent quelques jours à s'établir, il apparaît important que les premières lignes de défense, médiées par l'immunité innée, soient aptes à réagir promptement suite à une infection. Cette protection est principalement fournie par les phagocytes (macrophages, cellules dendritiques), par la production d'interférons de type I mais aussi, par une sous-population de lymphocytes B : les lymphocytes B-1 (Malmgaard, 2004; Ochsenein *et al*, 2000; Le Page *et al*, 2000). Ces derniers sont principalement localisés dans les cavités pleurales et péritonéales où ils peuvent sécréter, de façon spontanée des anticorps. Puisque la sécrétion se fait sans rencontre avec un antigène, ils ont été nommés « anticorps naturels ».

Plusieurs études ont démontré que les anticorps naturels avaient un effet protecteur suite à une infection (Ochsenein *et al*, 1999; Jayasekera *et al*, 2006;

Harandi *et al*, 2001) soit par la neutralisation directe des pathogènes ou grâce à la formation de complexes immuns. En effet, il a déjà été démontré que les antigènes étaient plus facilement recrutés vers les organes lymphoïdes lorsqu'ils étaient sous forme de complexes immuns (Youd *et al*, 2002; Ferguson *et al*, 2004). Puisque les anticorps naturels ne subissent pas de maturation d'affinité supplémentaire que celle fournie dans la lignée germinale, ceux-ci dépendent donc de ces processus de diversification afin de reconnaître un très grand nombre de pathogènes qui sont parfois très distincts les uns des autres (Kantor *et al*, 1997; Qin *et al*, 1999).

Conséquemment, nous avons émis comme hypothèse que la diversité générée par ces processus était essentielle pour une reconnaissance efficace des virus, VSV et LCMV, pour leur neutralisation, ainsi que pour le recrutement vers les organes lymphoïdes. Pour ce faire, nous disposons de modèles murins ayant, à différents degrés, des lacunes dans le répertoire primaire de leurs lymphocytes B. Dans un premier temps, nous avons pu observer que la diversité du répertoire des anticorps naturels est importante pour la reconnaissance efficace des deux virus ainsi que pour la neutralisation du VSV. Par la suite, ces résultats ont été corrélés avec ceux du recrutement viral à la rate. En effet, les souris qui ont un répertoire peu diversifié montrent une charge virale splénique plus faible que les souris témoins. Ceci est en accord avec les résultats précédents puisque ce recrutement est possible en grande partie grâce à la formation de complexes immuns.

Dans un deuxième temps, plusieurs études ont émis comme hypothèse que les anticorps naturels, en permettant un meilleur recrutement des pathogènes vers les organes lymphoïdes permettraient de faire un pont entre l'immunité innée et adaptative (Ochsenbein *et al*, 1999; Ochsenbein *et al*, 2000). Encore une fois, la formation de complexes immuns serait responsable de l'activation du système immunitaire adaptatif. En effet, il a été démontré que les lymphocytes B-2 étaient plus efficacement activés lorsque leur antigène était sous forme de complexe immun (Heyman *et al*, 1985; Heyman *et al*, 1990, Lehner *et al*, 1983). De même, l'activation des lymphocytes T serait aussi améliorée mais cela reste encore controversé (Thornton

*et al*, 1994; Suresh *et al*, 2003, Stager *et al*, 2003). Dans cette partie, nous avons émis comme hypothèse que la présence et la diversité des anticorps naturels était importante dans l'induction de la réponse humorale, médiée par les lymphocytes B-2 et de la réponse cytotoxique, médiée par les lymphocytes T. Dans un premier temps, nous avons voulu évalué le rôle des anticorps naturels dans l'induction d'une réponse des lymphocytes T cytotoxiques en utilisant le modèle d'infection avec LCMV qui induit généralement une réponse maximale à 8 jours post-infection (Kagi *et al*, 1994 ; Guidotti *et al*, 1999). Pour ce faire, l'activité cytotoxique de souris possédant des anticorps naturels par opposition à d'autres qui n'en possédaient pas a été comparée. Étonnamment, nous n'avons pu observer de lien entre la présence d'anticorps naturels et une meilleure induction de la réponse cellulaire des lymphocytes T. Toutefois, plusieurs études restent encore à être effectuées afin d'infirmer le rôle des anticorps naturels dans l'induction d'une réponse cytotoxique. Finalement, nous avons évalué le rôle des anticorps naturels dans l'induction d'une réponse humorale des lymphocytes B-2. À cette fin, nous avons utilisé le modèle d'infection avec VSV qui induit une forte production d'IgM neutralisants, environ de 3 à 4 jours post-infection, suivit d'une forte réponse en IgG neutralisants, survenant généralement 8 jours post-infection (Leist *et al*, 1987; Kalinke *et al*, 1996 ; Lefrancois *et al* 1982). Des souris avec ou sans anticorps naturels ont été comparées dans leur capacité à induire une réponse humorale. Bien que les différences étaient modestes, il a été possible de noter que la présence d'anticorps naturels semblait jouer un rôle dans l'induction rapide d'IgM neutralisants.

En conclusion, ces études démontrent que la pleine diversité des anticorps naturels est importante pour une reconnaissance efficace des virus ainsi que pour leur neutralisation. De plus, nous avons pu observer qu'un répertoire diversifié était important pour un recrutement des particules virales plus rapide et plus efficace vers les organes lymphoïdes. Finalement, nous avons pu démontrer l'existence d'un lien entre la présence d'anticorps naturels et l'induction d'une réponse humorale des lymphocytes B-2. Bien que plusieurs de ces résultats restent préliminaires, ces études sont les prémices pour un grand nombre de recherches approfondies dans le domaine de l'immunologie et de la virologie puisque les deux modèles viraux utilisés

constituent d'excellents modèles pour des virus causant d'importants problèmes en santé publique.

# Chapitre 1

## Revue de littérature

### 1 Lymphocytes B-1

#### 1.1 Ontogénèse des lymphocytes B-1

Le développement des lymphocytes B-1 survient majoritairement lors de la vie foetale et péri-natale, contrairement aux lymphocytes B-2 qui sont principalement produits après la naissance et qui continueront à être générés pendant toute la vie adulte (Kantor *et al*, 1993 ; Hardy *et al*, 1991 ; Herzenberg *et al*, 2000).

Plusieurs débats ont eu lieu quant à savoir si les lymphocytes B-1 et B-2 avaient ou non les mêmes progéniteurs. Afin de répondre à cette question, deux hypothèses ont été émises soit, d'une part, que le progéniteur des lymphocytes B-1 et B-2 était le même mais donnait naissance aux deux types de lymphocytes selon les stimuli du milieu. D'autre part, il a aussi été émis comme hypothèse que les lymphocytes B-1 et B-2 possédaient deux progéniteurs différents (Berland *et al*, 2002).

Tout d'abord, l'hypothèse de l'induction provient d'études qui démontraient que lorsque l'on stimulait le récepteur des lymphocytes B-2 (BCR) en absence d'antigène, d'aide des lymphocytes T et de liaison à la molécule de CD40, il y avait génération de lymphocytes B qui possédaient des caractéristiques des lymphocytes B-1 tel que l'apparition du récepteur LY-1 (ou CD5) (Cong *et al*, 1991; Wortis *et al*, 1995). De plus, cette même équipe avait remarqué que la liaison au BCR ainsi que la stimulation avec l'interleukine-6 (IL) apportaient deux autres caractéristiques des lymphocytes B-1, à savoir la régulation à la baisse de CD23 et de l'immunoglobuline D (Ig). Toutefois, n'ayant jamais réussi à induire un phénotype complet des lymphocytes B-1 *in vitro*, cette hypothèse a été mise de côté.

L'autre hypothèse ayant retenu beaucoup d'attention ces dernières années est celle qui stipule que les lymphocytes B-1 et B-2 auraient des progéniteurs différents. Celle-ci émerge d'études de transplantation démontrant que les tissus hématopoïétiques provenant de fœtus ou d'adulte permettaient de régénérer différentes populations chez les souris receveuses. En effet, lorsque les cellules de foie fœtal étaient transférées, il y avait une repopulation efficace des lymphocytes B-1 mais pas des lymphocytes B-2. Alternativement, lorsque des cellules de moelle osseuse de souris étaient transférées aux souris receveuses, il y avait régénération de la population de lymphocytes B-2 mais pas de lymphocytes B-1. Ces observations ont donc laissé croire que les deux types de lymphocytes provenaient de deux progéniteurs différents qui n'était pas présents au même moment dans le développement (Kantor *et al*, 1992; Kantor *et al*, 1993). Finalement, il a été admis que des précurseurs des lymphocytes B-1 pouvaient être présents dans la moelle osseuse des souris adultes mais en faible quantités (Herzenberg *et al*, 2006).

Récemment, des évidences pour ce dernier modèle ont été fournies par la découverte d'un nouveau progéniteur des lymphocytes B, identifié par l'expression des marqueurs suivants : Lin<sup>-</sup> CD45R<sup>-/lo</sup> CD19<sup>+</sup> (Montecino-Rodriguez *et al*, 2006). Cette équipe a démontré que ce progéniteur pouvait conduire à une repopulation des lymphocytes B-1 chez des souris immunodéficientes. Finalement, il est présent dans le foie, à l'âge fœtal seulement et dans la moelle osseuse, à l'âge fœtal et adulte (en faible fréquence). Le développement des lymphocytes B-1 est schématisé à la figure 1.

Malgré ces dernières études, il n'est toutefois pas encore possible d'éliminer totalement l'impact de certains signaux et des antigènes présents pour la génération des lymphocytes B-1. En effet, une fois le progéniteur des lymphocytes B-1 produit, il peut y avoir génération de deux sous-populations différentes, soit les lymphocytes B-1a et B-1b tel que représenté à la figure 1. Les mécanismes gouvernant cette différenciation ne sont pas encore bien compris. Toutefois, il a été remarqué que les progéniteurs Lin<sup>-</sup> CD45R<sup>-/lo</sup> CD19<sup>+</sup> présents dans la moelle osseuse donnait

préférentiellement naissance aux B-1b tandis que ceux présents dans les cavités pleurales et péritonéales donnaient plutôt naissance aux B-1a. Il est donc possible que la différence dans les microenvironnements de la moelle osseuse et la cavité péritonéale influence le sort des progéniteurs des lymphocytes B-1 (Montecino-Rodriguez *et al*, 2006).

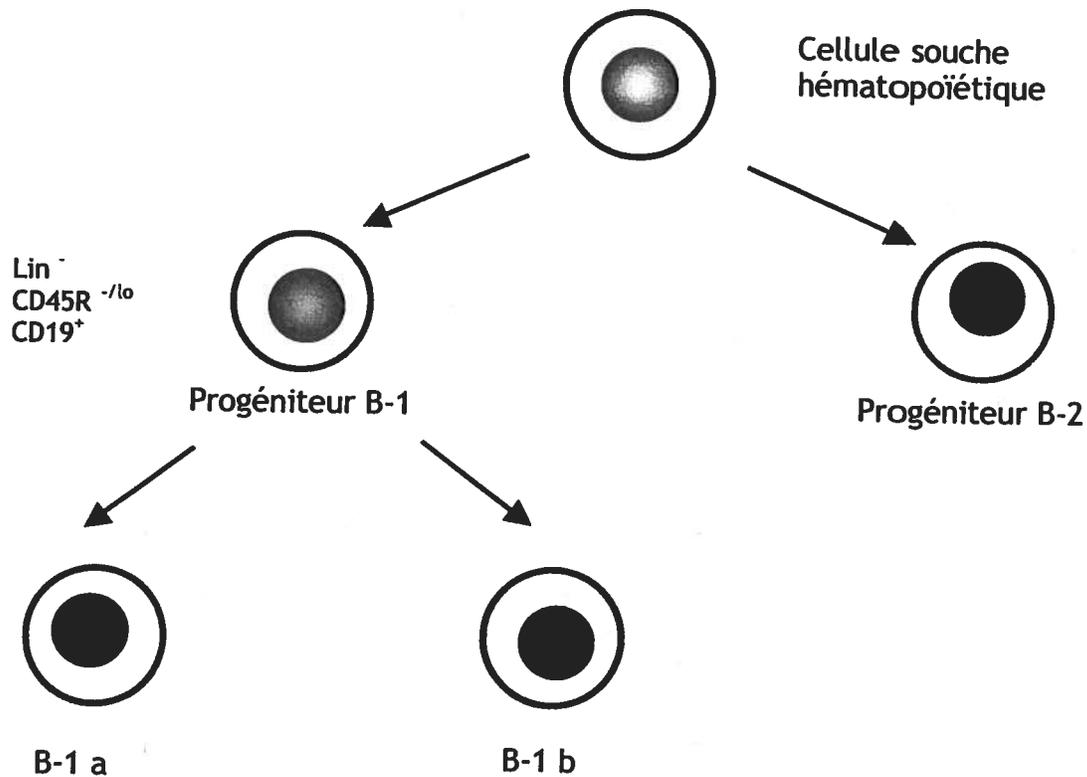


Figure 1: Développement des lymphocytes B-1

### 1.2 Sous-populations des lymphocytes B-1

Les différentes sous-populations de lymphocytes B-1 se distinguent principalement par l'expression de marqueurs de surface, mais aussi, par leur fonction. Comme il l'a été mentionné à la section précédente, il existe deux sous-populations qui sont plus caractérisées : les lymphocytes B-1a et les lymphocytes B-1b se distinguant par la présence de LY-1 chez la première et son absence, chez la deuxième.

Les lymphocytes B-1a sont localisés principalement dans les cavités pleurales et péritonéales où elles constituent une population auto-renouvelable (Baumgarth *et al*, 2005). Ils sont la principale source d'anticorps naturels, c'est-à-dire des anticorps qui sont présents dans le sérum de souris naïves en absence d'immunisation. En effet, les lymphocytes B-1a ne semblent pas sécréter d'anticorps suite à une stimulation antigénique, sauf dans quelques exceptions (Kawikova *et al*, 2004).

Les lymphocytes B-1b, quant à eux, sont principalement localisés dans la rate. Contrairement aux lymphocytes B-1a, ils sécrètent peu ou pas d'anticorps naturels mais sont plutôt impliqués dans les réponses suite à une stimulation antigénique. En effet, certaines études ont démontré leur importance dans la lutte contre certaines bactéries, telles que *Streptococcus pneumoniae* et certains parasites (Alugupalli *et al*, 2005; Haas *et al*, 2005).

Finalement, une troisième sous-population de lymphocytes B-1 aurait été mise en évidence récemment. Bien que sa fonction soit encore inconnue, elle serait localisée dans la cavité péritonéale et se distinguerait des lymphocytes B-1a par l'absence de Mac-1 à sa surface. Puisqu'il s'agit de la troisième sous-population à être identifiée, elle a été nommée B-1c (Hastings *et al*, 2006).

### 1.3 Signaux déterminants la localisation des lymphocytes B-1

Comme il l'a été mentionné dans la section précédente, chaque sous-population de lymphocytes B-1 se distinguent par leurs fonctions, par l'expression de certains marqueurs de surface mais aussi, par leur localisation dans l'organisme. Plusieurs études ont été effectuées afin de comprendre les signaux qui guidaient cette localisation.

Deux récepteurs de chimiokines ont été découverts comme étant importants dans la localisation des populations de lymphocytes B-1a aux cavités pleurales et péritonéales. Tout d'abord, l'expression de la molécule CXCR5 semble être cruciale

puisque des souris CXCR5<sup>-/-</sup> démontrent une absence complète de lymphocytes B-1 dans la cavité péritonéale. De plus, l'expression du récepteur CXCR7 semble aussi être importante, mais partiellement, car les souris déficientes en ce récepteur démontrent une population de lymphocytes B-1 réduite dans la cavité péritonéale. Bref, ceci laisse croire que CXCR7 est important pour la localisation des lymphocytes B-1a dans la cavité péritonéale quoique le rôle dominant est médié par CXCR5 (Hopken *et al*, 2004).

#### 1.4 Activation et sécrétion des anticorps naturels par les lymphocytes B-1

Les lymphocytes B-1 ne sont pas activés suite à une agrégation de leur récepteur. L'état de non-réponse peut être attribué, en partie, à la présence de la molécule LY-1 (Bikah *et al*, 1996). En effet, celle-ci s'associerait de façon constitutive à la *Sarc homology protein 1* (SHP-1) qui a pour effet de bloquer l'efflux de Ca<sup>2+</sup>, l'activation des facteurs nucléaires de la famille  $\psi$ -B ainsi que la prolifération des cellules suite à l'agrégation du récepteur (Sen *et al*, 1999; Kohler *et al*, 2003).

Cependant, la caractéristique particulière des lymphocytes B-1 qui nous intéressera particulièrement est leur capacité à sécréter des anticorps en absence de stimulation antigénique (Hayakawa *et al*, 1983; Forster *et al*, 1987; Wardemann *et al*, 2002). Cette particularité serait permise par la présence de *B lymphocyte-induced maturation protein 1* (Blimp-1) qui n'est normalement pas exprimé dans les lymphocytes B naïfs mais qui est responsable de l'activité sécrétrice des plasmocytes. En effet, il a été remarqué que les souris naïves déficientes en Blimp-1 avaient un taux d'anticorps sérique dramatiquement diminué (Forster *et al*, 1987 ; Shapiro-Shelef *et al*, 2003 ; Savitsky *et al*, 2006). La présence de Blimp-1 servirait à réprimer Pax-5 qui réprime lui-même une protéine nommée XBP-1 (Lin *et al*, 2002). Lorsque XBP-1 est fonctionnelle, elle agit comme facteur de transcription dans le programme de sécrétion des immunoglobulines. De même, il a été remarqué que des souris déficientes en XBP-1 possédaient des lymphocytes B-1 qui ne sécrétaient pas

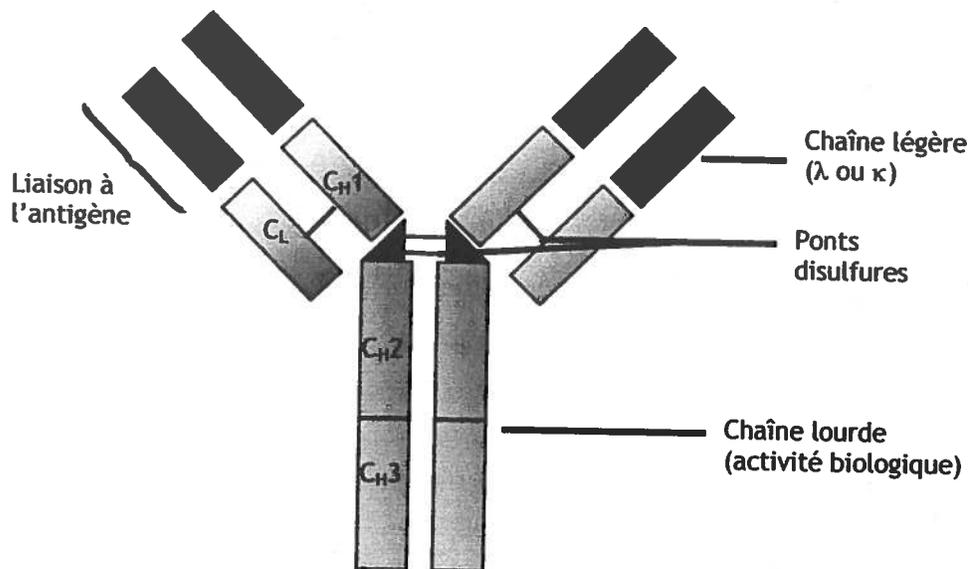
d'anticorps. En conclusion, la présence de Blimp-1 ainsi que XBP-1, qui est importante pour les plasmocytes, est cruciale pour l'activité sécrétrice des lymphocytes B-1.

## 2 Anticorps naturels

### 2.1 Structure des immunoglobulines

Les Ig sont des glycoprotéines présentes à la surface des lymphocytes B qui fixent les antigènes ou qui peuvent être sécrétées par des lymphocytes B à un stade de différenciation plus avancé, soit les plasmocytes. Les Ig présentes à la surface des lymphocytes B, les Ig membranaires, servent de récepteurs et confèrent aux lymphocytes leur spécificité antigénique. Les Ig sécrétées, quant à elles, permettent de lier les pathogènes ou leurs produits toxiques dans les espaces extracellulaires du corps et est la principale fonction effectrice des lymphocytes B.

La structure de base des immunoglobulines est composée de quatre chaînes polypeptidiques, soit deux chaînes légères (L), d'une masse moléculaire d'environ 25 000 Daltons (ou 25 kDa) et deux chaînes lourdes (H) d'une masse de 50 kDa, tel que démontré à la figure 2. Chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde par un pont disulfure (liaison covalente forte) et un ensemble de liaisons non covalentes comme des liaisons salines, hydrogènes et hydrophobes (Edelman *et al*, 1961; Edelman *et al*, 1961).



**Figure 2:** Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline de type IgG ( $V_L$  = région variable légère (*light*),  $V_H$  = région variable lourde (*heavy*),  $C_L$  = région constante légère,  $C_H$  = région constante lourde).

Ces mêmes interactions permettent de relier les combinaisons chaînes lourdes-légères à son homologue, permettant ainsi de former la structure à quatre chaînes des Ig. Finalement, pour une molécule d'anticorps donné, les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères sont identiques, donnant à la molécule d'anticorps deux sites de liaison à l'antigène, et donc, la capacité de fixer simultanément deux structures identiques.

Les chaînes légères peuvent être de deux types, soit  $\lambda$  ou  $\kappa$ . La chaîne légère d'une immunoglobuline peut être soit d'un type ou de l'autre mais jamais les deux en même temps en raison d'un phénomène d'exclusion allélique. Aucune différence fonctionnelle n'a été dénotée entre les deux chaînes  $\lambda$  ou  $\kappa$  mais il a été remarqué que le rapport des deux types de chaînes variaient d'une espèce à l'autre. Par exemple, chez la souris, le rapport  $\kappa/\lambda$  est de 20 :1 tandis que chez l'humain, il est de 2 :1 (Butler *et al*, 1997). La raison de cette variation est inconnue.

D'un autre côté, la chaîne lourde d'un anticorps permet de définir la classe, et donc, la fonction des immunoglobulines. Il existe cinq classes principales, soit les IgM, IgD, IgG, IgA et IgE. La chaîne lourde est désignée par la lettre grecque correspondante ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  et  $\varepsilon$  respectivement). De plus, la classe des IgG peut être subdivisée en quatre sous-classes, soit IgG1, 2, 3 et 4. Les propriétés fonctionnelles caractéristiques de chaque classe sont liées à la partie carboxyterminale de la chaîne lourde qui n'est pas associée à la chaîne légère.

Parmi ces caractéristiques, une fonction particulière attirera notre attention, soit la capacité des IgM de former des complexes pentamériques. Ceux-ci sont constitués de cinq sous-unités monomériques disposées de façon à ce que les régions  $F_c$  soient au centre du pentamère et que les dix sites de liaison à l'antigène soient à la périphérie de la molécule. Chaque pentamère contient un polypeptide nommé chaîne J qui est uni par des liaisons disulfure au résidu cystéine carboxy-terminal de deux des dix chaînes  $\mu$ , comme démontré à la figure 3.

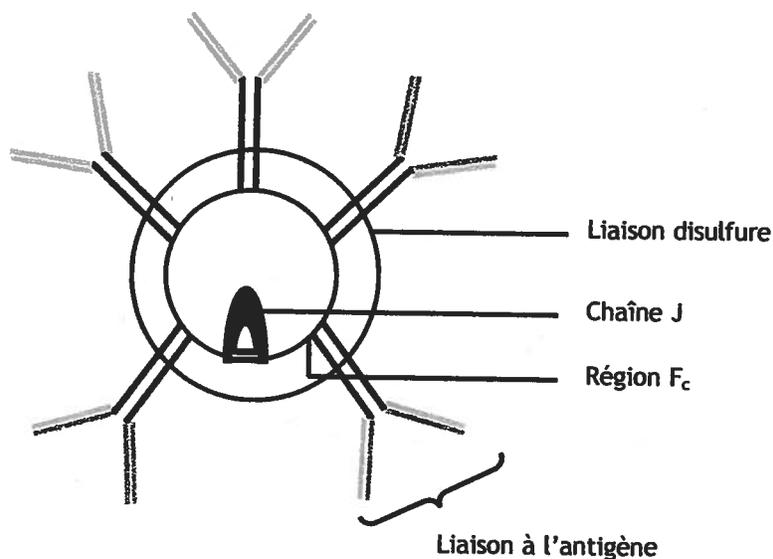


Figure 3: Représentation schématique d'une molécule d'IgM

Cette caractéristique des IgM leur permet d'avoir une plus grande valence que les autres isotopes. En effet, une molécule d'IgM peut lier dix petites molécules

d'haptène; cependant, pour des raisons d'encombrement stérique, seulement 5 molécules d'un antigène plus gros peuvent se lier simultanément. Bref, en raison de sa valence élevée, la molécule d'IgM est plus efficace que les autres isotypes dans la liaison des antigènes multidimensionnels tels que les particules virales. En effet, pour neutraliser un virus, il faut moins de molécules d'IgM que d'IgG et elle est plus efficace pour activer le complément. Toutefois, en raison de sa grande taille, la molécule d'IgM diffuse mal au travers des muqueuses. Néanmoins, la présence de la chaîne J permet à l'IgM de se lier aux récepteurs des cellules sécrétrices qui la transportent à travers des bordures épithéliales vers les sécrétions externes qui baignent les muqueuses (Carayannopoulos *et al*, 1993).

Les chaînes lourdes et légères sont composées de deux parties distinctes, soit la région variable (V) et la région constante (C). Les régions variables sont localisées dans les 110 premiers acides aminés de la région N-terminale des chaînes lourdes et légères ( $V_H$  pour la région variable de la chaîne lourde et  $V_L$  pour la région variable de la chaîne légère). C'est cette région qui détermine la spécificité de la liaison des anticorps à leur antigène. Toutefois, la diversité n'est pas également répartie tout au long de la chaîne variable mais est concentrée à différents endroits nommées régions de complémentarité (CDR, *complementarity determining region*) où se fait, à proprement parlé, la liaison à l'antigène (Davies *et al*, 1990). Les segments situés entre ces régions de haute variabilité, qui constituent le reste de la région V, montrent moins de variabilité et forment une charpente (*framework regions*) dans lequel les différentes parties hypervariables sont localisées.

Les CDR ont été divisés en trois régions, nommées CDR1 à CDR3. La partie la plus variable des immunoglobulines est localisée dans la région CDR3 qui englobe les acides aminés 92 à 103 (Davis *et al*, 1988). Finalement, en plus de son rôle important dans la liaison à l'antigène, la région CDR3 offre la structure la plus diversifiée de l'anticorps, tant en forme qu'en longueur (Chothia *et al*, 1987; Chothia *et al*, 1989; Xu *et al*, 2000).

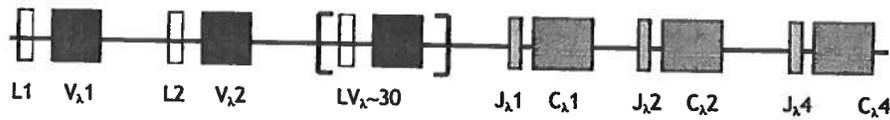
## 2.2 Organisation des gènes des immunoglobulines

La capacité des anticorps à reconnaître leur antigène peut être attribuée à plusieurs facteurs qui seront décrits à la section 2.4. Toutefois, la grande partie de la diversité pouvant être acquise peut être attribuée à l'organisation des gènes de la lignée germinale des lymphocytes B.

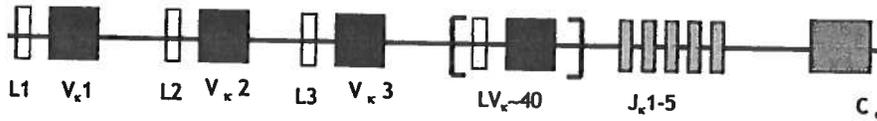
Les chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  et les chaînes lourdes sont codées par des familles multigéniques situées sur différents chromosomes. Dans l'ADN (acide désoxyribonucléique) des cellules germinales, les familles géniques sont composées de régions codantes, nommées segments géniques, séparés par des régions non-codantes.

Le génome des familles des chaînes légères est composé de segments géniques V (*variable*), J (*joining*) et C (*constant*). Quant à lui, le génome de la famille de la chaîne lourde contient une famille de segment de plus, soit le segment D (*diversity*). L'organisation génique de chacune des chaînes est illustrée à la figure 4. Dans chacune des familles, le segment C code pour la partie constante et les segments V, J et D permettront de créer de la diversité. Finalement, ces gènes seront réarrangés et réunis afin de former une molécule d'Ig fonctionnelle.

### Locus de la chaîne légère $\lambda$



### Locus de la chaîne légère $\kappa$



### Locus de la chaîne lourde



**Figure 4:** Organisation génique des chaînes lourdes et légères (L = séquence *leader*, V = segment variable, J = segment jonction, C = segment constant).

## 2.3 Réarrangement des gènes des immunoglobulines

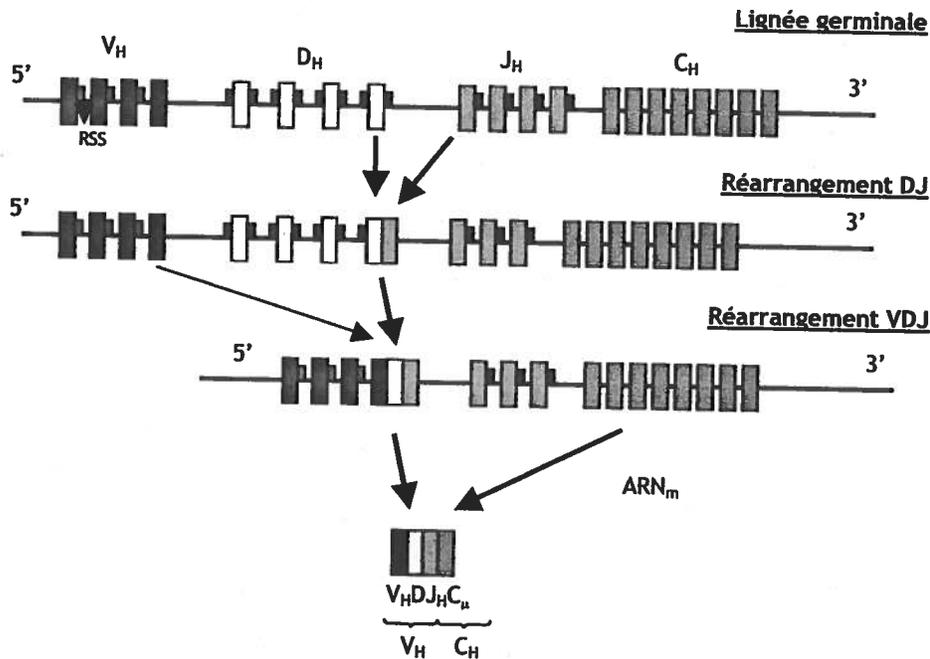
Le réarrangement des gènes des immunoglobulines s'opère selon une séquence ordonnée lors de la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse (Tonegawa *et al*, 1983). Les gènes des régions variables des chaînes lourdes sont les premiers à se réarranger puis ce sont ceux des régions variables des chaînes légères. À la fin du processus, chaque anticorps d'un lymphocyte B contient une unique séquence fonctionnelle dans la région variable de la chaîne lourde et dans la chaîne légère. Le processus de réarrangement génique peut être divisé en trois étapes. La réalisation de chacune de ces étapes est dépendante de la précédente.

Tout d'abord, il y a initiation de la recombinaison. Le principal acteur à cette étape est un complexe de deux enzymes : les enzymes RAG-1 et RAG-2 (*recombination activating gene*). Les enzymes vont reconnaître, sur l'ADN, des séquences non codantes et conservées, nommées signaux de recombinaison (RSS) (Sleckman *et al*,

1996). Ces signaux sont constituées d'une séquence conservée de sept nucléotides, d'un espacement long de 12 ou 23 nucléotides, puis d'un nonamère lui aussi conservé (Grawunder *et al*, 2001). L'espacement entre les deux régions conservées est variable mais sa longueur correspond toujours à un ou deux tours de la double hélice d'ADN. Ceci permet aux deux séquences de se trouver du même côté de l'hélice d'ADN et au complexe de se fixer aux séquences (Lewis *et al*, 1994). La recombinaison se fera ensuite selon la règle du 12/23. Cette règle assure que les segments s'assembleront dans le bon ordre et que deux segments du même type ne s'associeront pas ensemble. La seule exception à cette règle est l'association possible entre deux segments D qui survient dans environ 5 % des cas et qui constitue un mécanisme supplémentaire de diversité (Jung *et al*, 2004). Finalement, l'étape d'initiation permet de générer une coupure dans la molécule d'ADN.

Par la suite, il y aura arrangement dans les brins d'ADN. Cette étape implique d'autres coupures dans la molécule d'ADN afin de former les structures en épingle à cheveux. À ce moment, il peut y avoir addition aléatoire de nucléotides supplémentaires. Cette réaction est catalysée par la déoxynucléotidyl-transférase (TdT) et est un processus additionnel de génération de la diversité, tel que décrit à la section 2.4.

Finalement, les étapes d'hybridation et ligation permettront le réappariement des brins d'ADN et leur ligation afin de former une molécule fonctionnelle. Les processus de réarrangements géniques sont représentés à la figure 5.



.Figure 5: Réarrangement des gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines

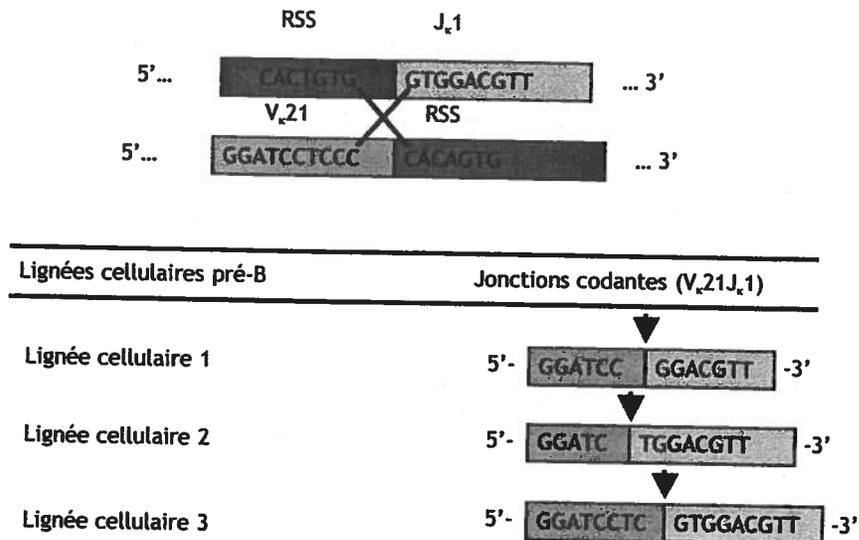
## 2.4 Génération de la diversité du répertoire primaire

Comme nous venons de le voir, la diversité du répertoire des immunoglobulines peut être due, en grande partie, à l'organisation de ses gènes. Toutefois, il existe d'autres mécanismes qui permettent une génération supplémentaire de la diversité. Bien qu'il soit difficile de quantifier la contribution de chacun des processus dans la génération de la diversité, certaines données ont pu être récoltées et une estimation est fournie au tableau 1.

### Flexibilité jonctionnelle

L'énorme diversité qui est générée par l'association aléatoire des différentes chaînes V, D et J est amplifiée par le phénomène de la flexibilité jonctionnelle. En effet, bien que le réarrangement des différents segments se fait toujours de façon ordonnée, le site de liaison exact entre ceux-ci peut varier (illustré à la figure 6). La flexibilité jonctionnelle se situe dans la région CDR3 de l'ADN des chaînes lourdes et

légères (Davis *et al*, 1988). Puisque cette région est importante pour la fixation à l'antigène, la diversité offerte par le phénomène de diversité jonctionnelle apporte une contribution majeure à la génération de la diversité des anticorps.



**Figure 6 :** Représentation schématique du phénomène de la flexibilité jonctionnelle en prenant pour exemple les régions codantes V<sub>κ</sub>21 et J<sub>κ</sub>1.

### Addition de nucléotides P

Lors du réarrangement des segments géniques, une fois le clivage initial de l'ADN effectué, il y a formation d'une structure en épingle à cheveux. Cette structure est par la suite clivée par une endonucléase. Quelques fois, cette coupure peut générer un brin d'ADN simple à une extrémité de la séquence codante. Afin de réparer cette coupure, des enzymes de réparation peuvent ajouter des nucléotides complémentaires au brin, ce qui crée une séquence palindromique : il s'agit de l'addition de nucléotides P. La variation de la position au niveau de laquelle l'épingle à cheveux est coupée conduit donc à une variation au niveau de la séquence codante (Fugmann *et al*, 2000).

### **Addition de nucléotides N**

Les nucléotides N sont ajoutés lors du processus d'appariement des segments D-J ou de V-DJ. Cette réaction est catalysée par l'enzyme TdT (Desiderio *et al*, 1984). Jusqu'à 15 nucléotides peuvent être ajoutés aux jonctions des segments. Puisque cette diversité se produit au niveau des jonctions codantes V-D-J, elle est localisée dans la région CDR3 des gènes des chaînes lourdes, c'est-à-dire au site de liaison de l'antigène. La chaîne légère, quant à elle, ne comporte pas de nucléotides N puisque l'expression de la TdT cesse avant le réarrangement des chaînes légères (Benedict *et al*, 2000; Bentolila *et al*, 1999)

### **Hypermutation somatique**

Le seul mécanisme qui n'est pas fourni par les mécanismes de réarrangements des segments géniques de la lignée germinale est l'hypermutation somatique. Ce processus prend lieu principalement dans les organes lymphoïdes, plus précisément au niveau des centres germinatifs, suivant l'infection. L'hypermutation somatique est ciblée vers les régions V réarrangées autour des régions des segments VJ ou VDJ. La fréquence de ce phénomène est d'environ de  $10^{-3}$  par paire de bases et par génération (Rajewsky *et al*, 1987). Ceci implique qu'à chaque division cellulaire, il y aura environ une mutation d'introduite.

Le mécanisme d'hypermutation somatique n'est pas encore complètement bien compris. Toutefois, il a été observé que les mutations sont des substitutions de nucléotides plutôt que des délétions ou des insertions. De plus, ces substitutions se font par hasard, mais pas complètement. En effet, des données suggèrent que certaines séquences palindromiques pourraient être particulièrement sensibles au processus d'hypermutation somatique.

	Chaînes légères		
	Chaîne lourde	$\kappa$	$\lambda$
V	134	85	2
D	13	0	0
J	4	4	3
Jonction combinatoire V-D-J et V-J (nombre possible de combinaisons)	$134 \times 13 \times 4$ = 6 968	$85 \times 4$ = 340	$2 \times 4$ = 8
Association combinatoires possibles des chaînes lourdes et des chaînes légères	$6\,968 \times (340 + 8)$ = $2,41 \times 10^6$		

**Tableau 1:** Estimation de la diversité combinatoire du répertoire primaire de la souris (Goldsby et al, 2001). En raison de la diversité apportée par la flexibilité jonctionnelle, l'addition de nucléotides P et N et de l'hypermutation somatique, le potentiel réel.

## 2.5 Répertoire primaire des anticorps naturels

Malgré tous ces mécanismes possibles de diversification du répertoire primaire, il a été remarqué que les anticorps naturels ne semblaient pas posséder certains d'entre eux.

Tout d'abord, il a été observé que les anticorps naturels avaient moins de variabilité dans la diversité combinatoire par opposition à leur contrepartie produite par les lymphocytes B-2. En effet, il a été remarqué que les lymphocytes B-1 avaient tendance à exprimer davantage certaines combinaisons de segment V ou J. Par exemple, les segments  $V_H11$  et  $V_\kappa9$  sont exprimés par environ 5 à 15 % des lymphocytes B-1 de la cavité péritonéale de la souris et codent pour des anticorps reconnaissant la phosphatidylcholine (Mercolino et al, 1988; Chumley et al, 2002). Par ailleurs, il ne

semble pas y avoir de différence entre l'usage des segments D et la longueur de la région CDR3 comparativement aux lymphocytes B-2.

Par la suite, il a été remarqué que les anticorps naturels sécrétés par les lymphocytes B-1 avaient peu ou pas d'addition de nucléotides N. Cette observation peut s'expliquer par l'ontogénèse des lymphocytes B-1. En effet, comme il l'a été décrit à la section 1.1, les lymphocytes B-1 sont principalement générés au stade foetal du développement. Or, la TdT, qui catalyse la réaction d'ajout de nucléotides N, n'est pas exprimée à ce moment. Les quelques anticorps naturels exhibant des nucléotides N pourraient être expliqués par le fait qu'il existe certains précurseurs des lymphocytes B-1 dans la moelle osseuse à un stade plus tardif du développement (Kantor *et al*, 1997; Gu *et al*, 1990; Berland *et al*, 2002, Benedict *et al*, 1999).

Finalement, il semblerait que les lymphocytes B-1 effectueraient peu ou pas de réarrangements secondaires ni d'hypermutation somatique. Les réarrangements secondaires sont définis comme étant le remplacement de segments V<sub>H</sub> chez des lymphocytes B matures. Cette réaction nécessite l'expression continue des enzymes RAG (Pelanda *et al*, 1997). Néanmoins, il semblerait qu'une faible proportion de lymphocytes B-1 pourraient effectuer des réarrangements secondaires en-dehors des organes lymphoïdes. Ceci pourrait expliquer, en partie, que plusieurs anticorps naturels sont auto-réactifs (Qin *et al*, 1999).

## 2.6 Fonctions des anticorps naturels et effets protecteurs au cours des infections

Les anticorps naturels sont présents dans le sérum naïf de souris, mais aussi, d'humain, non-immunisés (Avrameas, 1991; Herzenberg *et al*, 1993). En effet, il a été possible de trouver, chez l'humain, des anticorps qui étaient capables de reconnaître le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) chez des patients séronégatifs (Lawoko *et al*, 2000). De plus, le même phénomène a pu être observé chez la souris. Par exemple, des anticorps dirigés contre le virus de la stomatite vésiculaire, le virus de la chorioméningite lymphocytaire, le virus vaccinia et la bactérie *Listeria monocytogenes*

ont pu être détectés. Bien entendu, les titres de ces anticorps sont généralement peu élevés, en-dessous de 1 :10, ce qui fait en sorte qu'ils sont souvent considérés comme du bruit de fond dans plusieurs tests immunologiques (Ochsenbein *et al* 1999; Ochsenbein *et al*, 2000).

Les anticorps naturels sont majoritairement d'isotype IgM mais certains anticorps d'isotype IgA et IgG3 ont été décrits (Avrameas, 1991). Ils sont généralement polyréactifs, reconnaissant des structures conservées lors de l'évolution telles que les acides nucléiques, les protéines de choc thermique, les sucres et les phospholipides (Kantor *et al* 1993; Hardy *et al*, 1994, Boes, 2000). En conséquence de leur répertoire restreint, les anticorps naturels sont de faible affinité pour leurs antigènes. Toutefois, en raison de la structure pentamérique des IgM ainsi que par leur forte capacité à activer le système du complément, cette faible affinité peut être compensée.

Plusieurs études ont été effectuées dans le but de déterminer le rôle protecteur des anticorps naturels lors d'une infection (schématisé à la figure 7). Dans un premier temps, les anticorps naturels pourraient avoir un effet protecteur en neutralisant directement les virus ou les bactéries présents dans la circulation (Ochsenbein *et al*, 1999; Gobet *et al*, 1988). En effet, il a été possible d'observer que le virus était davantage présent aux organes lymphoïdes chez les souris de type sauvage, par opposition aux souris sans anticorps naturels, chez qui le virus se retrouvait principalement en périphérie (Ochsenbein *et al*, 1999). Il est alors possible de croire qu'un recrutement plus rapide aux organes lymphoïdes pourrait prévenir une dissémination du virus dans les organes périphériques et limiter ainsi l'infection (Youd *et al*, 2002; Ferguson *et al*, 2004).

Par la suite, il a été observé que des souris qui possédaient des anticorps naturels avaient un taux de survie supérieur aux souris qui en étaient dépourvus suite à une infection au virus de l'influenza (Coutelier *et al*, 1987; Hocart *et al*, 1988, Baumgarth *et al*, 2000; Jayasekera *et al*, 2006). Finalement, il a été remarqué que la présence d'anticorps naturels permettait de contrôler la réplication et l'inflammation

lors d'une infection avec le virus de l'herpès simplex 2 (HSV-2). De plus, lorsque des souris déficientes en anticorps naturels recevaient du sérum de souris naïve, il y avait amélioration des symptômes (Harandi *et al*, 2001). De plus, il a été démontré que la présence d'anticorps naturels prévenait l'établissement d'une encéphalite suite à l'infection au virus de la stomatite vésiculaire. Les souris qui ne possédaient pas d'anticorps naturels succombaient au virus 10 jours post-infection, par opposition aux souris qui en avaient reçu au préalable qui avaient un taux de survie supérieur ou égal à 80 % (Ochsenbein *et al*, 1999). La présence d'anticorps naturels est aussi importante dans le cadre d'infections bactériennes. Par exemple, elle permet de contrôler les infections bactériennes systémiques générées par le modèle de ligature-ponction du caecum (Boes *et al*, 1998). Finalement, les anticorps naturels sont importants pour le contrôle d'une infection à *Streptococcus pneumoniae* (Haas *et al*, 2005).

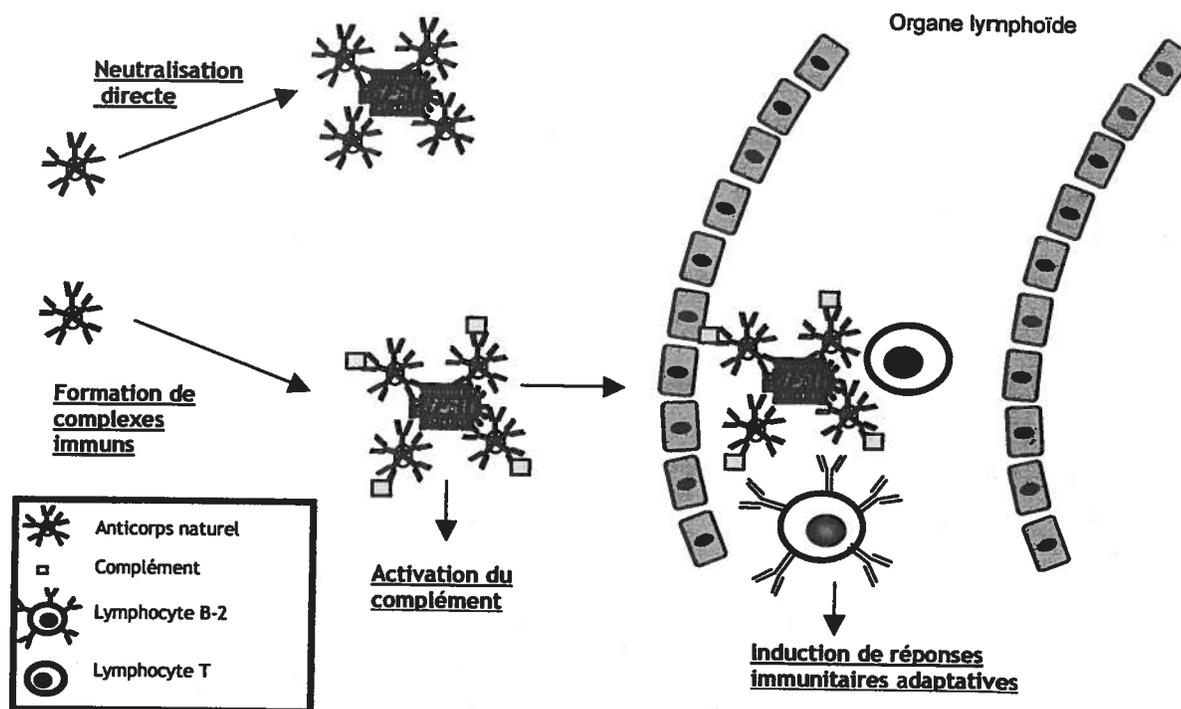


Figure 7: Représentation schématique du mode d'action des anticorps naturels.

Dans un deuxième temps, les anticorps naturels pourraient contribuer à la protection en augmentant l'activité de phagocytose des parasites (Navin *et al*, 1989). De plus, ils permettent de former des complexes immuns. D'une part, il a été démontré que des complexes immuns, formés avec des molécules d'IgM, étaient très efficaces pour activer la voie classique du complément. En effet, un pentamère d'IgM peut activer le complément et lyser un globule rouge, tandis que 1 000 molécules d'IgG sont nécessaires pour le même effet (Cooper, 1985). L'activation de la cascade du complément peut avoir, par la suite, des effets considérables sur le contrôle de l'infection. D'ailleurs, il a été démontré que la formation du complexe de lyse, formé des molécules C5 à C9, est impliqué dans l'élimination de certaines bactéries telles que *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* et *Salmonella typhimurium*. De la même façon, dans les infections virales, la molécule C1q peut lier les rétrovirus tandis que les molécules C3 et C4 peuvent se lier aux virions et ainsi médier plus rapidement la lyse (Figuerola *et al*, 1991; Lachmann *et al*, 1997). D'autre part, de nombreuses études ont démontré que les complexes immuns étaient recrutés plus efficacement aux organes lymphoïdes. Ceci pourrait donc permettre une réponse immunitaire adaptative plus rapide, et, peut-être, plus efficace. En effet, il est maintenant bien connu que les complexes immuns, formés de molécules d'IgM, d'un antigène et du complément, augmentaient de façon considérable la réponse humorale médiée par les lymphocytes B-2 (Heyman *et al*, 1985; Heyman *et al*, 1990, Lehner *et al*, 1983). De façon moins évidente, il semblerait que les complexes immuns pourraient aussi promouvoir les réponses des lymphocytes T (Thornton *et al*, 1994; Suresh *et al*, 2003, Stager *et al*, 2003).

Dans un dernier temps, les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques, seraient d'une très grande importance dans la rétention des complexes immuns dans les organes lymphoïdes. Une partie de ce processus pourrait impliquer la liaison des complexes immuns au récepteur Fc $\alpha$ / $\mu$ . Toutefois, beaucoup de recherches restent à faire dans ce domaine (Shibuya *et al*, 2000).

Bien qu'il s'agisse encore d'un domaine à approfondir, certaines études ont aussi été effectuées chez l'humain. En effet, comme il l'a été mentionné précédemment, des anticorps dirigés contre le VIH ont pu être détectés chez des patients séronégatifs. De plus, lors d'une infection au virus de l'hépatite C (VHC), il a été remarqué que la progression de la cirrhose associée au virus était inversement proportionnelle à la présence de lymphocytes B-1. Autrement dit, lorsqu'il y avait davantage de lymphocytes B-1, les dommages étaient moins importants (Curry *et al*, 2000; Monteverde *et al*, 1997).

En conclusion, la présence de lymphocytes B-1 et donc, d'anticorps naturels, confère un avantage lors d'infections. En effet, il est admis que les anticorps naturels peuvent soit directement neutraliser les pathogènes, soit former des complexes immuns. Ceux-ci sont alors plus facilement recrutés aux organes lymphoïdes pour induire des réponses immunitaires adaptatives plus rapides et plus efficaces.

Toutefois, puisque les anticorps naturels sont présents en faibles quantités, variant entre des titres de 1 :10 à 1 :100, des hautes doses infectieuses peuvent passer par-dessus cette première ligne de défense. Conséquemment, d'autres stratégies du système immunitaire ont dû être développées afin de palier à ce problème. Ces stratégies consistent en l'immunité acquise qui prend généralement quelques jours avant d'être effective. Nous nous intéresserons, dans les deux prochaines sections, à deux branches de l'immunité acquise, soit la réponse humorale médiée par les lymphocytes B-2 et la réponse cellulaire, médiée par les lymphocytes T cytotoxiques.

### 3 Lymphocytes B-2

#### 3.1 Récepteur des lymphocytes B-2

Le récepteur des lymphocytes B-2, tout comme celui des lymphocytes B-1, est constitué d'une Ig membranaire. Toutefois, elle ne constitue pas à elle seule le BCR. En effet, dans le cas de n'importe quel isotype d'Ig, la queue cytoplasmique est trop courte pour être capable de s'associer aux molécules de transduction de signaux. Pour cette raison, le BCR est composé d'une association de l'Ig membranaire ainsi qu'un hétérodimère Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$  représenté à la figure 8. Ceci permet, grâce à leur longue queue cytoplasmique, une transduction du signal (Reth, 1995; Wienands *et al*, 1996). En effet, les molécules Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$  possèdent des séquences peptidiques nommées *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAM). Lorsque l'antigène se fixe, les tyrosines des ITAM sont phosphorylées par des kinases de la famille des Src. Cette phosphorylation permettra d'augmenter l'affinité de la queue cytoplasmique de Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$  pour d'autres kinases, essentielles pour la transmission du signal en aval (Pao *et al*, 1998).

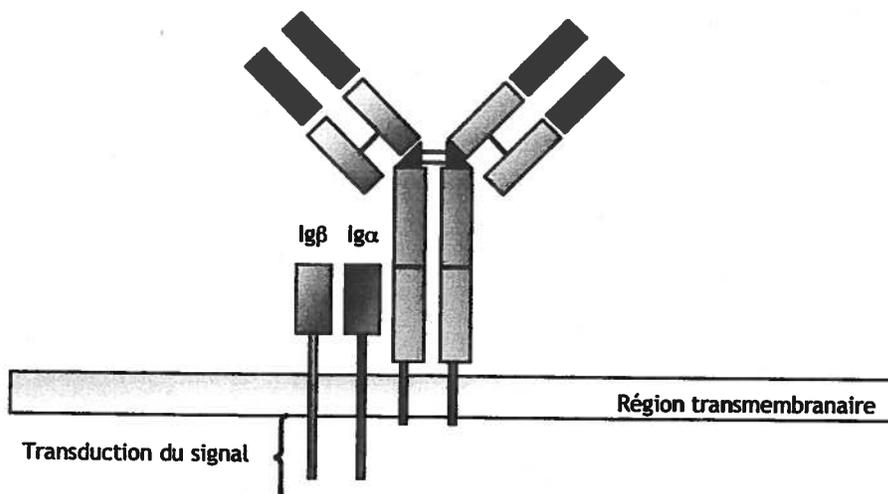


Figure 8: Représentation du récepteur des lymphocytes B.

### 3.2 Réponse immunitaire induite par les lymphocytes B-2

Il existe deux voies d'activation des lymphocytes B-2 qui dépendent du type d'antigène rencontré. Tout d'abord, il y a les antigènes thymodépendants (TD) qui nécessitent un contact entre un lymphocyte T auxiliaire et le lymphocyte B-2. Ensuite, il y a les antigènes thymo-indépendants (TI) qui sont subdivisés en deux catégories : les antigènes thymo-indépendants de type I (TI-1) et de type II (TI-2). En général, les antigènes TI-1 sont des mitogènes et peuvent donc activer les lymphocytes B indépendamment de leur spécificité antigénique. L'antigène le plus connu de cette catégorie est le lipopolysaccharide (LPS) (Mond *et al*, 1995). D'un autre côté, les antigènes TI-2 activent les lymphocytes B en établissant plusieurs liaisons croisées au niveau du BCR, entre autres, avec la molécule CD21.

Les antigènes TD seront ceux qui nous intéresseront davantage puisqu'ils sont souvent de nature protéique et sont donc impliqués dans les réponses antivirales (résumé à la figure 9). La reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte B se produit dans les organes lymphoïdes secondaires. Lorsqu'un antigène est introduit chez un animal, il sera capté et apprêté par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Celles-ci migrent ensuite vers les organes lymphoïdes, plus précisément dans la zone T, dans laquelle les lymphocytes T auxiliaires peuvent capter l'antigène. Par la suite, lorsque les lymphocytes B-2 pénètrent dans le tissu lymphoïde, ils passent en premier par la zone T. Lorsqu'ils rencontrent un antigène dans cette zone, les lymphocytes B-2 y seront piégés. Conséquemment, les lymphocytes B-2 qui ont reconnu un antigène restent à l'endroit où il est possible de recevoir de l'aide des lymphocytes T auxiliaires (Garside *et al*, 1998). L'interaction entre les lymphocytes B-2 et T se fait par le contact entre le CD40 ligand (CD40L), présent à la surface des lymphocytes T, qui interagira avec le CD40, présent à la surface des lymphocytes B-2. La fixation de CD40 à CD40L contribue au déclenchement de la prolifération des lymphocytes B-2 formant ainsi le foyer primaire (Snapper *et al*, 1995; Jumper *et al*, 1994).

Après plusieurs jours de divisions cellulaires, le foyer primaire commence à régresser. À ce moment, il peut alors y avoir différenciation de certains lymphocytes B-2 en plasmocytes qui migrent vers la pulpe rouge de la rate ou des cordons médullaires du ganglion lymphatique. Les plasmocytes sont caractérisés par un cytoplasme abondant avec plusieurs couches de réticulum endoplasmique rugueux, un noyau avec de la chromatine condensée en périphérie ainsi qu'un appareil de Golgi périnucléaire proéminent et des citernes endoplasmiques abondantes en Ig. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) ne sont pas exprimées par les plasmocytes. D'un autre côté, certaines cellules qui étaient présentes dans les foyers primaires peuvent migrer vers les follicules lymphoïdes primaires dans lesquelles elles continuent à proliférer pour former un centre germinatif (Shapiro-Shelef *et al*, 2005).

Les lymphocytes B-2 qui prolifèrent dans le centre germinatif subissent plusieurs changements très importants pour l'induction d'une réponse immunitaire humorale. En effet, c'est à cet endroit que les mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation de classe surviennent qui permettent d'augmenter l'affinité et l'avidité de la molécule d'Ig à son antigène. À la fin de ces processus, les nouveaux lymphocytes B-2 traverseront au travers d'un nouveau processus de sélection et certains se différencieront en lymphocytes mémoires ou en plasmocytes (MacLennan, 1994; Liu *et al*, 1997).

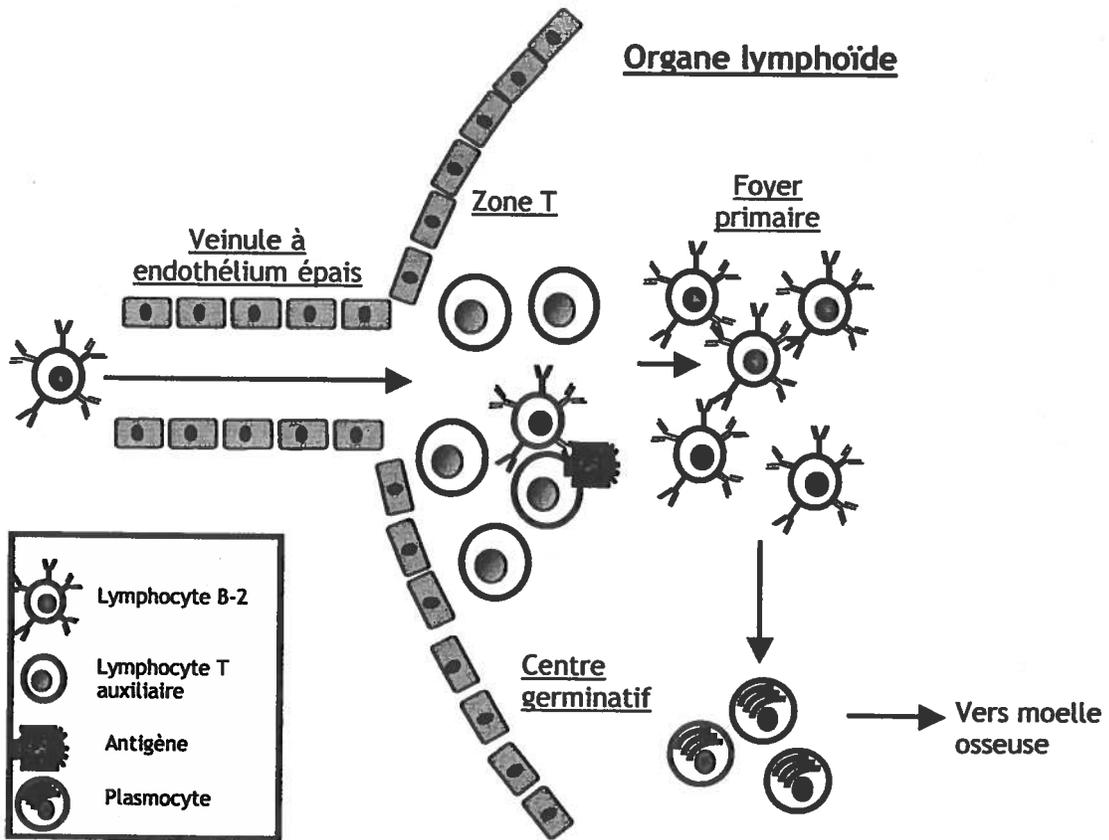


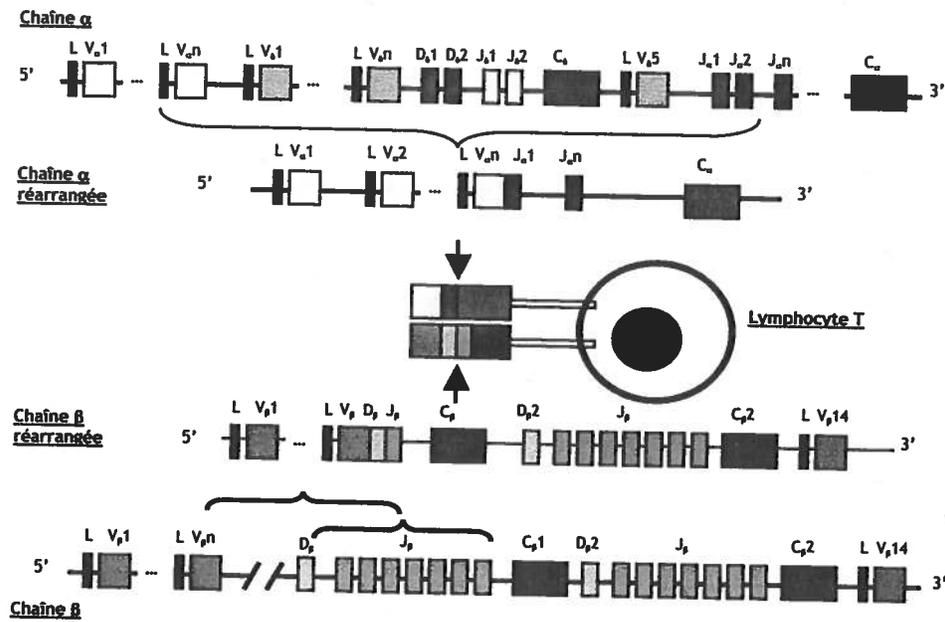
Figure 9: Activation des lymphocytes B-2.

## 4 Lymphocytes T

### 4.1 Récepteur des lymphocytes T (TCR)

L'organisation des segments géniques qui codent pour le TCR est remarquablement similaire à celle des Ig. Comme pour les Ig, les segments géniques V, D et J se réarrangent lors de la maturation des cellules T pour former des gènes fonctionnels qui codent pour le TCR. Comme dans le cas des Ig, les gènes fonctionnels du TCR sont produits par le réarrangement des segments V et J, pour la chaîne  $\alpha$  et des segments V, D et J pour la chaîne  $\beta$  (figure 10) (Bentley *et al*, 1995; Fields *et al*, 1995).

Tout comme pour la chaîne lourde des Ig, c'est la chaîne  $\beta$  qui se réarrangera en premier. Il y aura tout d'abord formation des jonctions D-J puis, V-DJ. Par la suite, il y aura réarrangement au niveau de la chaîne  $\alpha$  par association entre les segments V-J. Les mêmes enzymes sont impliquées dans le processus de réarrangements géniques, soit, entre autres, les enzymes RAG-1 et RAG-2 et la TdT pour l'ajout de nucléotides N (Zhu *et al*, 1995). Finalement, les processus de génération de la diversité chez le TCR sont relativement similaires à ceux des Ig comme la flexibilité jonctionnelle, l'addition de nucléotides N, l'addition de nucléotide P. Par contre, les TCR ne posséderont pas le processus d'hypermutation somatique afin d'augmenter la variabilité de leur répertoire.



**Figure 10:** Organisation et réarrangement des segments géniques du TCR. À noter que les gènes codant pour la chaîne δ se retrouvent sur le même chromosome que ceux codant pour celle de la chaîne α.

Le TCR possède une structure très similaire à celle des immunoglobulines; en fait, les TCR sont considérés comme faisant partie de la superfamille des immunoglobulines (Yanagi *et al*, 1984). Il est fait de l'association de deux chaînes polypeptidiques, soit la chaîne α et de la chaîne β reliées par un pont disulfure. Toutefois, dans une minorité de cas, le TCR peut être formé par l'association des chaînes δ et γ.

Chacune des chaînes du TCR possède deux domaines contenant une liaison disulfure intrachaîne qui unit des cystéines séparées d'environ 60 - 75 acides aminés. À l'intérieur des deux chaînes, la portion N-terminale exhibe une grande variabilité tandis que le reste de la chaîne est relativement constante. Tout comme les Ig, les chaînes du TCR présentent une portion variable et une portion constante. De plus, à l'intérieur de ces régions variables, on peut trouver des régions hypervariables, équivalentes aux CDR des Ig. Finalement, il y aurait même une quatrième région hypervariable (HV4) dans la chaîne β. Toutefois, puisqu'elle n'entre pas en contact

avec l'antigène, elle n'est pas considérée comme un CDR. À la suite des régions constantes, chaque chaîne des TCR contient une région charnière. Finalement, après cette séquence, il y a une région transmembranaire de 21-22 acides aminés qui ancrent les chaînes dans la membrane plasmique (voir figure 11).

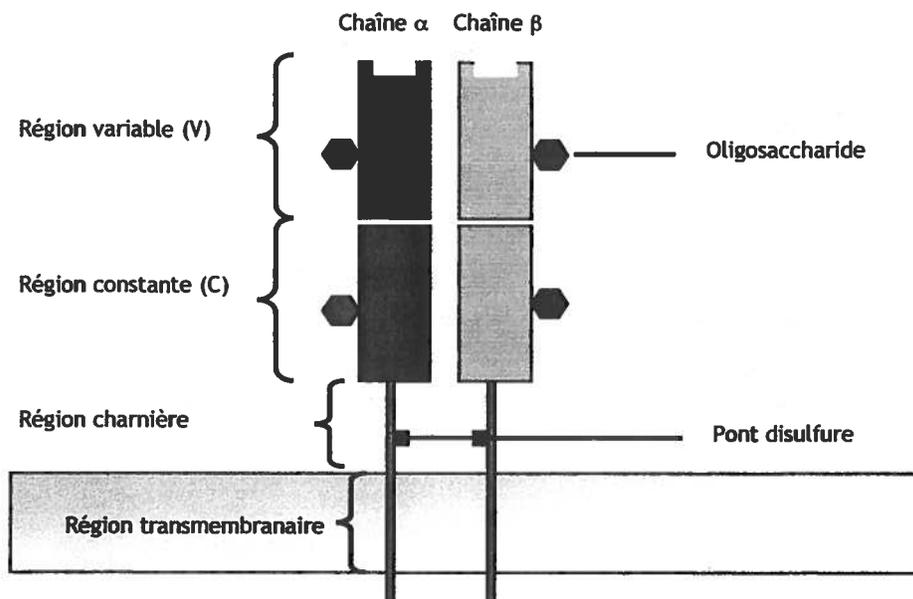


Figure 11: Représentation du récepteur des lymphocytes T.

Le TCR, à la surface des lymphocytes T, est associé à plusieurs molécules qui permettent une amplification ainsi qu'une meilleure transmission du signal reçu. Une molécule très importante pour la transduction du signal est le CD3. Le CD3 est un complexe de cinq chaînes polypeptidiques invariantes qui s'associent pour former trois dimères : un hétérodimère  $\gamma\epsilon$ , un autre hétérodimère  $\delta\epsilon$  et un homodimère  $\zeta\zeta$ , ou, dans environ 10 % des cas, un hétérodimère  $\zeta\eta$ . Les queues cytoplasmiques des chaînes du CD3 possèdent des motifs ITAM qui permettent l'activation des immunorécepteurs via le domaine tyrosine. Ces molécules sont donc cruciales pour la transduction du signal (Kuhns *et al*, 2006; Fischer *et al*, 2005).

Finalement, il existe deux autres molécules associées au TCR qui retiendront particulièrement notre attention : le CD4 et le CD8. Le CD4 est une glycoprotéine membranaire monomérique composée de quatre domaines extracellulaires ( $D_1$  à  $D_4$ ).

Ces domaines permettent le repliement de la molécule CD4 pour former une structure membre de la superfamille des Ig possédant un domaine hydrophobe et une longue queue cytoplasmique qui contient trois résidus de sérine pouvant être phosphorylés. Le CD8, quant à lui, se présente comme un hétérodimère  $\alpha\beta$  uni par des ponts disulfures ou comme un homodimère  $\alpha\alpha$ . Les chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  sont des petites glycoprotéines membranaires composée d'un seul domaine extracellulaire qui présente le repliement caractéristique des Ig. Son domaine transmembranaire est hydrophobe et il possède une queue cytoplasmique contenant deux résidus pouvant être phosphorylés. Les molécules CD4 et CD8 sont considérés comme des corécepteurs grâce à deux caractéristiques. Tout d'abord, leur domaine extracellulaire leur permet de reconnaître le CMH. La molécule CD4 reconnaît la molécule de classe II du CMH par opposition à la molécule CD8 qui reconnaît la molécule de classe I (Sakihama *et al*, 1995, Garcia *et al*, 1999). Dans un deuxième temps, grâce à leur queue cytoplasmique, ils permettent de transduire le signal. En résumé, l'expression de ces corécepteurs à la surface des cellules permet d'augmenter l'avidité de la liaison (Janeway, 1995). L'expression d'une de ces molécules à la surface d'un lymphocyte T permet de les diviser en deux catégories. Tout d'abord, les lymphocytes T exprimant la molécule de CD4 seront nommés T auxiliaires et ceux qui expriment la molécule de CD8 seront nommés T cytotoxiques. Dans ce travail, nous nous intéresserons à la deuxième population.

#### 4.2 Réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T cytotoxiques ont le pouvoir de lyser des cellules et jouent ainsi un rôle important dans l'élimination des cellules du Soi altérées (par exemple, des cellules infectées par un virus). Ces lymphocytes sont restreints à reconnaître leur antigène lorsqu'il est présenté par un CMH de classe I. Puisque la très grande majorité des cellules nucléées expriment la molécule de CMH I, les lymphocytes T cytotoxiques peuvent reconnaître et éliminer presque toutes les cellules altérées de l'organisme.

Tout comme pour les lymphocytes B-2, les lymphocytes T rencontrent leurs antigènes dans les organes lymphoïdes drainant la région infectée. Les lymphocytes T

cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>) naïfs sont incapables de tuer les cellules cibles et sont donc désignés comme précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques (CTL-P). Afin d'effectuer leur fonction, ils ont besoin d'être activés. La création d'une population fonctionnelle de lymphocytes T cytotoxiques nécessitent trois signaux. Tout d'abord, le CTL-P doit reconnaître son antigène présenté sur la molécule de classe I du CMH. Ensuite, il doit recevoir un signal de costimulation par l'interaction de CD28, à sa surface, avec B7, présent à la surface de cellules présentatrices d'antigène. Finalement, un signal induit par l'IL-2 est important pour la différenciation du CTL-P en T cytotoxiques. Les CTL-P non-activés n'expriment ni l'IL-2 ni le récepteur à l'IL-2, ne prolifèrent pas et ne présente pas d'activité cytotoxique. L'activation par l'antigène induit un CTL-P à exprimer le récepteur à l'IL-2 et, à un moindre degré, l'IL-2 (Croft, 1994; Gonzalo *et al*, 2001; Henry *et al*, 1999; Wang *et al*, 2000). Ces signaux sont cruciaux pour éviter la tolérisation des lymphocytes T (Chai *et al*, 1999)

Une fois activés, les lymphocytes T cytotoxiques peuvent avoir différents effets sur les cellules infectées. Suite à la reconnaissance de l'antigène par le complexe du TCR, il y a réorientation du cytosquelette, polarisant ainsi la cellule afin d'orienter la libération des molécules effectrices vers le site de contact avec la cellule cible. Lors de la polarisation, les sacs du Golgi et des granules de stockage sont déplacés vers la cellule cible. Les granules de stockage contiennent principalement deux molécules : les granzymes et la perforine (Barry *et al*, 2000). Ces dernières peuvent par la suite être libérées dans l'espace de jonction entre le lymphocyte et la cellule cible. Lorsque les molécules de perforine entrent en contact avec la membrane de la cellule cible, ils s'y mettent à former des pores cylindriques. L'importance de la perforine a été démontrée par des souris qui en étaient déficientes et qui ne pouvait éliminer le virus de la chorioméningite lymphocytaire, même s'il y avait génération d'une réponse immunitaire des lymphocytes CD8<sup>+</sup>. La formation de pores permettrait l'entrée plus efficace des granzymes dans la cellule cible. Ceux-ci peuvent alors fragmenter l'ADN de la cellule dans un processus similaire à l'apoptose (Atkinson *et al*, 1995; Griffiths, 1995, Henkart *et al*, 1994; Kagi *et al*, 1994).

D'autre part, les lymphocytes T cytotoxiques peuvent médier la mort cellulaire par l'interaction entre le ligand de Fas (Fas L) présent à leur surface et Fas, présent à la surface des cellules cibles. Il a été démontré que cette interaction induisait l'apoptose de la cellule cible (Medana *et al*, 2000; Suda *et al*, 1993; Watanbe *et al*, 1992).

Enfin, la polarisation du lymphocyte T induit *de novo* la sécrétion de molécules effectrices solubles comme par exemple, l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). L'IFN- $\gamma$  est très important dans le cadre d'infections causées par des virus car il permet de bloquer la réplication virale (Schindler *et al*, 1999, Harty *et al*, 2000).

## 5 Modèles murins

Comme il le sera expliqué en détails plus loin, nous avons voulu, dans ces études, étudier l'importance de la diversité des anticorps naturels dans l'induction de réponses antivirales. À cette fin, nous détenons plusieurs modèles de souris qui possèdent différentes lacunes dans leur répertoire.

### 5.1 Souris quasi-monoclonale (QM)

La souris quasi-monoclonale (QM) a été générée en 1996 par l'équipe du Dr. Wabl (Cascalho *et al* 1996). Il s'agit d'une souris hémizygote qui possède une insertion ciblée de la séquence V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> 17.2.25 dans la chaîne lourde des immunoglobulines (figure 12). L'autre allèle a été éliminée par délétion du segment J<sub>H</sub>, faisant en sorte que seulement le réarrangement de la séquence insérée sera productif. De plus, la souris QM n'a pas de chaîne légère  $\kappa$  fonctionnelle et ne peut donc réarranger que sa chaîne  $\lambda$ . La chaîne lourde V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>, lorsqu'associée à la chaîne légère  $\lambda$ , code pour des anticorps qui sont spécifiques à l'haptène 4-hydroxy-3-nitrophényl acétyl (NP). Conséquemment, le répertoire primaire de cette souris sera monospécifique.

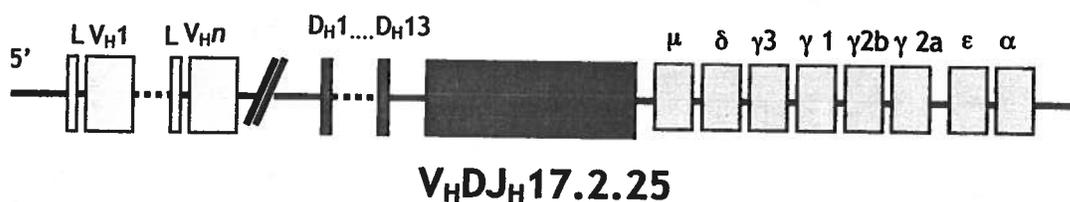


Figure 12: Représentation schématique de la chaîne lourde des immunoglobulines de la souris QM.

Toutefois, en réalité, il a été remarqué qu'une fraction des anticorps produits par la souris QM, environ 20%, pouvait reconnaître d'autres épitopes (Cascalho *et al*, 1997). Ceci a été attribué aux réarrangements secondaires et aux hypermutations

somatiques qui peuvent survenir dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes. En effet, il a été observé que la chaîne  $V_H$  pouvait être remplacée par une autre chaîne, entre autres grâce aux séquences de recombinaison localisées dans les régions 3' des chaînes  $V_H$  (Covey *et al*, 1990). Ceci permet alors de générer une diversité suffisante pour l'induction de réponses antivirales protectrices (Lopez-Macias *et al*, 1999).

Finalement, la souris QM possède des concentrations des différents isotypes d'immunoglobulines normales, quoiqu'elle aurait parfois des plus grandes concentrations d'IgG2a et IgA par rapport aux groupes contrôles. De plus, dans quelques cas, elles pourraient être modérément ou fortement hypergammaglobulémiques (Cascalho *et al*, 1996).

## 5.2 Souris HC1

La souris HC1 a été créée par l'insertion ciblée dans le génome murin d'un minilocus humain codant pour une seule région variable de la chaîne lourde fonctionnelle ( $V_{H5-51}$ ) (figure 13). Cette souris possède néanmoins 10 segments  $D_H$  et 5 segments  $J_H$  ainsi que les segments de la région constante  $C_\mu$  et  $C_{\gamma 1}$  fonctionnels (Taylor *et al*, 1994). La souris HC1 a ensuite été croisée sur un fond  $IgH^{-/-}IgK^{-/-}$  ce qui fait en sorte que les seules immunoglobulines fonctionnelles pouvant être générées combinent le segment  $V_{H5-51}$  et une chaîne légère  $\lambda$  (Chen *et al*, 1993).

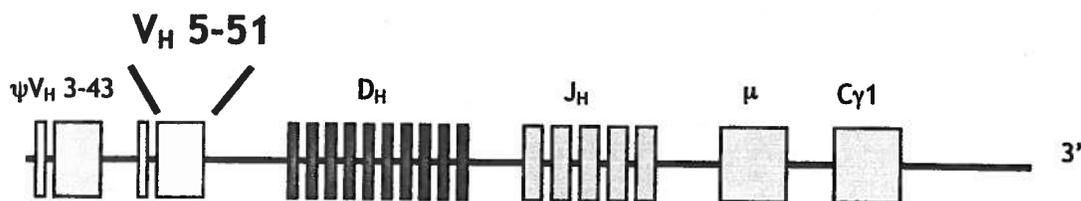


Figure 13: Représentation schématique de la chaîne lourde des immunoglobulines de la souris HC1.

Le répertoire de la souris HC1 est donc très limité. Il est estimé qu'elle peut avoir environ 13 000 combinaisons possibles, soit environ 3 000 fois moins qu'une souris de type sauvage. Toutefois, elle peut générer une diversité importante au niveau de la région CDR3 de la chaîne lourde.

La diversité qui peut être générée dans la région CDR3 semble être suffisante pour permettre à la souris de répondre à différents antigènes. En effet, il a été remarqué que les souris HC1 étaient capables de générer des anticorps contre plusieurs protéines. Toutefois, elles ne peuvent répondre à des polysaccharides bactériens et sont donc très sensibles à ce type d'infection. Il a été émis comme hypothèse que l'absence de réponse pouvait être due à l'absence d'une combinaison particulière  $V_H/V_L$  (Xu *et al*, 2000).

### 5.3 Souris $J_H T$ (ou $J_H^{-/-}$ )

La souris  $J_H T$  possède une délétion des segments J de la chaîne lourde des immunoglobulines. Cette délétion s'est faite par transfection d'un vecteur dans des cellules souches embryonnaires, brisant ainsi le cadre de lecture du gène. Par la suite, les cellules souches embryonnaires transfectées ont été injectées dans des blastocystes de souris C57BL/6 et la reproduction s'est faite sous ce fond génétique (Chen *et al*, 1993).

Puisque la souris  $J_H T$  ne possède pas de segment  $J_H$ , elle ne pourra pas réarranger correctement la chaîne lourde des immunoglobulines. Conséquemment, elle ne pourra pas générer de chaîne lourde fonctionnelle et donc, de lymphocytes B. Ceci aura aussi pour conséquence d'affecter l'architecture splénique (Mebius *et al*, 2004; Fu *et al*, 1999).

#### 5.4 Souris AID<sup>-/-</sup>

L'enzyme *activation-induced cytidine deaminase* (AID) est très importante lors des processus de commutation de classe ainsi que l'hypermutation somatique (Muramatsu *et al*, 2000). Cette enzyme permet de convertir les déoxycytidines en déoxyuraciles sur l'ADN simple brin.

L'importance de l'AID a été démontrée grâce à un modèle de souris déficiente en cet enzyme, la souris AID<sup>-/-</sup>. Tout comme la souris J<sub>H</sub>T, la souris AID<sup>-/-</sup> a été générée par la transfection d'un vecteur dans des cellules souches embryonnaires de souris. Les cellules ont par la suite été injectées dans des blastocystes de souris C57BL/6 et la reproduction subséquente s'est effectuée sous ce fond génétique.

Lorsque stimulées, ces souris peuvent répondre à un antigène, mais seulement en sécrétant des IgM. Tous les autres isotypes des immunoglobulines ne sont pas détectables dans le sérum de ces souris. De plus, il n'y avait pas de génération de diversité supplémentaire dans les régions CDR3 des anticorps, ce qui laisse croire qu'il y avait absence d'hypermutation somatique (Muramatsu *et al*, 2000).

Toutefois, il a été remarqué que les souris AID<sup>-/-</sup> possédaient un taux plus élevé d'IgM sérique comparativement aux souris de type sauvage. Ceci a d'ailleurs aussi été observé chez l'humain chez lequel un défaut génétique sur le gène codant pour l'AID résulte en un syndrome d'hyper-IgM de type 2 (Revy *et al*, 2000). Deux hypothèses ont été soulevées pour expliquer cette surproduction d'IgM. Tout d'abord, il a été remarqué que les populations de lymphocytes B, même si présentes en quantités normales, présentaient un taux plus élevé de marqueurs d'activation à leur surface, tels que CD69, CD86 ainsi que le CMH II. Ceci pourrait donc laisser croire que les lymphocytes B de ces souris sont activés plus fortement que ceux d'une souris de type sauvage. De plus, de concert avec une plus forte activation, les lymphocytes B des souris AID<sup>-/-</sup> recevraient moins de signaux de régulation négative de prolifération. En effet, il a été émis comme hypothèse que lorsqu'un lymphocyte B est activé et entre

en commutation de classe, il reçoit des signaux de régulation négatifs pour la prolifération afin de lui permettre de se différencier. Or, puisque les souris AID<sup>-/-</sup> ne peuvent entrer en commutation de classe, elles ne peuvent recevoir ces signaux et sont donc moins réprimées dans leur prolifération (Muramatsu *et al*, 2000).

### 5.5 Souris RAG-1<sup>-/-</sup>

Les souris RAG-1<sup>-/-</sup> ont été créées par la transfection d'un vecteur dans des cellules souches embryonnaires tout comme pour les souris J<sub>H</sub>T et AID<sup>-/-</sup>. Toutefois, dans ce cas, c'est le cadre de lecture de l'enzyme RAG-1 qui était ciblé. Toutes les souris ont été croisées sur un fond C57BL/6.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'enzyme RAG est essentiel pour le réarrangement des gènes du BCR mais aussi, pour ceux du TCR. Conséquemment, la souris RAG-1<sup>-/-</sup> sera incapable d'effectuer les réarrangements productifs des récepteurs des lymphocytes B et T ne sera donc pas capable de générer ces populations cellulaires. Il a été observé que cette souris avait une rate plus petite que la normale et dont l'architecture splénique était grandement affectée (Mebius *et al*, 2004; Fu *et al*, 1999). De plus, les souris RAG-1<sup>-/-</sup> possèdent des populations normales de CPA, macrophages et cellules NK. Elles restent toutefois très susceptibles aux infections. En conclusion, leur phénotype est très apparenté à d'autres souris fortement immunodéficientes tel que la *severe combined immunodeficiency* (SCID) (Mombaerts *et al*, 1992).

### 5.6 Souris P14

Les souris P14 ont été générées à partir de l'insertion de la chaîne V $\alpha$ 2 d'un clone T cytotoxique spécifique à l'épitope gp33 du virus de la chorioméningite lymphocytaire. Ces souris ont par la suite été croisées, sur un fond génétique de souris C57BL/6, avec des souris déficientes pour la chaîne V $\alpha$ . Conséquemment, ces souris

possèdent des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au virus, dans une proportion de 70 à 90 % (Pircher *et al*, 1987).

Toutefois, les populations de lymphocytes T chez ces souris sont plus basses que les souris de type sauvage. En effet, il a été remarqué que les souris P14 possédaient dix fois moins de lymphocytes T auxiliaires et deux fois moins de lymphocytes cytotoxiques. Finalement, bien qu'elles possèdent un plus grand nombre de précurseurs spécifiques au virus, les souris P14 n'éliminent pas plus rapidement le virus qu'une souris de type sauvage lorsqu'elles sont infectées (Brandle *et al*, 1995).

## 6 Modèles viraux

Les infections virales peuvent être classifiées en deux catégories, selon les dommages faits aux cellules hôtes et la persistance que les virus peuvent établir. Dans un premier temps, il existe des virus causant des infections aiguës qui sont souvent hautement cytopathiques mais qui sont rapidement contrôlés par le système immunitaire de l'hôte. La réponse immunitaire contre ce type de virus est principalement de type humorale. Par opposition, les virus provoquant des infections chroniques sont généralement peu cytopathiques et auront tendance à persister de façon silencieuse chez leur hôte puisque le système immunitaire détecte peu leur présence ou parce que la réponse induite n'est pas assez efficace pour l'éliminer complètement. Toutefois, la réponse des lymphocytes T cytotoxiques est souvent cruciale pour le contrôle initial de la virémie. Dans ces études, afin de déterminer le rôle des anticorps naturels dans la protection et l'induction de réponses antivirales, nous avons utilisé deux modèles viraux mimant soit une infection aiguë, ou soit une infection chronique.

### 6.1 Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)

Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) fait partie de la famille des *Rhabdoviridae*, plus précisément du genre *Vesiculovirus*. Il s'agit de virus couramment répandus dans la nature et pouvant infecter une gamme d'hôtes variée.

Les virions des *Rhabdoviridae* sont caractérisés par une forme en balle de fusil (dans la grande majorité des cas) ayant une taille d'environ 180 nanomètres (nm) de long par 75 nm de large tel qu'illustré à la figure 14.

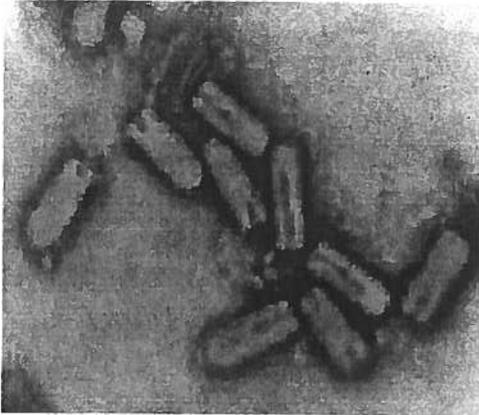


Figure 14: Image en microscopie électronique du VSV (Fields, 2001).

Ils sont composés d'une membrane lipidique provenant de la cellule hôte et exhibent à leur surface des projections d'une seule et unique protéine : la glycoprotéine G. En effet, la surface virale est composée d'une répétition d'environ 400 complexes trimériques de la glycoprotéine G ce qui en fait une structure quasi-cristalline. L'intérieur de l'enveloppe virale, quant à elle, est composée d'une répétition d'environ 1 800 unités de la protéine de la matrice, la protéine M, situé de part et d'autre de la membrane et de la nucléocapside. Finalement, le centre du virus contient le génome viral composé d'un brin d'ARN à polarité négative de 11 à 12 kilobases (kb) (Childs *et al* 1997). Une représentation schématique du virus est fournie à la figure 15.

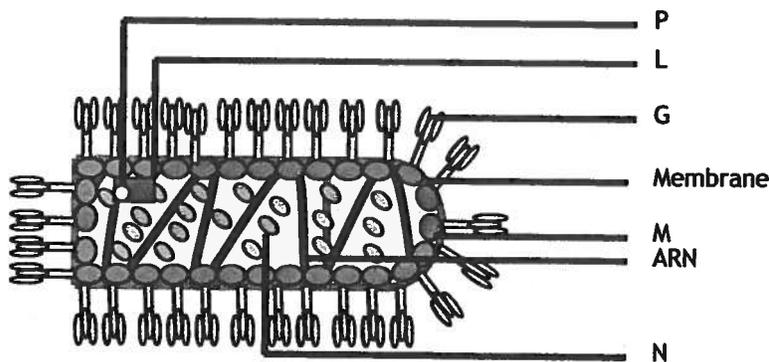


Figure 15: Représentation schématique du VSV (P = phosphoprotéine, L = protéine large, G = glycoprotéine, M = protéine de la matrice, N = nucléoprotéine).

### 6.1.1 Pathogénèse du VSV

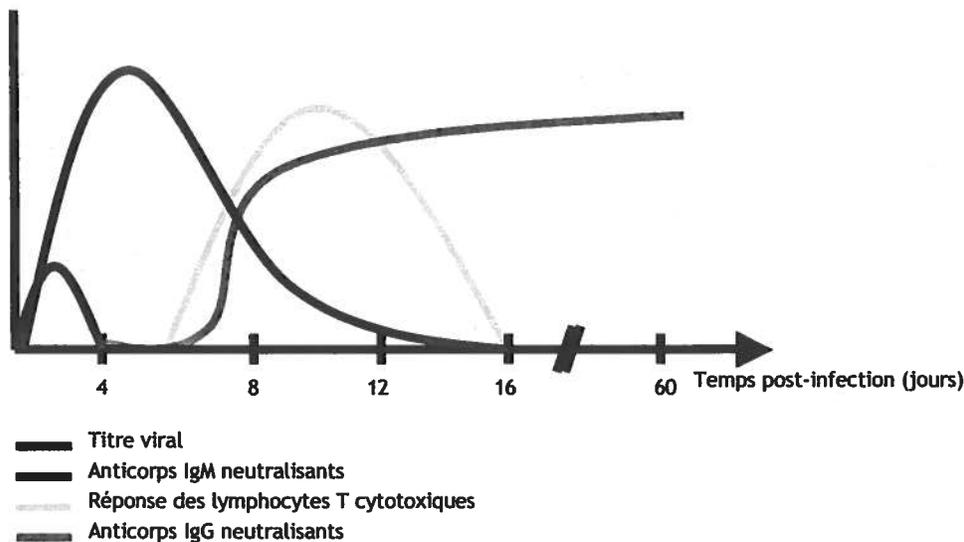
Le VSV est un virus cytopathique causant des infections aiguës. En effet, il est capable de se répliquer très rapidement chez son hôte et est éliminé tout aussi vite. D'ailleurs, il semblerait que la glycoprotéine G soit intimement reliée à sa pathogénicité. En effet, chez des virus possédant une forme incomplète de la glycoprotéine G, il a été remarqué que la réplication virale était grandement ralentie et, conséquemment, la pathogénèse était diminuée. Lorsque ces virus ont été injectés dans des souris, il a été possible d'observer une pathogénèse moins grande même en présence d'une réplication virale, quoique plus faible. Il est donc possible d'en conclure qu'une production virale robuste et rapide est essentielle pour la pathogénèse du virus (Roberts *et al*, 1999) (Schnell *et al*, 1998 ; Wertz *et al*, 1994).

L'effet cytopathique du VSV, d'un point de vue moléculaire, peut être attribué à quatre facteurs. Tout d'abord, il peut être causé directement par les protéines virales, plus spécifiquement, la glycoprotéine G et la protéine M. En effet, même si le mécanisme n'est pas encore connu, il a été observé que lorsque la G est présente en grandes quantités, cela avait un effet toxique sur la cellule (Florkiewicz *et al*, 1983 ; Puddington *et al*, 1986). Pour sa part, la protéine M aurait pour effet de provoquer la dépolymérisation de l'actine, de la tubuline ainsi que la vimentine. Cela a pour conséquence d'induire la destruction des microtubules et de provoquer le phénotype arrondi des cellules infectées ainsi que leur détachement de la matrice extracellulaire (Blondel *et al* 1990 ; Lyles *et al*, 1997 ; Melki *et al* 1994 ; Ye *et al*, 1994). Une autre cause des effets cytopathiques du VSV peut être imputée à l'inhibition de la synthèse protéique chez la cellule hôte. Finalement, la dernière cause moléculaire peut être due à l'inhibition de la transcription cellulaire, du transport des ARN<sub>m</sub> (acides ribonucléiques messagers) et de la synthèse d'ADN. En effet, il semblerait que la protéine M serait suffisante à elle seule pour bloquer la transcription cellulaire (Black *et al*, 1992). De plus, elle serait aussi capable de bloquer directement le transport des ARN<sub>m</sub> du noyau vers le cytoplasme (Her *et al*, 1997).

Dans le modèle expérimental de la souris, le VSV cause des infections aiguës. Lorsque la souris ne parvient pas à générer une réponse immunitaire protectrice, le virus cause une maladie paralysante qui survient généralement de 5 à 8 jours post-infection. Par la suite, il se dirige vers le système nerveux central ce qui amène à la mort de l'animal (Hangartner *et al*, 2006).

### 6.1.2 Réponse immunitaire générée contre le VSV

Comme il a été souligné à la section précédente, le contrôle du virus par le système immunitaire est crucial pour la survie de la souris. Ce contrôle s'effectue en grande partie par la génération d'une réponse à anticorps neutralisants de type IgM. Ceux-ci apparaissent généralement tôt suivant l'infection (environ de 4 à 5 jours post-infection) et sont générés de façon indépendante des lymphocytes T auxiliaires (figure 16). La capacité des IgM mais aussi, plus tard, des IgG, à neutraliser directement le VSV peut être expliquée par deux facteurs. D'une part, l'organisation de la G à la surface du virus en fait une structure quasi-cristalline laissant uniquement que les sites antigéniques disponibles à la surface. Conséquemment, tous les anticorps produits contre le virus seront dirigés contre la glycoprotéine G, pourront se lier à la surface du virus et ainsi bloquer la liaison et la fusion à la cellule hôte (Hangartner *et al*, 2006 ; Bachmann *et al*, 1995 ; Flamand *et al*, 1993). D'autre part, plusieurs études semblent démontrer que le répertoire primaire des lymphocytes B serait capable de reconnaître le virus sans nécessité de processus de maturation d'affinité. Ceci explique donc la génération d'anticorps neutralisants sans la présence de lymphocytes T auxiliaires (Kalinke *et al*, 1996 ; Lefrancois *et al* 1982).



**Figure 16:** Représentation schématique de la réponse immunitaire de la souris générée contre le VSV.

D'un autre côté, il semblerait que la réponse cellulaire, plus spécifiquement la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (T CD8<sup>+</sup>), soit relativement peu importante dans la protection de la souris. En effet, des études chez des souris déficientes en lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ont démontré qu'elles pouvaient contrôler l'infection et éliminer le virus aussi bien que des souris possédant cette population cellulaire (Fung-Leung *et al*, 1991). Toutefois, même si elle n'est pas essentielle pour le contrôle du virus, la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pourrait protéger les souris contre des infections normalement létales (Bachmann *et al*, 1994).

Finalement, une branche de l'immunité innée, soit la production d'IFN, semble être importante pour le contrôle de la virémie. Toutefois, la capacité du VSV à induire la production d'IFN varie selon les souches. En effet, la souche Indiana en serait une faible inductrice, comparativement à la souche New Jersey (Marcus *et al*, 1998). Toutefois, la réplication du VSV est très fortement influencée par la présence d'IFN, en particulier l'IFN- $\alpha$  et - $\beta$ . La sécrétion de ces molécules permettrait de contrôler la dissémination du virus avant la génération de la réponse humorale (Steinhauer *et al*, 1989).

## 6.2 Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)

Le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) fait partie de la famille des *Arenaviridae*. Cette famille de virus a été nommée en raison de la présence de ribosomes à l'intérieur des virions, lui donnant une apparence sablonneuse (du latin *arenosus*, signifiant sable) (Rowe *et al*, 1970). La famille des *Arenaviridae* est divisée en deux familles antigéniques soit celle du Nouveau Monde et du Vieux Monde. Le premier Arenavirus à avoir été découvert en 1933 est le LCMV qui appartient aux virus du Vieux Monde. Ce virus est reconnu pour causer des infections chroniques chez les rongeurs.

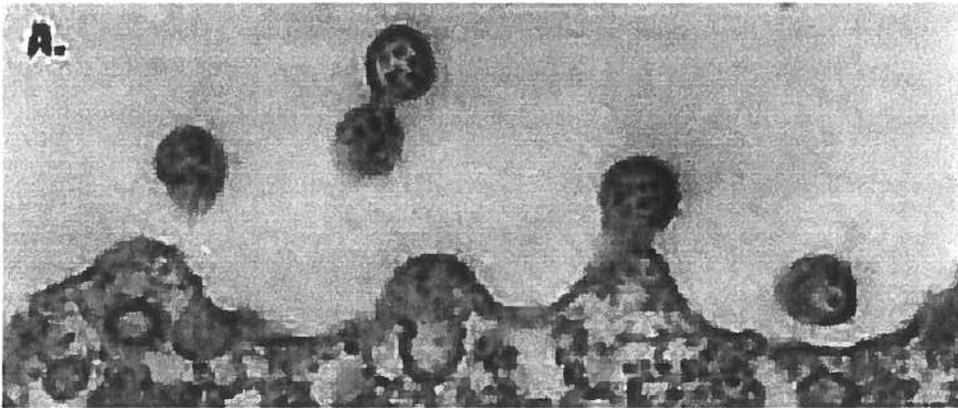


Figure 17: Image en microscopie électronique du LCMV (Fields, 2001).

Le LCMV est un virus enveloppé, de forme pléiomorphe, mesurant entre 62 nm et 200 nm de diamètre tel qu'illustré à la figure 17. La surface du virion est recouverte d'un complexe tétramérique de deux glycoprotéines : GP1 et GP2. La nucléocapside du virus, quant à elle, est composée essentiellement d'environ 1 530 unités de la nucléoprotéine (NP) qui est associée au génome viral (Burns *et al*, 1991). Une représentation schématique du virus est fournie à la figure 18.

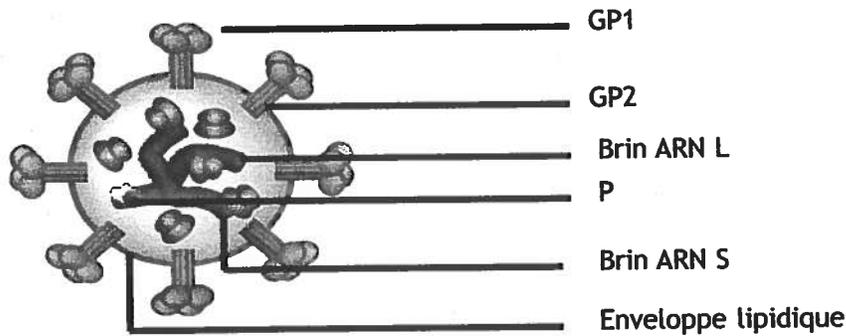


Figure 18: Représentation schématique du LCMV (GP1 = glycoprotéine 1, GP2 = glycoprotéine 2, P = polymérase virale, Brin ARN S = brin small, Brin ARN L = brin large).

Le génome viral est composé de deux brins d'ARN à organisation ambisense. Chacun des brins, ou segments, ont été nommés en fonction de leur longueur, à savoir S, pour « *small* » et L pour « *large* ». Le ratio entre les deux segments, à l'intérieur du virion, serait de 2 :1. Le segment S contient deux gènes qui codent pour deux protéines : la N et les GP. Les GP sont tout d'abord exprimées sous forme de précurseurs, nommées GPC et sont ensuite clivées, de façon post-traductionnelle, afin de former la GP1 et la GP2 (Buchmeier *et al*, 1978). Le segment L, quant à lui, contient deux gènes qui codent pour deux protéines virales encore mal caractérisées : la polymérase virale (protéine L) et la protéine Z dont la fonction n'est pas connue (Iapalucci *et al*, 1989 ; Salvato *et al*, 1989 ; Salvato *et al*, 1989).

### 6.2.1 Pathogénèse du LCMV

Le LCMV, tout comme la majorité des Arenavirus, cause des infections persistantes chez son hôte qui peuvent avoir trois issues possibles : la mort, une infection aiguë ou une infection chronique. Dans le dernier cas, l'infection est asymptomatique. La persistance du virus peut tout d'abord être expliquée par une combinaison de mécanismes moléculaires, tels que la diminution de la réplication et de l'expression de protéines, telle que la GP (Bruns *et al*, 1990). De plus, la

persistance chez l'hôte peut être imputable à l'absence d'une réponse immunitaire efficace.

La pathogénèse du virus est principalement causée par la réplication au site même de l'infection. Dans tous les cas, les macrophages seraient la principale cible du virus. Celui-ci se dissémine ensuite vers d'autres types cellulaires, dont les cellules épithéliales et les cellules de la zone marginale de la rate et des ganglions. La présence du virus à cet endroit induit par la suite une réponse cytotoxique des lymphocytes T qui se traduit en la lyse des CPA et une destruction des structures lymphoïdes, empêchant finalement la génération d'une réponse immunitaire efficace. (Gonzalez *et al*, 1980 ; Mims *et al*, 1969 ; Odermatt *et al*, 1991 ; Walker *et al*, 1982 ; Matter *et al*, 2007).

Cliniquement, une infection par LCMV, chez la souris, se traduit par une méningite et, à l'occasion, une hydroencéphalite, dans le cas des infections aiguës (Armstrong *et al*, 1934). Dans la grande majorité des cas, les souris survivent à l'infection.

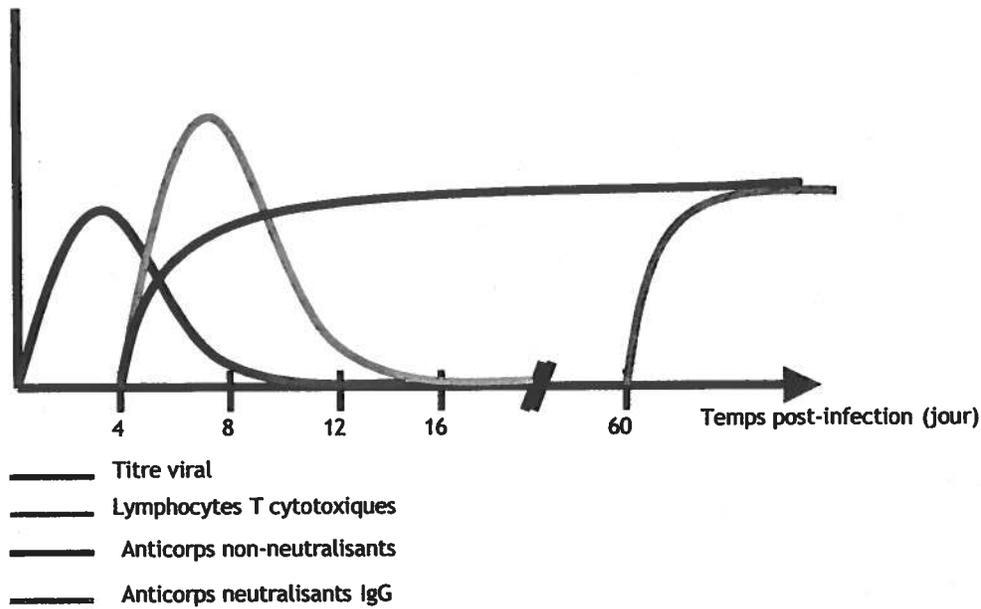
Un trait caractéristique de l'infection de LCMV chez les souris est la destruction de l'architecture splénique survenant généralement 10 jours post-infection. Ce phénomène pourrait être, tout d'abord, causé par des effets directs, c'est-à-dire en raison d'un relâchement excessif de cytokines par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou par la lyse directe des cellules infectées. D'autre part, la destruction des lymphocytes B, macrophages et cellules stromales par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> a pour effet de désorganiser la structure de la rate puisqu'il a été démontré que ces cellules fournissent des cytokines, ligands et récepteurs importants au maintien de l'architecture (Matter *et al*, 2006 ; Ato *et al*, 2004 ; Lu *et al*, 2002 ; Karlsson *et al*, 2003). Dans tous les cas, la destruction de l'architecture splénique a pour effet de retarder la réponse immunitaire puisque la préservation de cette dernière est essentielle pour induire des réponses immunitaires adaptatives (Louten *et al*, 2006)

### 6.2.2 Réponse immunitaire générée contre le LCMV

Le modèle de l'infection au LCMV, chez la souris, démontre bien la balance qu'il faut y avoir entre une réponse immunitaire protectrice et les dommages immunopathologiques qu'il peut y avoir.

Comme dans la majorité des infections non-cytopathiques, lors d'une infection au LCMV, la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est essentielle pour le contrôle de la virémie. En effet, il a été démontré que les souris qui ne pouvaient générer de réponse cellulaire succombaient rapidement à l'infection (Kagi *et al*, 1994; Lehmann-Grube *et al*, 1979; Muller *et al*, 1992). La réponse cytotoxique atteint son apogée environ 8 jours post-infection et est corrélée avec une diminution importante de la virémie (figure 19). Cette réponse peut être médiée soit par la lyse directe des cellules infectées ou par la production de médiateurs non-cytolytiques (Kagi *et al*, 1994 ; Guidotti *et al*, 1999).

L'apparition des anticorps neutralisants survient généralement de 60 à 120 jours post-infection, lorsque la virémie est déjà contrôlée (Moore *et al*, 1994 ; Battegay *et al*, 1993 ; Planz *et al*, 1996). Même si les anticorps neutralisants ne sont pas un facteur déterminant pour le contrôle initial de la virémie, ils sembleraient toutefois importants pour éviter la réémergence du virus. De plus, des expériences d'immunisations passives avec des anticorps neutralisants ont démontré que ceux-ci conféraient une protection contre une chorioméningite létale du LCMV (Wright *et al*, 1991). Les effets des anticorps étaient de diminuer les titres viraux et de diminuer la réponse des lymphocytes TCD8<sup>+</sup> réduisant ainsi l'immunopathologie. De plus, l'effet protecteur des anticorps neutralisants a pu être démontré dans le cadre d'un transfert d'anticorps de la mère à l'enfant. En effet, lorsque des mères immunisées contre le virus transmettaient, via le lait maternel, des anticorps aux nouveaux-nés, ceux-ci étaient à leur tour protégés contre une infection subséquente. Cette protection était majoritairement donnée grâce à des anticorps de type IgG2a (Baldrige *et al*, 1992).



**Figure 19:** Représentation schématique de la réponse immunitaire générée contre le LCMV.

Contrairement à l'infection au VSV, la réponse immunitaire contre le LCMV sera majoritairement médiée par la réponse cellulaire et les anticorps neutralisants seront peu importants pour le contrôle initial de la virémie. Par contre, ceux-ci sont cruciaux pour prévenir une réémergence du virus à long terme.

## 7 Hypothèse

En tant que médiateurs de l'immunité innée, les anticorps naturels doivent être capables de reconnaître une grande variété d'épitopes différents. La reconnaissance rapide des micro-organismes est cruciale pour le contrôle précoce de l'infection ainsi que pour l'induction des réponses immunitaires adaptatives. Or, l'induction de ces réponses immunitaires dépendent entre autres de la capacité du système immunitaire inné, dont les anticorps naturels, à recruter les pathogènes aux organes lymphoïdes.

Nous croyons donc qu'un répertoire primaire diversifié des anticorps naturels est crucial pour un recrutement efficace des pathogènes aux organes lymphoïdes. Conséquemment, nous pensons que des souris qui ont un répertoire primaire déficient auront de la difficulté à recruter correctement les pathogènes aux organes lymphoïdes. Ceci pourra alors se refléter par leur présence accrue dans les organes périphériques. De plus, nous croyons qu'un recrutement aux organes lymphoïdes moins important aura pour conséquence de diminuer l'amplitude des réponses immunitaires adaptatives des lymphocytes B-2 et des lymphocytes T cytotoxiques.

Nous nous proposons donc, dans cette étude, d'évaluer l'impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans le recrutement de VSV-IND et de LCMV-WE aux organes lymphoïdes, mais aussi, d'en évaluer l'impact sur les réponses adaptatives humorales et cellulaires.

## **8 Objectifs de travail**

### **8.1 Caractérisation des souris transgéniques**

Les souris transgéniques qui ont été décrites à la section 1.4 possèdent des répertoires des lymphocytes B qui sont moins diversifiés qu'une souris de type sauvage. Toutefois, il est possible que la création des mutations ayant servi à réaliser ces souris ait affecté les populations des lymphocytes B-1 ainsi que leur capacité à sécréter des anticorps naturels. Afin d'exclure cette possibilité pour l'interprétation de nos résultats, nous allons tout d'abord évaluer la quantité totale d'anticorps naturels sécrétés par chacune de ces souris. Par la suite, leur capacité à lier différents antigènes sera évaluée. Finalement, des analyses par cytométrie en flux permettront de quantifier les populations de lymphocytes B-1 sécrétrices d'anticorps naturels dans la cavité péritonéale.

### **8.2 Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans le recrutement aux organes lymphoïdes**

La principale fonction des anticorps naturels est de permettre un recrutement plus efficace et rapide aux organes lymphoïdes. Ceci se reflète par une diminution des pathogènes en périphérie et permet ensuite d'éviter une réplication virale à cet endroit.

Afin de déterminer l'importance de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans le recrutement aux organes lymphoïdes, les différentes souris transgéniques seront infectés avec soit le VSV ou soit le LCMV et les titres viraux seront calculés dans différents organes à différents temps post-infection.

Si la diversité des anticorps naturels est importante pour un recrutement efficace, nous nous attendons à ce que les souris qui ont les répertoires les plus restreints, soit la QM et la HC1, aient plus de difficulté à recruter les virus aux organes lymphoïdes. De plus, nous croyons que les souris dépourvus en anticorps naturels, soit la J<sub>H</sub>T et la RAG-1<sup>-/-</sup> recrutent très peu les virus aux organes lymphoïdes.

Dans un deuxième temps, nous voulons déterminer s'il est possible de restaurer, ou du moins, d'améliorer, le recrutement des virus aux organes lymphoïdes chez les souris J<sub>H</sub>T et HC1. Pour ce faire, des IgM de souris naïves seront purifiés, puis, transférés aux souris. Tout comme pour les expériences de dissémination virale, les souris seront par la suite infectées puis les titres viraux seront mesurés dans différents organes.

### 8.3 Impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques

Une fois que les anticorps naturels ont lié les pathogènes, ils forment des complexes immuns qui sont recrutés plus facilement aux organes lymphoïdes. À ce moment, ils peuvent induire des réponses immunitaires adaptatives comme celle des lymphocytes T cytotoxiques. Toutefois, le rôle des complexes immuns dans l'induction de la réponse cytotoxique des lymphocytes T est moins reconnu même si plusieurs expériences semblaient démontrer leur importance (Thorton *et al*, 1994; Suresh *et al*, 2003; Stager *et al*, 2004).

Afin de vérifier si la formation de complexes immuns via la présence d'anticorps naturels est importante pour l'induction d'une réponse cellulaire, certaines souris J<sub>H</sub>T recevront des IgM purifiés avant d'être infectés avec le LCMV. L'activité cytotoxique des lymphocytes T sera comparée à des souris J<sub>H</sub>T qui n'auront pas reçu d'IgM. De plus, ces mêmes expériences seront effectuées chez chacune de nos souris transgéniques afin d'évaluer leur capacité à induire une réponse cytotoxique.

Si la présence d'anticorps naturels formant des complexes immuns est importante dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative des lymphocytes T cytotoxiques, nous nous attendons à voir une meilleure réponse chez les souris J<sub>H</sub>T ayant reçu des IgM purifiés. Finalement, si la diversité des anticorps naturels est importante, les souris dont le répertoire est plus restreint devrait avoir des réponses cytotoxiques plus faibles.

#### 8.4 Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans l'induction de la réponse des lymphocytes B-2

Tout comme pour les lymphocytes T cytotoxiques, un recrutement rapide des pathogènes aux organes lymphoïdes peut influencer la réponse des lymphocytes B-2. De plus, il a déjà été démontré que la formation de complexes immuns influençait grandement la réponse humorale.

Afin de déterminer l'impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction d'une réponse humorale, des souris J<sub>H</sub>T seront irradiées puis recevront un transfert de moelle osseuse afin de générer une population de lymphocytes B-2. Par la suite, certaines de ces souris recevront des IgM purifiés provenant de souris C57BL/6 avant d'être infectées avec VSV. La capacité à induire une réponse humorale neutralisante sera comparée dans les deux groupes de souris.

Encore une fois, si la présence d'anticorps naturels est importante dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative de type humorale, nous nous attendons à ce que les J<sub>H</sub>T ayant reçu des IgM purifiés génèrent de meilleures réponses humorales.

## **Chapitre 2**

### **Matériel et méthode**

#### **1 Lignées cellulaires**

Les lignées suivantes proviennent de l'ATCC (*American Type Culture Collection*). La lignée cellulaire MC57G provient d'un fibrosarcome isolé d'une tumeur d'une souris C57BL/6 après traitement au méthylcholanthrène (# ATCC : CRL-2295). La lignée L929 provient du tissu connectif sous-cutané de souris C3H/An (# ATCC : CCL-1). La lignée BHK-21 (*baby hamster kidney*) a été isolée à partir de reins de hamster nouveaux-nés par I.A Macpherson et M.G.P Stoker (# ATCC : CCL-10). La lignée cellulaire Vero a été isolée à partir de reins de singe vert africain (*Cercopithecus aethios*) (# ATCC : CCL-81). Elles ont été cultivées dans du milieu MEM (*Earle's Modified Essential Medium*) (Invitrogen, Burlington, Ontario) additionné de 5 % (volume/volume, v/v) de sérum bovin foetal décomplémenté 30 minutes à 56°C (SBF) (Wysent, St-Bruno, Québec).

Les cellules EL-4 proviennent d'un lymphome de lymphocyte T d'une souris C57BL/6 exprimant la molécule de CMH H-2b. Cette lignée provient du Dr. Claude Daniel (INRS- Institut Armand-Frappier, Québec, Canada) et a été cultivée dans du MEM additionné de 10 % de SBF (v/v).

L'hybridome VL4 a été fourni par le laboratoire du Dr. Rolf M. Zinkernagel (Institut of Experimental Immunologie, Zurich, Suisse). Elle a été cultivé dans du milieu IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) additionné de 10 % (v/v) de SBF et de  $\psi$ -mercaptoéthanol (Invitrogen).

## **2 Production virale**

### **2.1 Production du virus de la stomatite vésiculaire, sérotype Indiana (VSV-IND)**

Le virus VSV-IND a été produit sur des cellules BHK-21 cultivées jusqu'à une confluence de 50 % dans du milieu MEM 5 % (v/v) de SBF. Les flacons ont été vidangés afin qu'il ne reste qu'environ 5 millilitres (ml) de milieu de culture. Par la suite, les cellules ont été infectées avec VSV-IND (fourni par le Dr. Rolf Zinkernagel, Institut of Experimental Immunology, Zurich, Suisse) à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 et laissées à température pièce (TP) pendant 2 heures. Ensuite, 40 ml de milieu MEM ont été ajoutés aux flacons qui ont été incubés 24 heures à 37°C à une atmosphère de 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>. Finalement, les surnageants ont été collectés, centrifugés à 2000 tours/minute pendant 30 minutes à 4°C (Sorvall Legend RT, Mandel, Guelph, Ontario), aliquotés et congelés à -80°C. Le titre viral a été déterminé par un test de plages de lyses et est décrit à la section 3.1.

### **2.2 Production du virus de la chorioméningite lymphocytaire, sérotype WE (LCMV-WE)**

Le virus a été produit sur des cellules L929 à une confluence de 80 %, cultivées dans du milieu MEM 5 % (v/v) de SBF. Les flacons de cellules ont été vidés et le virus a été ajouté dans 5 ml de milieu à une MOI de 0,01. Par la suite, les flacons ont été incubés une heure avec agitation manuelle aux 10 minutes. Ensuite, 10 ml de milieu ont été ajoutés et l'incubation s'est poursuivie pendant 48 heures à 37°C à une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub> (v/v). Après cette incubation, le surnageant contenant les particules virales a été récupéré et aliquoté. Du milieu frais a été ajouté et l'incubation s'est poursuivie encore 24 heures. Le surnageant à 72 heures a lui aussi été récolté et aliquoté. Afin d'évaluer le titre viral de la production, un test de foyers infectieux a été effectué et est décrit à la section 3.2.

### 3 Titrage des virus

#### 3.1 Titrage de VSV-IND

Le titrage de VSV-IND s'est fait par un test de plage de lyse sur des cellules Vero. Tout d'abord, les cellules à une concentration de  $2,5 \times 10^5$  cellules/ml ont été déposées dans les puits d'un plateau 24 puits (Corning, New York, USA) et incubées pendant 24 heures. Le lendemain, les échantillons viraux ont été soniqués dans un bain-sonicateur 2 fois, pendant 15 secondes, afin de dissocier les agrégats et dilués dans un plateau 96 puits à fonds ronds (Corning) dans du MEM 5 % (v/v) de SBF. Le milieu de culture des cellules a été aspiré et les dilutions virales ont été déposées sur les cellules. Lorsqu'il s'agissait d'homogénats d'organes, la suspension a directement été déposée sur les cellules, sans sonication. Les plateaux ont été incubés 1 heure à 37 °C à une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub> avec agitation manuelle aux 15 minutes. Après ce temps d'incubation, environ 300 µL d'une solution de méthylcellulose/MEM<sup>1</sup> a été déposé sur les cellules et les plateaux ont été laissés à nouveau dans l'incubateur. Après 24 heures, la solution de méthylcellulose/ MEM a été aspirée et environ 300 µL d'une solution de fixateur/colorant<sup>2</sup> ont été ajoutés afin de fixer et colorer les cellules. Après 6 heures d'incubation à température pièce, les plateaux ont été rincés à l'eau distillée. Finalement, les plages de lyse ont été dénombrées afin d'évaluer le titre viral.

#### 3.2 Titrage de LCMV-WE

Le titrage de LCMV-WE a été effectué par une méthode de titrage de foyers infectieux sur des cellules MC57G. L'échantillon a été dilué à différentes

---

<sup>1</sup> 1% poids/volume (p/v) de méthylcellulose (Sigma, Steinheim, Suisse), 10% v/v MEM 10X (Invitrogen), 5% v/v SBF, 1% Pénicilline/Streptomycine 100X (Invitrogen), 0,5% v/v glutamine 100X (Invitrogen), 1,7% v/v bicarbonate de sodium 7,5% (Invitrogen), 35,8% v/v ddH<sub>2</sub>O.

<sup>2</sup> 50 % (v/v) EtOH 96 %, 0,5 % p/v crystal violet (Fisher) , 0,8 % p/v NaCl (Sigma-Aldrich), 45 % v/v ddH<sub>2</sub>O, 5% formaldéhyde 37 % (Sigma-Aldrich).

concentrations directement dans un plateau 24 puits (Corning) contenant du MEM 5 % (v/v) de SBF. Par la suite,  $8 \times 10^5$  cellules/ml ont été rajoutées à ces dilutions. Les plateaux ont été incubés entre 4 et 6 heures, à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Après ce temps d'incubation, environ 300 µL d'une solution de méthylcellulose/MEM a été déposé sur les cellules et les plateaux ont été laissés à nouveau dans l'incubateur pour 48 heures. La solution de méthylcellulose/MEM a été aspiré et les plateaux ont été lavé deux fois avec du HBSS (*Hank's Balance Salt Solution*) (Invitrogen). Les cellules ensuite été fixées 30 minutes à la formaldéhyde 25 % (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Toutes les étapes ont été réalisées à température pièce (TP), après 3 à 5 lavages au tampon phosphate (PBS) entre chaque étape subséquente. Afin de perméabiliser les cellules, 250 µL d'une solution de HBSS rouge phénol (Invitrogen), contenant 0.5 % (v/v) de Triton-X (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a été ajouté au tapis cellulaire pendant 20 minutes. Par la suite, afin de bloquer les sites de liaisons non-spécifiques, 250 µL d'une solution de PBS contenant 10 % (v/v) de SBF a été ajouté et laissée 90 minutes. Afin de détecter le virus et d'amplifier le signal, trois anticorps différents ont été utilisés et laissés, sur les cellules pendant 90 minutes. 200 µL de chacune des dilutions d'anticorps ont été déposés sur les cellules. Tout d'abord, l'anticorps primaire est un rat anti-LCMV présent dans le surnageant de l'hybridome VL4. L'anticorps secondaire, un chèvre anti-rat conjugué à la peroxydase (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA), a été utilisé à une concentration de 5 µg/ml dilué dans du HBSS. Finalement, l'anticorps tertiaire était un porc anti-chèvre conjugué à la peroxydase (Biosource, Camarillo, CA, USA) et a été utilisé dilué 1 :400 dans du HBSS. Finalement, 300 µL d'un substrat composé de 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich), de 0,1 M de C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (Sigma-Aldrich), de 50 % de H<sub>2</sub>O, de 0,04 % (poids volume, p/v) d'orthophényldiamine (Sigma-Aldrich) et de 0,00004 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (Sigma-Aldrich) a été déposé sur les cellules et laissé environ 20 minutes. Les foyers d'infection sont dénombrés afin de déterminer le titre infectieux.

## 4 Purification des IgM

Le sérum de souris C57BL/6 utilisé pour la purification des IgM a été acheté (Innovative Immunoresearch, USA).

Avant la purification, chacun des sérums de souris ont été mélangé, dans un rapport 1 :1 (v/v), au tampon de liaison (0,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Sigma-Aldrich) dans du tampon phosphate 20 mM) afin d'éviter la précipitation des IgM. Par la suite, la solution a été passée sur la colonne *HiTrap IgM Purification HP* (GE Healthcare, pays) grâce à la technologie Akta Prime. La colonne a ensuite été lavée avec le tampon de liaison jusqu'à ce que la densité optique (DO) retombe à zéro. Par la suite, le tampon d'élution (tampon phosphate 20 mM) a été ajouté afin de recueillir les IgM. Finalement, une deuxième élution avec du tampon phosphate 20 mM contenant 30 % d'isopropanol (Sigma-Aldrich) a été effectuée afin de recueillir les IgM qui se seraient liés plus fortement à la colonne.

Afin de s'assurer de la pureté des fractions recueillies, les échantillons ont été migrés sur un gel d'acrylamide 12 %. Seules les fractions ayant une bande à 50 kilodaltons (kD) et à 25 kD ont été conservées. La présence d'IgM et l'absence d'IgG a été confirmée par immunobavardage de type Western sur membrane de nitrocellulose (Ge Healthcare, Canada). Des anticorps anti-IgM et anti-IgG de souris, couplés à la peroxydase (Jackson Immunoresearch) et dilués 1 :50 000 (v/v) dans du PBS ainsi que des molécules d'IgM (Sigma-Aldrich) et d'IgG2a (Jackson Immunoresearch) ont été utilisés. Les anticorps ont été mis en présence de la membrane pendant une heure avant 5 lavages au PBS-Tween-20 0,1 %. Les bandes ont été révélées par l'ajout d'un substrat ECL plus (GE Healthcare).

Finalement, la concentration a été déterminée par spectrophotométrie à 280 nm et en utilisant le facteur de conversion pour les IgM (1,2 mg/ml par unité de densité optique) (Harlow et Lane, 1988). Les anticorps ont été concentrés et dialysés 3 fois dans du PBS avant d'être injectés.

## 5 Manipulation sur les souris

### 5.1 Typage des souris HC1

Entre 21 et 31 jours après la naissance, environ 2 mm de la queue des souriceaux était prélevés puis digérés avec 0,1 mg/ml de protéinase K (Roche, Mannheim, Allemagne) diluée dans du tampon de digestion<sup>3</sup>. La réaction de digestion s'est faite pendant la nuit à 55°C sous agitation. Le lendemain, les échantillons étaient chauffés à 95°C afin d'inactiver la protéinase puis centrifugés à 13 200 tours/minute (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) afin de recueillir l'ADN. Deux microlitres (µL) de chaque échantillon d'ADN ont été ajoutés au mélange pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (2 µL de tampon de PCR Thermo Pol 10X (Invitrogen), 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL d'amorce *Forward* (5' GCCTCAGGAGATGAGCTAGAGC 3') 1 :10, 1 µL d'amorce *Reverse* (5' TAGAGACAGCACTGTGCGTTGG 3') 1 :10, 0,4 µL de polymérase Taq 5 unités/µL (Invitrogen) et 13,1 µL de H<sub>2</sub>O distillée).

Les réactions de PCR ont débuté par une période de 5 minutes à 94°C, ont subi 35 cycles d'élongation et se sont terminées par une période d'élongation de 4 minutes à 72°C. Les cycles d'élongation étaient caractérisés par les étapes de dénaturation (95°C), d'appariement (60°C) et d'élongation (72°C) de 40 secondes chacune.

Environ 4 µL d'échantillon d'ADN ont ensuite été déposés dans un gel d'agarose 1 % (p/v) et 1 % de bromure d'éthidium (v/v) (Sigma-Aldrich) et migrés à 120 volts pour environ 30 minutes. Les produits amplifiés ont été détectés avec l'appareil Alphamager 3400 (AlphaInnovatech, San Leandro, CA, USA). La détection d'une bande de 171 pb confirmait que la souris possédait le transgène HC1 dans son génome.

---

<sup>3</sup> 100 mM Tris-HCl pH9, 500mM KCL, 5% Tween 20 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)

## 5.2 Typage des souris P14<sup>4</sup>

Entre 21 et 31 jours après la naissance, environ 200  $\mu$ L de sang ont été prélevés chez les souriceaux par le sinus rétro-orbital suite à une anesthésie à l'isoflurane (Baxter, Mississauga, Ontario). Le sang était mis directement dans les tubes pour la cytométrie en flux contenant du tampon de cytométrie<sup>5</sup> et 20 unités d'héparine (Invitrogen) afin d'éviter la coagulation. Les échantillons ont été lavés une première fois en remplissant le tube de tampon de cytométrie puis en centrifugeant 5 minutes à 400 g à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot de cellules resuspendu. Un double marquage a ensuite été effectué en ajoutant 1  $\mu$ L d'anticorps anti-CD8 $\alpha$  marqué à la phycoérythrine (PE) et 1  $\mu$ L d'anticorps anti-chaîne V $\alpha$ 2 marqué à la fluorescéine (FITC) (BD Biosciences). Les deux anticorps ont été mis en présence des cellules à la noirceur pendant 20 minutes à 4°C. Les échantillons ont été lavés deux fois avec le tampon de cytométrie. Par la suite, afin d'éliminer les érythrocytes, un tampon de lyse dilué dans de l'eau distillée (BD Biosciences) a été ajouté, en mélangeant, pendant 10 minutes. Les cellules ont encore été lavées puis resuspendues dans 400  $\mu$ L de tampon. Les échantillons ont finalement été analysés en cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Les souris ayant entre 70 % et 95 % de lymphocytes CD8 possédant la chaîne V $\alpha$ 2 étaient considérées comme P14.

## 5.3 Infection des souris avec VSV-IND

Les souris C57BL/6 (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec), QM<sup>6</sup>, HC1<sup>6</sup>, AID<sup>-/-6</sup>, RAG-1<sup>-/-7</sup>, et J<sub>H</sub>T<sup>8</sup> ont été infectées par voie intra-veineuse (iv) avec une dose de  $2 \times 10^8$  unités formatrices de plages (ufp) dans du MEM 0 % SBF (v/v) pour un volume final de 0,2 ml. À 1 heure, 2 heures, 5 heures et 8 heures post-infection (p-i)

---

<sup>4</sup> Fournies par P. Ohashi, Hôpital Princess Margaret, Toronto, Canada

<sup>5</sup> 1% sérum d'albumine bovine (p/v) , 2% d'azide de sodium (v/v) dans du PBS

<sup>6</sup> Fournies par le Dr. Rolf Zinkernagel, Institut of Experimental Immunology, Zurich, Suisse

<sup>7</sup> Fournies par le Dr. Claude Daniel, INRS-Institut Armand-Frappier, Québec, Canada

<sup>8</sup> Fournies par le Dr. Andrew MacPherson, Mc Master University, Toronto, Ontario, Canada

les souris étaient sacrifiées par inhalation de CO<sub>2</sub>. Le grand lobe du foie, la rate et les reins ont été prélevés afin de déterminer le titre du virus. De plus, 300 µL de sang a été prélevé par ponction intracardiaque et dilué 1 :1 (v/v) dans du PBS contenant 20 unités d'héparine afin d'éviter la coagulation. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'au moment du titrage.

Avant le titrage les organes ont été pesés et homogénéisés au Polytron (Kinematica AG, Luzerne, Suisse) dans 2 mL de milieu MEM 5 % SBF (v/v). Les homogénats ont été centrifugés pendant 5 minutes à 1 200 tours/minute à 40C. Le titre de VSV-IND dans le surnageant des organes et dans le sang a été déterminé par un test de plages de lyse tel que décrit à la section 3.1.

Dans un deuxième temps, les souris J<sub>H</sub>T irradiées ayant reçu ou non des IgM purifiés ainsi que des C57BL/6 ont été infectées avec 2 x 10<sup>6</sup> ufp dans du MEM 0 % SBF (v/v) pour un volume final de 0,2 ml. L'état et la survie des souris ont été évalués quotidiennement. Les souris présentant les points limites suivants ont été euthanasiées : perte massive de poids et poils ébouriffés (souris moribonde), perte de mobilité des membres inférieurs et réflexe de retournement lent ou paralysie des membres inférieurs. Afin d'évaluer la cinétique d'apparition d'anticorps anti-VSV-IND neutralisants, des échantillons sanguins ont été récoltés aux jours 0, 4, 8 et 12 post-infection par sinus rétro-orbital ou par ponction intra-faciale. Les souris étaient préalablement anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Baxter).

#### 5.4 Infection des souris avec LCMV-WE

Dans un premier temps, les souris C57BL/6, QM, HC1, AID<sup>-/-</sup>, RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T ont été infectés par voie iv avec une forte dose de LCMV-WE, soit 2 x 10<sup>6</sup> unités formatrice de foyer infectieux (uff). À 2 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures post-infection, les souris ont été sacrifiées par inhalation de CO<sub>2</sub>. Comme décrit à la section

précédente, la rate, le grand lobe du foie, les reins et du sang ont été prélevés. Le virus a été titré tel que décrit aux sections 3.2 et 5.3.

Dans un deuxième temps, les souris C57BL/6 et J<sub>H</sub>T ayant reçu des cellules de rate de souris P14 ont été infectés avec une faible dose de virus, soit 200 uff. Huit jours p-i les souris ont été sacrifiées et les rates ont été prélevées afin d'évaluer l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> tel que décrit à la section 7.

## 5.5 Irradiation

Les souris C57BL/6 et JHT ont été irradiées deux fois à une dose semi-létale de 700 rads (125 kilo Volts, 16 mili Ampères). Les deux irradiations ont été séparées de 4 heures. Suivant l'irradiation, les souris ont été laissées telles quelles pour la nuit. Les transferts de moelle osseuse ont été effectués le lendemain matin tel que décrit à la section 5.6.2.

## 5.6 Transferts adoptifs de cellules de splénocytes, de moelle osseuse et d'IgM

### 5.6.1 Transfert de splénocytes

Dans un premier temps, des souris J<sub>H</sub>T ont reçu des cellules de rate de souris P14. La rate, une fois prélevée, a été déposée dans du milieu de culture MEM additionné de 5 % de SBF (v/v). La rate a été broyée au travers d'un tamis moléculaire ayant des pores de 100 µM de diamètre. Les cellules ont été centrifugées 7 minutes à 1 200 tours/minute, comptées, puis diluées dans du milieu de culture MEM sans SBF. Les cellules ont finalement été injectées par voie iv à une concentration de 10<sup>4</sup> cellules dans 0,2 ml.

### 5.6.2 Transfert de cellules de moelle osseuse

Les cellules de moelle osseuse ont été prélevées sur les tibias et les fémurs de souris C57BL/6. Les os ont été lavés avec environ 5 ml de milieu MEM additionné de 5 % de SBF (v/v) chacun. Les cellules ont été centrifugées puis resuspendues dans du milieu MEM sans SBF. Finalement,  $10^7$  cellules ont été injectées par voie iv.

### 5.6.3 Transfert d'IgM

Les IgM de souris C57BL/6 purifiés ont été injectés par voie iv environ 15 heures avant l'infection. Les souris ont reçu soit 400  $\mu$ g ou 600  $\mu$ g. Les anticorps étaient dilués dans du PBS.

## 6 Analyse de la réponse humorale

### 6.1 Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-VSV-IND

Les cellules Vero ont été déposées dans les puits d'un plateau 96 puits (Corning) à fond plat et incubées 24 heures dans du milieu MEM à 5 % (v/v) de SBF. Les échantillons sanguins ont été prélevés sur des souris naïves âgées de 2 mois par ponction intra-cardiaque puis centrifugés à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Les sérums, préservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , ont été dilués 1 :4 dans du MEM 2 % (v/v) de SBF. Les sérums ont aussi été testés pour leur capacité neutralisante en l'absence d'IgM. Afin de dépléter le sérum en IgM, 20  $\mu$ L de sérum ont été mis en présence de 20  $\mu$ L de  $\beta$ -Mercaptoéthanol 0.1M (Bio-Rad) pendant 1 heure à TP. Les échantillons ont par la suite été décomplémentés 30 minutes à  $56^{\circ}\text{C}$ .

Des dilutions successives d'un facteur de 2 ont par la suite été effectuées dans un plateau de 96 puits à fond rond dans du milieu MEM 2 % (v/v) de SBF. Par la suite, dans une proportion 1 :1, chaque échantillon a été mis en contact, pendant 1h30 à

37°C, avec une dilution 1 :50 du virus soniqué ( $3.08 \times 10^8$  ufp/ml). Cette étape permet la neutralisation du virus par les anticorps présents dans le sérum. Les mélanges sérum-virus ont ensuite été déposés sur les cellules et laissés 1 heure à 37°C. Après cette incubation, deux gouttes (environ 200 µL) de méthylcellulose/MEM ont été déposées dans les puits. Les plateaux ont nouveau été incubés. Après 24 heures, l'innoculum a été enlevé et les cellules ont été fixées et colorées avec la solution fixateur/colorant environ 6 heures avant d'être rincés à l'eau. Les plages de lyses ont été dénombrées afin de déterminer le titre neutralisant des anticorps qui se définit par la plus grande dilution de sérum qui réduit de 50% la quantité de plages dénombrées dans le témoin négatif (virus seul).

## 6.2 Dosage du titre neutralisant des anticorps anti-LCMV-WE

La méthode pour doser le titre d'anticorps neutralisants anti-LCMV-WE s'effectue sensiblement de la même façon que pour le titrage du virus mais dans des plateaux 96 puits à fond plat plutôt que des plateaux 24 puits. Les échantillons ont été dilués 1 :4 dans du MEM 5 % SBF (v/v) puis d'un facteur de 2 pour les rangées subséquentes. Tout comme pour le dosage des anticorps neutralisants anti-VSV-IND, certains échantillons ont été au préalable déplétés en IgM en utilisant 0,1M de  $\beta$ -Mercaptoéthanol. Une dilution virale de 1 :50 du virus soniqué ( $2 \times 10^3$  ufp/ml) a été par la suite ajoutée aux dilutions du sérum. Le mélange a ensuite été incubé 90 minutes à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Des cellules MC57G dans du milieu MEM 5 % SBF (v/v) ont par la suite été déposées dans les puits puis laissées de 3 à 4 heures à 37°C. Finalement, environ deux gouttes de méthylcellulose/MEM ont été rajoutées et le mélange sérum-virus a été laissé à 37°C pour 48 heures. Les étapes de coloration qui suivent sont identiques à celles du titrage du virus sauf que les volumes ont été adaptés pour des plateaux 96 puits. Le titre neutralisant est déterminé par la plus grande dilution de sérum qui réduit de 50 % le nombre de foyers infectieux du témoin négatif (virus seul).

### 6.3 Quantification des IgM par ELISA

Des anticorps anti-IgM de souris (Jackson Immunoresearch) ont été adsorbés dans un plateau ELISA (Corning) à une concentration de 2 µg/ml en mettant 50 µL par puits. L'adsorption s'est fait pendant une heure, à 37°C, sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. Par la suite, les puits ont été vidés et le blocage des liaisons non-spécifiques a été effectué en ajoutant 150 µL de diluant ELISA<sup>9</sup> pour une heure à température pièce. La solution blocante a été jetée et les dilutions de sérums ajoutées. La première dilution démarrait à un ratio de 1 : 20 000 puis était dilué d'un facteur de 3 directement dans le plateau. Afin de pouvoir déterminer la quantité d'IgM, un standard IgM (Sigma-Aldrich) a été utilisé à une concentration de 936 µg/ml. Après une heure à TP, les échantillons ont été jetés et le plateau lavé 4 fois au PBS-Tween 0,1% (v/v) et une fois au PBS. Par la suite, l'anticorps secondaire, un anticorps de chèvre anti-IgM de souris couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch), a été rajouté au puits dilué dans un ratio 1 :20 000 à raison de 100 µL par puits. Après une heure à TP, l'anticorps secondaire a été jeté puis les plateaux lavés selon les mêmes conditions que pour les échantillons. Par la suite, 100 µL de substrat<sup>10</sup> ont été rajoutés aux puits pendant 20 minutes, avant d'être inhibé par l'ajout de 50 µL de HCL 1M par puits. L'absorbance à une longueur d'onde de 490 nm a finalement été mesurée avec le lecteur ELISA 680 (Bio-Rad). La quantité d'IgM (ng/ml) a pu être déterminée en faisant une courbe standard à partir de la molécule d'IgM.

## 7 Analyse de la réponse cellulaire par test de cytotoxicité cellulaire

Dans un premier temps, les cellules cibles EL-4 ont été mises en présence soit de 10<sup>-6</sup> M du peptide gp33 préalablement soniqué (KAVYNFATC) (Sigma-Aldrich) représentant l'épitope immunodominant de la réponse cytotoxique anti-LCMV ou,

---

<sup>9</sup> 10 % (v/v) de SBF, 0,2 % de Tween-20 (Bio-Rad) dans du PBS

<sup>10</sup> 0,04 % (p/v) d'ortho-phényldiamine (Sigma), 0,000033 % (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) dans du tampon citrate pH5 (1 % (p/v) C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (Fisher), 1,4 % (p/v) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O (USB) dans H<sub>2</sub>O distillée

comme témoin négatif, en présence de milieu MEM additionné de 2 % de SBF (v/v). Les cellules ont par la suite été marquées à l'isotope radioactif chrome 51 ( $^{51}\text{Cr}$ ) (GE Healthcare) pendant 2 heures, à  $37^{\circ}\text{C}$ , sur une plaque agitatrice. Par la suite, les cellules ont été lavées 2 fois avec du MEM 2 % de SBF (v/v) en centrifugeant à 400 g.

Parallèlement, les rates des souris à tester ont été prélevées et déposées dans du milieu MEM 5 % de SBF (v/v) avant d'être broyées au travers d'un tamis moléculaire de  $100\ \mu\text{M}$ . Les échantillons ont ensuite été comptés et dilués dans les puits d'un plateau 96 puits à fonds ronds. Ces dilutions permettaient d'obtenir les ratios cellules effectrices : cellules cibles suivants : 90 :1, 30 :1, 10 :1 et 3 :1. Finalement, les cellules cibles EL-4 ont été ajoutées aux puits. Quatre puits contenant un mélange de milieu MEM additionné de 2 % de SBF (v/v) et de cellules EL-4 ont été conservés afin de mesurer le relâchement spontané de  $^{51}\text{Cr}$ . De même, quatre puits contenant un mélange de PBS-0,1 % Triton-X (Bio-Rad) et de cellules EL-4 ont été réservés afin de quantifier le relâchement maximal de  $^{51}\text{Cr}$  par les cellules EL-4. Finalement, le mélange a été centrifugé 30 secondes à 200 g afin de promouvoir le contact entre les cellules cibles et effectrices. Les plateaux ont été laissés 5 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ . Chaque échantillon était effectué en triplicata.

Par la suite, les plateaux ont été centrifugés à 400 g pendant 5 minutes et  $30\ \mu\text{L}$  du surnageant ont été prélevés et déposés dans un plateau 96 puits à fonds ronds flexible (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). Afin de convertir les rayons  $\gamma$  émis par le  $^{51}\text{Cr}$  en rayons  $\beta$ ,  $150\ \mu\text{L}$  de liquide Supermix (Perkin Elmer) ont été ajouté aux puits. Le plateau a été laissé 20 minutes sur une plaque agitatrice afin d'être lu avec le Trilux (1450 Microbeta Wallac, Perkin Elmer). Le pourcentage de lyse spécifique a été mesuré selon la formule suivante :

$$\% \text{ lyse spécifique} = \frac{(\text{valeur moyenne de relâchement} - \text{relâchement minimal})}{(\text{relâchement maximal} - \text{relâchement minimal})}$$

## **8 Caractérisation des populations cellulaires par cytométrie en flux**

Dans un premier temps, pour la caractérisation des populations cellulaires présentes dans la rate, celle-ci a été prélevée et broyée comme mentionné à la section 5.3. Différents marquages ont été effectués afin de mettre en évidence différentes populations cellulaires. Tous les échantillons ont reçu 1  $\mu\text{L}$  d'anticorps par million de cellules.

Dans un deuxième temps, pour la caractérisation des populations de la cavité péritonéale, des lavages péritonéaux ont été effectués dans 15 ml de PBS additionné de 20 unités d'héparine (Invitrogen). Encore une fois, tous les échantillons ont reçu 1  $\mu\text{L}$  d'anticorps par million de cellules. Afin de mettre la population des lymphocytes B-1 en évidence, des doubles marquages ont été effectués.

Chaque anticorps a été incubé avec les cellules 20 minutes à 4°C, à la noirceur avant d'être lavé deux fois au tampon de cytométrie. Les cellules ont été resuspendues dans un volume final de 400  $\mu\text{L}$  et les cellules mortes ont été exclues au 7-AAD.

## **9 Analyse statistique**

L'analyse statistique de ce mémoire a été effectuée avec la loi de Student. Les données qui étaient inférieures à 0.05 ( $P < 0.05$ ) étaient jugées significatives.

## **Chapitre 3**

### **Résultats**

#### **1 Caractérisation des souris transgéniques**

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les différentes souris transgéniques utilisées dans cette étude possédaient des niveaux comparables de lymphocytes B-1. Par la suite, l'activité sécrétrice des lymphocytes B-1 de ces souris a été évaluée en mesurant la quantité totale d'anticorps naturels sériques d'isotype IgM. De plus, nous avons déterminé la capacité des anticorps naturels de chacune des souris transgéniques à reconnaître les deux modèles viraux étudiés. Finalement, puisque les anticorps naturels peuvent agir en neutralisant directement les pathogènes, nous avons évalué leur capacité à neutraliser le VSV ou le LCMV.

##### **1.1 Quantification des populations de lymphocytes B-1**

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les différentes souris transgéniques utilisées lors de cette étude possédaient les mêmes proportions de lymphocytes B-1 que les souris témoins C57BL/6. Pour ce faire, des lavages de la cavité péritonéale ont été effectués afin de récolter les lymphocytes B-1a. Par la suite, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-B220 et anti-LY-1 qui distinguent les lymphocytes B-1a des lymphocytes B-1b et B-2. En effet, la population des lymphocytes B-1a est B-220<sup>int</sup> LY-1<sup>int</sup> par opposition aux lymphocytes B-1b et B-2 qui sont LY-1<sup>-</sup>.

Nous avons constaté que toutes les souris transgéniques possèdent environ 7 % des cellules de la cavité péritonéale qui expriment B-220<sup>int</sup> LY-1<sup>int</sup> et donc, que l'on

peut caractériser comme étant des lymphocytes B-1a (Tableau 2). De plus, les populations de lymphocytes B-1 sont similaires à celles des souris témoins C57BL/6 dont environ 7 % des cellules de la cavité péritonéales sont des lymphocytes B-1a. Finalement, les souris RAG-1<sup>-/-</sup> ne possèdent pas de lymphocytes B-1a dans leur cavité péritonéale puisqu'elles ne peuvent réarranger leur BCR et ne possèdent donc pas de lymphocytes B.

Souris	Proportion de lymphocyte B-1a dans la cavité péritonéale (%)	Écart type (%)
C57BL/6	8,28	2,86
AID <sup>-/-</sup>	11,96	6,32
HC1	9,93	2,15
QM	10,40	4,92
RAG-1 <sup>-/-</sup>	0,13	0,04

**Tableau 2 : Détermination de la proportion de lymphocytes B-1a dans la cavité péritonéale de chacune des souris transgénique des souris témoins C57BL/6.**

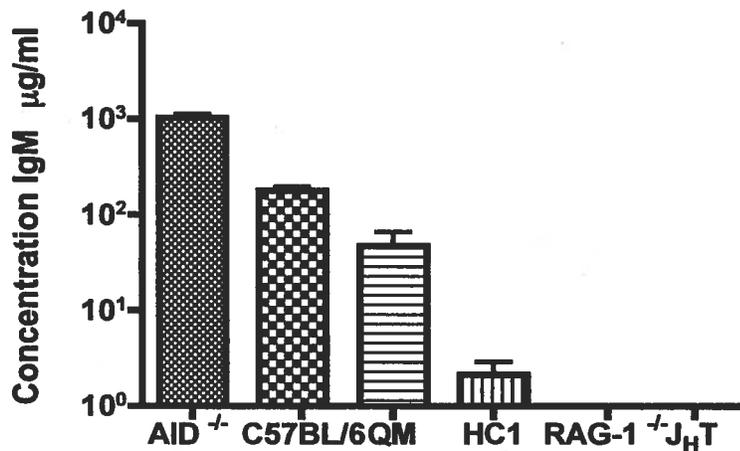
Les lavages de la cavité péritonéale ont été effectués sur des souris naïves âgées de 2 mois. Un million de cellules ont par la suite été marquées avec un anticorps de rat anti-B220 de souris marqué à la PE et un anticorps de rat anti-LY-1 (CD5) de souris marqué à la FITC. Les cellules mortes ont été exclues par marquage au 7-AAD ( $n = 3$ ).

En conclusion, les souris transgéniques possèdent des niveaux comparables de lymphocytes B-1a avec la souris témoin. Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature pour les souris HC1 et QM (Taylor LD *et al*, 1994 ; Cascalho M *et al*, 1997).

## 1.2 Quantification de la production d'anticorps naturels

Afin de déterminer la quantité d'anticorps naturels produits par chacune des souris transgéniques, du sang de souris naïves âgées de 2 mois a été prélevé. Par la suite, un test ELISA a été effectué en adsorbant au fond des puits des anticorps anti-IgM de souris. La quantité totale par ml de sang a pu être déterminée en utilisant une courbe standard à l'aide d'une molécule d'IgM dont la concentration était connue.

La souris AID<sup>-/-</sup> est celle qui présente la plus forte sécrétion d'anticorps naturels d'isotype IgM avec des concentrations atteignant les 1100 µg /ml. Par la suite, suivent les souris C57BL/6. Les souris QM et HC1 démontrent une faible sécrétion d'anticorps naturels, soit environ, 4 fois et 10 fois moins respectivement, que la souris C57BL/6. Les souris RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T, tel qu'attendu, ne produisent aucun IgM puisqu'elles n'ont pas de lymphocytes B (figure 20).



**Figure 20: Détermination de la quantité totale d'anticorps naturels produits par les souris AID<sup>-/-</sup>, C57BL/6, QM, HC1, RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T.**

Du sang de souris naïves âgées de 2 mois a été prélevé par ponction intra-cardiaque et la quantité d'IgM a pu être évaluée par test ELISA. Les densités optiques obtenues à 490 nanomètres (nm) ont été comparées à celle d'un échantillon d'IgM de concentration connue. ( $n = 3$  ; expérience répétée 2 fois).

La surproduction d'IgM par les souris AID<sup>-/-</sup> (environ 5 fois plus que la souris C57BL/6) n'est pas surprenante puisqu'il a déjà été rapporté que ces souris faisaient de l'hypermuglobulémie (Muramatsu *et al*, 2000). Les souris C57BL/6 démontrent un taux moyen d'anticorps naturels de 200 µg /ml de sang. Cette concentration concorde avec d'autres données présentes dans la littérature (Jayasekera *et al*, 2006; Klein-Schneegans *et al*, 1989).

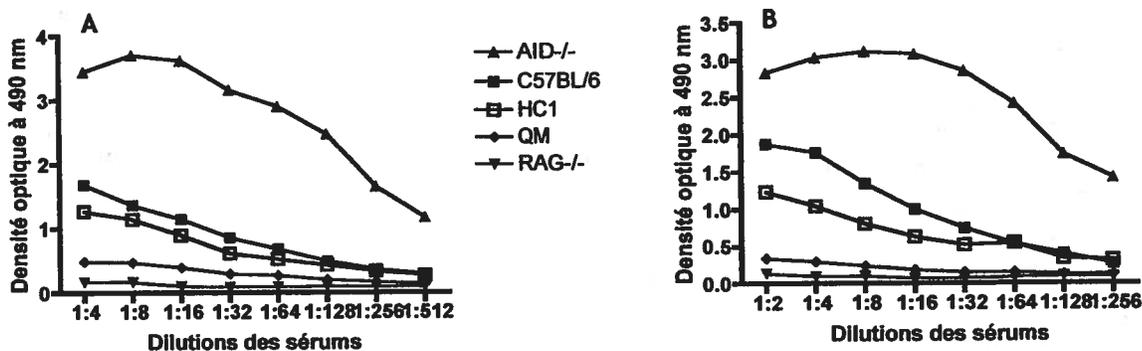
Par la suite, la souris QM produit environ la moitié moins d'anticorps naturels d'isotype IgM que la souris témoin C57BL/6. Ceci ne concorde malheureusement pas avec ce qui est retrouvé dans la littérature (Cascalho *et al*, 1996). En effet, il a été observé que les souris QM avaient la même quantité d'IgM que les souris de type sauvage. Toutefois, des observations provenant de d'autres laboratoires tendent à démontrer qu'il y a une plus faible production d'IgM chez ces souris (*Alain Lamarre, données non-publiées*).

La souris HC1 possède environ 10 fois moins d'IgM que la souris C57BL/6. En effet, il a été démontré que bien que ces souris possèdent une quantité normale de lymphocytes B-1, elles possèdent beaucoup moins d'anticorps sériques (Taylor *et al*, 1994). De plus, elles expriment à la surface de leurs lymphocytes B des densités normales d'Ig et cela pourrait donc laisser sous-entendre qu'il s'agit d'un défaut intrinsèque de sécrétion d'anticorps.

Finalement, les souris RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T démontrent une absence complète d'IgM puisque ces souris ne possèdent pas de lymphocytes B.

### 1.3 Caractérisation de la spécificité des anticorps naturels chez les souris transgéniques

Après avoir quantifié la population de lymphocytes B-1 ainsi que la production d'anticorps naturels chez chacune des souris transgéniques, nous avons voulu déterminer si, malgré le manque de diversité du répertoire primaire des anticorps naturels, ces souris étaient capables de reconnaître les deux modèles viraux. Pour ce faire, du sang de souris naïves a été prélevé et un test ELISA a été effectué en adsorbant du virus purifié au fond des puits.



**Figure 21: Spécificité de liaison des anticorps naturels au VSV et LCMV (Résultats fournis par Maude Bigras).**

Du sang de souris naïves âgées de 2 mois a été prélevé par ponction intra-cardiaque. VSV-IND (A) ou LCMV-WE (B) purifiés ont été adsorbés au fond des puits d'une plaque ELISA et le sérum prélevé a été mis en contact avec les antigènes. La détection des anticorps naturels s'est faite avec un anticorps anti-IgM de souris couplé à la peroxydase. Les densités optiques ont été lues à 490 nm ( $n = 3$ ).

Tel que prédit par son plus haut taux d'anticorps sériques, la souris AID<sup>-/-</sup> est celle qui possède le plus haut titre d'anticorps contre les deux virus. La souris HC1, bien qu'ayant un répertoire limité, semble être capable de bien reconnaître les deux virus. La souris QM est celle qui possède la plus faible spécificité de liaison aux deux virus. Finalement, tel qu'attendu, la souris RAG-1 ne démontre aucune spécificité de liaison contre VSV-IND et LCMV-WE puisqu'elle ne possède pas d'anticorps naturels (figure 21).

La souris AID<sup>-/-</sup> possède un titre d'anticorps naturels spécifiques aux virus supérieur à la souris témoin et aux souris transgéniques. Ceci peut être attribué à deux faits. Tout d'abord, la souris AID<sup>-/-</sup> est peu affectée dans la diversité du répertoire primaire des lymphocytes B-1. En effet, la majorité des anticorps naturels sont d'isotype IgM et possèdent peu d'hypermutation somatique (Avrameas, 1991). D'autre part, le fort titre peut être expliqué par la plus grande concentration d'anticorps naturels présents dans le sérum (voir figure 20). De plus, la souris HC1, bien que possédant un répertoire primaire peu diversifié est tout de même capable de reconnaître les deux virus. En effet, même si cette souris ne peut exprimer qu'une seule chaîne lourde, elle peut tout de même réarranger ses segments D et J. Ceci lui

laisse donc le plein potentiel pour développer de la diversité dans la région CDR3 de ses anticorps, région qui est en grande partie responsable de la reconnaissance des antigènes (Taylor *et al*, 1994). Finalement, les anticorps naturels de la souris QM semblent être capables de reconnaître les virus mais à des titres minimes. En effet, ceci peut être expliqué par le fait qu'environ 80 % des anticorps naturels produits par la souris QM sont spécifiques à l'haptène NP. Il n'est donc pas surprenant ces anticorps aient de la difficulté à reconnaître les modèles viraux. Toutefois, la faible reconnaissance des anticorps pourrait être attribuée au 20 % des anticorps non-spécifiques à l'haptène NP, dus, en partie, aux réarrangements secondaires. En effet, ce mécanisme permet le remplacement d'une chaîne V<sub>H</sub> par une autre, ce qui confère alors une autre spécificité aux anticorps (Cascalho *et al*, 1997).

En conclusion, bien que compromises dans la diversité de leur répertoire, les souris transgéniques HC1 et QM sont capables de reconnaître les deux modèles viraux mais de façon moindre que la souris C57BL/6. La souris AID<sup>-/-</sup>, puisqu'elle est peu affectée dans la diversité du répertoire primaire de ses anticorps naturels et puisqu'elle en possède de plus fortes concentrations est celle qui a généré des titres les plus élevées.

#### 1.4 Caractérisation de la capacité neutralisante des anticorps naturels chez les souris transgéniques

Puisqu'une partie des effets protecteurs des anticorps naturels peut être attribuée à la neutralisation directe des pathogènes, nous avons voulu déterminer si les souris transgéniques, malgré leur répertoire limité, pouvaient neutraliser nos deux modèles viraux. Pour ce faire, du sérum de souris naïves a été prélevé et des tests de neutralisation *in vitro* ont été effectués. Tout d'abord, pour VSV-IND, il est possible d'observer que seulement les souris C57BL/6 et AID<sup>-/-</sup> possèdent des anticorps naturels neutralisants. Quelques échantillons du groupe de la souris QM neutralisent le virus mais à un titre très près de la limite de détection du test. Finalement, les souris

HC1, J<sub>H</sub>T et RAG-1<sup>-/-</sup> ne neutralisent pas le virus. Par ailleurs, l'ajout de β-mercaptoéthanol (βME) semble totalement abroger cette activité neutralisante ce qui nous permet de conclure que l'activité neutralisante observée était attribuable aux anticorps naturels d'isotype IgM. Finalement, aucune des souris ne possède d'anticorps naturels pouvant neutraliser le virus LCMV.

	Titre Neutralisant			
	VSV-IND - βME	VSV-IND + βME	LCMV-WE - βME	LCMV-WE + βME
C57BL/6	1 : 8 1 : 16	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
AID <sup>-/-</sup>	1 : 4 1 : 16	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
QM	1 : 4 < 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
HC1	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
J <sub>H</sub> T	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
RAG-1 <sup>-/-</sup>	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4

**Tableau 3: Titre en anticorps naturels neutralisant des différentes souris transgéniques.**

Du sang de souris naïves âgées de 2 mois a été prélevé par ponction intra-cardiaque. Un test de neutralisation a ensuite été effectué contre chacun des modèles viraux en présence ou non de β-mercaptoéthanol (βME). Le titre neutralisant a été défini comme la plus petite dilution pouvant diminuer de 50 % le nombre de plages de lyse ( $n = 3$ , expérience répétée 3 fois). Les résultats représentatifs sont représentés dans le tableau.

#### 1.4.1 Titres en anticorps naturels neutralisants contre VSV-IND

Les souris C57BL/6 et AID<sup>-/-</sup> sont celles qui semblent générer le plus facilement des anticorps naturels neutralisants contre VSV-IND. De plus, elles possèdent des titres neutralisants relativement similaires. Encore une fois, ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la souris AID<sup>-/-</sup> est peu affectée dans la diversité du répertoire primaire de ses anticorps naturels (tableau 3).

Les souris QM et HC1 sont pratiquement incapables de neutraliser le virus. Bien que les anticorps naturels de ces souris semblent être capables de reconnaître le virus à des titres faibles (voir figure 21), ils ne semblent pas être capable de médier une neutralisation directe *in vitro*. Cette observation pourrait être expliquée par une faible concentration d'anticorps naturels par rapport à une grande quantité de virus *in vitro*.

Une fois en présence de  $\beta$ ME, nous avons noté une absence complète de neutralisation chez toutes les souris. L'effet principal du  $\beta$ ME est de dissocier les ponts disulfure qui permettent normalement la formation de la structure pentamérique des IgM. En conséquence, le  $\beta$ ME permet de dépléter le sérum en IgM. Bref, la perte totale de neutralisation en présence de  $\beta$ ME nous laisse croire que la neutralisation était médiée par l'isotype IgM des anticorps naturels. Conséquemment, on peut croire soit que les anticorps naturels des autres isotypes (IgA et IgG3) sont peu importants pour neutraliser le virus ou qu'ils ne sont pas présents en assez grande quantité pour avoir un effet visible *in vitro*.

#### 1.4.2 Titres en anticorps naturels neutralisants contre LCMV-WE

Aucune des souris n'a été capable de générer des anticorps naturels capables de neutraliser LCMV que ce soit en présence ou en absence de  $\beta$ ME. Ceci nous indique donc que même en présence d'un répertoire primaire diversifié, les anticorps naturels des souris ne peuvent neutraliser directement LCMV-WE. Une des hypothèses pouvant expliquer ce phénomène est que le virus, afin d'échapper à la réponse humorale, aurait évolué de façon à ne pas être reconnu par le répertoire primaire des lymphocytes B. En conséquence, les lymphocytes B des souris naïves doivent subir une maturation d'affinité afin d'être capables de neutraliser le LCMV (Hangartner *et al*, 2003).

## **2 Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans la dissémination virale**

La principale fonction des anticorps naturels est de se lier aux différents pathogènes et de former des complexes immuns. Il a déjà été démontré que ceux-ci étaient plus facilement recrutés vers les organes lymphoïdes (Youd *et al*, 2002; Ferguson *et al*, 2004). Nous avons donc voulu déterminer si la diversité du répertoire des anticorps naturels était importante pour un recrutement rapide et efficace à la rate. Si tel est le cas, nous devrions retrouver, chez les souris dont le répertoire est compromis, moins de virus à la rate et davantage en périphérie.

### **2.1 Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans la dissémination de VSV-IND et de LCMV-WE aux organes lymphoïdes**

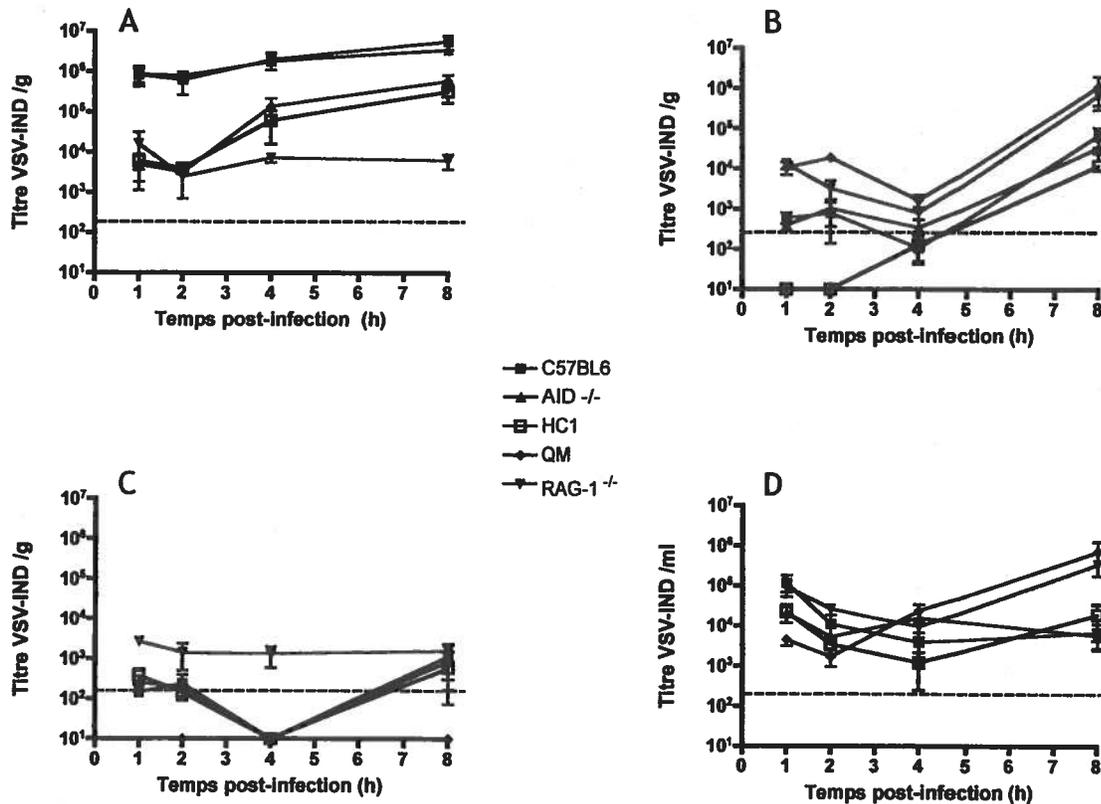
Les souris AID<sup>-/-</sup>, QM, HC1, RAG-1<sup>-/-</sup>, J<sub>H</sub>T et C57BL/6 ont été infectées par voie intraveineuse avec  $2 \times 10^8$  ufp de VSV-IND ou avec  $2 \times 10^6$  ufp de LCMV-WE. La rate, les reins, le foie et du sang ont été récoltés à différents temps post-infection afin d'y titrer le virus. Selon notre hypothèse de départ, si un répertoire diversifié des anticorps naturels est important pour un recrutement efficace des pathogènes à la rate, nous devrions observer une charge virale plus élevée dans la rate chez les souris C57BL/6 et AID<sup>-/-</sup> que chez les souris HC1 et QM. De plus, nous nous attendons à ce que les souris RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T aient le titre viral le plus bas. Finalement, une plus grande présence du virus dans la rate chez les souris dont le répertoire est diversifié devrait se traduire par une baisse de la charge virale en périphérie.

#### **2.1.1 Recrutement de VSV-IND et de LCMV-WE vers la rate**

Dans les premières heures suivant l'infection avec VSV-IND, les titres viraux dans la rate des souris C57BL/6 et AID<sup>-/-</sup> sont les plus élevés (figure 22 A). Encore une

fois, la souris AID <sup>-/-</sup> ressemble beaucoup à la souris C57BL/6 dans sa capacité à reconnaître le virus et à permettre son recrutement à la rate. Les souris HC1 et QM possèdent un titre viral environ 100 fois moins important que les souris AID <sup>-/-</sup> et C57BL/6. Dans tous les cas, le titre viral augmente dans la première heure suivant l'infection puis reste relativement stable. Le moment le plus important du recrutement semble donc se faire dans la première heure suivant l'infection.

La capacité de recrutement du virus LCMV-WE vers la rate est très similaire à ce qui a été observé pour VSV-IND (figure 23A). En effet, il est possible d'observer que les souris C57BL/6 et AID <sup>-/-</sup> semblent être celles qui recrutent le plus efficacement le virus vers la rate. De plus, il est intéressant d'observer que chez ces dernières, le recrutement débute dès 8 heures post-infection comparativement aux deux souris ayant un répertoire moins diversifié, soit les souris HC1 et QM, qui commencent seulement à démontrer la présence du virus à 24 heures post-infection. Chez ces souris, la quantité totale du virus est environ 100 fois moins élevée que la souris contrôle. Finalement, les souris RAG-1 <sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T recrutent très peu le virus à la rate, avec des titres environ 1 000 fois moins élevé que la souris C57BL/6.

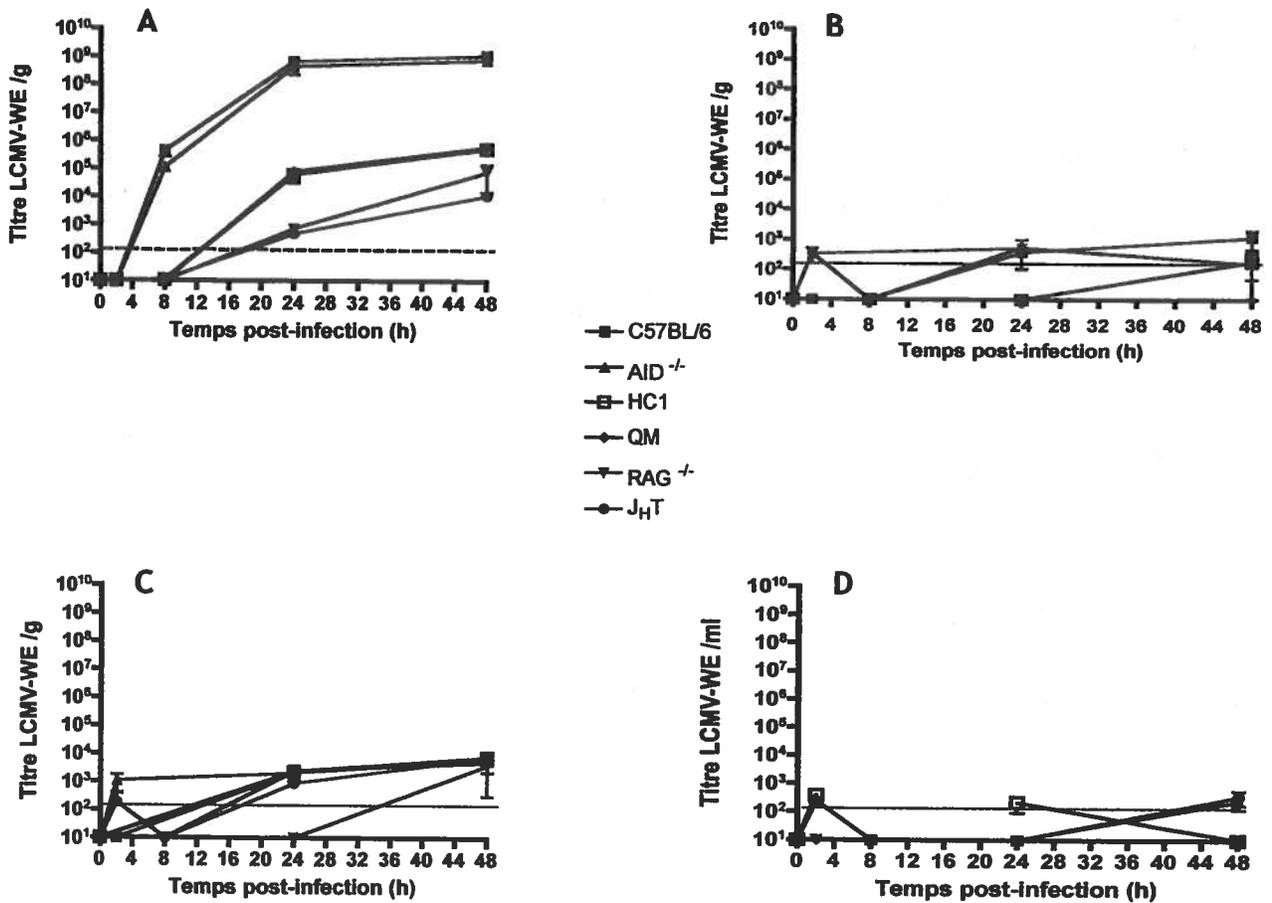


**Figure 22: Dissémination de VSV-IND dans la rate, le foie, les reins et le sang à différents temps post-infection.**

Les souris AID<sup>-/-</sup>, QM, HC1, RAG-1<sup>-/-</sup> et C57BL/6 ont été infectées par voie intraveineuse avec  $2 \times 10^8$  ufp de VSV-IND. Le virus a été titré par un test de plaque de lyse dans la rate (A), le foie (B), les reins (C) et le sang (D) à 1, 2, 4 et 8 heures post-infection. ( $n = 3$ , expérience répétée 3 fois)

La diversité du répertoire des anticorps naturels semble donc être importante pour un recrutement efficace et rapide des virus vers la rate. En effet, la souris témoin est celle qui recrute le plus efficacement et le plus rapidement les virus vers la rate. Dans le même ordre d'idées, la souris AID<sup>-/-</sup> possède une cinétique de recrutement très similaire à la souris C57BL/6. Ceci peut être expliqué par le fait que le répertoire primaire des anticorps naturels des souris AID<sup>-/-</sup> est très peu affecté et donc, assez comparable à la souris témoin. Par opposition, les souris HC1 et QM possèdent des titres viraux à la rate environ 100 fois moins élevés que la souris C57BL/6. Cette différence pourrait être attribuable, d'une part, à la plus faible concentration d'anticorps naturels dans le sérum et, d'autre part, à la plus faible

diversité du répertoire des anticorps naturels. En effet, bien que la diversité du répertoire semble être importante dans la reconnaissance des pathogènes (section 1.3), il n'est pas possible dans ces études d'affirmer que la quantité ne peut avoir d'impact sur le recrutement du virus. Toutefois, la souris HC1, qui possède une concentration sérique en IgM faible mais qui reconnaît bien les virus, semble avoir plus de difficulté à les recruter vers la rate, ce qui nous laisse croire que la quantité, et pas seulement la diversité, est aussi très importante à un recrutement efficace. Finalement, les souris J<sub>H</sub>T et RAG-1<sup>-/-</sup> sont celles qui possèdent les plus bas titres viraux à la rate, probablement car l'absence d'anticorps naturels ne leur permet pas de recruter efficacement le virus vers la rate.



**Figure 23: Dissémination de LCMV-WE dans la rate, le foie, les reins et le sang à différents temps post-infection.**

Les souris AID<sup>-/-</sup>, QM, HC1, J<sub>H</sub>T et C57BL/6 ont été infectées par voie intraveineuse avec  $2 \times 10^6$  uff de LCMV-WE. Le virus a été titré dans par un test de foyers infectieux dans la rate (A), les reins (B), le foie (C) et le sang (D) à 2, 8, 24 et 48 h post-infection. ( $n = 3$ )

### 2.1.2 Charge virale en périphérie

L'apparition du virus dans les organes périphériques (foie, rein et sang) semble se faire elle aussi dans les premiers temps suivants l'infection, soit dans la première heure pour VSV-IND et les 4 premières heures pour LCMV-WE, et reste stable par la suite (figure 22 B, C, D et 23 B, C, D). Les organes présentant les plus hautes charges virales sont le foie et les reins, probablement en raison de leur fonction qui est d'agir

comme filtreur de l'organisme. Notamment, dans le cas de LCMV-WE, il est possible que l'organe le plus atteint semble être le foie. Ce tropisme est dû au fait que la souche WE du virus LCMV est hépatotropique (Zinkernagel *et al*, 1986). Par la suite, le sang présente une charge virale modérée. Bien qu'il soit difficile de tirer des conclusions à partir de ces graphiques, en raison des titres qui sont à des niveaux se rapprochant de la limite de détection du test, il est tout de même possible d'observer que les souris RAG-1<sup>-/-</sup> et QM sont celles qui semblent posséder les plus hauts titres viraux en périphérie.

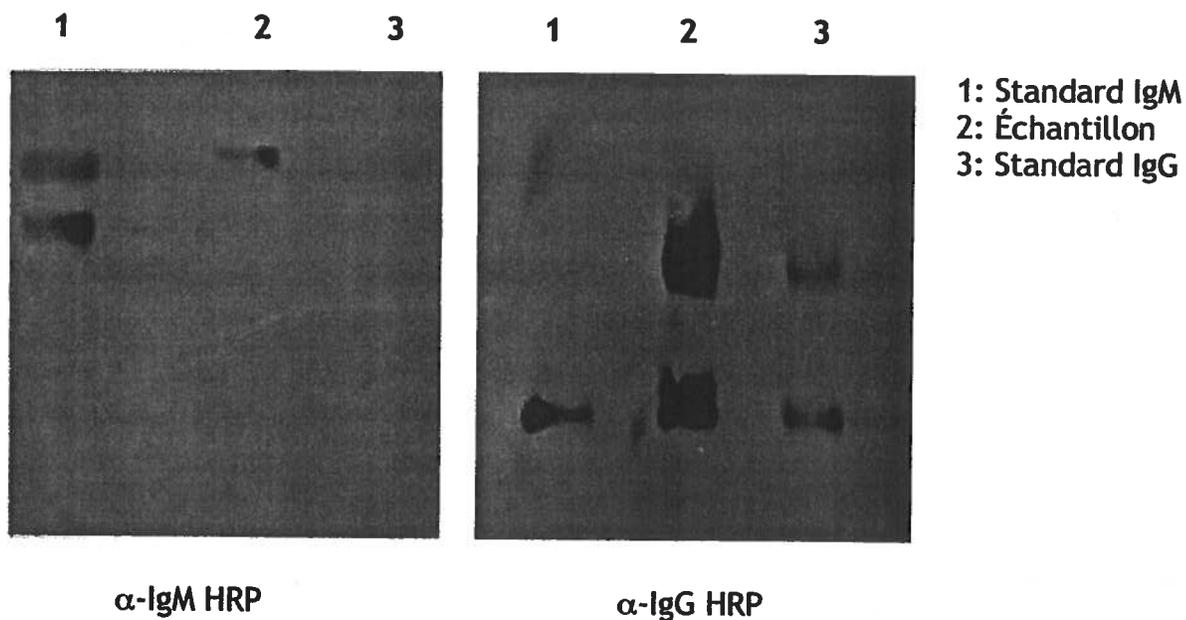
Selon notre hypothèse, un meilleur recrutement du virus à la rate se traduirait par une diminution de la charge virale en périphérie. Toutefois, puisque les titres des virus en périphérie sont très rapprochés de la limite de détection du test, il devient très compliqué de tirer des conclusions claires. Néanmoins, la souris qui est totalement déficiente en anticorps naturels, soit la RAG-1<sup>-/-</sup>, présente une forte charge virale en périphérie. Cette observation peut être due au fait que le virus n'est pas lié par les anticorps naturels et peut donc se disséminer davantage dans les organes périphériques au lieu d'être recruté à la rate. De plus, la souris QM qui possède un répertoire peu diversifié démontre elle aussi des charges virales plus élevées en périphérie, ce qui est corrélé avec un titre plus faible à la rate. Il serait donc intéressant de répéter l'expérience avec une charge virale plus importante afin de pouvoir tirer des conclusions quant à la charge virale en périphérie.

## **2.2 Rétablissement de la capacité de recrutement du virus LCMV-WE à la rate chez les souris J<sub>H</sub>T et HC1**

Nous avons pu observer, à la section 2.1, que les souris J<sub>H</sub>T et HC1 recrutent faiblement le virus vers la rate. Nous avons alors émis comme hypothèse que cela était dû à une absence d'anticorps naturels. En conséquence, nous avons donc voulu déterminer s'il était possible de rétablir le recrutement du virus à la rate chez ces souris en leur transférant des anticorps naturels.

### 2.2.1 Purification des IgM de souris C57BL/6 naïves

Dans un premier temps, du sérum de souris naïves a été purifié par chromatographie d'affinité afin d'obtenir des anticorps naturels purs d'isotype IgM. La pureté des échantillons a par la suite été vérifiée par immunobavardage de type Western (figure 24).



**Figure 24 : Immunobuvardage de type Western sur les fractions positives issues de la purification par chromatographie d'affinité de sérum de souris C57BL/6 naïves.**

Du sérum de souris C57BL/6 a été purifié par chromatographie d'affinité grâce à la technologie Äkta Prime en utilisant la colonne *HiTrap IgM Purification HP* qui permet de purifier les IgM de souris. La pureté des échantillons a été évaluée selon la présence d'IgM (A) grâce à un anticorps anti-IgM de souris spécifique à la chaîne  $\mu$  et l'absence d'IgG (B) grâce un anticorps anti-IgG de souris spécifique à la chaîne  $\gamma$ .

Puisqu'il s'agit de sérum de souris naïves, nous pouvons penser que la purification nous a permis d'isoler des anticorps naturels d'isotype IgM. Toutefois, il est aussi possible d'observer qu'il y a une faible présence, dans nos fractions positives,

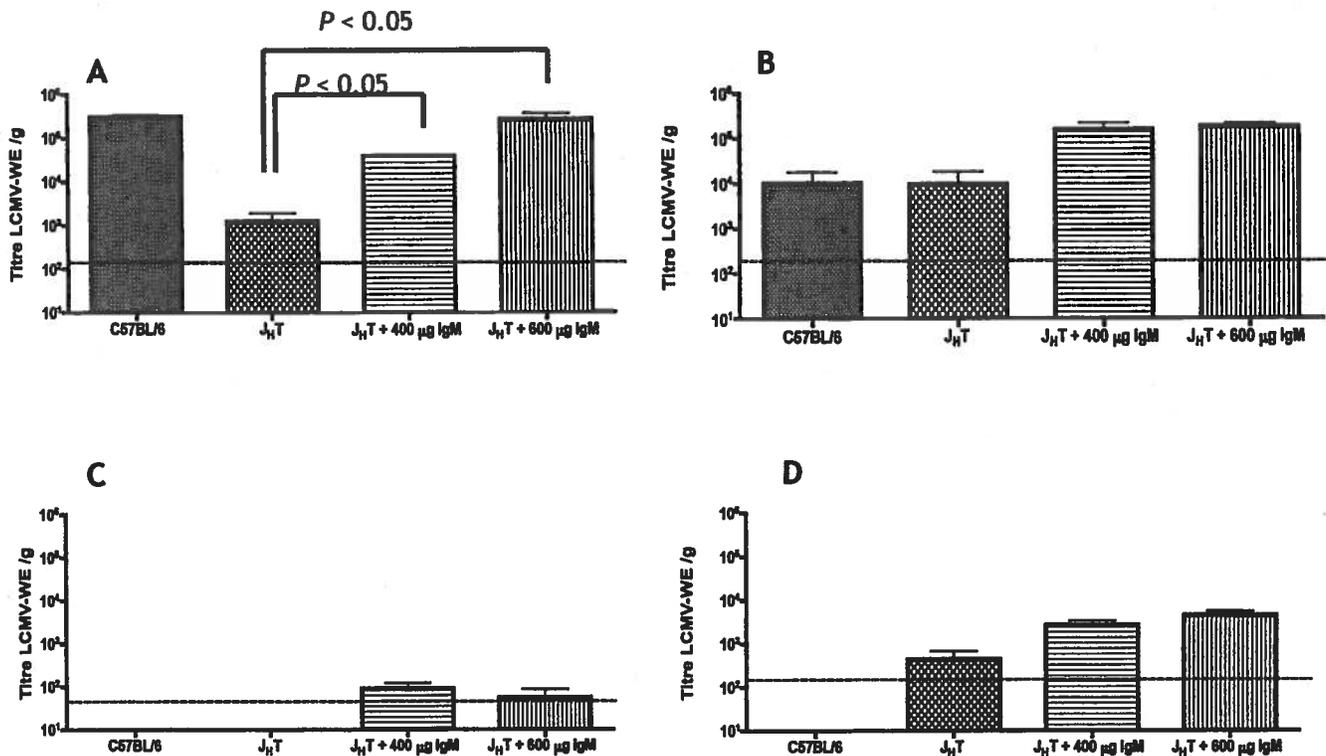
d'IgG (figure 24 B). Puisqu'il existe aussi des anticorps naturels de cet isotype, nous ne pensons pas que cela pose problème dans l'interprétation des résultats suivants.

### 2.2.2 Dissémination virale de LCMV-WE chez des souris J<sub>H</sub>T et HC1 ayant reçu des IgM purifiés de souris C57BL/6

Afin de démontrer l'importance des anticorps naturels dans un recrutement rapide et efficace à la rate, des souris J<sub>H</sub>T et HC1 ont reçu des IgM purifiés de souris C57BL/6. Dans le cas de la souris J<sub>H</sub>T, deux doses ont été testées, soit 400 µg, ce qui est légèrement en-dessous de ce que possède une souris de type sauvage, et 600 µg ce qui correspond à une quantité normale chez une souris C57BL/6. Dans le cas de la souris HC1, la dose la plus efficace, soit 600 µg, a été utilisée. Par la suite, les souris ont été infectées avec  $2 \times 10^6$  ufc de LCMV-WE par voie intraveineuse et le virus a été titré dans les différents organes à 24 heures post-infection, moment où l'on observe le plus grand écart entre les souris témoins et J<sub>H</sub>T (figure 23).

#### 2.2.2.1 Recrutement du virus vers la rate

Les souris J<sub>H</sub>T qui ont reçu des anticorps d'isotype IgM semblent avoir retrouvé leur capacité à recruter le virus vers la rate. En effet, les souris ayant reçu soit 400 µg ou 600 µg démontrent des titres viraux de 10 fois ou 100 fois supérieurs, respectivement, aux souris J<sub>H</sub>T n'ayant pas reçu d'anticorps naturels. De plus, la capacité à recruter LCMV-WE semble être proportionnelle à la quantité d'anticorps transférés puisque les souris ayant reçu 400 µg semblent avoir des titres 10 fois inférieurs à celles ayant reçu 600 µg. Finalement, il est très intéressant d'observer que les souris ayant reçu 600 µg d'IgM recrutent le virus à la rate de façon équivalente aux souris C57BL/6 (figure 25).



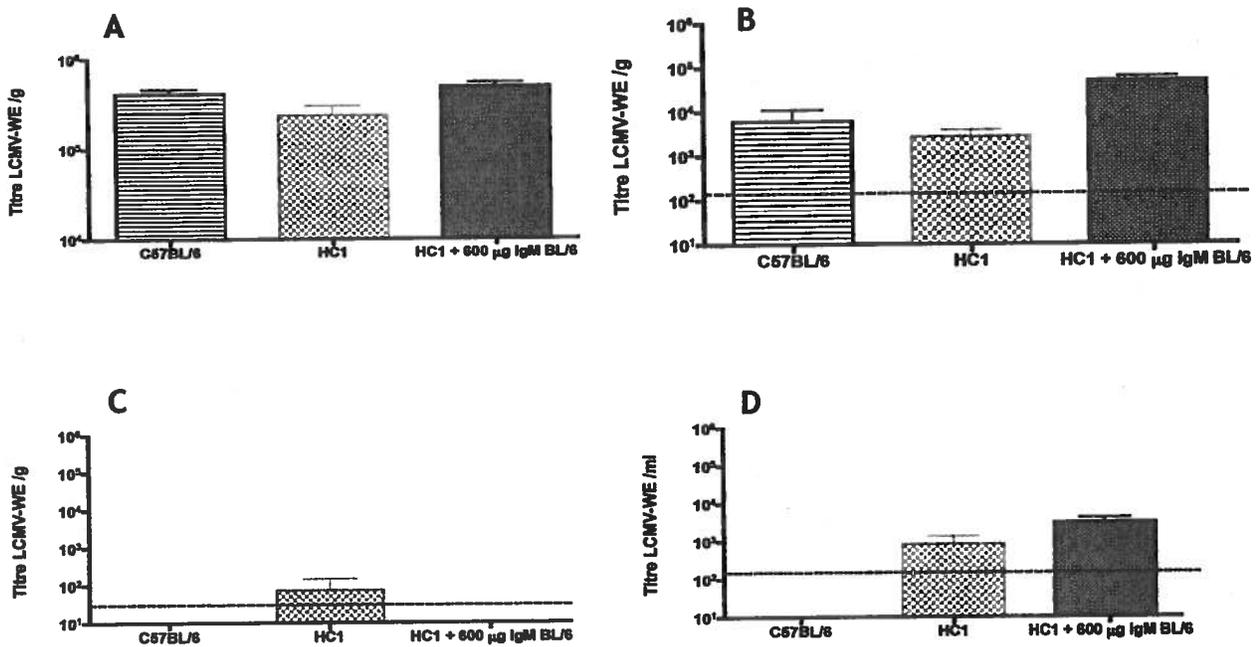
**Figure 25 : Dissémination de LCMV-WE dans la rate, le foie, les reins et le sang à 24 heures post-infection chez des souris J<sub>H</sub>T ayant reçu des IgM purifiés.**

Les souris J<sub>H</sub>T ont reçu soit 400 µg ou 600 µg d'IgM purifiés de souris C57BL/6 environ 12 heures avant infection avec  $2 \times 10^6$  uff de LCMV-WE par voie intraveineuse. La rate (A), le foie (B), les reins (C) et le sang (D) ont été récoltés à 24 heures post-infection. Le virus a ensuite été titré par un test de foyers infectieux. Des souris J<sub>H</sub>T n'ayant pas reçu d'IgM et des souris C57BL/6 servaient de témoins. ( $n = 3$ , expérience répétée 2 fois). L'étude statistique a été effectuée avec la loi de Student. Les données jugées significatives sont inférieures à 0.05 ( $P < 0.05$ )

De même, les souris HC1, qui possèdent un répertoire limité, ont une activité de recrutement du virus à la rate augmentée lorsqu'elles reçoivent des IgM purifiés, comme en témoignent les titres viraux de 100 fois supérieur à une souris HC1 normale.

Les anticorps naturels semblent donc avoir un rôle à jouer au niveau du recrutement viral à la rate. En effet, les souris J<sub>H</sub>T ou HC1 ayant reçu des anticorps naturels purifiés d'isotype IgM retrouvent leur capacité à recruter LCMV-WE à la rate. De plus, cette action semble proportionnelle à la quantité transférée puisque les

souris ayant reçu une plus faible concentration d'IgM démontrent une charge virale à la rate inférieure à celles qui ont en ont eu davantage. Finalement, les souris ayant reçu 600 µg d'IgM recrutent le virus à la rate dans les mêmes proportions que les souris C57BL/6. Ceci s'explique par le fait qu'une souris normale possède de 500 µg à 700 µg d'IgM circulants (Jayasekera *et al*, 2006).



**Figure 26 : Dissémination de LCMV-WE dans la rate, le foie, les reins et le sang à 24 heures post-infection chez des souris HC1 ayant reçu des IgM purifiés.**

Les souris HC1 ont reçu 600 µg d'IgM purifiés de souris C57BL/6 environ 12 heures avant infection avec  $2 \times 10^6$  uff de LCMV-WE. La rate (A), les reins (B), le foie (C) et le sang (D) ont été récoltés à 24 heures post-infection. Par la suite, le virus a été titré par un test de foyers infectieux. Des souris HC1 n'ayant pas reçu d'IgM et des souris C57BL/6 servaient de contrôle. ( $n = 3$ ).

### 2.2.2.2 Charge virale en périphérie

Les souris J<sub>H</sub>T et HC1 ayant reçu des anticorps naturels d'isotype IgM possèdent des titres viraux élevés non seulement dans la rate, mais aussi, dans tous les organes en périphérie (figure 25 B à D et 29 B à D). Cette fois-ci, les reins et le sang sont les

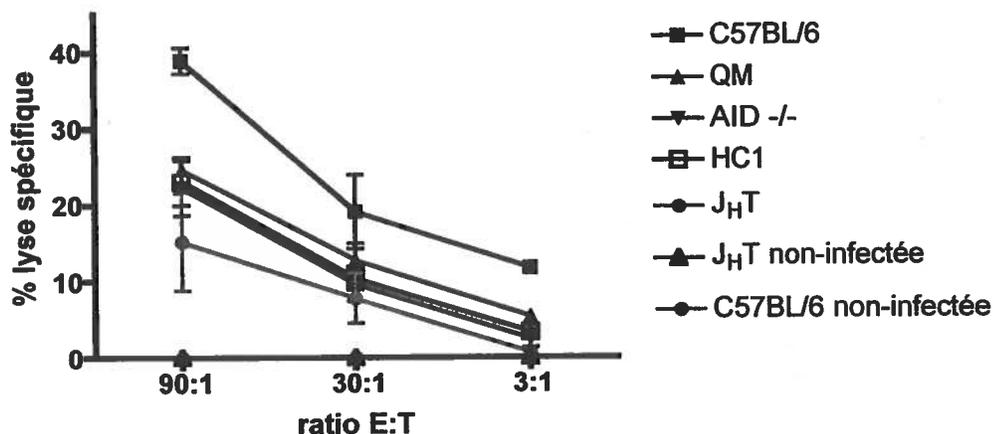
deux organes qui démontrent une charge virale plus importante, soit environ de 10 à 100 fois plus que la souris J<sub>H</sub>T non-transférée et la souris témoin. Finalement, le foie des souris transférées contient peu de virus, dont le titre est très près de la limite de détection du test, tout comme pour la souris C57BL/6. Nous croyons que les titres viraux élevés observés dans tous les organes pourraient être expliqué par la dose massive d'IgM qui a été transférée, tel qu'il en sera discuté plus loin. Brièvement, il est possible de penser que puisque les anticorps étaient injectés seulement 12 heures avant infection, ceux-ci étaient peut être densément présent dans la circulation sanguine.

### **3 Impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques**

Les résultats précédents semblent démontrer, d'une part, que la présence des anticorps naturels est importante pour un recrutement efficace vers la rate et, d'autre part, qu'une pleine diversité du répertoire est bénéfique à cet effet. Nous avons par la suite voulu déterminer si la présence et la diversité des anticorps naturels étaient importantes dans l'induction des réponses immunitaires adaptatives. Cette section portera sur la réponse des lymphocytes T cytotoxiques dans le cadre d'une infection au virus du LCMV qui induit généralement une forte réponse 8 jours post-infection.

#### **3.1 Réponse des lymphocytes T cytotoxiques générée chez les différentes souris transgéniques**

Afin de déterminer l'impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques, des souris C57BL/6, AID<sup>-/-</sup>, QM, HC1 et J<sub>H</sub>T ont été infectées avec 200 uiff de LCMV-WE. La réponse cytotoxique a par la suite été évaluée 8 jours post-infection en prélevant la rate et en effectuant un test de cytotoxicité cellulaire par relâchement de <sup>51</sup>Cr. Si la diversité du répertoire des anticorps naturels est importante pour l'induction d'une réponse des lymphocytes T cytotoxiques, nous nous attendrions à observer un plus faible pourcentage de lyse spécifique chez les souris HC1 et QM.



**Figure 27 : Activité cytotoxique des lymphocytes T des différentes souris transgéniques.**

Les souris C57BL/6, AID<sup>-/-</sup>, HC1, QM et J<sub>H</sub>T ont été infectées avec 200 uff de LCMV-WE par voie intraveineuse. La rate a été récoltée 8 jours post-infection afin d'effectuer un test de cytotoxicité cellulaire ( $n = 3$ )

### 3.1.1 Activité cytotoxique des lymphocytes T chez les souris AID<sup>-/-</sup>, QM et HC1

Après 8 jours post-infection, c'est la souris témoin qui démontre une haute activité cytotoxique. Suivent, par la suite, les trois souris transgéniques, soit, en ordre, la souris QM, AID<sup>-/-</sup> et HC1 qui sont relativement similaires. La souris déficiente en anticorps naturels, soit la J<sub>H</sub>T, est celle qui démontre la plus faible activité cytotoxique (figure 27). Finalement, les souris non-infectées présentent une activité cytotoxique nulle, nous démontrant la valeur de bruit de fond du test.

La diversité des anticorps naturels semble donc jouer un rôle dans l'induction d'une réponse des lymphocytes T cytotoxiques puisque les souris qui ont un répertoire moins diversifié présentent un pourcentage de lyse spécifique inférieur à la souris contrôle. Les trois souris transgéniques possèdent une activité cytotoxique relativement similaire, quoique la souris QM semble légèrement supérieure aux trois autres. D'une part, bien qu'en théorie le répertoire de la souris QM soit mono-spécifique, en pratique, il y a environ 20 % des anticorps qui ont une spécificité

différente, phénomène dû en partie aux réarrangements secondaires (Cascalho *et al*, 1997). D'autre part, bien que les anticorps naturels démontrent peu de commutation de classe et d'hypermutation somatique, il est tout de même possible de trouver des anticorps naturels d'isotype IgG3 et IgA (Avrameas, 1991). Conséquemment, le fait que la souris AID<sup>-/-</sup>, chez qui on ne s'attendait pas à ce que l'activité des anticorps naturels soit affectée, démontre une plus faible activité cytotoxique pourrait être expliqué par l'importance possible des anticorps naturels d'isotype IgG3 et qui ont subi des hypermutations somatiques. Par la suite, la souris HC1 est celle qui semble démontrer la plus faible activité cytotoxique. Cette observation s'explique par le fait que le répertoire primaire des souris HC1 est compromis et donc, que les anticorps naturels auraient de la difficulté à reconnaître le virus, à le diriger vers les organes lymphoïdes et ainsi induire une réponse immunitaire adaptative.

Enfin, puisque'il s'agit d'une réponse immunitaire adaptative qui survient donc plusieurs jours après infection, il est difficile de dissocier totalement l'importance de d'autres mécanismes ayant pu influencer la réponse cytotoxique. Un de ces phénomènes pourrait être l'importance des anticorps anti-NP sécrétés par les lymphocytes B-2 suite à l'infection au LCMV-WE. Ces anticorps apparaissent généralement de 3 à 4 jours post-infection et pourraient signaler à des cellules du système immunitaire la présence du virus. Puisque les souris AID<sup>-/-</sup> sont affectées dans leur capacité à induire une réponse humorale cela pourrait aussi avoir un impact sur l'induction d'une réponse cellulaire. Ceci se traduit d'ailleurs par un taux de survie d'environ 20 % suite à une infection au LCMV chez ces souris (Marie-Hélène Côté, 2006).

### 3.1.2 Activité cytotoxique des lymphocytes T chez la souris J<sub>H</sub>T

La souris J<sub>H</sub>T est celle qui montre la plus faible activité cytotoxique, ayant un pourcentage de lyse spécifique au virus de deux fois inférieur au témoin (figure 27). Cette souris possède une délétion du segment J<sub>H</sub> ce qui l'empêche de réarranger les gènes de son BCR. Elle ne possède donc ni lymphocyte B-1, ni lymphocyte B-2. Il

semble donc que la présence des anticorps naturels est importante dans l'induction de la réponse immunitaire adaptative puisque la souris J<sub>H</sub>T a une réponse des lymphocytes T cytotoxiques beaucoup diminuée.

### 3.2 Impact de la présence des anticorps naturels dans l'activité cytotoxique des lymphocytes T chez la souris J<sub>H</sub>T

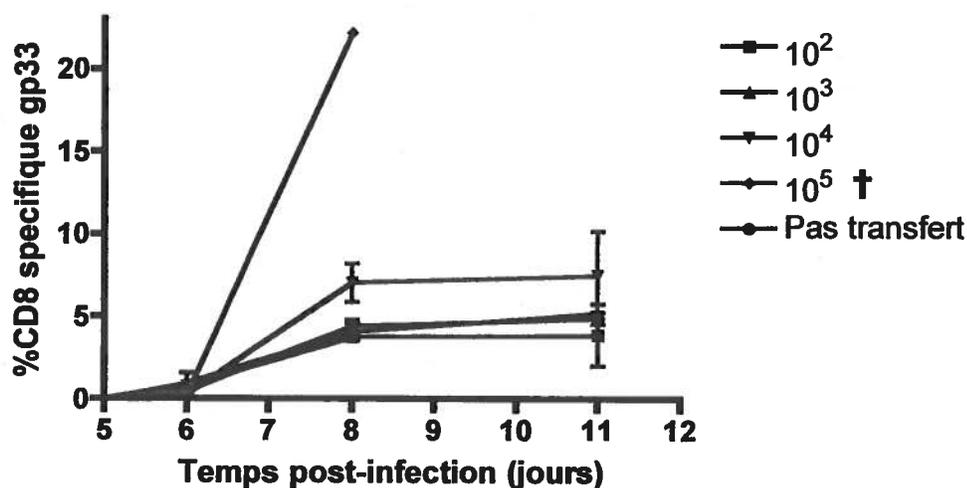
Afin de déterminer si la présence d'anticorps naturels pouvait rétablir l'activité cytotoxique des lymphocytes T de la souris J<sub>H</sub>T, nous avons transféré différentes concentrations d'IgM purifiés, puis, infecté les souris avec 200 uiff de LCMV-WE afin d'analyser la réponse cellulaire 8 jours post-infection.

Toutefois, il a été observé que l'absence de lymphocyte B pouvait avoir un impact sur la diversité, le nombre de précurseurs de lymphocytes T ainsi que sur l'amplitude de la réponse cellulaire (Joao *et al*, 2006). En effet, il a été remarqué que les souris J<sub>H</sub>T possédaient un répertoire du TCR contracté. Dans notre étude, afin de pouvoir comparer l'activité cytotoxique des souris J<sub>H</sub>T avec les souris témoins C57BL/6, nous avons dû transférer des splénocytes de souris P14 afin de normaliser la quantité de précurseurs. Il a été établi que les souris C57BL/6 possédaient environ 50 précurseurs de lymphocytes T spécifiques au LCMV par rate (Ehl *et al*, 1998).

### 3.3 Optimisation de la quantité de cellules de rate de souris P14 à transférer

La première étape consistait donc à évaluer la réponse cellulaire chez les souris J<sub>H</sub>T ayant reçu différentes quantités de splénocytes de souris P14 afin de déterminer celle qui serait utilisée dans les expériences subséquentes. Pour ce faire, différentes quantités de cellules de rate ont été injecté par voie i.v à des souris J<sub>H</sub>T et correspondaient à différentes quantités de précurseurs. Les souris ont donc reçu soit 10<sup>2</sup> cellules (moins de un précurseur), 10<sup>3</sup> cellules (5 précurseurs), 10<sup>4</sup> cellules (50 précurseurs) ou 10<sup>5</sup> cellules (500 précurseurs) (Ehl *et al*, 1998) et ont ensuite été

infectées, une journée plus tard, avec 200 uff de LCMV-WE. La cinétique de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques a été mesurée par marquage aux tétramères aux jours 6, 8 et 11 post-infection. La protéine présentée par le tétramère était gp 33 qui est l'épitope T immunodominant de la réponse cytotoxique.



**Figure 28 : Optimisation de la quantité de splénocytes de souris P14 à transférer à des souris J<sub>H</sub>T.**

Les souris J<sub>H</sub>T ont reçu les cellules une journée avant l'infection avec 200 uff de LCMV-WE. Le sang a été recueilli aux jours 6, 8 et 11 afin d'effectuer un marquage aux tétramères qui permettait de quantifier le nombre de lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> spécifiques au virus ( $n = 2$ ).

† Mort des souris (jour 10)

Avant le sixième jour post-infection, il ne semble pas y avoir de différence entre les différents groupes de souris. Toutefois, au jour 8 post-infection, les souris ayant été transférées avec 10<sup>4</sup> cellules possédaient environ 2 fois plus de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques au virus. Remarquablement, les souris ayant reçu 10<sup>5</sup> cellules avaient environ 3 fois plus de lymphocytes T spécifiques au virus que les souris ayant été transférées avec 10 fois moins de cellules. Dans tous les groupes, c'est au jour 8 que la réponse maximale survient, ce qui correspond à des études réalisées précédemment dans le laboratoire. Par la suite, la quantité de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques au virus reste relativement stable. Il est intéressant de noter que les souris ayant reçu 10<sup>5</sup> splénocytes de souris P14 ont été retrouvées mortes au jour 10 post-

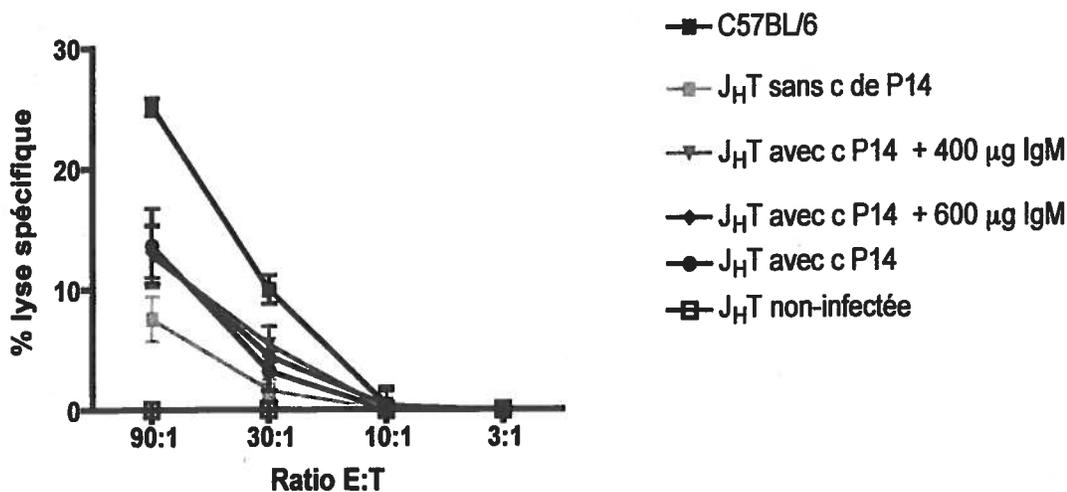
infection. Ceci pourrait s'expliquer par les dommages immunopathologiques normalement observables dans le cadre d'une infection au LCMV qui atteignent leur apogée environ 10 jours post-infection. Ces dommages sont causés par la libération de cytokines pro-inflammatoires et la destruction des cellules des organes lymphoïdes infectés par les lymphocytes T cytotoxiques (Gonzalez *et al*, 1980 ; Mims *et al*, 1969 ; Odermatt *et al*, 1991 ; Walker *et al*, 1982). Il est donc possible de penser que les souris ayant davantage de lymphocytes T cytotoxiques activés auront davantage de dommages immunopathologiques. Cette immunopathologie se traduit par une destruction de l'architecture splénique et inhibe par la suite la réponse immunitaire. Il semble donc probable que les souris ayant reçu  $10^5$  cellules, en raison des dommages immunopathologiques, n'ont pas pu contrôler l'infection virale ce qui pourrait avoir causé leur mort.

Les souris ayant reçu  $10^4$  cellules ont environ 8 % de lymphocytes T CD8+ spécifiques au virus 8 jours post-infection. Il est intéressant de noter qu'un transfert de  $10^4$  cellules correspond à un transfert de 50 précurseurs de lymphocytes T spécifiques à LCMV, ce que possède une souris C57BL/6. De plus, à ce même temps post-infection, la souris C57BL/6 a environ elle aussi 8 % de ses lymphocytes T spécifiques au virus (*résultats observés dans le laboratoire*). Conséquemment, il a été choisi de transférer  $10^4$  cellules de rate puisque cela mime bien la souris C57BL/6.

### **3.4 Rétablissement de l'activité cytotoxique des lymphocytes T des souris J<sub>H</sub>T par transfert d'anticorps naturels**

Afin de déterminer l'importance des anticorps naturels dans l'induction de la réponse immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques, des transferts d'IgM purifiés ont été effectués. Tout d'abord, afin de normaliser la quantité de précurseurs de lymphocytes T spécifiques au virus, les souris J<sub>H</sub>T ont reçu  $10^4$  splénocytes de souris P14 au jour -2. Par la suite, des transferts d'IgM ont été effectués, soit avec 400 µg ou 600 µg au jour -1. Les souris ont ensuite été infectées avec 200 uff de LCMV-WE au

jour 0. Finalement, 8 jours post-infection, les rates des souris ont été prélevées afin de mesurer l'activité des lymphocytes T cytotoxiques par un test de cytotoxicité cellulaire. La souris C57BL/6 a été infectée elle aussi au jour 0 et servait de témoin positif. De plus, des souris J<sub>H</sub>T n'ayant pas reçu de splénocytes de souris P14 ou n'ayant pas reçu d'IgM purifiés ont été infectées au même moment et servaient aussi de témoins. Finalement, des souris non-infectées nous servaient à déterminer le bruit de fond de l'expérience. Si la présence d'anticorps naturels est importante dans l'induction de la réponse cytotoxique des lymphocytes T, nous nous attendons à observer un plus grand pourcentage de lyse spécifique chez les souris ayant reçu des IgM purifiés par rapport à celle qui n'en n'ont pas reçus.



**Figure 29 : Activité cytotoxique des lymphocytes T des souris J<sub>H</sub>T suite à un transfert d'IgM purifiés.**

Les transferts de splénocytes de souris P14 ont été effectués au jour -2, les transferts d'IgM purifiés ont été faits au jour -1 et l'infection au jour 0 avec 200 uff de LCMV-WE. Les rates ont été prélevées 8 jours post-infection afin d'effectuer un test de cytotoxicité cellulaire par relâchement de <sup>51</sup>Cr (*n* = 3).

La souris témoin C57BL/6 est celle qui démontre la plus forte activité cytotoxique 8 jours post-infection. Survient par la suite, les souris J<sub>H</sub>T transférées avec des splénocytes de souris P14. Toutefois, il ne semble pas y avoir de différence entre les souris ayant reçu les différentes quantités d'IgM purifiés et celles qui n'en n'ont pas reçus. Néanmoins, elles possèdent une activité cytotoxique supérieure à

celles qui n'ont pas reçu de cellules de rate de souris P14 ce qui nous indique que le transfert de cellules s'est bien effectué (figure 29).

La présence d'anticorps naturels ne semble donc pas avoir influencé la réponse immunitaire adaptative des lymphocytes T cytotoxiques à 8 jours post-infection dans cette expérience. En effet, les souris ayant reçu soit 400  $\mu$ g ou 600  $\mu$ g d'IgM purifiés ne semblent pas plus aptes à développer une forte réponse cytotoxique que les souris sans anticorps naturels. On peut toutefois affirmer que ce n'est pas en raison d'un nombre plus faible de précurseur de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au virus puisque les souris ayant reçu des splénocytes de souris P14 possèdent une plus grande activité cytotoxique que celles qui n'en n'ont pas reçu. Toutefois, il n'est pas possible dans ces études d'exclure l'importance de la présence des anticorps naturels dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques. En effet, plusieurs paramètres restent à évaluer, notamment la prolifération initiale des lymphocytes T suite à l'infection ainsi que d'effectuer une évaluation plus quantitative de la cytotoxicité par marquage intracellulaire à l'IFN- $\gamma$  et au granzyme B qui sont deux molécules importantes dans l'activité des lymphocytes T.

#### 4 Impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction de la réponse humorale des lymphocytes B-2

Les résultats précédents semblent démontrer que la présence des anticorps naturels ainsi qu'une pleine diversité de leur répertoire sont importantes pour un recrutement efficace et rapide aux organes lymphoïdes. Puisque les lymphocytes B-2 y sont localisés, nous avons voulu déterminer si la présence d'anticorps naturels était importante pour induire une meilleure réponse humorale.

À cette fin, des souris  $J_H T$  ont été irradiées avec deux doses semi-létales de 700 rads avant de recevoir un transfert de cellules de moelle osseuse provenant de souris C57BL/6 afin de générer des souris déficientes en lymphocytes B-1 mais qui possèdent des lymphocytes B-2. Par la suite, certaines souris ont reçu 600  $\mu\text{g}$  d'IgM purifiés 12 h avant d'être infectées avec un virus induisant normalement une forte réponse humorale, soit le VSV-IND. Des échantillons sanguins ont été récoltés aux jours 4, 8 et 12 post-infection afin d'évaluer l'activité neutralisante des anticorps sécrétés par les lymphocytes B-2. Si la présence d'anticorps naturels est importante dans l'induction d'une réponse humorale, nous nous attendrions à observer de plus hauts titres neutralisants chez les souris ayant reçu au préalable des anticorps naturels.

Dans un premier temps, il est possible d'observer une légère différence dans la production d'Ig totales entre la souris  $J_H T$  ayant reçu des IgM et celle qui n'en n'a pas reçus (figure 30). En effet, à 4 jours post-infection, les souris transférées avec des anticorps naturels démontrent un titre neutralisant en Ig totales légèrement plus élevée que celles qui n'en n'ont pas eues. Toutefois, la situation semble se corriger à 8 jours post-infection puisque toutes les souris possèdent un titre neutralisant identique. De plus, il est à noter qu'à ce temps, les souris irradiées restent légèrement en-dessous des souris contrôles quant à leur neutralisation. Finalement, à 12 jours post-infection, les souris  $J_H T$  ayant reçu des IgM purifiés possèdent une activité neutralisante légèrement au-dessus des souris contrôle. Il ne nous a pas été possible

d'évaluer le titre neutralisant des souris J<sub>H</sub>T sans anticorps naturels en raison de leur mortalité à 11 jours post-infection (figure 35).

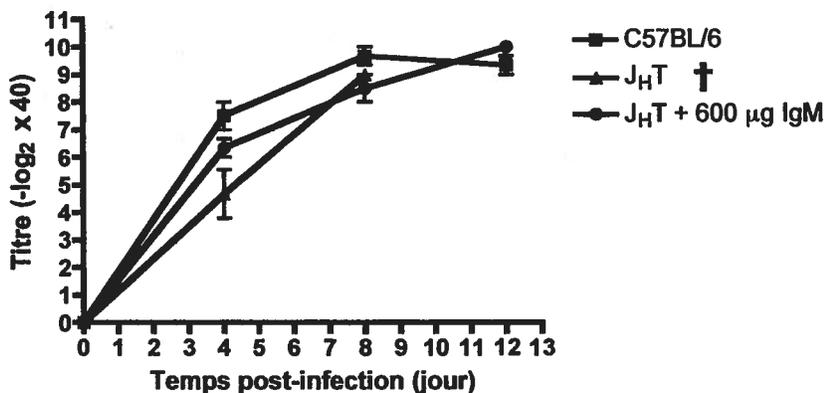
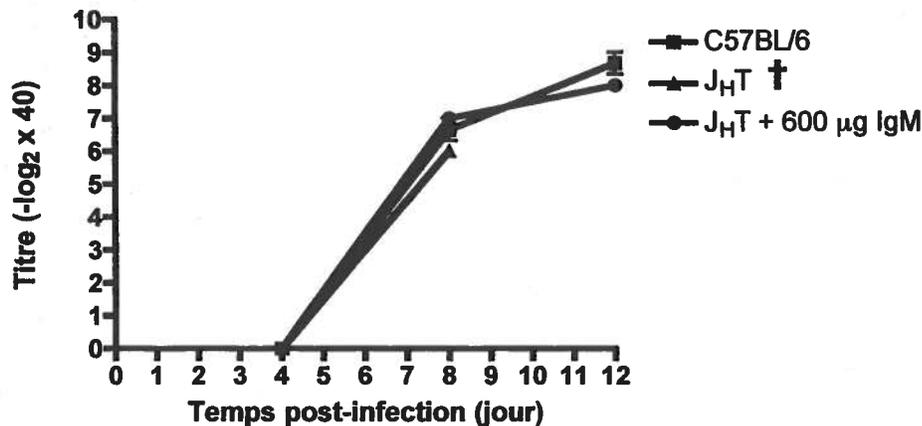


Figure 30 : Titres en anticorps neutralisants chez des souris J<sub>H</sub>T ayant reçu des anticorps naturels.

Les souris J<sub>H</sub>T ont été irradiées avec 2 doses semi-létales de 700 rads. Le jour même, elles ont reçu, par voie intraveineuse,  $10^7$  cellules de moelle osseuse de souris C57BL/6 et ont été laissées telles quelles pendant 3 à 4 semaines afin de permettre un rétablissement des populations de la lignée lymphoïde. Par la suite, certaines souris ont reçu 600 µg d'IgM purifiés de souris C57BL/6 environ 12 heures avant une infection avec  $2 \times 10^6$  ufp de VSV-IND. Des échantillons sanguins ont été prélevés aux jours 4, 8 et 12 post-infection et l'activité neutralisante des anticorps a été évaluée par test de neutralisation.

#### † Mort des souris (jour 11)

Par la suite, nous avons évalué l'activité neutralisante des IgG en dépliant le sérum des IgM avec du β-ME (figure 31). La réponse IgG survient seulement 8 jours post-infection, ce qui est corrélé avec l'apparition de la réponse des lymphocytes T auxiliaires environ 5 jours post-infection (Hangartner *et al*, 2006). Dans un deuxième temps, il nous a été possible d'observer que les souris J<sub>H</sub>T sans anticorps naturels démontraient une très légère différence avec les autres souris. Toutefois, cette différence est tellement minime qu'elle n'a pas été jugée significative. Bref, il semblerait que toutes les souris soient capables de produire une réponse IgG neutralisante de la même amplitude et en même temps.

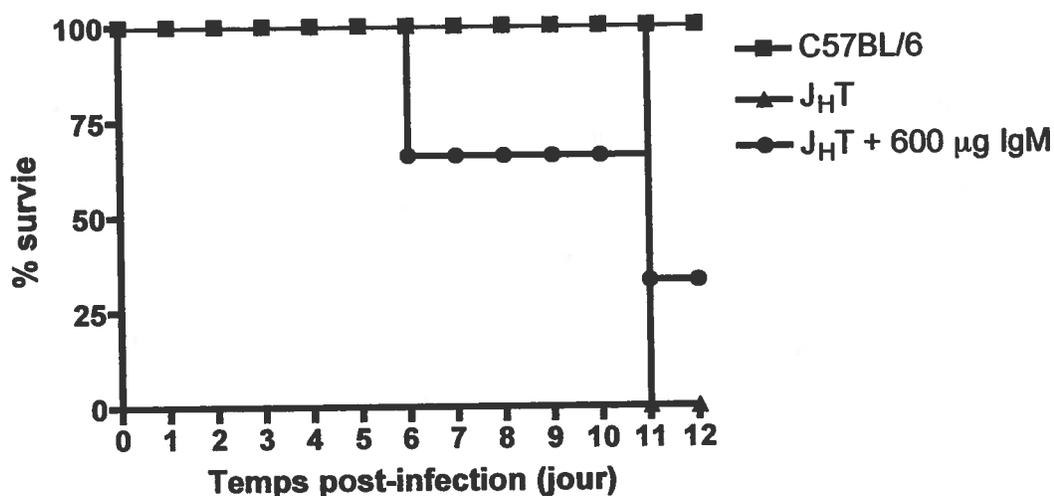


**Figure 31 : Titres en anticorps neutralisants IgG chez des souris J<sub>HT</sub> ayant reçu des anticorps naturels**

Le sérum des souris J<sub>HT</sub>, J<sub>HT</sub> avec IgM purifiés et C57BL/6 récoltés aux jours 4, 8 et 12 post-infection a été mis en présence de  $\beta$ -ME afin de dépléter le sérum en IgM et d'observer l'activité neutralisante des IgG.

† Mort des souris (jour 11)

D'un autre côté, les courbes de survie pour chacune des souris nous démontrent que les souris J<sub>HT</sub> sans anticorps naturels ont une mortalité de 100 % à 11 jours post-infection, que les souris J<sub>HT</sub> avec anticorps naturels ont un pourcentage de survie de 33 % et que toute les souris témoins ont survécu (figure 32). Il semble donc qu'un élément manque chez les souris J<sub>HT</sub> afin d'assurer leur protection. Donc, il pourrait être possible d'émettre comme hypothèse qu'un apport constant en anticorps naturels serait nécessaire pour promouvoir une meilleure réponse humorale ainsi que pour assurer la survie des animaux. Toutefois, il est important de considérer le faible échantillonnage utilisé. En conséquence, les données fournies par ces expériences restent très préliminaires et elles méritent d'être répétées afin de pouvoir tirer davantage de conclusions.



**Figure 32 : Survie des souris suite à l'infection avec VSV-IND**

Les souris J<sub>H</sub>T, J<sub>H</sub>T ayant reçu des IgM purifiés et les souris C57BL/6 ont été infectées par voie intraveineuse avec  $2 \times 10^6$  ufp de VSV-IND. Les points limites et la survie ont été évalués de façon quotidienne ( $n = 3$ ).

La présence d'anticorps naturels paraît donc importante dans l'induction rapide d'une réponse humorale mais pas dans le maintien d'une réponse à plus long terme. En effet, en présence ou en absence d'anticorps naturels, la réponse des IgG est la même ce qui nous laisse croire que d'autres mécanismes entrent en ligne de compte pour la protection des souris.

## Chapitre 4

### Discussion

L'interaction entre les virus et le système immunitaire est souvent représentée comme un état d'équilibre. D'un côté, les virus ont développé plusieurs mécanismes pour échapper au système immunitaire afin d'assurer au maximum leur réplication et leur propagation. De l'autre côté, le système immunitaire s'est doté de mécanismes précis mais plutôt lents à apparaître, fournis par la réponse des lymphocytes B-2 et T ainsi que des mécanismes plus rapides, innés, afin de permettre la détection immédiate des pathogènes. La reconnaissance d'une multitude de micro-organismes est permise grâce à la grande diversité des récepteurs des cellules impliquées dans les réponses immunitaires. Chez les lymphocytes B-1, la génération de la diversité est concentrée dans le récepteur des lymphocytes B ainsi que dans les anticorps qu'ils sécrètent, soient les anticorps naturels.

Plusieurs études ont démontré que les anticorps naturels avaient un effet protecteur suite à une infection (Ochsenbein *et al*, 1999; Jayasekera *et al*, 2006; Harandi *et al*, 2001) soit par la neutralisation directe des pathogènes ou la formation de complexes immuns qui permettent l'activation de la cascade du complément ainsi qu'un meilleur recrutement vers les organes lymphoïdes (Youd *et al*, 2002; Ferguson *et al*, 2004). Puisque les anticorps naturels ne subissent pas de maturation d'affinité supplémentaire autre que celle fournie par le réarrangement des gènes de la lignée germinale, ceux-ci dépendent donc de ces processus de diversification afin de reconnaître un très grand nombre de pathogènes qui sont parfois très distincts les uns des autres (Kantor *et al*, 1997; Qin *et al*, 1999).

En conséquence, nous avons émis comme hypothèse que la diversité générée par le réarrangement des gènes de la lignée germinale était essentielle à une

reconnaissance efficace des pathogènes et ainsi, à la formation de complexes immuns et pour un recrutement efficace vers les organes lymphoïdes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous possédons plusieurs souris transgéniques ayant à des niveaux différents, des lacunes dans le répertoire primaire de leurs lymphocytes B-1. Elles ont donc été testées dans leur capacité à reconnaître nos deux modèles viraux, soit VSV et LCMV, à les neutraliser ainsi qu'à les capter dans la rate. De plus, la quantité de lymphocytes B-1 ainsi que la concentration sérique en anticorps naturels de chacune des souris transgéniques a été déterminée.

Dans un deuxième temps, plusieurs études ont émis comme hypothèse que les anticorps naturels, en permettant une meilleure rétention des pathogènes aux organes lymphoïdes permettraient de faire un pont entre l'immunité innée et adaptative. Autrement dit, la présence d'anticorps naturels pourrait permettre une meilleure réponse immunitaire adaptative (Ochsenbein *et al*, 1999; Ochsenbein *et al*, 2000). Ce pont pourrait être permis grâce à la formation de complexes immuns dont on a déjà démontré l'utilité dans la stimulation des lymphocytes B-2 (Heyman *et al*, 1985; Heyman *et al*, 1990, Lehner *et al*, 1983) et, quoique controversé, dans la stimulation des lymphocytes T (Thornton *et al*, 1994; Suresh *et al*, 2003, Stager *et al*, 2003). Dans cette section, nous avons voulu évaluer le lien unissant les anticorps naturels à deux voies de l'immunité adaptative, soit la réponse humorale médiée par les lymphocytes B-2 dans le cadre d'une infection au VSV ainsi que la réponse cellulaire, médiée par les lymphocytes T cytotoxiques, dans le cadre d'une infection au LCMV.

## 1 Caractérisation des souris transgéniques

Les différentes souris utilisées dans ces études possèdent certaines lacunes au niveau de leur répertoire primaire des lymphocytes B. Ceci a pour effet de moduler la façon dont elles reconnaissent les différents pathogènes. Toutefois, l'introduction de certains segments géniques pourrait aussi avoir un impact sur la quantité de lymphocytes B-1 présents chez chacune ainsi que sur leur activité sécrétrice. Tout d'abord, afin de caractériser ce type cellulaire, nous avons déterminé la quantité totale de lymphocytes B-1 chez chacune des souris et avons mesuré la quantité d'anticorps naturels. Par la suite, puisque les souris possèdent différentes lacunes dans leur répertoire, nous avons voulu évaluer leur capacité à reconnaître nos deux modèles viraux ainsi qu'à les neutraliser, puisqu'il s'agit d'une fonction importante des anticorps naturels.

### 1.1 Quantification des populations de lymphocytes B-1

Tout d'abord, nous avons pu constater que les différentes souris transgéniques utilisées dans ces études possèdent des populations semblables de lymphocytes B-1 dans la cavité péritonéale (Tableau 2). De plus, elles possèdent une même quantité de lymphocyte B-1a que la souris témoin C57BL/6, constituant généralement environ 7 % des cellules de la cavité péritonéale. Toutefois, les souris RAG-1<sup>-/-</sup> ne possédaient pas de lymphocytes B-1 puisqu'elles ne peuvent générer de récepteur des lymphocytes B fonctionnels (Chen *et al*, 1993; Mombaerts *et al*, 1993). Les résultats concordent avec des études effectuées ultérieurement qui démontraient que les souris HC1, QM et AID<sup>-/-</sup> possèdent des populations normales de lymphocytes B-1a (Taylor *et al*, 1994; Cascalho *et al*, 1997; Muramatsu *et al*, 2000).

## 1.2 Quantification de la production d'anticorps naturels

Dans un deuxième temps, l'activité sécrétrice des lymphocytes B-1 a été évaluée par un test ELISA qui nous permettait de quantifier la quantité totale d'anticorps d'isotype IgM présente dans le sérum de chacune des souris. En premier lieu, il a été possible d'observer que la souris AID<sup>-/-</sup> sécrétait environ 5 fois plus d'IgM que la souris témoins (figure 20). En effet, ce syndrome d'hypermuglobulémie, ou surproduction d'IgM, a déjà été rapporté dans la littérature où il a été remarqué que les lymphocytes B de cette souris exprimaient davantage de molécules d'IgM à leur surface. Plus précisément, les lymphocytes B localisés dans les plaques de Peyer et dans les ganglions mésentériques ont été identifiés comme étant ceux dont la molécule d'IgM était la plus densément exprimée (Muramatsu *et al*, 2000). Ces études n'ont toutefois pas déterminé s'il s'agissait de lymphocytes B-1 ou de lymphocytes B-2. La surproduction d'IgM par les souris AID<sup>-/-</sup> est causée par une combinaison de deux facteurs. Tout d'abord, la surexpression de molécules d'activation telles que CMH II, CD69 et CD86, ajouté à une plus faible expression de facteurs de régulation négative expliqueraient la suractivité des lymphocytes B des souris AID<sup>-/-</sup> (Muramatsu *et al*, 2000). Les souris QM et HC1 possédaient respectivement 4 fois et 10 fois moins d'anticorps naturels d'isotype IgM que la souris témoin. Les résultats obtenus avec la souris QM ne correspondent à ceux du groupe de Matthias Wabl qui affirmait que les souris QM possédaient un taux d'IgM sérique normal (Cascalho *et al*, 1996). Toutefois, des observations provenant de d'autres laboratoires nous laissent croire que nos observations sont justes (Lamarre A, *observation non-publiées*). D'un autre côté, il a déjà été observé que la souris HC1 possédait une plus faible quantité d'IgM sérique que la souris C57BL/6. Bien qu'ils produisent moins d'Ig, les populations de lymphocytes B-1 et la densité d'Ig qu'ils expriment à leur surface sont normales (tableau 2; Taylor *et al*, 1994). Il a alors été émis comme hypothèse que les lymphocytes B des souris HC1 avaient un taux de survie qui était plus faible que chez une souris de type sauvage. Finalement, bien entendu, les souris RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T ne sécrètent pas d'anticorps naturels d'isotype IgM puisqu'elles ne possèdent pas de lymphocytes B (Mombaerts *et al*, 1992; Chen *et al*, 1993).

### 1.3 Caractérisation de la spécificité des anticorps naturels chez les souris transgéniques

Dans un troisième temps, la capacité à reconnaître les deux modèles viraux a été testée chez chacune des souris. Si la diversité du répertoire des anticorps naturels est importante pour une reconnaissance efficace des pathogènes, nous nous attendrions à ce que les deux souris qui possèdent un répertoire moins diversifié, soit les souris HC1 et QM reconnaissent moins efficacement VSV et LCMV. L'évaluation de la spécificité de la liaison s'est fait par un test ELISA avec VSV ou LCMV adsorbés au fond des puits. La souris AID<sup>-/-</sup> est celle qui possède les densités optiques les plus élevées contre les deux virus (figure 21). Cette observation peut être expliquée de deux façons. Tout d'abord, tel que décrit précédemment, les souris AID<sup>-/-</sup> possèdent une plus grande quantité d'IgM sérique que les souris témoins (figure 20 ; Mombaerts *et al*, 1992). De plus, le répertoire des anticorps naturels est peu affecté par une déficience en l'enzyme AID puisqu'ils démontrent peu d'hypermutation somatique et de commutation de classe (Avrameas, 1991). D'autre part, la souris HC1 semble être capable de reconnaître le virus, mais de façon moins efficace que la souris témoin. En effet, bien que cette souris possède l'insertion de la chaîne V<sub>H5-51</sub>, elle peut réarranger de façon normale ses segments D et J<sub>H</sub>. Cela fait en sorte qu'elle peut générer une diversité relativement importante dans la région CDR3 de ses anticorps lui permettant de répondre à plusieurs pathogènes (Xu *et al*, 2000). Il est donc normal qu'elle puisse reconnaître VSV et LCMV mais de façon moins efficace que la souris C57BL/6. La souris QM semble reconnaître peu efficacement les deux virus. Cette dernière possède l'insertion d'une chaîne lourde V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> 17.2.25 ainsi qu'une seule chaîne légère de type  $\lambda$  (Casalho *et al*, 1997). L'association des deux génère des anticorps spécifiques au NP dans environ 80 % des cas. Pour cette raison, la souris ne semble pas être capable de reconnaître efficacement les deux virus puisque son répertoire est pratiquement mono-spécifique. Toutefois, puisque 20 % de ses anticorps auront des spécificités différentes, grâce aux réarrangements secondaires, elle semble quand même pouvoir reconnaître VSV et LCMV mais avec une efficacité moindre (Lopez-Macias *et al*, 1999).

La diversité du répertoire des anticorps naturels semble donc être importante pour une reconnaissance efficace des pathogènes puisque les souris ayant un répertoire moins diversifié (HC1 et QM) reconnaissent les virus de façon moins efficace que la souris témoin. Par ailleurs, les densités optiques observées peuvent être influencées, d'une part, par la capacité des anticorps à reconnaître les pathogènes, démontré par la diversité du répertoire, mais aussi, par la quantité présente dans le sérum. Pour cette raison, la souris AID<sup>-/-</sup> semble reconnaître de façon plus importante les virus que la souris témoin. Toutefois, la quantité ne semble pas être le seul facteur limitant puisque la souris HC1 qui possède environ 10 fois moins d'anticorps naturels que la souris témoins génère des densités optiques plus élevées que la souris QM qui en possède davantage. En conclusion, la quantité d'anticorps naturels présente dans le sérum est certes importante mais la qualité de ces anticorps est aussi un facteur déterminant. Afin de démontrer l'importance de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans la reconnaissance des pathogènes, il serait intéressant de refaire ces tests ELISA mais en mettant les mêmes quantités d'IgM pour chacune des souris.

#### **1.4 Caractérisation de la capacité neutralisante des anticorps naturels chez les souris transgéniques**

Dans un dernier temps, l'activité neutralisante des anticorps naturels a été évaluée pour chacune des souris chez les deux modèles viraux. Encore une fois, si la diversité du répertoire des anticorps naturels est importante afin de médier une activité neutralisante efficace, les souris ayant un répertoire plus restreint, soit les souris HC1 et QM, devraient posséder des titres neutralisants plus faibles que la souris témoins. Tout d'abord, pour VSV-IND, il est possible d'observer que les souris AID<sup>-/-</sup> et C57BL/6 sont les seules qui semblent neutraliser le virus et ce, de façon pratiquement similaire (tableau 3). Cette observation s'explique par le fait que la souris AID<sup>-/-</sup> est très peu affectée au niveau de la diversité du répertoire des anticorps naturels. De plus, la souris QM semble être capable de neutraliser VSV-IND. Toutefois, il est

difficile de déterminer si ce résultat est significatif puisque, d'une part, la majorité des souris ne neutralisaient pas le virus et, d'autre part, car le titre neutralisant détecté est très près du seuil de détection du test. Néanmoins, cette observation pourrait être expliquée par le 20 % d'anticorps qui possèdent une spécificité autre que pour le NP chez la souris QM. De plus, la souris HC1, bien qu'elle semble reconnaître le virus de façon plus efficace que la souris QM, n'exhibe aucun titre neutralisant. En conséquence, il serait possible d'émettre comme hypothèse que dans ce cas-ci, la quantité d'anticorps naturels présente dans le sérum ait un rôle à jouer. En effet, le test de neutralisation est réalisé en mettant le sérum en présence d'une grande quantité de virus. Même si la réactivité ainsi que la spécificité des anticorps est convenable, il est possible qu'ils ne puissent arriver à neutraliser le virus si le ratio anticorps : virus est trop faible (Bachmann *et al*, 1999). En conséquence, aucun titre neutralisant ne sera observé. Donc, tout comme pour les tests ELISA, il serait intéressant de répéter l'expérience en comparant les souris avec une même quantité d'anticorps pour chacune.

Dans un autre ordre d'idées, nous avons voulu déterminer si l'activité neutralisante observée était médiée par les IgM qui est le principal isotype des anticorps naturels (Avrameas, 1991). Pour ce faire, du  $\beta$ -ME a été ajouté aux sérums afin de le dépléter en IgM. Lorsque ces derniers ont été mis en présence de  $\beta$ -ME, il n'y avait plus aucune activité neutralisante. Ceci nous laisse donc croire que l'activité neutralisante qui était observée était imputable aux IgM.

Finalement, nous n'avons pu observer de titre neutralisant contre LCMV-WE en présence ou en absence de  $\beta$ -ME. Donc, une diversité des anticorps naturels ne semble pas importante dans la neutralisation de ce virus, comparativement à ce qui était observé pour VSV-IND. La différence des titres neutralisants observée entre les deux virus peut être expliquée par deux phénomènes. Tout d'abord, il a été émis comme hypothèse que le LCMV aurait évolué de façon à ne pas être reconnu et neutralisé par le répertoire primaire des lymphocytes B. En conséquence, les lymphocytes B des souris naïves doivent passer au travers de plusieurs processus de maturation d'affinité

afin d'être capable de neutraliser le virus (Hangartner *et al*, 2003). De ce fait, il a été remarqué que des souris naïves possédaient davantage de précurseurs de lymphocytes B spécifiques à VSV-IND qu'à LCMV (Kalinke *et al*, 2000 ; Kalinke *et al*, 1996 ; Roost *et al*, 1995). Finalement, la structure même des virus peut expliquer la différence observée quant à la capacité des souris à les neutraliser. En effet, la protéine G du VSV est très densément exprimée à la surface du virus. Ceci fait en sorte que le seul épitope immunodominant pour la réponse des lymphocytes B est la GP. Or, puisque cette protéine est essentielle à l'entrée du virus dans la cellule cible, un anticorps dirigé contre la GP est automatiquement neutralisant. Par opposition, le LCMV exhibe plusieurs sites immunogéniques pouvant être reconnus par la réponse humorale. Donc, un anticorps dirigé contre le LCMV ne sera pas nécessairement contre la GP du virus et ne sera donc pas automatiquement neutralisant (Hangartner *et al*, 2006).

## **2 Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans le recrutement vers les organes lymphoïdes**

Une des principales fonctions des anticorps naturels est de former des complexes immuns. Il a déjà été démontré que ces derniers étaient très efficaces pour activer la voie classique du complément (Cooper, 1985) ainsi que pour opsoniser, avec ou sans aide du complément, différents pathogènes (Walport, 2001; McCullough *et al*, 1986). De plus, les complexes immuns pourraient être plus facilement retenus aux organes lymphoïdes, en raison des récepteurs Fc présents à la surface des cellules dendritiques et macrophages présents dans la zone marginale ou par des processus de rétention physique (Yoshida *et al*, 1993). Puisque les complexes immuns formés des pathogènes et des anticorps naturels peuvent être retenus aux organes lymphoïdes et ainsi faire un lien avec l'immunité adaptative, il apparaît important d'évaluer si la diversité du répertoire des anticorps naturels est importante à cet effet.

Nous avons préalablement démontré à la **section 1** que la diversité du répertoire des anticorps naturels était importante pour une reconnaissance efficace des virus ainsi que pour leur neutralisation. Dans un deuxième temps, nous avons voulu évaluer les cinétiques de recrutement du virus à la rate en fonction de la diversité du répertoire. Si celle-ci est importante pour générer des complexes immuns, nous croyons que les souris qui auront un répertoire moins diversifié auront davantage de difficulté à recruter le virus à la rate. Une moins grande présence du virus à cet endroit pourrait se traduire par une plus grande présence en périphérie, en particulier dans les organes cibles.

### **2.1 Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans le recrutement de VSV-IND et de LCMV-WE vers les organes lymphoïdes**

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer l'importance de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans un recrutement rapide et efficace

du virus à la rate. Pour ce faire, les différentes souris ont été infectées avec une forte dose de VSV-IND et la rate, les reins, le foie et le sang ont été récoltés à 1h, 2h, 4h, et 8h post-infection afin d'y titrer le virus. Parallèlement, d'autres souris ont été infectées avec une forte dose de LCMV-WE et les mêmes organes ont été récoltés à 2h, 8h, 24h et 48h post-infection.

### 2.1.1 Recrutement de VSV-IND et de LCMV-WE à la rate

Tout d'abord, il a été possible d'observer que les souris qui possédaient un répertoire plus diversifié semblaient recruter le virus à la rate de façon plus efficace que les autres (figures 22A et 23 A). En effet, les souris C57BL/6 et AID<sup>-/-</sup> possèdent des titres d'environ de 100 fois plus élevés, dans les premières heures suivant l'infection, à 10 fois plus élevée à la fin de l'infection. Le phénomène était encore plus accentué lors d'une infection avec LCMV-WE lors de laquelle il était possible d'observer des titres de 10<sup>6</sup> fois plus élevés en début d'infection à 100 fois plus élevés 24h post-infection. Ceci nous laisse croire, d'une part, que la diversité du répertoire des anticorps naturels est importante pour une reconnaissance efficace des pathogènes, tel que démontré à la section 1, pour une formation de complexes immuns ainsi qu'un recrutement plus efficace à la rate. D'autre part, cela nous laisse supposer que la quantité d'anticorps naturels n'est pas le seul facteur déterminant. En effet, bien que la souris AID<sup>-/-</sup> possède environ 10 fois plus d'anticorps naturels que la souris témoins, elle recrute les virus de façon très similaire à cette dernière. Comme il l'a été mentionné précédemment, il est important considérer le fait que la formation de complexes immuns est influencée par la quantité d'anticorps présents mais aussi, par la quantité d'antigène présent. Même si une souris possède une forte quantité d'anticorps sérique, si la quantité de virus est faible, cela ne lui sera d'aucun avantage. Inversement, une souris qui possède peu d'anticorps sera probablement affectée par une infection à forte dose (Bachmann *et al*, 1997). Finalement, la ressemblance entre la souris AID<sup>-/-</sup> et C57BL/6 peut nous laisser croire que les

anticorps naturels d'isotype IgA ou IgG3 sont peu importants pour la formation de complexes immuns ainsi que pour le recrutement des pathogènes à la rate.

Par la suite, il est possible de constater que les souris qui ont un répertoire moins diversifié, soit les souris HC1 et QM possèdent des titres viraux à la rate moins élevés que les souris AID<sup>-/-</sup> et témoins. Nous croyons que cette différence peut être expliquée par la plus faible diversité du répertoire. En effet, ces deux souris reconnaissent de façon moins efficace le virus que la souris C57BL/6 (figure 21). Il est donc possible de spéculer que si la reconnaissance s'effectue moins bien, il y aura moins de complexes immuns de générés et donc, une moins bonne rétention à la rate. Il est toutefois intéressant de noter qu'à 8 heures post-infection, dans le cas de VSV-IND, les souris HC1 et QM semblent avoir augmenté la charge virale à la rate. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la spécificité de liaison est plus faible chez ces souris et en conséquence, les complexes immuns prendraient plus de temps à être formés. L'avidité des molécules d'anticorps naturels a d'ailleurs été démontrée comme étant importante dans la protection et la neutralisation du VSV-IND (Bachmann *et al*, 1997). Ce phénomène s'exprime de façon plus marquée lors d'une infection avec LCMV-WE. En effet, les souris QM et HC1 ne commencent à recruter le virus qu'à 24h post-infection, par opposition aux souris témoins. De plus, les titres viraux restent faibles jusqu'à 48h post-infection, moment où ils égalisent ceux de la C57BL/6.

De façon surprenante, la souris HC1, qui reconnaissait bien les virus, n'arrive pas à les recruter de façon efficace ou du moins, de façon supérieure à la souris QM qui avait une spécificité de liaison inférieure. Ceci pourrait être dû à la plus faible concentration d'anticorps naturels chez cette souris. En effet, comme il l'a été démontré à la section 1 (figure 20), la souris HC1 possède environ 10 fois moins d'anticorps naturels que la souris témoins et environ 2 fois moins que la souris QM. Même si ces anticorps reconnaissent bien le virus (figure 21), il est possible que la grande quantité de virus injecté ait surpassé la quantité d'anticorps naturels reconnaissant les virus. En conséquence, il serait intéressant d'évaluer le recrutement du virus à la rate chez des souris possédant les mêmes quantités d'anticorps. Une

alternative pourrait être de purifier des anticorps naturels d'isotype IgM de souris HC1 et de les injecter chez ces souris en complétant à la quantité normale, soit environ de 500 à 600 µg au total (Jayasekera *et al*, 2006). Finalement, les souris RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T sont celles qui possèdent les plus bas titres viraux qui restent stables tout au long de l'infection. Il est donc possible de croire que la présence d'anticorps naturels est importante pour le recrutement du virus par la formation de complexes immuns. En effet, bien que les souris RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T soient capables de recruter un peu de virus à la rate, possiblement grâce aux cellules présentatrices d'antigènes présentes à cet endroit, elles le font de façon 1 000 fois moins efficace que la souris témoins, ce qui concorde avec des observations précédentes (Ochsenbein *et al*, 1999).

Dans un autre ordre d'idées, il est aussi intéressant de constater la grande différence dans la cinétique du recrutement entre les différentes souris, particulièrement lors de l'infection avec LCMV-WE. En effet, les souris C57BL/6 et AID<sup>-/-</sup> commencent à recruter le virus dès 8 h post-infection, par opposition aux souris HC1, QM, RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T chez qui le virus apparaît dans la rate 24 heures post-infection. Ceci peut nous laisser croire que la formation de complexes immuns chez les premières se fait de façon plus efficace et plus rapide que chez les dernières. En effet, puisque les souris C57BL/6 et AID<sup>-/-</sup> reconnaissent bien le virus, tel que démontré par les tests ELISA, la liaison de leurs anticorps naturels au virus se fait plus facilement et donc, le recrutement aussi. Par opposition, les souris HC1 et QM possèdent une plus faible spécificité au virus. Cela prend donc davantage de temps avant qu'une liaison entre l'anticorps et le virus se produise et donc, cela se traduit par un recrutement moins efficace et retardé.

En conclusion, un répertoire diversifié des anticorps naturels semble être important pour un recrutement plus rapide et plus efficace aux organes lymphoïdes. En effet, nous avons pu observer que les souris avec un répertoire diversifié, soit les souris C57BL/6 et AID<sup>-/-</sup>, commencent à recruter plus tôt le virus à la rate, dès les premières heures suivant l'infection, par opposition aux souris HC1 et QM qui voient leur recrutement augmenter de façon importante quelques heures post-infection. De

plus, les titres viraux chez ces dernières sont plus faibles que pour les souris C57BL/6 et AID<sup>-/-</sup> même à 8 heures post-infection. Finalement, il nous a été possible de remarquer que la quantité d'anticorps présente chez les animaux pouvait avoir un impact si la quantité de virus est en excès. En effet, la souris HC1 possède une faible concentration d'anticorps naturels pouvant tout de même reconnaître différents pathogènes en raison de la diversité générée dans la région CDR3 des Ig (Xu *et al*, 2000). Toutefois, puisque la quantité de virus excède la quantité d'anticorps présents, la souris ne parvient pas à former une quantité appréciable de complexes immuns. Inversement, la souris AID<sup>-/-</sup> qui est hypermuglobulémique (Muramatsu *et al*, 2000) a des anticorps en excès par rapport à la quantité de virus. Même s'il reste encore des anticorps disponibles, si déjà tout le virus est lié par les molécules d'Ig, un surplus ne sera d'aucune aide. En conclusion, il est possible de croire que la diversité des anticorps naturels est importante pour un recrutement efficace du virus à la rate. Il serait toutefois intéressant de normaliser la quantité d'anticorps présents dans chacune des souris utilisées afin d'enlever la variable de la quantité.

### 2.1.2 Charge virale en périphérie

Comme il l'a été mentionné plus haut, il était possible de spéculer qu'un recrutement important à la rate pouvait se traduire par une charge virale plus faible en périphérie. Il a été possible d'observer que l'apparition des deux virus dans les organes périphériques survenait dans la première heure suivant l'infection (figure 22 B à D et 23 B à D). Dans le cas de VSV-IND, les deux organes semblant être les plus affectés sont les reins et le foie probablement en raison de leur fonction d'agent filtreur important dans les premiers moments de l'infection. De plus, la forte rétention du virus dans les reins, probablement en raison des complexes immuns, sont explicables car il s'agit d'un organe riche en récepteur Fc $\alpha$ / $\mu$  (Shibuya *et al*, 2000). Finalement, le sang présente des titres viraux moyens. Dans le cas de LCMV-WE, l'organe présentant la plus haute charge virale est le foie et ce, pour la plupart des souris. Il est possible d'émettre comme hypothèse qu'une plus grande quantité de

virus s'y retrouve car il agit comme agent filtreur de l'organisme mais aussi, parce que la souche WE du LCMV est hépatotropique (Zinkernagel *et al*, 1986).

Il n'a toutefois pas été possible d'établir une corrélation entre la charge virale à la rate et celle en périphérie. En effet, bien qu'il soit possible d'observer que les souris RAG-1<sup>-/-</sup> et J<sub>H</sub>T démontrent des charges virales plus élevées en périphérie et plus faible dans la rate, ce lien n'est pas facilement observable pour les autres souris. En effet, les souris C57BL/6, AID<sup>-/-</sup>, QM et HC1 démontrent des titres viraux relativement similaires en périphérie et qui varient beaucoup avec le temps. Ceci rend donc l'interprétation des résultats très difficile. Néanmoins, certains groupes ont réussi à établir cette corrélation (Ochsenbein *et al*, 1999). L'analyse de la quantité de virus présente dans le foie, les reins et le sang a été affectée par la toxicité de certains organes sur les cellules utilisées pour effectuer le titrage. En conséquence, il pourrait être intéressant de refaire cette expérience mais en utilisant une méthode qui serait plus précise et moins sensible à la toxicité des organes tel que le PCR en temps réel quantitatif. En effet, cela nous permettrait de diminuer encore plus le seuil de détection du test et peut être pouvoir tirer des conclusions plus précises.

## 2.2 Rétablissement de la capacité de recrutement du virus LCMV-WE à la rate chez les souris J<sub>H</sub>T et HC1

Puisque les souris J<sub>H</sub>T et HC1 possèdent une capacité limitée à recruter le virus à rate, nous avons voulu savoir s'il était possible de rétablir la situation en transférant des anticorps naturels d'isotype IgM purifiés.

Pour ce faire, du sérum de souris naïves C57BL/6 a été purifié par chromatographie d'affinité. La pureté des échantillons a par la suite été évaluée par immunobuvardage de type Western (figure 24). Comme il est possible de le constater l'échantillon est presque pur, bien qu'il reste une faible quantité d'anticorps d'isotype IgG. Néanmoins, puisque le sérum utilisé provient de souris naïves et que certains

anticorps naturels peuvent être d'isotype IgG3, nous ne croyons pas que cela influencera l'interprétation des résultats.

Par la suite, les différentes souris ont reçu différentes doses d'IgM purifiés environ 12 h avant infection avec une forte dose de LCMV-WE. La rate, le foie, les reins et le sang ont été récoltés 24 h suivant l'infection afin d'y titrer le virus. Dans le cas des souris J<sub>H</sub>T, 400 et 600 µg d'anticorps naturels ont été purifiés contrairement aux souris HC1 qui n'ont reçu que la dose la plus efficace, soit 600 µg. Si la présence des anticorps naturels est essentielle pour un recrutement efficace à la rate, nous nous attendons à ce que les souris qui auront reçu des IgM purifiés démontrent une charge virale plus importante à cet endroit et moins en périphérie.

### 2.2.1 Recrutement de LCMV-WE à la rate

Dans un premier temps, il est possible d'observer que les souris J<sub>H</sub>T ayant reçu soit 400 ou 600 µg d'IgM purifiés démontrent un titre viral respectivement de 10 à 1 000 fois plus élevé à la rate que la souris qui n'en n'a pas reçu (figure 25 A). De plus, il est intéressant de noter que les souris J<sub>H</sub>T qui ont reçu 600 µg d'IgM purifiés, ce qui correspond à la concentration sérique d'une souris normale (Jayasekera *et al*, 2006), recrutent le virus à la rate de façon pratiquement identique à la souris C57BL/6. Cette observation nous laisse donc croire à une restauration complète de la capacité à recruter le virus à la rate suite à un transfert d'IgM.

Dans le cas des souris HC1, il est possible d'observer un titre viral à la rate environ 10 fois plus élevé chez les souris ayant reçu des anticorps purifiés (figure 26 A). De plus, il est intéressant de noter que la souris reconstituée détient une charge virale similaire à la souris témoin. Ces résultats nous laissent donc croire qu'une diversité du répertoire des anticorps naturels est importante pour un recrutement efficace à la rate. En effet, la souris HC1 possède un répertoire environ 3 000 fois moins diversifié qu'une souris normale. Néanmoins, elle peut générer une diversité

quand même considérable dans la région CDR 3 de ses Ig (Xu *et al*, 2000). Toutefois, comme il l'a été observé précédemment, elle semble reconnaître le virus de façon moins efficace que la souris témoin. Dans ce sens, il apparaît logique que le recrutement à la rate s'effectue de façon moins importante. Lorsque l'on complète le répertoire peu diversifié des souris HC1 avec des anticorps naturels purifiés de souris C57BL/6, elles se remettent à recruter de façon plus efficace. Bien entendu, la différence entre charge virale de la souris C57BL/6 et HC1 est moins considérable que ce qu'il était observé pour la souris J<sub>H</sub>T. Cette différence peut être expliquée par le fait que le manque à gagner était moins important dans le cas de la souris HC1. En conclusion, il est possible d'associer cette augmentation de l'efficacité du recrutement à un élargissement du répertoire de ses anticorps naturels.

Finalement, le rétablissement de la capacité à recruter le virus chez les souris reconstituées, ou du moins, à l'augmenter, nous démontre bien le rôle clé des anticorps naturels dans un recrutement efficace des pathogènes aux organes lymphoïdes.

### 2.2.2 Charge virale en périphérie

Tout comme pour les expériences de dissémination virale, nous avons émis comme hypothèse qu'un meilleur recrutement à la rate se traduirait par une charge virale plus faible en périphérie. Malheureusement, il a encore été difficile de mettre ce lien en évidence. En effet, les souris qui ont reçu des IgM purifiés de souris C57BL/6 démontrent une charge virale plus élevée que les souris non-transférées dans tous les organes testés (figure 27 B à D et 28 B à D). Ceci pourrait possiblement être expliqué par une surcharge dans la quantité d'anticorps présents. En effet, les souris ont reçu une très grande quantité d'IgM et de virus à seulement 12 h d'intervalle. Il est possible qu'en raison de la très grande disponibilité momentanée des deux, une quantité plus importante de complexes immuns se soient formés. Puisque le récepteur Fc $\alpha$ / $\mu$  se retrouve sur plusieurs types cellulaires et dans plusieurs organes (Shibuya *et al*, 2000),

il est possible qu'il y ait eu une adhérence des complexes à des endroits moins courants qu'en réalité. En raison du temps de demi-vie de 2 jours court des IgM dans le sérum (Vieira *et al*, 1988), il est malheureusement difficile de remédier à la situation.

Afin de compléter les résultats déjà obtenus avec les expériences de dissémination virale, il serait très intéressant de refaire les tests de complémentations avec cette fois-ci, avec des IgM purifiés de souris QM. En effet, cela nous permettrait de comparer des doses identiques d'anticorps naturels provenant de souris C57BL/6 et QM. De plus, il serait intéressant de déterminer si une faible diversité des anticorps naturels peut être compensée en partie par une plus forte concentration de ces mêmes anticorps.

### **3 Impact de la diversité du répertoire des lymphocytes B-1 dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques**

Les anticorps naturels permettent un recrutement des pathogènes plus rapide vers les organes lymphoïdes secondaires (Ochsenbein *et al*, 1999). Puisque les lymphocytes T cytotoxiques s'y localisent, il est possible de spéculer qu'un recrutement des complexes immuns à ces endroits pourrait permettre l'induction d'une réponse cytotoxique plus rapide et peut être même plus efficace. À cette fin, nous avons voulu déterminer l'importance de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction d'une réponse des lymphocytes T cytotoxiques.

#### **3.1 Réponse des lymphocytes T cytotoxiques générée chez les différentes souris transgéniques**

Nous avons voulu déterminer si la réponse cytotoxique des lymphocytes T était similaire chez les différentes souris. En effet, nous avons préalablement démontré qu'un répertoire diversifié des anticorps naturels était important pour un recrutement plus efficace et plus rapide aux organes lymphoïdes (section 2). Il est donc possible de croire que si le recrutement est moins efficace chez les souris ayant un répertoire moins diversifié, soit les souris HC1 et QM, une induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques sera moins importante. Donc, nous nous attendions à ce que les souris HC1 et QM démontrent une activité cytotoxique moindre que la souris témoin. Il a été possible d'observer que l'activité cytotoxique semblait être influencée par la diversité du répertoire des lymphocytes B (figure 29). En effet, les souris HC1 et QM démontrent une activité cytotoxique environ 2 fois moins importante que la souris témoin C57BL/6. De plus, la souris QM semble avoir un pourcentage de lyse spécifique légèrement plus élevé que les souris HC1, bien que son répertoire soit moins diversifié. Ceci pourrait possiblement être expliqué par la plus forte concentration d'anticorps naturels chez ces souris. En effet, il est possible que,

malgré la faible spécificité, davantage de complexes immuns se soient formés chez cette souris. Cela aurait donc eu comme conséquence une plus grande rétention des antigènes vers la rate et donc, d'une meilleure induction de la réponse cytotoxique des lymphocytes T. Toutefois, puisque la différence entre les souris QM et HC1 est faible, cette expérience devrait être refaite afin de s'assurer des résultats.

Les souris  $J_H T$  sont celles qui démontrent la plus faible activité cytotoxique, soit environ 3 fois moins que la souris témoin. Ceci pourrait donc nous laisser croire que la présence d'anticorps naturels est importante dans l'induction de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques puisque ces souris n'en possèdent pas. De plus, cela pourrait être expliqué, comme nous l'avons montré précédemment, par une mauvaise reconnaissance du virus, se traduisant par un recrutement moins efficace aux organes lymphoïdes et donc, une moins bonne induction de la réponse immunitaire.

De façon surprenante, la souris  $AID^{-/-}$ , qui est peu affectée au niveau de la diversité des anticorps naturels et qui en possède de plus grandes concentrations, a une activité cytotoxique similaire aux autres souris transgéniques, soit environ 2 fois moins que la souris témoin. En effet, toutes les expériences effectuées précédemment démontraient que la souris se comportait de façon très similaire à la souris C57BL/6 en raison de son répertoire pratiquement normal. D'une part, il serait possible d'émettre comme hypothèse que les anticorps naturels d'isotype IgA et IgG3 absents chez cette souris pourraient s'avérer importants dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques. Toutefois, cela serait étonnant puisque la souris  $AID^{-/-}$  ne semblait pas affectée au niveau de la reconnaissance des pathogènes et de leur neutralisation (section 1) ainsi que pour le recrutement aux organes lymphoïdes (section 2). Il est se pourrait donc que d'autres facteurs puissent entrer en jeu. Une hypothèse qui a été retenue est le lien entre la diversité du répertoire des lymphocytes B et celle du répertoire des lymphocytes T.

Récemment, certaines études ont démontré un lien entre la diversité du répertoire des lymphocytes B et celle des lymphocytes T (Joao *et al*, 2006 ; Joao *et al*, 2004). En effet, il a été remarqué que la diversité du répertoire du récepteur des lymphocytes T était réduite chez les souris QM et J<sub>H</sub>T sans toutefois affecter leur capacité à proliférer ou leur activité cytotoxique. Cette situation semblait toutefois réversible puisque lorsque l'on ajoutait des Ig solubles, le répertoire revenait à la normale. Ces auteurs ont alors émis l'hypothèse que les lymphocytes B pourraient être importants dans les processus de sélection des thymocytes, leur colonisation du thymus ou pourraient leur donner des signaux de survie lorsque les lymphocytes T se retrouvent en périphérie et ainsi maintenir la population (Ogle *et al*, 2003).

### 3.2 Impact de la présence des anticorps naturels dans l'activité cytotoxique des lymphocytes T chez la souris J<sub>H</sub>T

Afin de réellement voir l'impact de la présence d'anticorps naturels dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative des lymphocytes T cytotoxiques, nous avons pris en compte le fait que les souris ayant un répertoire des lymphocytes B affecté pouvaient posséder un répertoire des lymphocytes T plus restreint. À cette fin, des transferts de splénocytes de souris P14 ont été effectués afin de normaliser la quantité de précurseurs présents chez chacune des souris. En effet, il a été observé qu'un transfert de  $10^4$  cellules de rate de souris P14 correspondait à 50 précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au LCMV retrouvés dans la rate. Or, une souris C57BL/6 possède généralement ce nombre de précurseurs à la rate (Ehl *et al*, 1998). Les expériences subséquentes ont été effectuées sur les souris J<sub>H</sub>T, c'est-à-dire celles qui possèdent la plus forte différence de cytotoxicité cellulaire avec la souris témoin. De plus, afin de démontrer la présence des anticorps naturels dans l'induction de la réponse cytotoxique, un groupe de souris a reçu, environ 12 heures avant infection, différentes concentrations d'IgM purifiés de souris C57BL/6.

Nous avons alors pu observer que la présence d'anticorps naturels ne semblait pas être un facteur déterminant dans l'induction de la réponse cytotoxique (figure 30). En effet, les souris qui ont reçu 400 µg ou 600 µg d'IgM purifiés ont le même pourcentage de lyse spécifique que les souris n'en ayant pas reçu. Il est toutefois possible maintenant d'exclure l'hypothèse du nombre de précurseurs. En effet, la souris J<sub>H</sub>T qui n'a pas reçu de splénocytes de souris P14 démontre une activité cytotoxique moindre que celles qui ont été transférées, ce qui nous indique que le transfert s'est bien effectué et que la quantité de précurseurs pouvait influencer nos résultats précédents.

Les études présentées dans ce mémoire ne semblent pas démontrer de lien entre la présence et la diversité du répertoire des anticorps naturels et l'induction de la réponse cytotoxique des lymphocytes T. Toutefois, ces études restent préliminaires et ne nous permettent pas non plus d'infirmer le rôle des anticorps naturels dans ce type de réponse. En effet, plusieurs variables pourraient encore influencer nos résultats. Tout d'abord, il est important de considérer le fait que les souris J<sub>H</sub>T ont une architecture splénique anormale en raison de l'absence de lymphocytes B. Bien que les graphiques de dissémination virale présentés aux figures 22 et 23 semblent démontrer que la souris J<sub>H</sub>T peut accumuler une certaine quantité de complexes immuns dans la rate, cela ne nous informe pas de la rétention à long terme de ces complexes ainsi qu'à savoir s'ils sont en quantité suffisante pour l'induction efficace d'une réponse cytotoxique. En effet, des études avec des souris dont l'architecture splénique était désorganisée ont démontré une profonde diminution de la réponse aux interférons de type 1 qui est important pour le témoin de la réplication virale (Louten *et al*, 2006). De plus, d'autres études ont observé que des souris avec une architecture splénique affectée avaient des réponses des lymphocytes T cytotoxiques moins prononcées. En effet, une zone importante de la rate dans l'induction de réponses immunitaires est la zone marginale. Celle-ci est composée principalement de cellules endothéliales et de macrophages. Les cellules effectrices de l'immunité adaptative, soit les lymphocytes B-2 et T, la traversent régulièrement afin de rencontrer leur antigène (Kraal, 1992 ; Seiler *et al*, 1997). Une désorganisation de l'architecture peut

affecter les contacts entre ces différentes cellules, résultant alors en une plus faible induction de la réponse immunitaire adaptative. Ceci a d'ailleurs été démontré dans le cadre de souris possédant une architecture splénique anormale qui génèrent de faibles réponses cytotoxiques contre LCMV (Karrer *et al*, 1997; Berger *et al*, 1999). En conséquence, il serait intéressant de trouver un modèle de souris déficiente en lymphocytes B-1 mais dont l'architecture splénique est intacte.

D'un autre côté, il est possible que l'effet bénéfique des anticorps naturels survienne plus tôt au cours de l'infection. En effet, il se pourrait que la prolifération soit induite de façon plus efficace lorsqu'il y a présence d'anticorps naturels mais que cet effet passe inaperçu 8 jours post-infection. Pour cette raison, il serait très intéressant de regarder la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques dans les quelques heures suivant l'infection chez des souris qui ne possèdent pas d'anticorps naturels par opposition à celles qui en ont. De même, puisque les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène très efficaces, il serait intéressant de tester si leur présentation est augmentée en présence d'anticorps naturels.

De plus, il est important de considérer le fait qu'à 8 jours post-infection, il est difficile de dissocier les effets des réponses immunitaires innées et adaptatives. En effet, d'autres réponses que celles fournies par les lymphocytes B-1 et les lymphocytes T cytotoxiques peuvent entrer en jeu. Par exemple, il a été démontré qu'à environ 3 à 4 jours post-infection il était possible d'observer la production, par les lymphocytes B-2, d'anticorps non-neutralisants dirigés contre la nucléoprotéine du virus. Bien qu'aucune étude n'ait démontré leur rôle dans le cadre d'une infection à LCMV, l'importance des anticorps non-neutralisants par l'opsonisation, entre autres, a été démontré (Hangartner *et al*, 2006). Puisque les différentes souris testées possèdent des lacunes dans le répertoire primaire, non seulement des lymphocytes B-1 mais aussi des lymphocytes B-2, il serait très probable que la réponse fournie par ces derniers soit affectée. L'opsonisation se définit comme le marquage des pathogènes par des anticorps. Grâce aux récepteurs d'Ig présents à la surface des phagocytes, les récepteurs Fc, les pathogènes exhibant ces molécules d'Ig sont plus facilement

reconnus et phagocytés (Aderem *et al*, 1999). Une internalisation plus rapide et plus efficace des pathogènes par les cellules présentatrices d'antigène pourrait faire en sorte d'augmenter la présentation aux lymphocytes T cytotoxiques. En conséquence, les souris transgéniques, restreintes quant à la diversité du répertoire des lymphocytes B, pourrait générer moins d'anticorps non-neutralisants, résultant en une diminution de la présentation aux lymphocytes T. De plus, cela pourrait aussi se traduire par un moins bon contrôle de la virémie puisque les pathogènes sont moins bien phagocytés.

En conclusion, nous n'avons pu ni affirmer ni infirmer l'importance de la présence des anticorps naturels dans l'induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques. Il serait toutefois très intéressant à poursuivre des recherches dans ce domaine soit par la génération de souris déplétées en lymphocytes B-1 mais dont l'architecture splénique est intacte, soit en utilisant un test plus quantitatif ou soit en regardant plus tôt au cours de l'infection. En effet, de plus en plus d'études tendent à démontrer le lien entre une bonne induction de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques et la présence de complexes immuns. D'une part, la formation de complexes immuns pourrait induire une plus grande sécrétion d'IL-4 par les cellules dendritiques. Or, l'importance de cette cytokine dans la prolifération et l'activation des lymphocytes T a déjà été démontrée (Stager *et al*, 2003). De plus, il semblerait que les complexes immuns liés au complément seraient de bons inducteurs de la réponse des lymphocytes T (Kopf *et al*, 2002). Tout d'abord, la présence de la molécule C3 du complément permettrait un meilleur recrutement aux organes lymphoïdes et un meilleur apprêtement par les cellules présentatrices d'antigènes (Guinamard *et al*, 2000). Finalement, la présence de molécules d'Ig dans les complexes immuns médierait une meilleure reconnaissance par les récepteurs Fc présents à la surface des lymphocytes T (Huber *et al*, 2001).

#### 4 Impact de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans l'induction de la réponse humorale des lymphocytes B-2

Comme il l'a été vu précédemment, les anticorps naturels permettent une reconnaissance rapide des pathogènes et leur rétention aux organes lymphoïdes grâce à la formation de complexes immuns (Ochsenbein *et al*, 1999 ; Corley *et al*, 2005). Puisque plusieurs cellules du système immunitaire adaptatif s'y localisent, il a été émis comme hypothèse que les anticorps naturels permettaient de faire un pont entre l'immunité innée et adaptative. Dans cette partie, nous avons voulu évaluer le lien entre la présence des anticorps naturels et l'induction d'une réponse des lymphocytes B-2.

À cette fin, des souris J<sub>H</sub>T ont été irradiées avant de recevoir un transfert de moelle osseuse afin de rétablir les populations cellulaires de la lignée lymphoïde. Comme il l'a été vu précédemment, les précurseurs des lymphocytes B-1 sont localisés presque exclusivement dans la cavité péritonéale (Herzenberg *et al*, 2006). En conséquence, ces souris redevenaient normales quant à leurs populations lymphocytaires sans toutefois posséder de lymphocytes B-1. Par la suite, un groupe de souris ont reçu 600 µg d'IgM purifiés de souris C57BL/6 avant d'être infectées, 12 h plus tard, avec VSV-IND. Ce virus est un modèle d'infection générant une très forte réponse humorale, débutant dès 4 jours post-infection (Hangartner *et al*, 2006). Si la présence des anticorps naturels est importante dans l'induction de la réponse des lymphocytes B-2, nous devrions observer un retard ou un plus faible titre en anticorps neutralisants.

Les souris qui ont reçu des anticorps naturels semblaient avoir légèrement plus d'Ig neutralisantes que les souris n'en n'ayant pas eues (figure 30). Toutefois, le rétablissement de l'activité neutralisante n'est pas complet puisque les souris J<sub>H</sub>T avec anticorps naturels neutralisent moins le virus que les souris témoins. Finalement, à 8 jours post-infection, toutes les souris possèdent des titres neutralisants similaires.

Donc, la présence d'anticorps naturels semble être importante dans les premiers jours suivants l'infection, afin d'induire rapidement une réponse humorale. Cet effet bénéfique pourrait être expliqué par un recrutement plus rapide du virus aux organes lymphoïdes, grâce à la formation de complexes immuns, ainsi qu'une stimulation plus prompte des lymphocytes B-2. De plus, plusieurs études ont démontré l'importance entre la présence des complexes immuns et l'activation des lymphocytes B-2 (Heyman *et al*, 1985; Heyman *et al*, 1990, Lehner *et al*, 1983). Cette interaction se ferait en grande partie grâce à aux molécules du complément qui peuvent se lier aux complexes immuns. En effet, les lymphocytes B-2 présentent à leur surface un récepteur du complément (CR2 ou CD21) et des récepteurs d'Ig soit  $Fc\psi$  et  $Fc\psi/\mu$ . La liaison croisée entre le complexe immun, le complément et l'antigène sur le lymphocyte B-2 a pour effet d'augmenter son activation et sa capacité à internaliser et présenter l'antigène (Takai *et al*, 1996; Wernersson *et al*, 1999). Néanmoins, en raison de la réplication très rapide du virus ainsi que de sa forte immunogénicité (Hangartner *et al*, 2006), l'activité neutralisante semble retrouver son cours normal 8 jours post-infection. En conséquence, il serait intéressant de répéter ces expériences en utilisant VSV-IND inactivé afin d'enlever le biais causé par sa réplication rapide. Une autre alternative pourrait être d'évaluer la production d'anticorps totaux contre un virus qui se réplique plus lentement, comme le LCMV, par exemple.

Dans un autre temps, l'activité neutralisante des IgG a été évaluée. Tout d'abord, il a été possible de noter que l'apparition des IgG neutralisants ne survenait qu'à 8 jours post-infection (figure 31). Ceci concorde avec l'apparition de la réponse des lymphocytes T auxiliaires survenant généralement de 3 à 4 jours post-infection (Charan *et al*, 1986; Bachmann *et al*, 1993). En conséquence, il a été observé que la commutation de classe se faisait 6 à 8 jours suivants l'infection (Leist *et al*, 1987). On peut également noter que toutes les souris génèrent des titres neutralisants de la même amplitude. Ceci peut donc nous laisser croire que la présence d'anticorps naturels ne semble pas affecter les processus de commutation de classe et donc, l'apparition des IgG. De plus, il pourrait aussi être possible de spéculer que les lymphocytes T auxiliaires ne sont pas influencés par la présence des anticorps naturels

en raison de leur rôle central dans ces processus. Toutefois, puisqu'il s'agit de résultats préliminaires, d'autres études plus poussées impliquant le lien entre les anticorps naturels et les lymphocytes T auxiliaires méritent d'être effectuées. En effet, il serait intéressant de comparer la prolifération de cette population cellulaire en présence ou en absence d'anticorps naturels et de regarder s'il y a une différence entre les profils de cytokines qu'ils sécrètent. Un lien entre les complexes immuns formés de molécules d'IgG, les cellules dendritiques et l'activation des lymphocytes T auxiliaires a déjà été effectué (de Jong *et al*, 2006). Si les cellules dendritiques expriment le récepteur des IgM, le  $Fc\alpha/\mu$ , il pourrait être possible de croire que les anticorps naturels pourraient former des complexes immuns avec les pathogènes et, suite à leur reconnaissance par les cellules dendritiques, aideraient à une meilleure stimulation des lymphocytes T auxiliaires.

Finalement, dans nos études, il ne nous a pas été possible d'établir un lien clair entre la présence des anticorps naturels et la survie des animaux. En effet, il est possible de noter que les souris qui ont reçu des IgM purifiés ont un taux de survie légèrement supérieur à celles qui n'en n'ont pas eues mais en raison du faible échantillonnage, il est difficile de dire si ces résultats sont significatifs (figure 32). Par ailleurs, d'autres études impliquant des virus cytopathiques, tels que VSV et influenza, ont réussi à démontrer que le taux de survie était augmenté lorsque les souris recevaient des anticorps naturels ou des lymphocytes B-1 avant infection. Il est toutefois important de considérer que dans ces études, les souris recevaient une dose constante d'anticorps naturels, soit par l'injection quotidienne de sérum (Ochsenbein *et al*, 1999) ou par la reconstitution des populations de lymphocytes B-1 (Baumgarth *et al*, 2000). En conséquence, nous pourrions émettre comme hypothèse que les souris auraient besoin d'un apport stable et continu en anticorps naturels pour assurer leur survie mais aussi, pour maintenir de plus fortes réponses humorales équivalentes à celles des souris témoins. Donc, il serait intéressant de reproduire les expériences soit en transférant quotidiennement des IgM purifiés ou en reconstituant la population de lymphocytes B-1 afin d'évaluer la production d'anticorps neutralisants et la survie.

## 5 Conclusion et perspectives

En conclusion, cette étude a démontré l'importance de la diversité du répertoire des anticorps naturels dans la reconnaissance des pathogènes ainsi que dans leur recrutement rapide et efficace vers organes lymphoïdes. Finalement, nous avons pu démontrer que les anticorps naturels faisaient un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, du moins, dans le cas des lymphocytes B-2. La présence d'anticorps naturels semble donc être bénéfique lors d'infections aiguës comme celles causées par le virus VSV et influenza (Ochsenbein *et al*, 1999; Jayasekera *et al*, 2006; Baumgarth *et al*, 2000). Leur rôle consiste à neutraliser les virus ou à s'y lier, favorisant leur accumulation aux organes lymphoïdes. La grande majorité des virus causant des infections aiguës induisent principalement une réponse de type humorale et dont la production massive d'anticorps neutralisants est souvent cruciale pour le contrôle de la virémie.

Par opposition, il nous a été possible d'observer que bien que le recrutement de notre modèle d'infection chronique, soit le LCMV, s'effectuait de façon similaire au VSV, nous ne pouvions observer une meilleure induction de la réponse immunitaire adaptative. Le LCMV est un modèle d'infection très complexe puisqu'il peut infecter non seulement les hépatocytes, comme nous l'avons remarqué précédemment, mais aussi, les cellules du système immunitaire. Plus particulièrement, il a été observé, chez différentes souches de ce virus, que les macrophages et les cellules dendritiques y étaient particulièrement sensibles (Gonzalez *et al*, 1980 ; Borrow *et al*, 1995). Nous avons donc déterminé que le LCMV était efficacement reconnu par les anticorps naturels et qu'il pouvait être recruté à la rate. Toutefois, contrairement aux virus causant des infections aiguës, cela n'aide pas à l'induction d'une meilleure réponse immunitaire adaptative.

Puisque certains virus causant des infections chroniques, comme le virus de l'immunodéficience acquise (VIH) chez l'humain, peuvent infecter des cellules du système immunitaire, il y a lieu de se demander s'ils ne pourraient pas tirer avantage

d'être reconnus par les anticorps naturels afin d'être transportés vers leurs sites de réplication et leur permettant ainsi de s'établir. En effet, il a déjà été démontré, pour le virus de Dengue, qu'une présence d'anticorps non-neutralisants pouvait augmenter l'infection des cellules cibles et en conséquence, augmenter la maladie. Ce phénomène a été nommé « *antibody-dependant enhancement of disease* ». Il a été observé que ce virus tirait profit de la formation de complexes immuns afin d'être transporté et être reconnu par ses cellules cibles grâce au récepteur Fc $\gamma$  qui y est présent (Anderson *et al*, 1986). Leur liaison à la cellule augmenterait les chances du virus de rencontrer son récepteur cellulaire (Littaua *et al*, 1990; Mady *et al*, 1991; Erbe *et al*, 1991).

Bien qu'il soit encore trop tôt pour spéculer sur les mécanismes de persistance du VIH chez l'humain, il pourrait être intéressant de d'évaluer le lien entre le virus et la présence d'anticorps naturels. Il a été observé que le VIH, dont la cible principale est les lymphocytes T auxiliaires, tirait aussi profit de l'infection des cellules dendritiques afin d'augmenter sa réplication et sa transmission aux autres cellules (Burleigh *et al*, 2006; Geijtenbeek *et al*, 2000; van Kooyk *et al*, 2003). En conséquence, il y a lieu de se demander si une reconnaissance par les anticorps naturels et un drainage vers les organes lymphoïdes, où se situent les cellules cibles des virus, ne pourraient pas aider à la réplication virale et nuire à l'hôte. De façon préliminaire, il serait intéressant de mener une étude sur la persistance du clone 13 du virus LCMV chez la souris qui cible les cellules dendritiques et qui est reconnu pour causer des infections persistantes.

Les anticorps naturels font un pont entre l'immunité innée et adaptative. Nous avons vu que ces derniers favorisaient la neutralisation des virus, leur recrutement aux organes lymphoïdes ainsi que de permettre une réponse humorale plus rapide des lymphocytes B-2, dans le cas du VSV-IND. Bien que ce lien soit moins évident dans le cas de LCMV, les anticorps naturels semblent aussi cruciaux pour une reconnaissance précoce du pathogène. Tel qu'il a été discuté ci-haut, il pourrait être possible de spéculer que le LCMV, ou d'autres virus non-cytopathiques, pourraient

tirer profit du fait d'être recrutés aux organes lymphoïdes. Toutefois, des études récentes tendent à démontrer une corrélation positive entre la présence d'anticorps naturels et l'induction d'une meilleure réponse des lymphocytes T cytotoxiques (Durrbach *et al*, 2007). Conséquemment, des travaux plus précis sur le sujet devraient être menés afin d'élucider cette controverse.



## Références bibliographiques

Aderem, A., Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.

Alt, F.W., Blackwell, T.K., Yancopoulos, G.D., 1987. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 238, 1079-1087.

Alugupalli, K.R., Gerstein, R.M., 2005. Divide and conquer: division of labor by B-1 B cells. *Immunity* 23, 1-2.

Anderson, C.L., Guyre, P.M., Whitin, J.C., Ryan, D.H., Looney, R.J., Fanger, M.W., 1986. Monoclonal antibodies to Fc receptors for IgG on human mononuclear phagocytes. Antibody characterization and induction of superoxide production in a monocyte cell line. *J Biol Chem* 261, 12856-12864.

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

Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1994. Immunization with recombinant protein: conditions for cytotoxic T cell and/or antibody induction. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 183, 315-324.

Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1995. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur J Immunol* 25, 3445-3451.

Bachmann, M.F., Kalinke, U., Althage, A., Freer, G., Burkhart, C., Roost, H., Aguet, M., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1997. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 276, 2024-2027.

Bachmann, M.F., Rohrer, U.H., Kundig, T.M., Burki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1993. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262, 1448-1451.

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

Baltimore, D., Huang, A.S., Stampfer, M., 1970. Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus, II. An RNA polymerase in the virion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66, 572-576.

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

Baumgarth, N., Chen, J., Herman, O.C., Jager, G.C., Herzenberg, L.A., 2000. The role of B-1 and B-2 cells in immune protection from influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 252, 163-169.

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

Benedict, C.L., Kearney, J.F., 1999. Increased junctional diversity in fetal B cells results in a loss of protective anti-phosphorylcholine antibodies in adult mice. *Immunity* 10, 607-617.

Bentley, G.A., Boulot, G., Karjalainen, K., Mariuzza, R.A., 1995. Crystal structure of the beta chain of a T cell antigen receptor. *Science* 267, 1984-1987.

Bentolila, L.A., Olson, S., Marshall, A., Rougeon, F., Paige, C.J., Doyen, N., Wu, G.E., 1999. Extensive junctional diversity in Ig light chain genes from early B cell progenitors of mu MT mice. *J Immunol* 162, 2123-2128.

Benveniste, J., Lespinats, G., Adam, C., Salomon, J.C., 1971. Immunoglobulins in intact, immunized, and contaminated axenic mice: study of serum IgA. *J Immunol* 107, 1647-1655.

Berger, D.P., Naniche, D., Crowley, M.T., Koni, P.A., Flavell, R.A., Oldstone, M.B., 1999. Lymphotoxin-beta-deficient mice show defective antiviral immunity. *Virology* 260, 136-147.

Berland, R., Wortis, H.H., 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 20, 253-300.

Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J.R., Tarakhovsky, A., Bondada, S., 1996. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 274, 1906-1909.

Black, B.L., Lyles, D.S., 1992. Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo. *J Virol* 66, 4058-4064.

Blondel, D., Harmison, G.G., Schubert, M., 1990. Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 64, 1716-1725.

Boes, M., 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 37, 1141-1149.

Boes, M., Prodeus, A.P., Schmidt, T., Carroll, M.C., Chen, J., 1998. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med* 188, 2381-2386.

Borrow, P., Evans, C.F., 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.

Brandle, D., Brduscha-Riem, K., Hayday, A.C., Owen, M.J., Hengartner, H., Pircher, H., 1995. T cell development and repertoire of mice expressing a single T cell receptor alpha chain. *Eur J Immunol* 25, 2650-2655.

Bruns, M., Kratzberg, T., Zeller, W., Lehmann-Grube, F., 1990. Mode of replication of lymphocytic choriomeningitis virus in persistently infected cultivated mouse L cells. *Virology* 177, 615-624.

Buchmeier, M.J., Oldstone, M.B., 1978. Virus-induced immune complex disease: identification of specific viral antigens and antibodies deposited in complexes during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 120, 1297-1304.

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

Butler, J.E., 1997. Immunoglobulin gene organization and the mechanism of repertoire development. *Scand J Immunol* 45, 455-462.

Cascalho, M., Ma, A., Lee, S., Masat, L., Wabl, M., 1996. A quasi-monoclonal mouse. *Science* 272, 1649-1652.

Cascalho, M., Wong, J., Wabl, M., 1997. VH gene replacement in hyperselected B cells of the quasimonoclonal mouse. *J Immunol* 159, 5795-5801.

Charan, S., Zinkernagel, R.M., 1986. Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *J Immunol* 136, 3057-3061.

Chen, J., Trounstine, M., Alt, F.W., Young, F., Kurahara, C., Loring, J.F., Huszar, D., 1993. Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol* 5, 647-656.

Chothia, C., Lesk, A.M., 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196, 901-917.

Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., Tulip, W.R., et al., 1989. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-883.

Chumley, M.J., Dal Porto, J.M., Cambier, J.C., 2002. The unique antigen receptor signaling phenotype of B-1 cells is influenced by locale but induced by antigen. *J Immunol* 169, 1735-1743.

Cong, Y.Z., Rabin, E., Wortis, H.H., 1991. Treatment of murine CD5- B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. *Int Immunol* 3, 467-476.

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

Corley, R.B., Morehouse, E.M., Ferguson, A.R., 2005. IgM accelerates affinity maturation. *Scand J Immunol* 62 Suppl 1, 55-61.

Côté M. H. 2006 Contribution du répertoire primaire des lymphocytes B et des mécanismes de maturation de l'affinité dans l'induction d'une réponse antivirale protectrice. Université du Québec INRS- IAF : Mémoire # 1003

Coutelier, J.P., van der Logt, J.T., Heessen, F.W., Warnier, G., Van Snick, J., 1987. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J Exp Med* 165, 64-69.

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

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

de Jong, J.M., Schuurhuis, D.H., Ioan-Facsinay, A., Welling, M.M., Camps, M.G., van der Voort, E.I., Huizinga, T.W., Ossendorp, F., Verbeek, J.S., Toes, R.E., 2006. Dendritic cells, but not macrophages or B cells, activate major histocompatibility complex class II-restricted CD4<sup>+</sup> T cells upon immune-complex uptake in vivo. *Immunology* 119, 499-506.

Desiderio, S.V., Wolff, K.R., 1988. Rearrangement of exogenous immunoglobulin VH and DJH gene segments after retroviral transduction into immature lymphoid cell lines. *J Exp Med* 167, 372-388.

Durrbach, A., Baple, E., Preece, A.F., Charpentier, B., Gustafsson, K., 2007. Virus recognition by specific natural antibodies and complement results in MHC I cross-presentation. *Eur J Immunol* 37, 1254-1265.

Edelman, G.M., Benacerraf, B., Ovary, Z., Poulik, M.D., 1961. Structural differences among antibodies of different specificities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47, 1751-1758.

Edelman, G.M., Poulik, M.D., 1961. Studies on structural units of the gamma-globulins. *J Exp Med* 113, 861-884.

Ehl, S., Klenerman, P., Zinkernagel, R.M., Bocharov, G., 1998. The impact of variation in the number of CD8(+) T-cell precursors on the outcome of virus infection. *Cell Immunol* 189, 67-73.

Erbe, D.V., Pfefferkorn, E.R., Fanger, M.W., 1991. Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 146, 3145-3151.

Fields, B.A., Ober, B., Malchiodi, E.L., Lebedeva, M.I., Braden, B.C., Ysern, X., Kim, J.K., Shao, X., Ward, E.S., Mariuzza, R.A., 1995. Crystal structure of the V alpha domain of a T cell antigen receptor. *Science* 270, 1821-1824.

Figueroa, J.E., Densen, P., 1991. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 4, 359-395.

Fischer, A., de Saint Basile, G., Le Deist, F., 2005. CD3 deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5, 491-495.

Flamand, A., Raux, H., Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., 1993. Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology* 194, 302-313.

Florkiewicz, R.Z., Smith, A., Bergmann, J.E., Rose, J.K., 1983. Isolation of stable mouse cell lines that express cell surface and secreted forms of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J Cell Biol* 97, 1381-1388.

Forster, I., Rajewsky, K., 1987. Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur J Immunol* 17, 521-528.

Fu, Y.X., Chaplin, D.D., 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 17, 399-433.

Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J., Schatz, D.G., 2000. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* 18, 495-527.

Fung-Leung, W.P., Schilham, M.W., Rahemtulla, A., Kundig, T.M., Vollenweider, M., Potter, J., van Ewijk, W., Mak, T.W., 1991. CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 65, 443-449.

Garcia, K.C., Teyton, L., Wilson, I.A., 1999. Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17, 369-397.

Garside, P., Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J., Jenkins, M.K., 1998. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 281, 96-99.

Gobet, R., Cerny, A., Ruedi, E., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1988. The role of antibodies in natural and acquired resistance of mice to vesicular stomatitis virus. *Exp Cell Biol* 56, 175-180.

Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. 2001 *Immunologie, le cours de Janis Kuby*. Dunod, Paris.

Gonzalez, P.H., Cossio, P.M., Arana, R., Maiztegui, J.I., Laguens, R.P., 1980. Lymphatic tissue in Argentine hemorrhagic fever. Pathologic features. *Arch Pathol Lab Med* 104, 250-254.

Gu, H., Forster, I., Rajewsky, K., 1990. Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *Embo J* 9, 2133-2140.

Guidotti, L.G., Borrow, P., Brown, A., McClary, H., Koch, R., Chisari, F.V., 1999. Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. *J Exp Med* 189, 1555-1564.

Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J., Ravetch, J.V., 2000. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* 1, 31-36.

Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., Tedder, T.F., 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7-18.

Hangartner, L., Senn, B.M., Ledermann, B., Kalinke, U., Seiler, P., Bucher, E., Zellweger, R.M., Fink, K., Odermatt, B., Burki, K., Zinkernagel, R.M., Hangartner, H., 2003. Antiviral immune responses in gene-targeted mice expressing the immunoglobulin heavy chain of virus-neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12883-12888.

Hangartner, L., Zinkernagel, R.M., Hangartner, H., 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol* 6, 231-243.

Harandi, A.M., Svennerholm, B., Holmgren, J., Eriksson, K., 2001. Differential roles of B cells and IFN-gamma-secreting CD4(+) T cells in innate and adaptive immune control of genital herpes simplex virus type 2 infection in mice. *J Gen Virol* 82, 845-853.

Hardy, R.R., Hayakawa, K., 1991. A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11550-11554.

Hardy, R.R., Hayakawa, K., 1994. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* 55, 297-339.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., Herzenberg, L.A., 1983. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* 157, 202-218.

Her, L.S., Lund, E., Dahlberg, J.E., 1997. Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* 276, 1845-1848.

Herzenberg, L.A., 2000. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev* 175, 9-22.

Herzenberg, L.A., Kantor, A.B., 1993. B-cell lineages exist in the mouse. *Immunol Today* 14, 79-83; discussion 88-90.

Herzenberg, L.A., Tung, J.W., 2006. B cell lineages: documented at last! *Nat Immunol* 7, 225-226.

Heyman, B, Hobbs, M.V., Weigle, W.O. 1985. IgM-mediated enhancement of in vivo anti-sheep erythrocyte antibody responses: isotype analysis of the enhanced responses. *Cell Immunol* 92 (1), 134-41.

Heyman, B, Wiersma, E.J., Kinoshita, T. 1990. In vivo inhibition of the antibody response by a complement receptor-specific monoclonal antibody. *J Exp Med.* 172(2):665-8.

Hocart, M.J., Mackenzie, J.S., Stewart, G.A., 1988. The IgG subclass responses induced by wild-type, cold-adapted and purified haemagglutinin from influenza virus A/Queensland/6/72 in CBA/CaH mice. *J Gen Virol* 69 ( Pt 8), 1873-1882.

Hopken, U.E., Achtman, A.H., Kruger, K., Lipp, M., 2004. Distinct and overlapping roles of CXCR5 and CCR7 in B-1 cell homing and early immunity against bacterial pathogens. *J Leukoc Biol* 76, 709-718.

Huber, V.C., Lynch, J.M., Bucher, D.J., Le, J., Metzger, D.W., 2001. Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. *J Immunol* 166, 7381-7388.

Iapalucci, S., Lopez, R., Rey, O., Lopez, N., Franze-Fernandez, M.T., Cohen, G.N., Lucero, M., Ochoa, A., Zakin, M.M., 1989. Tacaribe virus L gene encodes a protein of 2210 amino acid residues. *Virology* 170, 40-47.

Janeway, C.A., Jr., 1995. Ligands for the T-cell receptor: hard times for avidity models. *Immunol Today* 16, 223-225.

Jayasekera, J.P., Moseman, E.A., Carroll, M.C., 2007. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J Virol*.

Joao, C., Ogle, B.M., Gay-Rabinstein, C., Platt, J.L., Cascalho, M., 2004. B cell-dependent TCR diversification. *J Immunol* 172, 4709-4716.

Joao, C., Ogle, B.M., Geyer, S., 2006. Immunoglobulin promotes the diversity and the function of T cells. *Eur J Immunol* 36, 1718-1728.

Jumper, M.D., Nishioka, Y., Davis, L.S., Lipsky, P.E., Meek, K., 1995. Regulation of human B cell function by recombinant CD40 ligand and other TNF-related ligands. *J Immunol* 155, 2369-2378.

Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1994. CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* 24, 3068-3072.

Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., Golstein, P., 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265, 528-530.

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

Kalinke, U., Oxenius, A., Lopez-Macias, C., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., 2000. Virus neutralization by germ-line vs. hypermutated antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10126-10131.

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

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

Kantor, A.B., Stall, A.M., Adams, S., Herzenberg, L.A., 1992. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3320-3324.

Karrer, U., Althage, A., Odermatt, B., Roberts, C.W., Korsmeyer, S.J., Miyawaki, S., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1997. On the key role of secondary lymphoid organs in antiviral immune responses studied in alymphoplastic (aly/aly) and spleenless (Hox11(-)/-) mutant mice. *J Exp Med* 185, 2157-2170.

Kawikova, I., Paliwal, V., Szczepanik, M., Itakura, A., Fukui, M., Campos, R.A., Geba, G.P., Homer, R.J., Iliopoulou, B.P., Pober, J.S., Tsuji, R.F., Askenase, P.W., 2004. Airway hyper-reactivity mediated by B-1 cell immunoglobulin M antibody generating complement C5a at 1 day post-immunization in a murine hapten model of non-atopic asthma. *Immunology* 113, 234-245.

Klein-Schneegans, A.S., Kuntz, L., Fonteneau, P., Loor, F., 1989. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the *lpr* (lymphoproliferation) locus. *J Autoimmun* 2, 869-875.

Kohler, H., Bayry, J., Nicoletti, A., Kaveri, S.V., 2003. Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response? *Scand J Immunol* 58, 285-289.

Kopf, M., Abel, B., Gallimore, A., Carroll, M., Bachmann, M.F., 2002. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat Med* 8, 373-378.

Kraal, G., 1992. Cells in the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol* 132, 31-74.

Kuhns, M.S., Davis, M.M., Garcia, K.C., 2006. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24, 133-139.

Lachmann, P.J., Davies, A., 1997. Complement and immunity to viruses. *Immunol Rev* 159, 69-77.

Lawoko, A., Johansson, B., Rabinayaran, D., Pipkorn, R., Blomberg, J., 2000. Increased immunoglobulin G, but not M, binding to endogenous retroviral antigens in HIV-1 infected persons. *J Med Virol* 62, 435-444.

Lefrancois, L., Lyles, D.S., 1982. The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibodies of nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology* 121, 168-174.

Lehmann-Grube, F., Kallay, M., Ibscher, B., Schwartz, R., 1979. Serologic diagnosis of human infections with lymphocytic choriomeningitis virus: comparative evaluation of seven methods. *J Med Virol* 4, 125-136.

Leist, T.P., Cobbold, S.P., Waldmann, H., Aguet, M., Zinkernagel, R.M., 1987. Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J Immunol* 138, 2278-2281.

Lehner, P, Hutchings, P, Lydyard, P.M., Cooke, A. 1983. II. IgM-mediated enhancement: dependency on antigen dose, T-cell requirement and lack of evidence for an idiotype-related mechanism. *Immunology*. 50(3):503-9.

Lin, K.I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., Calame, K., 2002. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* 22, 4771-4780.

Littaua, R., Kurane, I., Ennis, F.A., 1990. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol* 144, 3183-3186.

Liu, Y.J., Arpin, C., 1997. Germinal center development. *Immunol Rev* 156, 111-126.

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

Louten, J., van Rooijen, N., Biron, C.A., 2006. Type 1 IFN deficiency in the absence of normal splenic architecture during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 177, 3266-3272.

Lyles, D.S., McKenzie, M.O., 1997. Activity of vesicular stomatitis virus M protein mutants in cell rounding is correlated with the ability to inhibit host gene expression and is not correlated with virus assembly function. *Virology* 229, 77-89.

MacLennan, I.C., 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12, 117-139.

Mady, B.J., Erbe, D.V., Kurane, I., Fanger, M.W., Ennis, F.A., 1991. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection mediated by bispecific antibodies against cell surface molecules other than Fc gamma receptors. *J Immunol* 147, 3139-3144.

Marcus, P.I., Rodriguez, L.L., Sekellick, M.J., 1998. Interferon induction as a quasispecies marker of vesicular stomatitis virus populations. *J Virol* 72, 542-549.

Matter, M., Odermatt, B., Yagita, H., Nuoffer, J.M., Ochsenbein, A.F., 2006. Elimination of chronic viral infection by blocking CD27 signaling. *J Exp Med* 203, 2145-2155.

McCullough, K.C., Crowther, J.R., Butcher, R.N., Carpenter, W.C., Brocchi, E., Capucci, L, De Simone, F. 1986. Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus-neutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology*. 58(3):421-8.

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

Melki, R., Gaudin, Y., Blondel, D., 1994. Interaction between tubulin and the viral matrix protein of vesicular stomatitis virus: possible implications in the viral cytopathic effect. *Virology* 202, 339-347.

Mercolino, T.J., Arnold, L.W., Hawkins, L.A., Haughton, G., 1988. Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1+ (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline. Relationship to cells that secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes. *J Exp Med* 168, 687-698.

Mims, C.A., Tosolini, F.A., 1969. Pathogenesis of lesions in lymphoid tissue of mice infected with lymphocytic choriomeningitis (LCM) virus. *Br J Exp Pathol* 50, 584-592.

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

Mond, J.J., Vos, Q., Lees, A., Snapper, C.M., 1995. T cell independent antigens. *Curr Opin Immunol* 7, 349-354.

Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K., 2006. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol* 27, 428-433.

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

Moore, J.P., Cao, Y., Ho, D.D., Koup, R.A., 1994. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 68, 5142-5155.

Muller, D., Koller, B.H., Whitton, J.L., LaPan, K.E., Brigman, K.K., Frelinger, J.A., 1992. LCMV-specific, class II-restricted cytotoxic T cells in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Science* 255, 1576-1578.

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

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

Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286, 2156-2159.

Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M., 2000. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 21, 624-630.

Odermatt, B., Eppler, M., Leist, T.P., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1991. Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8252-8256.

Ogle, B.M., Cascalho, M., Joao, C., Taylor, W., West, L.J., Platt, J.L., 2003. Direct measurement of lymphocyte receptor diversity. *Nucleic Acids Res* 31, e139.

Pao, L.I., Famiglietti, S.J., Cambier, J.C., 1998. Asymmetrical phosphorylation and function of immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines in B cell antigen receptor signal transduction. *J Immunol* 160, 3305-3314.

Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R.M., Nemazee, D., Rajewsky, K., 1997. Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity* 7, 765-775.

Pircher, H., Michalopoulos, E.E., Iwamoto, A., Ohashi, P.S., Baenziger, J., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., Mak, T.W., 1987. Molecular analysis of the antigen receptor of virus-specific cytotoxic T cells and identification of a new V alpha family. *Eur J Immunol* 17, 1843-1846.

Planz, O., Seiler, P., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1996. Specific cytotoxic T cells eliminate B cells producing virus-neutralizing antibodies [corrected]. *Nature* 382, 726-729.

Puddington, L., Bevan, M.J., Rose, J.K., Lefrancois, L., 1986. N protein is the predominant antigen recognized by vesicular stomatitis virus-specific cytotoxic T cells. *J Virol* 60, 708-717.

Qin, X.F., Schwers, S., Yu, W., Papavasiliou, F., Suh, H., Nussenzweig, A., Rajewsky, K., Nussenzweig, M.C., 1999. Secondary V(D)J recombination in B-1 cells. *Nature* 397, 355-359.

Reth, M., 1995. The B-cell antigen receptor complex and co-receptors. *Immunol Today* 16, 310-313.

Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., Durandy, A., 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565-575.

Roberts, A., Buonocore, L., Price, R., Forman, J., Rose, J.K., 1999. Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* 73, 3723-3732.

Rolink, A., Melchers, F., 1991. Molecular and cellular origins of B lymphocyte diversity. *Cell* 66, 1081-1094.

Roost, H.P., Bachmann, M.F., Haag, A., Kalinke, U., Pliska, V., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1995. Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1257-1261.

Rowe, W.P., Pugh, W.E., Webb, P.A., Peters, C.J., 1970. Serological relationship of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 5, 289-292.

Sakihama, T., Smolyar, A., Reinherz, E.L., 1995. Oligomerization of CD4 is required for stable binding to class II major histocompatibility complex proteins but not for interaction with human immunodeficiency virus gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6444-6448.

Salvato, M., Borrow, P., Shimomaye, E., Oldstone, M.B., 1991. Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. *J Virol* 65, 1863-1869.

Salvato, M.S., Shimomaye, E.M., 1989. The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* 173, 1-10.

Savitsky, D., Calame, K., 2006. B-1 B lymphocytes require Blimp-1 for immunoglobulin secretion. *J Exp Med* 203, 2305-2314.

Schnell, M.J., Buonocore, L., Boritz, E., Ghosh, H.P., Chernish, R., Rose, J.K., 1998. Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *Embo J* 17, 1289-1296.

Seiler, P., Aichele, P., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., Schwendener, R.A., 1997. Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophilic cells in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Eur J Immunol* 27, 2626-2633.

Sen, G., Bikah, G., Venkataraman, C., Bondada, S., 1999. Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol* 29, 3319-3328.

Shapiro-Shelef, M., Calame, K., 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 5, 230-242.

Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., Calame, K., 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607-620.

Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroyama, T., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Endo, Y., Fujita, T., Miyabayashi, T., Sakano, S., Tsuji, T., Nakayama, E., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Nakauchi, H., 2000. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol* 1, 441-446.

Snapper, C.M., Kehry, M.R., Castle, B.E., Mond, J.J., 1995. Multivalent, but not divalent, antigen receptor cross-linkers synergize with CD40 ligand for induction of Ig synthesis and class switching in normal murine B cells. A redefinition of the T1-2 vs T cell-dependent antigen dichotomy. *J Immunol* 154, 1177-1187.

Stager, S, Alexander, J, Kirby, A.C., Botto, M, Rooijen, N.V., Smith, D.F., Brombacher, F, Kaye, P.M. 2003. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *J Immunol.* 170(2):788-94.

Steinhauer, D.A., de la Torre, J.C., Holland, J.J., 1989. High nucleotide substitution error frequencies in clonal pools of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 63, 2063-2071.

Suresh, M, Molina H, Salvatao M.S., Mastellos, D, Lambris, J.D., Sandor, M. 2003. Complement component 3 is required for optimal expansion of CD8 T cells during a systemic viral infection. *J Immunol.* 170(2):788-94.

Takai, T., Ono, M., Hikida, M., Ohmori, H., Ravetch, J.V., 1996. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379, 346-349.

Taylor, L.D., Carmack, C.E., Huszar, D., Higgins, K.M., Mashayekh, R., Sequer, G., Schramm, S.R., Kuo, C.C., O'Donnell, S.L., Kay, R.M., et al., 1994. Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *Int Immunol* 6, 579-591.

Thornton, B.P., Vetvicka, V, Ross, G.D. 1994. Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. *J Immunol.* 152(4):1727-37.

Vieira, P., Rajewsky, K., 1988. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 18, 313-316.

Walker, D.H., McCormick, J.B., Johnson, K.M., Webb, P.A., Komba-Kono, G., Elliott, L.H., Gardner, J.J., 1982. Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man. *Am J Pathol* 107, 349-356.

Walport, M.J. 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 344(14):1058-66.

Wardemann, H., Boehm, T., Dear, N., Carsetti, R., 2002. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med* 195, 771-780.

Wernersson, S., Karlsson, M.C., Dahlstrom, J., Mattsson, R., Verbeek, J.S., Heyman, B., 1999. IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice. *J Immunol* 163, 618-622.

Wertz, G.W., Perepelitsa, V.P., Ball, L.A., 1998. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3501-3506.

Wienands, J., Larbolette, O., Reth, M., 1996. Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7865-7870.

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

Wright, K.E., Buchmeier, M.J., 1991. Antiviral antibodies attenuate T-cell-mediated immunopathology following acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol* 65, 3001-3006.

Xu, J.L., Davis, M.M., 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13, 37-45.

Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S.P., Aleksander, I., Mak, T.W., 1984. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 308, 145-149.

Ye, Z., Sun, W., Suryanarayana, K., Justice, P., Robinson, D., Wagner, R.R., 1994. Membrane-binding domains and cytopathogenesis of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 68, 7386-7396.

Yoshida, K., van den Berg, T.K., Dijkstra, C.D., 1993. Two different mechanisms of immune-complex trapping in the mouse spleen during immune responses. *Adv Exp Med Biol* 329, 377-382.

Zhu, C., Roth, D.B., 1995. Characterization of coding ends in thymocytes of scid mice: implications for the mechanism of V(D)J recombination. *Immunity* 2, 101-112.

Zinkernagel, R.M., Haenseler, E., Leist, T., Cerny, A., Hengartner, H., Althage, A., 1986. T cell-mediated hepatitis in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Liver cell destruction by H-2 class I-restricted virus-specific cytotoxic T cells as a physiological correlate of the 51Cr-release assay? *J Exp Med* 164, 1075-1092.

