

Université de Montréal

**Rôle du TLR2 dans l'hépatite fulminante induite par le virus de l'hépatite
murine**

Par

Mélanie Burnette

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise ès sciences (M. Sc.)

en Microbiologie et Immunologie

Décembre 2013

© Mélanie Burnette, 2013

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Rôle du TLR2 dans l'hépatite fulminante induite par le virus de l'hépatite murine

Présenté par

Mélanie Burnette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président du jury : Dr Guy Lemay

Membre du jury : Dr Mariela Segura

Directeur de recherche : Dr Lucie Lamontagne

Moj Sivi Vuk, moja ljubav zauvijek,

À ma mère,

Résumé

Ce travail examine les mécanismes de l'immunité innée impliqués dans l'hépatite aiguë virale du modèle murin d'infection par le virus de l'hépatite virale murine de type 3 (MHV-3). Afin de déterminer le rôle du TLR2 dans l'aggravation de l'hépatite, des infections avec le virus MHV-3 ont été réalisées *in vivo* chez des souris C57BL/6 et des souris déficientes pour le gène *tlr2* et *in vitro* dans des macrophages et des hépatocytes infectés avec le virus MHV-3 et le virus moins virulent MHV-A59. Les niveaux de transcription et de traduction des senseurs microbiens, des interférons (IFN) de type I, des cytokines et/ou des chimiokines ont été évalués par qRT-PCR et ELISA. Les cellules ont été traitées avec des petits ARNs interférants (siRNAs) pour le TLR2 et le CEACAM1a ou mises en présence d'inhibiteurs des voies d'endocytose. Les résultats révèlent le rôle stimulateur du TLR2 pour la réplication virale, la production de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α et des chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2. Un nouveau mécanisme d'échappement aux senseurs viraux dépendant du TLR2 a également été mis en évidence dans les macrophages et les hépatocytes lors de l'infection de ces cellules avec le virus MHV-3, et non pas avec le virus moins virulent MHV-A59. Ces différents travaux révèlent un nouveau rôle du TLR2 lors d'infections virales dans l'aggravation de la réponse inflammatoire tout en protégeant le virus des autres senseurs de la réponse immune innée.

Mots-clés : MHV-3, TLR2, hépatite aiguë, IL-6, TNF- α , chimiokines, macrophages, hépatocytes, endocytose, échappement.

Abstract

This work investigates the innate immunity mechanisms involved in the Murine Hepatitis Virus type 3 (MHV-3) acute hepatitis disease model. In the goal of determining the role of the TLR2 receptor in aggravating the hepatitis disease, *in vivo* infections with the MHV-3 virus were performed on C57BL/6 mice or *tlr2*^{-/-} gene knockout mice as well as *in vitro* infections of murine macrophages and hepatocytes with the MHV-3 and less virulent MHV-A59 serotypes. The levels of transcription and translation of different microbial sensors, type I interferons (IFN), cytokines and/or chemokines were measured by qRT-PCR and ELISA tests. Cells were treated with small interfering ARN (siRNA) for the TLR2 and/or CEACAM1a genes or treated with the different endocytosis inhibitors before infection. Our results reveal the stimulatory role of the TLR2 receptor on viral replication, production levels of the IL-6 and TNF- α cytokines and chemokines CXCL1, CXCL10 and CCL2. This study also reveals a new immune evasion mechanism via TLR2 in macrophages infected with MHV-3, but not with the lesser virulent MHV-A59 serotype. These different experiments have revealed a new role for the TLR2 receptor in viral infections wherein inflammatory responses are aggravated whilst shielding viral detection by other pathogens sensors of the innate immunity.

Keywords: MHV-3, TLR2, acute hepatitis, IL-6, TNF- α , chemokines, macrophages, hepatocytes, endocytosis, immune escape.

Table des matières

Résumé et mots-clés.....	iv
Abstract and keywords.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste d'abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xxi
Introduction.....	xxii
1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
1.1. Le foie.....	2
1.1.1. Structure et fonctions.....	2
1.1.2. Les cellules hépatiques.....	3
1.1.2.1. Les hépatocytes.....	3
1.1.2.2. Les cellules NK hépatiques.....	5
1.1.2.3. Les cellules dendritiques hépatiques.....	5
1.1.2.4. Les macrophages hépatiques : cellules de Kupffer.....	6
1.1.2.5. Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC).....	7
1.1.2.6. Les cellules étoilées hépatiques (HSC).....	7
1.1.3. Le foie et l'immunité innée.....	7
1.2. L'hépatite aiguë.....	8
1.3. La réponse inflammatoire aiguë et la détection des pathogènes.....	10
1.3.1. Les récepteurs de type Toll (TLR).....	11
1.3.1.1. La découverte des récepteurs TLRs.....	11
1.3.1.2. L'activation des TLRs.....	11
1.3.1.3. Un nouveau rôle pour le TLR2 dans la détection virale.....	14
1.3.2. Les PRRs cytosoliques – les hélicases.....	15
1.3.2.1. Gènes induits par l'activation des PRR.....	16
1.3.3. L'IL-6 et le TNF- α : marqueurs d'inflammation.....	16
1.3.4. La réponse interféron (IFN) de type I lors d'infections virales.....	17
1.4. Les voies d'endocytose : entrée des virus et détection par les PRRs.....	18
1.4.1. Attachement à la cellule-hôte.....	18
1.4.2. Les mécanismes d'endocytose utilisés par les virus.....	20
1.4.2.1. Endocytose dépendante de la clathrine (CME).....	21
1.4.2.2. Endocytose par la voie cavéolaire/radeau lipidique.....	21
1.4.2.3. La macropinocytose.....	22

1.5. Les coronavirus.....	23
1.5.1.Historique.....	23
1.5.2.Classification des coronavirus.....	23
1.5.3.Le coronavirus de l'hépatite murine (MHV).....	25
1.5.3.1. Structure du virus MHV.....	25
1.5.3.2. Le génome du virus MHV.....	26
1.5.3.3. Les protéines de structure du MHV.....	28
1.5.4.Le cycle de réplication des virus MHV.....	29
1.5.4.1. La molécule CEACAM1 : le récepteur des virus MHV.....	29
1.5.4.2. La glycoprotéine S du MHV et la molécule CEACAM1a.....	31
1.5.4.3. La glycoprotéine S du MHV et la fusion membranaire.....	32
1.5.4.4. La glycoprotéine S du MHV et l'endocytose.....	33
1.5.5.Transcription, traduction et assemblage des virus MHV.....	34
1.6. Les modèles d'hépatite aiguë induits pas les virus fortement hépatotrope MHV-3 et faiblement hépatotrope MHV-A59.....	37
1.6.1.Le tropisme cellulaire du MHV-3 et du MHV-A59.....	38
1.6.2.Pathologies et mécanismes d'immunodéficiences induites par le MHV-3 et le MHV-A59.....	39
1.6.3.L'hépatite aiguë induite par le MHV-3 et le MHV-A59 et la réponse immunitaire innée.....	40
1.7. Problématique et hypothèses.....	42
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
2.1. Animaux.....	45
2.2. Cellules.....	45
2.2.1.Cellules L2.....	45
2.2.2.Cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7.....	45
2.2.3.Cellules FL83B.....	45
2.3. Virus.....	46
2.3.1.Souches virales.....	46
2.3.2.Titrage des virus.....	46
2.4. Infections virales chez les souris.....	47
2.4.1.Infections <i>in vivo</i> des souris C57BL/6 et <i>tlr2</i> ^{-/-}	47
2.4.2.Infections virales <i>in vitro</i>	47
2.5. La quantification relative des d'ARNm par la technique RT-PCR en temps réel.....	47

2.6. Détermination de la sécrétion de cytokines, des chimiokines et de l'IFN par des tests ELISA.....	48
2.6.1. Dosage des cytokines dans le foie.....	48
2.6.2. Dosages des cytokines, IFN- β et chimiokines dans les surnageants de cellules....	48
2.7. Dosage de la MAPK p38 non-phosphorylée et phosphorylée.....	49
2.8. Traitements des cellules avec des agonistes de TLR2, des inhibiteurs des voies d'endocytose ou de la phosphatase SHP-1 et/ou avec des anticorps anti-TLR2.....	49
2.8.1. Produits et anticorps.....	49
2.8.2. Traitements des cellules avant infection.....	49
2.9. Atténuation de l'expression génique par traitement avec des petits ARN interférants.....	50
2.10. Analyses statistiques.....	50
3. RÉSULTATS.....	52
3.1. Le rôle du TLR2 dans l'activation de la réponse innée lors de l'hépatite aiguë induite par le virus MHV-3.....	53
3.1.1. La présence du TLR2 augmente la réplication virale du L2-MHV-3 et la sévérité des dommages hépatiques précoces.....	53
3.1.2. Le TLR2 est transcrit chez les souris C57BL/6 infectées par le virus L2-MHV-3 mais n'a aucun effet sur les faibles niveaux de transcription des autres senseurs viraux.....	55
3.1.3. L'activation du TLR2 par le virus L2-MHV-3 augmente faiblement le niveau de transcription de l'IFN- β via la voie IRF-7.....	58
3.1.4. Le TLR2 est impliqué dans la réponse inflammatoire innée face à l'infection au L2-MHV-3.....	60
3.1.5. L'activation du TLR2 par le virus L2-MHV-3 augmente la transcription des gènes des chimiokines pro-inflammatoires CXCL1, CXCL 10 et CCL2 in vivo.....	62
3.1.6. Le TLR2 augmente les niveaux de traduction des gènes de cytokines et de chimiokines dans le foie lors de l'infection in vivo avec le virus L2-MHV-3.....	64
3.2. Un nouveau mécanisme d'évasion virale via la voie TLR2/radeaux lipidiques chez les macrophages infectés avec le virus hautement virulent MHV-3 et non par le virus modérément virulent MHV-A59.....	66
3.2.1. La réplication des virus fortement virulent MHV-3 et modérément virulent MHV-A59 dans les cellules de lignées macrophagiques J774A.1 et RAW264.7.....	66
3.2.2. Une relation inverse entre la virulence des sérotypes MHV-3 et MHV-A59 et les niveaux d'ARNm des récepteurs toll-like (TLR) -2, -3, -4, -7 et des hélicases MDA5 et RIG-I dans les cellules J774A.1 et RAW264.7 infectées.....	69
3.2.3. Les niveaux d'ARN des gènes des interférons (IFN)- α et β induits dans les cellules J774A.1 et RAW264.7 sont plus faibles lors de l'infection avec le virus hautement virulent MHV-3 qu'avec le virus modérément virulent MHV-A59.....	71

3.2.4. Le virus hautement virulent MHV-3 induit des niveaux plus importants de transcription et de traduction des cytokines IL-6 et TNF- α dans les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 que ceux stimulés par le virus moins virulent MHV-A59.....	73
3.2.5. Le TLR2 et le CEACAM1a sont essentiels à l'infection par le MHV-3 tandis que seul le CEACAM1a est nécessaire à l'infection par le MHV-A59.....	75
3.2.6. Les récepteurs TLR2 et CEACAM1 sont impliqués dans la production rapide de l'IL-6 dans les macrophages J774A.1 infectés au MHV-3.....	78
3.2.7. Les récepteurs CEACAM1 et TLR2 sont impliqués dans le blocage de l'IFN- β par les macrophages J774A.1 infectés au MHV-3	80
3.2.8. La MAPK p38 est impliquée dans la production rapide de l'IL-6 et la réplication virale du MHV-3 dans les macrophages J774A.1.....	82
3.2.9. Les voies d'endocytose dépendantes de la clathrine et des TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline sont différemment impliquées dans la réplication du MHV-3 et du MHV-A59 dans les macrophages J774A.1.....	85
3.2.10. Les radeaux lipidiques sont impliqués dans l'infection au MHV-3.....	87
3.2.11. La séquestration du MHV-3 par le complexe TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline réduit sa reconnaissance par les TLRs et les hélicases.....	89
3.2.12. La séquestration du MHV-3 par le complexe TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline module les niveaux d'expression de l'IL-6 et de l'IFN- β dans les macrophages J774A.1.....	91
3.3. Les hépatocytes sont permissifs à l'infection in vitro avec le virus L2-MHV-3 et deviennent inflammatoires.....	93
3.3.1. La permissivité des hépatocytes à l'infection par le virus MHV-3.....	93
3.3.2. Le L2-MHV-3 active les réponses inflammatoires antivirales chez les hépatocytes via sa fixation au TLR2.....	95
3.3.3. L'infection des hépatocytes FL83-B par le virus hautement virulent L2-MHV-3 entraîne une production rapide et soutenue des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et de l'IFN- β	97
3.3.4. La production des cytokines et chimiokines par les hépatocytes infectés par le L2-MHV-3 est partiellement dépendante du TLR2.....	99
4. DISCUSSION.....	101
4.1. Le rôle du TLR2 dans la gravité de l'hépatite aiguë induite par le virus L2-MHV-3.....	102
4.2. Un nouveau mécanisme d'évasion de la réponse immune innée du virus hautement hépatotrope MHV-3 via la voie endocytaire TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline.....	106
4.3. Le rôle du TLR2 dans la permissivité des hépatocytes au virus MHV-3 et dans les propriétés inflammatoires induites par l'infection virale.....	115
5. CONCLUSIONS.....	120
6. BIBLIOGRAPHIE.....	123

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des paires d'amorces utilisées pour les tests de qRT-PCR.....	51
--	----

Liste des figures

Figure 1: Modélisation du lobule hépatique (A) et de son système vasculaire (B) (Modifiée de Hoehme <i>et al.</i> , 2010).....	2
Figure 2: Schéma d'un sinusoiide hépatique (Modifiée à partir de Frevert <i>et al.</i> , 2005).....	4
Figure 3: Schéma des voies de signalisation des TLRs (Tiré de Yang <i>et al.</i> , 2012).....	14
Figure 4: Structure de la particule virale du MHV (Phillips & Weiss, 2011).....	26
Figure 5: Organisation et expression du génome du MHV-A59 (Sawicki <i>et al.</i> , 2005).....	27
Figure 6: Cycle de réplication des coronavirus (Baker <i>et al.</i> , 2009).....	35
Figure 7: Histopathologie (section I), niveaux sériques des transaminases ASAT/ALAT (section II), niveaux de transcription du gène de la nucléocapside (N) du virus MHV-3 et titres viraux (section III) dans le foie de souris C57BL/6 ou <i>tlr2</i> ^{-/-} infectées avec le L2-MHV-3.....	54
Figure 8: Cinétique des niveaux d'expression génique des TLR2, -3, -4, -7 (A à D) et des hélicases RIG-I (E) et MDA-5 (F) dans le foie de souris C57BL/6 ou <i>tlr2</i> ^{-/-} infectées avec le virus L2-MHV-3.....	57
Figure 9: Cinétique des niveaux d'expression génique de l'IFN-β (A) et des IRF-3 (B) et IRF-7 (C) dans le foie de souris C57BL/6 ou <i>tlr2</i> ^{-/-} infectées avec le virus L2-MHV-3.....	59
Figure 10: Cinétique des niveaux d'expression génique des cytokines IL-6 (A) et TNF-α (B) dans le foie de souris C57BL/6 ou <i>tlr2</i> ^{-/-} infectées avec le virus L2-MHV-3.....	61
Figure 11: Cinétique des niveaux d'expression génique des chimiokines CXCL1 (A), CXCL10 (B) et CCL2 (C) dans le foie de souris C57BL/6 ou <i>tlr2</i> ^{-/-} infectées avec le virus L2-MHV-3.....	63
Figure 12: Niveaux de production protéique de l'IL-6 (A), TNF-α (B), IFN-β (C), CCL2 (D), CXCL1 (E) et CXCL10 (F) dans le foie de souris C57BL/6 ou <i>tlr2</i> ^{-/-} non-infectées (CTRL) ou infectées avec le virus L2-MHV-3	65

Figure 13: Effets cytopathiques (A), niveaux d'expression de l'ARN de la nucléocapside des virus MHV (B) et réplication virale (C) dans les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 infectées avec les virus hautement hépatotropique L2-MHV-3 et modérément hépatotropique MHV-A59.....	68
Figure 14: Niveaux d'expression génique des détecteurs microbiens TLR2, -3, -4, -7 (A à C, E) et des hélicases MDA-5 (D) et RIG-1 (F) dans les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 infectées avec les virus hautement hépatotropique L2-MHV-3 et le virus modérément hépatotropique MHV-A59.....	69
Figure 15: Niveaux d'expression génique de l'IFN- β (A), IRF-3 (C) et IRF-7 (D) et niveaux de sécrétion protéique de l'IFN- β (B) dans les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW267.1 infectées avec le virus hautement hépatotropique L2-MHV-3 et le virus modérément hépatotropique MHV-A59.....	71
Figure 16: Cinétique des niveaux d'expression génique et de sécrétion protéique de l'IL-6 (I-A à D) et du TNF- α (II- E à F) dans les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW267.1 infectées avec les virus hautement hépatotropique L2-MHV-3 et le virus modérément hépatotropique MHV-A59.	73
Figure 17: Niveaux d'expression de l'ARN viral de la nucléocapside des virus MHV dans les cellules macrophagiques J774A.1 infectées avec le virus hautement hépatotropique L2-MHV-3 (A) et le virus modérément hépatotropique MHV-A59 (B) et traitées avec des petits ARNs interférants pour les gènes CEACAM1a (+siCC1) et/ou TLR2 (+siTLR2) ou les deux (+siCC1/TLR2).....	76
Figure 18: Niveaux d'expression du l'ARNm de l'IL-6 dans les cellules macrophagiques J774.1 traitées avec un anticorps anti-TLR2 (Section I) ou lorsque traitées avec des petits ARNs interférants pour les gènes CEACAM1a (siCC1) et/ou TLR2 (siTLR2) ou les deux (section II-A et B) et leurs niveaux de sécrétion de l'IL-6 (Section II-C) suite à l'infection avec le virus hautement hépatotrope L2-MHV-3 durant 5 h p.i. (Section II-A et B) ou 22 h p.i. (Sections et section II-C)	78
Figure 19: Niveaux d'expression de l'ARNm de l'IFN- β de cellules macrophagiques J774.1 traitées avec un anticorps anti-TLR2 (Section I) ou de l'IFN- β (Section II-A) et de l'IRF-7 (Section II-B) lorsque traitées avec des petits ARNs interférants pour les gènes CEACAM1a (siCC1) et/ou TLR2 (siTLR2) ou les deux (section II) et de sécrétion de l'IFN- β (Section II-C), et infectées avec le virus hautement hépatotrope L2-MHV-3 durant 22 h p.i.....	81

Figure 20: Cinétique des niveaux d'expression de l'ARN viral de la nucléocapside (A et B) et des niveaux de phosphorylation de la p38 MAPK (C) dans les cellules macrophagiques J774A.1 infectées avec le virus hautement hépatotrope L2-MHV-3 et le virus modérément hépatotrope MHV-A59 (A, C) ou mis en contact avec ces virus inactivés aux rayons U.V. (B) ou traitées avec un agoniste de TLR2 (C).....	84
Figure 21: Niveaux d'expression de l'ARN viral de la nucléocapside dans les cellules macrophagiques J774A.1 traitées avec un anticorps anti-TLR2 ou des inhibiteurs de la voie d'endocytose dépendante de la cavéoline/radeaux lipidiques (nystatin), de la fusion endosomale dépendante du pH (chloroquine), de la voie d'endocytose dépendant de la clathrine (chlorpromazine) ou de la phosphatase SHP-1 activée par le récepteur CEACAM1a (NaSb) et infectées avec les virus hautement hépatotrope L2-MHV-3 (A, B) ou le virus modérément hépatotrope MHV-A59 (C) pour 5h (B) ou 22h (A, C).....	86
Figure 22: Niveaux d'expression de l'ARN viral de la nucléocapside dans les cellules macrophagiques J774A.1 traitées au nystatin en présence ou non de cholestérol hydrosoluble exogène (A) ou en présence d'inhibiteurs de la dynamine (dynasore), de la fusion endosomale pH-dépendante (chloroquine) ou de la voie endocytairre clathrine dépendante (chlorpromazine) (B) et infectées avec le virus hautement hépatotrope L2-MHV-3 (A, B) pour 22h.....	88
Figure 23: Niveaux d'expression génique des senseurs microbiens TLR2,-3,-4, et-7 (A à D), MDA-5 (E) et RIG-1 (F) dans les cellules macrophagiques J774A.1 traitées avec l'anticorps anti-TLR2 ou avec du nystatin et infectées avec le virus hautement hépatotrope L2-MHV-3 durant 22h.....	90
Figure 24: Niveaux d'expression génique de l'IL-6 (A, B) et de l'IFN- β (C, D) dans les cellules macrophagiques J774A.1 traitées avec un anticorps anti-TLR2, ou des inhibiteurs de la voie d'endocytose dépendante de la cavéoline/radeaux lipidiques (nystatin), de la fusion endosomale dépendante du pH (chloroquine), de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (chlorpromazine) ou de la phosphatase SHP-1 via le récepteur CEACAM1a (NaSb) et infectées avec le virus hautement hépatotrope L2-MHV-3 pour 22h (A, C) ou 5h (B, D).....	92
Figure 25: Cinétique des niveaux d'expression de l'ARN de la nucléocapside du virus MHV-3 (A) et titres viraux (B) dans les surnageants d'hépatocytes FL83-B infectés avec le virus L2-MHV-3.	94

Figure 26: Cinétique des niveaux d'expression génique de TLR2 (A), IFN- β (B), IL-6 (C), TNF- α (D), CCL2 (E), CXCL1(F) et CXCL10(G) dans les hépatocytes FL83-B infectés avec le virus L2-MHV-3.	96
Figure 27: Cinétique des niveaux de sécrétion protéique de l'IL-6 (A), du TNF- α (B), IFN- β (C), du CCL2 (D) et du CXCL10 (E) dans le surnageant d'hépatocytes FL83-B infectés avec le virus L2-MHV-3.	98
Figure 28: Niveaux d'expression de l'ARNm l'IL-6 (A), du TNF- α (B), de l'IFN- β (C), du CXCL1 (D), du CXCL10 (E) et du CCL2 (F) dans les hépatocytes FL83-B traités avec des petits ARNs interférants pour le gène TLR2 (siTLR2) et infectés avec les virus L2-MHV-3 ou MHV-A59 durant 22 h p.i.	99

Liste d'abréviations

Acide poly I:C : acide polyinosique-polycytidylique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNdb : Acide désoxyribonucléique double brin

ALAT : alanine aminotransférase

AP-1 : Protéine activatrice 1 (Activating protein 1)

ARN : Acide ribonucléique

ARNg : Acide ribonucléique génomique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNsg : Acide ribonucléique sous-génomique

ASAT : aspartate aminotransférase

ATCC® : *American Type Culture Collection*®

CARD : domaines de recrutement de caspases (*Caspase Recruitment Domains*)

CAV1 : cavéoline-1

CCL : Chimiokine possédant des motifs C-C (*chemokine (C-C motif) ligand*)

CCP : poches recouvertes de clathrine (*clathrin-coated pits*)

CD : Marqueur de différenciation (Cluster of differentiation)

CEACAM : Molécule d'adhésion cellulaire de l'antigène carcinoembryonnaire (*Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule*)

CIPA : Comité institutionnel de protection des animaux

CME : endocytose dépendante de la clathrine (*clathrine-mediated endocytosis*)

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

ConA : concanavaline A

COX2 : cyclooxygénase 2

CPAs : cellules présentatrices d'antigènes

CXCL : Chimiokine possédant des motifs C-X-C (*Chemokine (C-X-C motif) ligand*)

DAMPs : motifs moléculaires associés au danger (*danger-associated molecular patterns*)

DD : Domaine de mort (*death domain*)

ECP : Effet cytopathique

EE : endosome précoce (*early endosome*)

eIF4E : Facteur 4E de l'initiation de la transcription chez les eucaryotes (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*)

ELISA : Test d'immunoabsorbance lié à une enzyme (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

ERK : Kinase régulant le signal extracellulaire (*Extracellular signal-regulated kinase*)

FIPV : virus de la péritonite infectieuse féline (*feline infectious peritoneous virus*)

HCoV : Coronavirus humain (*Human coronavirus*)

HEPA : Filtre de particules aériennes à haute efficacité (*High efficiency particulate air filter*)

HSC : cellules étoilées hépatiques (*Hepatic stellate cells*)

IBV : Virus de la bronchite infectieuse du poulet (*Infectious bronchitis virus*)

IKK ϵ : (*I κ B kinase- ϵ*)

IFN : interféron

IFNAR : récepteur de l'interféron alpha (*interferon-alpha receptor*)

IL : interleukine

i.p. : intrapéritonéale

IPS-1 : protéine promoteur stimulatrice de l'IFN- β 1 (*IFN- β promoter stimulator 1*)

IRAK : kinase associée au récepteur IL-1 (*IL-1 receptor-associated kinase*)

IRF : facteur de régulation de l'interféron (*interferon regulating factor*)

ISGs : gènes stimulés par l'interféron (*interferon-stimulated genes*)

ITIM : Immunorécepteur associé à des tyrosines à fonction inhibitrice (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*)

JNK : Kinase c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal kinase*)

KC : Cellule de Kupffer (*Kupffer cell*)

LE : endosome tardif (*late endosome*)

LGP2 : gène 2 du laboratoire de génétique et physiologie (*Laboratory of Genetics and Physiology gene 2*)

LPS : lipopolysaccharide

LRR : domaines riches en leucine (*leucine rich repeats*)

LSEC : cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (*LiverSinusoidal Endothelium Cells*)

MAPK : kinase activée par les mitogènes (*mitogen-activated protein kinase*)

MDA5 : protéine associée à la différenciation de mélanomes 5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*)

mDC : cellules dendritiques myéloïdes (*myeloid dendritic cells*)

ME : endosomes en maturation (*maturing endosome*)

MHV : virus de l'hépatite virale murine (*murine hepatitis virus*)

MKK : MAPK kinase

m.o.i. : Multiplicité d'infection (*Multiplicity of infection*)

MyD88 : protéine 88 de la réponse primaire de la différenciation myéloïde (*myeloid differentiation protein 88*)

NF-κB : facteur nucléaire κB (*nuclear factor κB*)

NK : *Natural killer cells*

NOD : *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein*

Nsp : protéine non-structurale (*non-structural protein*)

ORF : cadre de lecture ouvert (*open-reading frame*)

PAMPs : motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*)

pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes

p.i. : post-infection

PPA : protéines de phase aiguë

PRRs : récepteurs de reconnaissance de pathogènes (*pattern recognition receptors*)

qRT-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (*quantitative real-time polymerase chain reaction*)

Rab : *Ras-related in brain*

RE : endosomes de recyclage (*recycling endosome*)

RIG-I : gène 1 inductible par l'acide rétinoïque (*Retinoic Acid-inducible gene 1*)

RIP-1 : protéine kinase 1 interactive avec le récepteur (*receptor interacting protein kinase 1*)

RIS : propagation indépendante du récepteur (*Receptor independent spread*)

SARM : protéine stérile contenant les motifs- alpha et -armadillo (*sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein*)

SHP : Phosphatase homologue à l'oncogène Src (*Src homology phosphatase*)

siRNA : petits ARN interférants (*small interfering ARN*)

SRAS : syndrome respiratoire aigu et sévère

SRE : système réticuloendothélial

SS : Stibogluconate de sodium (*Sodium stibogluconate*)

STAT : Signal de transduction et d'activation de la transcription (*Signal transducer and activator of transcription*)

STING : protéine stimulatrice des gènes de l'IFN (*stimulator of interferon genes*)

SVF : sérum de veau fœtal

TBK1 : kinase 1 se fixant au TANK (*TANK-binding kinase 1*)

DICT₅₀ : dose infectante pour 50% des cellules en culture (*tissue culture infectious dose 50%*)

TCoV : coronavirus de dinde (*turkey coronavirus*)

TGF : facteur de croissance tumorale (*Tumor growth factor*)

TIR : récepteur *Toll/IL-1* (*Toll/IL-1 receptor*)

TIRAP : protéine adaptatrice contenant le domaine TIR (*TIR adaptor protein*)

TLR : récepteurs de type *Toll* (*Toll-like receptor*)

TNF : facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*)

TRAF : facteur associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor receptor associated factor*)

TRAM : protéine adaptatrice reliée au TRIF (*TRIF-associated molecule*)

TTSP : sérines protéases transmembranaires de type II (*type II transmembrane serine protease*)

UTR : séquences non-traduites (*untranslated region*)

VHC : virus de l'hépatite C humaine

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Remerciements

Je tiens à remercier tous les gens qui m'ont aidé, conseillé, encouragé, enduré et soutenu pendant mes études graduées et sans qui je n'aurais pas pu en tirer autant.

Moja je ljubav mog života, koji nije oklijevao da me poticati u mojim istraživanjima, za sve žrtve i ljubavi. Ja nikada ne bi mogao dobiti gdje sam danas bez tebe. Zahvalan sam na moju smrt.

Dr Lucie Lamontagne, pour m'avoir accueilli dès notre première rencontre à bras grand ouvert, qui a toujours cru en moi, qui avait toujours du temps pour moi malgré son horaire toujours trop chargé et pour qui j'ai énormément d'admiration. Je vous remercie Lucie du plus profond de mon coeur pour tout ce que vous m'avez donné, académiquement et personnellement.

Maître, et docteur en devenir, **Christian Bleau**. Par où commencer! ... Et voilà. Je te remercierai en personne, ça «paraîtra» plus sincère.

Dr Michel Samson, pour m'avoir accueilli dans sa famille, dans son laboratoire et dans son pays, la Bretagne!

Dr Alexandre Jacques, pour avoir mis en place les bases de mon projet, pour ses conseils scientifiques et de vie.

Dr Tatianna Scorza et **Dr Roland Savard** pour leurs maintes lettres de référence très efficaces!

Tous les techniciens du département des sciences biologiques, plus particulièrement **Marie-Josée Carbonneau**, **Hélène Beaumier** et **Luc Dubé**, pour leur aide et soutien.

Je remercie tous les organismes subventionnaires qui m'ont appuyé financièrement depuis toutes ces années : CRSNG, FQRNT, Fondation UQÀM, Département de chimie et Caisse Desjardins.

Introduction

Les travaux de ce mémoire porte sur les désordres de l'immunité innée hépatique qui favorise le développement de l'hépatite aiguë dans un modèle murin d'hépatite virale. L'objectif principal des travaux réalisés pour ce mémoire est de déterminer quels sont les rôles du TLR2 dans l'induction de l'hépatite aiguë fulminante induite par le virus de l'hépatite murine de type 3 (MHV-3) *in vivo* et dans la détection de l'entrée et de la replication virale dans les macrophages et les hépatocytes *in vitro*.

La revue de littérature nécessaire à la compréhension des mécanismes cellulaires, viraux et pathologiques impliqués dans l'hépatite aiguë inclura les éléments essentiels tels que la structure et la composition cellulaire particulière du foie, la diversité des senseurs microbiens présents et les cytokines et chimiokines produits par les voies de signalisation activées par ses senseurs. Le modèle des coronavirus murins sera étudié en fonction de la structure et du cycle de réplication de ces virus en général et, particulièrement, sur les différences dans les pathologies, les tropismes cellulaires et de voies d'endocytose utilisés par le MHV-3 fortement virulent et le MHV-A59 moins virulent. Afin de déterminer le rôle de la particularité du virus MHV-3 à se fixer sur le TLR2 dans l'aggravation de l'hépatite, des infections *in vivo* chez des souris normales ou déficientes pour le gène TLR2 et des infections *in vitro* dans des macrophages et des hépatocytes seront étudiés au niveau de l'expression des senseurs viraux (TLRs et hélicases), des cytokines, de l'interféron et des chimiokines. Cette revue permet d'établir les bases de cette étude et de mettre en lumière les travaux précédents menant aux hypothèses et problématiques présentées.

Le second chapitre fera état des produits et méthodologies utilisés lors des différentes expériences *in vitro* et *in vivo*. En plus de l'utilisation de deux sérotypes de MHV différant dans leur virulence et hépatotropisme, des techniques de qRT-PCR et ELISA seront principalement utilisées pour quantifier les niveaux de transcription et de traduction des différents gènes cellulaires et viraux étudiés. L'utilisation de souris *tlr2*^{-/-} et de petits ARNs interférants pour le TLR2 et le récepteur CEACAM1a seront aussi utilisés pour identifier les composantes inflammatoires activées ou inhibées par le TLR2. Des inhibiteurs de voies d'endocytose ou de signalisation intracellulaires seront aussi utilisés afin d'identifier les mécanismes responsables.

Les résultats de cette étude dans la pathogénicité et la virulence du L2-MHV-3 seront divisés en trois sections du chapitre 3 selon le type d'expérience effectuée, soit des études comparatives d'infections *in vivo* chez des souris immunocompétentes C57BL/6 et des souris invalidées pour le gène *tlr2* au niveau de la gravité de l'hépatite et des niveaux de transcription et de traduction des senseurs, des cytokines, de l'IFN et des chimiokines dans les foies de ces souris en relation avec les niveaux de réplication virale. Suivront les études d'infections *in vitro* sur des lignées de cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 et hépatocytaires FL83B qui mettront en évidence le rôle majeur du TLR2 comme nouveau mécanisme d'échappement viral en favorisant la voie d'endocytose dépendant de la cavéoline/radeaux lipidiques au détriment de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, le protégeant des senseurs viraux et de l'IFN tout en aggravant la production de cytokines et de chimiokines.

La discussion des résultats, selon les connaissances à ce jour et les résultats observés lors de cette étude, nous amènera à proposer que le L2-MHV-3, par sa fixation sur le TLR2 présent à la surface de différentes cellules hépatiques, telles les hépatocytes et les macrophages, induit une forte réponse en cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α , et chez les hépatocytes, en chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2, tout en échappant à la détection par les TLRs endosomaux et les hélicases cytoplasmiques et par une faible réponse antivirale IFN de type I. Nos résultats démontrent l'exploitation du L2-MHV-3 des radeaux lipidiques et de la voie endocytairre dépendante de la cavéoline, au contraire du sérotype modérément virulent MHV-A59, via l'activation de la MAPK p38 suite à cette fixation sur le TLR2, augmentant simultanément la réplication virale et l'inflammation. Ces travaux sont la première démonstration d'un virus MHV exploitant un récepteur TLR de surface pour échapper à la détection par les senseurs microbiens intracellulaires et favoriser sa réplication entraînant, en conséquence, une maladie plus sévère.

Revue de littérature

1.1. Le foie

1.1.1. Structure et fonctions

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme humain, représentant environ 1/50 de son poids total. L'architecture de cet organe est parmi les plus complexes et peut être divisée en cinq systèmes tissulaires, soient le système vasculaire, les lobules hépatiques et les hépatocytes, les cellules sinusoidales, le système biliaire et le stroma. L'unité structurelle et fonctionnelle du foie est le lobule hépatique (Rappaport *et al.*, 1954) qui est organisé en un arrangement hexagonal formé d'embranchements de 15 à 20 hépatocytes, délimité par des triades portales. Ces dernières comprennent une artériole hépatique, une veinule portale ainsi qu'un canal cholédoque (Figure 1-A). Le flux sanguin unidirectionnel du foie part de ces veinules portales en bordure vers la veine centrale lobulaire via les sinusoides (Figure 1-B) pour finalement rejoindre la circulation sanguine par la veine caudale (Ishibash *et al.*, 2009; Nemeth *et al.*, 2009).

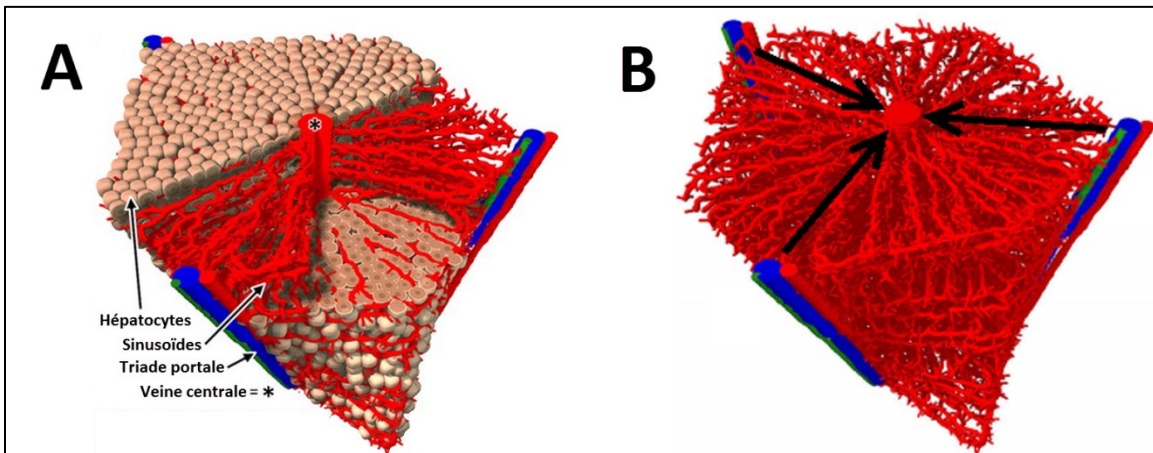


Figure 1 : Modélisation du lobule hépatique (A) et de son système vasculaire (B) (Modifiée de Hoehme *et al.*, 2010).

Le foie est au cœur de deux circulations sanguines, la circulation splanchnique-sinusoidale-systémique et la circulation entéro-hépatique. Le système réticuloendothélial (SRE) hépatique est le plus important de l'organisme (Ishibash *et al.*, 2009) car il reçoit à la fois du sang oxygéné de la circulation artérielle systémique et du sang intestinal de la veine porte dans un rapport (1 : 4) (Gao *et*

al., 2008). Conséquemment, tous les produits métaboliques de la digestion, tels que les substances sécrétées par le pancréas et la rate (Ishibash, *et al.*, 2009), ainsi que les antigènes et produits microbiens de la flore intestinale, notamment le lipopolysaccharide (LPS) dérivé de la paroi de bactéries Gram négatives, de même que les antigènes de la circulation systémique transitent par le SRE hépatique (revue dans Zimmermann *et al.*, 2012). Ces décharges sanguines se mélangent et passent au-travers du foie via de très fins vaisseaux caractéristiques, les sinusoides, où se trouvent plusieurs sous-populations de cellules autant lymphoïdes que myéloïdes impliquées dans la réponse immunitaire. Le foie contient des populations cellulaires particulières pouvant jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) (Crispe *et al.*, 2009). Les cellules du système réticulo-endothélial, d'un diamètre d'environ 5 à 7 μm (MacPhee *et al.*, 1995), sont le premier site d'élimination de débris et de microorganismes circulants (Gao *et al.*, 2008). La structure et vascularisation caractéristique du foie favorise donc les opportunités de contact et de reconnaissance d'antigènes immuno-actifs (Nemeth *et al.*, 2009). L'hépatotropisme de certains microbes pathogènes est relié à l'emplacement physiologique et à la structure particulière du foie (Protzer *et al.*, 2012).

1.1.2. Les cellules hépatiques

Le foie est composé de deux groupes de populations cellulaires, les cellules parenchymateuses constituées essentiellement par les hépatocytes, et les cellules non-parenchymateuses présentes dans les sinusoides. Ces cellules sinusoidales se retrouvent à la surface et dans la lumière des sinusoides hépatiques et regroupent les cellules endothéliales (LSEC), les cellules de Kupffer (KC), les cellules de Ito et les cellules *Natural-killer* (NK) (Wisse *et al.*, 1996), tel que montré dans la Figure 2.

1.1.2.1. Les hépatocytes

Les hépatocytes représentent à eux seuls 80% du volume hépatique et sont des éléments importants du métabolisme et des processus de détoxification de l'organisme. Ces cellules parenchymateuses synthétisent également des substances essentielles au bon fonctionnement d'autres organes du corps, tels les reins, le cœur et même le cerveau (Ishibash *et al.*, 2009). Ces cellules jouent également un rôle prépondérant dans le contrôle systémique de l'immunité innée. En fait, les hépatocytes sont les principales cellules productrices de protéines de phase aiguë, de facteurs de croissance et de

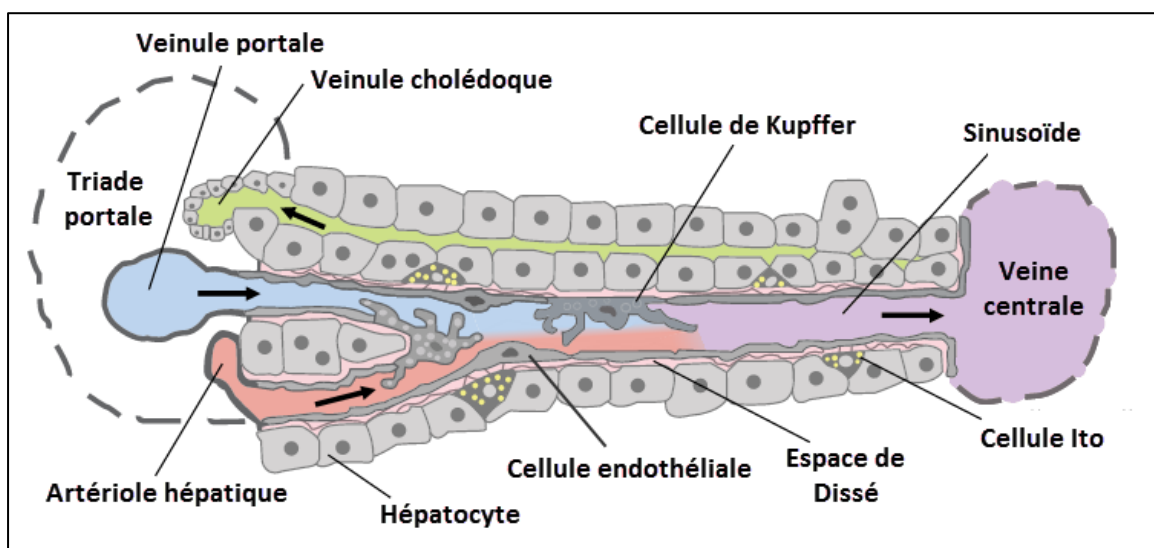


Figure 2 : Schéma d'un sinusoïde hépatique. Le flux sanguin unidirectionnel en provenance des circulations splanchniques-sinusoïdale-systémique (en rouge) et entéro-hépatique (en bleu) se mélange au niveau des sinusoïdes (en mauve) et sort du système réticulo-endothélial hépatique via la veine centrale tandis que le liquide biliaire (en vert) se dirige vers les canaux cholédoques parallèles dans le sens opposé. Les sinusoïdes sont bordés par les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC) étroitement liées aux cellules de Kupffer (KC) dans la lumière sinusoidale. Celles-ci délimitent l'espace de Dissé (en rose) où sont situées les cellules d'Ito intercalées parmi les chaînes d'hépatocytes (Modifiée à partir de Frevert *et al.*, 2005).

cytokines circulantes (Nemeth *et al.*, 2009). Lors de la phase aiguë de la réponse inflammatoire, les cytokines pro-inflammatoires produites par le foie, telles que l'interleukine (IL-) 6, l'IL-1, le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α et l'interféron (IFN)- γ , provoquent la sécrétion massive de complément et l'induction des récepteurs de reconnaissance des pathogènes, tels les récepteurs de type *Toll* (TLR) (Gao *et al.*, 2008). En fait, lors d'une infection hépatique, les hépatocytes coordonnent la réponse

immune innée locale et, parallèlement, la réponse systémique et/ou la phase aiguë de la réponse inflammatoire. Cette réponse rapide est caractérisée par des taux sanguins élevés de protéines de phase aiguë (PPA) produites massivement par les hépatocytes (Gabay & Kushner, 1999) comme la γ -fibrinogène, la macroglobuline- $\alpha(2)$ et l'antichymotrypsine- $\alpha(1)$ (Bode *et al.*, 2012). Les cytokines pro-inflammatoires telles que les IL-6, IL-1 et TNF- α au niveau du foie induisent l'expression de protéines de phase aiguë (PPAs) par les hépatocytes (Quinton *et al.*, 2009). L'infection ou l'altération des hépatocytes peut également induire la sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires et aussi des chimiokines, telles que les chimiokines possédant des motifs C-X-C (CXCL1, CXCL5, CXCL8) et les chimiokines possédant des motifs C-C (CCL2 (MCP-1) et CCL5 (Rowell *et al.*, 1997), responsables du recrutement des neutrophiles, des cellules NK et des lymphocytes T (Saiman et Friedman, 2012). Les hépatocytes sont parmi les cellules hépatiques produisant les niveaux les plus importants de chimiokines (Wasmuth *et al.*, 2010) et peuvent même exprimer de façon exclusive certaines chimiokines comme le CXCL10 (IP-10) suite à l'infection par le virus de l'hépatite C humaine (VHC) (Harvey *et al.*, 2003). De plus, l'augmentation de l'expression de ces chimiokines au niveau des hépatocytes se produit avant l'observation des dommages hépatiques et l'infiltration de cellules inflammatoires (Leifeld *et al.*, 2003).

1.1.2.2. Les cellules NK hépatiques

Les cellules NK sont en plus forte quantité dans le foie que dans tout autre organe. Elles peuvent représenter jusqu'à 50% de la population lymphocytaire hépatique (Tu *et al.*, 2007). Parmi la population de cellules NK hépatiques, il existe une sous-population adaptée au foie nommée les cellules *Pit* (Wisse *et al.*, 1976). Ces cellules spécialisées, morphologiquement plus matures que les NK circulantes et définies comme de larges lymphocytes granulaires, sont intra-sinusoïdales et adhérentes aux LSEC et aux KC (Nakatani *et al.*, 2004).

1.1.2.3. Les cellules dendritiques hépatiques

Le foie contient des cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et plasmacytoïdes (pDC), ces dernières étant présentes dans une proportion plus importante que dans les autres tissus lymphoïdes (Crispe *et al.*, 2009). D'autres populations de DC hépatiques ont été observées chez la souris, notamment les

DCs CD8+ (O'Connell *et al.*, 2000) et mêmes des cellules tueuses DC (Pillarisetty *et al.*, 2005). Les DC, découvertes en 1973 par Steinman *et al.* (1973), sont des CPAs dites professionnelles qui contrôlent l'équilibre entre l'immunité et la tolérance (Doherty *et al.*, 2001). Majoritairement localisées dans les zones de la triade portale et de la veine centrale du foie, les DCs hépatiques, caractérisées par l'absence ou la faible expression constitutive de molécules co-stimulatrices, sont beaucoup moins immunogènes induisant des réponses immunitaires moins intenses, quoique plus promptes à la phagocytose que les DCs d'autres tissus (Jomantaite *et al.*, 2004).

1.1.2.4. Les macrophages hépatiques : cellules de Kupffer

Une des caractéristiques les plus remarquables du foie est son importante population de macrophages résidents nommés cellules de Kupffer. Elles représentent 15% des cellules du foie (Lloyd *et al.*, 2008) et 80 à 90% de toutes les cellules de type macrophagique localisées dans les différents tissus de l'organisme (Wing *et al.*, 1998). En conditions normales, les niveaux de macrophages intra-hépatiques restent constants grâce notamment à la repopulation par des précurseurs myéloïdes circulants dérivés de la moelle osseuse (revue dans Zimmermann *et al.*, 2012). Quoique présentes dans les différentes régions du foie, les KCs varient selon l'emplacement hépatique quant à leur densité, leurs caractéristiques cytologiques et leur fonction (Sleyster *et al.*, 1982).

Ces cellules possèdent un grand répertoire de récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRRs) tels que les récepteurs SR-AI/AII, le récepteur au mannose, les récepteurs TLR et des récepteurs Fc- γ (revue dans Gao *et al.*, 2008). Les KCs sont les plus importants phagocytes de particules insolubles du foie, notamment du LPS en provenance du tractus gastrointestinal et contribuent à l'endocytose de certaines macromolécules solubles. Les KC sont aussi des CPA dynamiques (MacPhee *et al.*, 1992) qui produisent des quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires telles que les IL-6, IL-1 et le TNF- α (Ishibash *et al.*, 2009). De surcroît, les KCs sont situées dans la lumière des sinusoides, principalement dans la zone périportale (43%) (Kolios *et al.*, 2006), de sorte qu'elles sont les premières cellules en contact avec les macromolécules du flux sanguin (Naito *et al.*, 1997). En absence d'infection, elles sont responsables du maintien de l'intégrité du tissu hépatique en éliminant les cellules senescentes et en aidant au remodelage tissulaire suite aux lésions inflammatoires aseptiques qui ont pu se produire (Gordon *et al.*, 1998). Les KCs contribuent également à l'immunotolérance hépatique grâce à la régulation fine de différents facteurs immunomodulateurs

comme l'IL-10 (Knolle *et al.*, 1995) qui réduit l'activation des cellules T CD4+ par les KCs et les LSEC (Knolle *et al.*, 1998). Ces effets sont également paracrines et modifient significativement la biologie des LSEC, ce qui démontre la proximité cruciale de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie du foie (Knolle *et al.*, 2000).

1.1.2.5. Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC)

La paroi des sinusoides est bordée par les LSEC impliquées dans la filtration sanguine hépatique. Elles sont essentielles à la reconnaissance rapide et efficace des pathogènes circulants ainsi qu'à l'induction et au maintien de la tolérance immunitaire. Les LSEC, d'environ 100 nm, sont dépourvues de membrane basale, environ 5-10% de leur surface est perforée de fenestrations et elles sont rassemblées en tamis cellulaire (Crispe *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2012). Cette architecture particulière du foie et de ses sinusoides permet aux cellules lymphocytaires circulantes d'interagir directement grâce aux tamis cellulaires (Braet *et al.*, 2001), à la fois avec les LSEC, les KC intravasculaires, les cellules hépatiques étoilées (HSC) et les hépatocytes sous-jacents (Warren *et al.*, 2006) et indirectement via des médiateurs solubles comme l'IL-10 relâché par les KC (Fraser *et al.*, 1995).

1.1.2.6. Les cellules étoilées hépatiques (HSC)

Situé dans l'espace sous-endothélial (espace de Dissé) résident, les cellules étoilées hépatiques (HSC) sont impliquées dans le stockage de la vitamine A et la régulation du flot sanguin dans les sinusoides hépatiques (Crispe *et al.*, 2009). Elles jouent aussi un rôle important dans le développement de la fibrose (Hendriks *et al.*, 1985). Expriment également les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des classes I et II ainsi que le CD1d (CMH non-conventionnel), ces cellules peuvent être considérées comme des CPA, quoique des questions de contaminations possibles soient soulevées à ce sujet (Crispe *et al.*, 2009).

1.1.3 Le foie et l'immunité innée

Le foie est hautement enrichi de cellules et composantes du système immunitaire inné ce qui lui confère un rôle immunologique inné important (Ishibash *et al.*, 2009). Le système réticulo-

endothéliale (SRE) hépatique est composé de LSEC et de KC possédant de forte capacité d'endocytose dépendant des récepteurs impliqués (Smedsr *et al.*, 2004). Le flux constant d'antigènes intestinaux, notamment ceux pouvant agir comme ligands de récepteurs TLR, crée un environnement de tolérance spécifique au foie en activant divers mécanismes de régulation afin d'éviter l'apparition d'une inflammation chronique indésirable (Tacke *et al.*, 2009) et ce, tout en maintenant ses capacités à contrer des infections. Selon Raz *et al.*, (2007), il existe plusieurs facteurs reliés aux TLR qui sont responsables de cet environnement immuno-privilegié, dont la tolérance croisée des TLR induite par la présence constante de ligands spécifiques dans les conditions normales (Abe *et al.*, 2006), la présence de cytokines anti-inflammatoires, comme IL-10 et le facteur de croissance tumorale (TGF)- β (Ohtani *et al.*, 2008) et les niveaux importants d'expression des régulateurs négatifs des TLRs (Liew *et al.*, 2005) comme les molécules SHP (Yuk *et al.*, 2011) et les enzymes de déubiquitination (Kondo *et al.*, 2012). Cette immunotolérance est un phénomène actif, tel que démontré par le haut taux de réussite des allogreffes hépatiques (Calne *et al.*, 1969). Néanmoins, certains pathogènes bien adaptés, tels le virus de l'hépatite C (Webster *et al.*, 2009) et le parasite du paludisme (Balter *et al.*, 2000), utilisent cette tolérance hépatique à leur avantage.

1.2. L'hépatite aiguë

L'hépatite fulminante ou aiguë est définie comme une inflammation dérégulée et exagérée du foie, souvent caractérisée par la présence d'un excès de cellules inflammatoires recrutées, menant finalement à des dommages hépatiques importants. Plusieurs causes peuvent être responsables de dommages hépatiques aigus chez l'homme dont la toxicité aiguë due à l'ingestion de dose élevée d'acétaminophène et les infections virales (les virus des hépatites A, B et E) (revue dans Zimmermann *et al.*, 2012). Lors d'hépatite aiguë, l'amplification de la réponse inflammatoire induite par l'activation des TLR mène à la production excessive de cytokines inflammatoires, tel que l'IL-6 et le TNF- α ce qui peut contribuer activement à la pathologie (revue dans Parker *et al.*, 2007). Il a été montré qu'au cours de l'infection par le VHC, la réponse immunitaire innée favorisait une forte augmentation d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- α dans le foie, ce qui provoquait la libération de protéines de phase aiguë par les hépatocytes. Les niveaux d'IL-6 sériques corrélaient positivement avec la durée de l'infection virale et la charge virale (Oyanagi *et al.*, 1999) puisque l'élimination virale était efficace lors de faibles niveaux d'IL-6 (Barrett *et al.*, 2003). D'autre part, le TNF- α libéré lors de l'infection par le VHC augmentait les risques d'apoptose cellulaire et rendait les hépatocytes encore plus vulnérables à l'action cytotoxique

du TNF- α (Lio *et al.*, 2003). Ces effets néfastes du TNF- α ont été démontré suite à des traitements par la ribavirine, un agent antiviral à large spectre, qui diminuaient la production de TNF- α par les cellules dendritiques infectées par le VHC alors que les dommages tissulaires étaient plus élevés chez des patients infectés non-traités (Barnes *et al.*, 2004). Les niveaux hépatiques d'IL-8 étaient également très élevés lors de la réponse inflammatoire induite par le VHC. Les LSEC en seraient la source et provoqueraient un recrutement important de leucocytes dans le foie (Hoshida *et al.*, 2005). L'effet de l'activation des différents TLRs varie selon le type de cellule hépatique activée et l'agent microbien. Par ailleurs, plus d'une voie de signalisation peut être enclenchée lors de la stimulation d'un TLR en particulier (Wu *et al.*, 2010).

De plus en plus d'études démontrent que les KCs jouent un rôle central dans la pathogénèse des hépatites aiguës et seraient même responsables de l'initiation des cascades inflammatoires menant à la réponse immunitaire dérégulée responsable des dommages tissulaires (revue dans Zimmermann *et al.*, 2012). Les KCs sont les principales cellules détectrices et phagocytaires des agents pathogènes circulants dans le foie (Yang *et al.*, 2012). Elles expriment fortement tous les TLRs, sauf le TLR5, tel que détecté par la présence d'acide ribonucléique messenger (ARNm) et par l'expression protéique des TLRs en surface et/ou dans les vésicules endosomales. Ces TLRs sont stimulés par leurs ligands pour produire principalement les cytokines TNF- α , IL-6 et IL-12 (Wu *et al.*, 2010). Ces cytokines inflammatoires initient une boucle d'amplification menant à l'aggravation de l'inflammation (Wu *et al.*, 2010) qui est destinée à combattre l'infection mais qui peut, en absence de répresseurs de la réponse inflammatoire, aggraver la pathologie (Antoniades *et al.*, 2008).

Les neutrophiles et les monocytes/macrophages sont des populations cellulaires hépatiques essentielles à la réponse innée lors d'hépatites aiguës (Shi *et al.*, 2011). Les monocytes et les neutrophiles sont massivement recrutés au niveau du foie notamment grâce à la sécrétion rapide de chimiokines par les KC telle que le CCL2 (MCP-1) (revue dans Zimmermann *et al.*, 2012). De fait, l'induction de CCL2 est détectée dans les toutes premières heures (1 à 4 h) dans un modèle d'inflammation aiguë au tétrachlorure de carbone (CCl₄) (Czaja *et al.*, 1994). Le stress oxydatif déclenché par les monocytes inflammatoires Ly6c^{hi} et les neutrophiles recrutés, en coordination avec les KC présents, endommagent directement les hépatocytes en modifiant la composition de leurs protéines, de leurs lipides et de leurs acides nucléiques menant éventuellement à leur mort (Stauffer *et al.*, 2012).

Quelques modèles expérimentaux d'hépatite aiguë existent dont des modèles chimiques utilisant la galactosamine couplé au LPS, la phytolectine concanavaline A (ConA) et l'acide désoxyribonucléique double-brin (ARNdb) synthétique polyinosique-polycytidylique (poly I : C) (Wu *et al.*, 2010). Il existe également des modèles d'hépatites virales qui utilisent certains adénovirus humains (Liang *et al.*, 2013) et des virus associés aux adénovirus contenant de l'acide désoxyribonucléique (ADN) du virus de l'hépatite B (Tzeng *et al.*, 2013). Ces modèles n'englobent pas la totalité des mécanismes pathogéniques et la complexité d'une infection virale naturelle, particulièrement lorsqu'il s'agit d'hépatites virales aiguës humaines. À cet effet, le modèle murin d'hépatite aiguë fulminante naturellement induite par le virus de l'hépatite virale murine (MHV), un coronavirus, est un modèle d'infection virale idéal pour l'étude des mécanismes inflammatoires responsables de la fulminance de l'hépatite lors d'une infection dans son hôte naturel (Rose et Weiss, 2009).

1.3. La réponse inflammatoire aiguë et la détection des pathogènes

La réponse inflammatoire est la première ligne de défense contre les pathogènes. L'inflammation induite par la reconnaissance immédiate de ces agents et des dommages tissulaires qu'ils engendrent est essentiel dans l'induction des mécanismes d'élimination de l'infection et, si nécessaire, de l'induction de la réponse immune adaptative (Parker *et al.*, 2007). La détection initiale des pathogènes se fait au niveau du tissu infecté grâce à des cellules phagocytaires pouvant aussi agir comme CPA, tels que les macrophages résidents et les cellules dendritiques. Les monocytes et neutrophiles circulants jouent également un rôle important dans le déclenchement de l'inflammation. Ces cellules inflammatoires reconnaissent des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs) hautement conservés et partagés par plusieurs pathogènes (Janeway *et al.*, 1989), tels que des glycoprotéines de surface et les acides nucléiques viraux, ainsi que les motifs moléculaires associés au danger (DAMPs) relâchés par les cellules lésées via leurs récepteurs de reconnaissance de motifs (PRRs) situés à la surface ou au niveau du cytosol. L'activation des PRRs par leurs ligands induit leur assemblage en complexes qui initient des cascades de signalisation menant à la production de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de recrutement de leucocytes. À cet effet, plusieurs modulateurs de la perméabilité vasculaire sont sécrétés afin d'augmenter le flux sanguin permettant l'extravasation des neutrophiles circulants au-travers des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins

drainant le lieu de l'infection. Finalement, les agents microbiens et les débris tissulaires détectés sont éliminés par les cellules phagocytaires qui sécrètent par la suite des facteurs modulant la réponse adaptative (revue dans Newton *et al.*, 2012).

1.3.1. Les récepteurs de type Toll (TLR)

1.3.1.1. La découverte des récepteurs TLRs

La première démonstration d'une résistance à l'infection par l'induction de gènes antimicrobiens fut réalisée en 1996 par Lemaitre et ses collaborateurs. Ils ont relié l'induction du peptide antifongique drosomysine à l'activation d'un type de PRR : les récepteurs de type Toll (TLRs). L'importance de ce travail a par ailleurs été soulignée en 2011 par l'attribution du Prix Nobel en physiologie ou médecine à Jules Hoffmann, auteur sénior de cet article (Vogel, 2012).

Les TLRs sont le résultat d'un long processus évolutif qui a débuté avant même la séparation des plantes et animaux (Beutler *et al.*, 2002). Le premier membre de la famille TLR, nommé *Toll*, découvert en 1996 chez la drosophile, a mené à la découverte de TLR chez l'homme (Medzhitov *et al.*, 1997). L'expression des TLRs chez les CPAs, tels que les macrophages et les cellules dendritiques, est essentielle à l'immunité innée et à l'apprêtement des antigènes pour la réponse adaptative (Iwasaki *et al.*, 2004). Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I caractérisées par des domaines riches en leucine (LRR) responsables de la liaison aux ligands et un domaine récepteur *Toll/IL-1* (TIR) responsables de l'induction de la cascade de signalisation (Takeuchi *et al.*, 2010). Les TLR murins de surface (TLR1-TLR6/TLR2, TLR4, TLR5 et TLR11) détectent les PAMPs et les DAMPs du milieu extracellulaire tandis que les TLRs endosomaux (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 et TLR10) reconnaissent leur présence à l'intérieur de vésicules endosomales. Ces TLRs endosomaux détectent généralement la présence d'acides nucléiques microbiens, une stratégie globale adoptée par l'immunité innée pour contrer la capacité des virus à muter ses récepteurs de surface (revue dans Barton *et al.*, 2009). Le TLR10 murin est rendu non-fonctionnel par l'insertion d'un rétrovirus et les TLRs-11/-12/-13 n'existent pas dans le génome humain (Yang *et al.*, 2012).

1.3.1.2. L'activation des TLRs

L'activation de différents TLRs par leurs ligands spécifiques induit leur oligomérisation avec d'autres protéines de surface, ce qui permet le recrutement de protéines adaptatrices intracellulaires par le domaine d'interaction protéine-protéine TIR en carboxy-terminal. Par exemple, le TLR2 forme spontanément des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6 au repos. Ces hétérodimères ne sont pas induits par la fixation au ligand. C'est plutôt, suite à leur fixation au ligand, qu'ils migrent vers les radeaux lipidiques où ils interagissent avec des protéines résidentes de ces microdomaines plasmidiques (Triantafilou *et al.*, 2011). Dans le cas du TLR2, il s'agit des récepteurs éboueurs CD14 et CD36, qui augmentent sa capacité de détection de ligands (Yamamoto *et al.*, 2010) comme les lipopeptides tri-acétylés ou di-acétylés (Takeuchi *et al.*, 2010). La capacité des TLR2 et TLR4 à former des complexes avec plusieurs récepteurs au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique leur confère un large éventail de combinaisons de signalisation (Hajishengallis *et al.*, 2006).

Il existe présentement cinq molécules adaptatrices connues, menant à des cascades de signalisation précises : la protéine 88 de la réponse primaire de la différenciation myéloïde (MyD88) et la protéine adaptatrice contenant le domaine TIR (TIRAP) mènent à l'activation des voies pro-inflammatoires dépendant des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et du NF- κ B (*nuclear factor κ B*) tandis que la protéine adaptatrice reliée au TRIF (TRAM) et la protéine adaptatrice contenant le domaine TIR qui induit l'interféron (TRIF) activent les voies TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) et IKK ϵ (*I κ B kinase- ϵ*) menant à la production de l'IFN- β . Les molécules TIRAP et TRAM sont considérées comme étant plutôt des molécules de triage permettant la distinction spatio-temporelle de la réponse innée (Barton *et al.*, 2009). L'unique molécule adaptatrice négative découverte à ce jour est la protéine stérile contenant les motifs- alpha et -armadillo (SARM) (O'Neill *et al.*, 2007) qui interfère négativement avec les fonctions du TRIF (Carty *et al.*, 2006).

Quoique chaque TLR induit sa propre cascade de signalisation, tous les TLR activés, à l'exception du TLR3, recrutent la protéine adaptatrice MyD88 via leur domaine TIR intra-cytoplasmique, soit directement par une oligodimérisation homodimérique (TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11) ou soit par combinaison avec la molécule de triage TIRAP (TLR1-TLR6/TLR2, TLR4) (revue dans Newton *et al.*, 2012). La cascade de signalisation immédiatement en aval du MyD88 est réalisée grâce à la formation d'un complexe de signalisation en motif à six hélices, nommé le MyDosome, formé par l'interaction entre les domaines de mort (DD) des différentes molécules impliquées. Tout d'abord, l'activation de

MyD88 permet le recrutement de la sérine/thréonine kinase associée au récepteur IL-1 (IRAK)-4 via leurs DD respectifs. Ce rapprochement des domaines kinases d'IRAK-4 permet son auto-phosphorylation, nécessaire à la liaison et l'activation de IRAK-2/-1, ce qui forme le MyDdosomme complet composé de 6 MyD88 :4 IRAK-4 :4 IRAK-2/-1. Les protéines IRAKs recrutent par la suite des ligases polyubiquitinées tel que le facteur associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TRAF)-6 qui active les kinases TAK1-TAB1/2/3 et IKK γ . Ces dernières sont essentielles à l'activation du facteur de transcription NF- κ B tandis que seul le TAK1 est nécessaire à l'activation des kinases activées par les mitogènes (MAPKs) p38 α et Janus (JNK). Le complexe de signalisation TAK1 migre dans le cytosol et recrute la MAPK kinase (MKK) 4 pour phosphoryler et activer la MAPK JNK tandis que la MAPK p38 α est activée par les facteurs MKK3 et MKK6 qui sont associés à TRAF6.

Les TLRs endosomaux se spécialisent dans la détection des virus via la reconnaissance d'acides nucléiques. Le TLR3 reconnaît l'ARN double-brin (Alexopoulou *et al.*, 2001), les TLR-7 et TLR-8 se lient à l'ARN simple-brin (Diebold *et al.*, 2004), plus fréquemment retrouvé dans le cycle répliatif viral, tandis que le TLR-9 reconnaît les motifs CpG méthylés du génome bactérien (Hemmi *et al.*, 2000) et de certains virus à ADN comme les herpèsvirus (Zucchini *et al.*, 2008), les adénovirus et leurs vecteurs (Zhu *et al.*, 2007) et les poxvirus (Samuelsson *et al.*, 2008).

L'activation du TLR3 et/ou du TLR4 endocyté permet le recrutement séquentiel de TRIF (Yamamoto *et al.*, 2003), le complexe TRAF3-TBK1-IKK ϵ (Hoebe *et al.*, 2006) et du facteur 3 de régulation de l'interféron (IRF3), ce dernier pénétrant le noyau pour se fixer et activer le promoteur du gène de l'IFN- β (Takeuchi *et al.*, 2010). La molécule TRIF peut également recruter le TRAF6 afin d'activer les voies MAPK et NF- κ B qui sont activés par les TLRs de surface et les TLRs -7/8 et -9 (Yang *et al.*, 2012) via la protéine kinase 1 interactive avec le récepteur (RIP-1) (Meylan *et al.*, 2004).

Une seconde voie d'induction de l'IFN- β dépend des TLRs 7/8 et TLR9 via la molécule TRAF3 en vue de l'activation de l'IRF7 (Arpaia *et al.*, 2011). Cette dernière voie semble être utilisée principalement par les cellules dendritiques plamacytoïdes (Barbalat *et al.*, 2011). L'induction du gène de l'IFN- β suite à l'activation par les TLRs se produit exclusivement au niveau endosomal (Kawai *et al.*, 2006) et ceci est largement dû à l'ubiquitine ligase TRAF3 essentielle qui est retrouvée au niveau intracellulaire (Kagan *et al.*, 2008).

Le TLR4 sert d'exemple pour la distinction spatiale de la nature des signaux puisque ce TLR peut activer les deux principales voies de signalisation selon sa localisation cellulaire (revue dans Barton *et al.*, 2009) (Figure 3). L'activation du TLR-4 de surface par un ligand extracellulaire induit, dans un premier temps, une cascade de signalisation via la voie dépendante du MyD88/TIRAP menant à l'induction de la translocation du facteur de transcription NF- κ B et des cytokines pro-inflammatoires. Par la suite, le TLR4 est internalisé et lié à des endolysosomes grâce à sa fixation à la molécule CD14 et à la tyrosine kinase Syk, avant de permuter de molécules adaptatrices et induire la production d'IFN- α et - β (type I) via la voie TRAM/TRIF comme le TLR3 (revue dans Barton *et al.*, 2009).

1.3.1.3. Un nouveau rôle pour le TLR2 dans la détection virale

Plusieurs études ont démontré que le TLR2, en plus de détecter des marqueurs de bactéries Gram-positives via l'acide lipotéichoïque et les peptidoglycanes (Takeuchi *et al.*, 1999), pourrait aussi agir

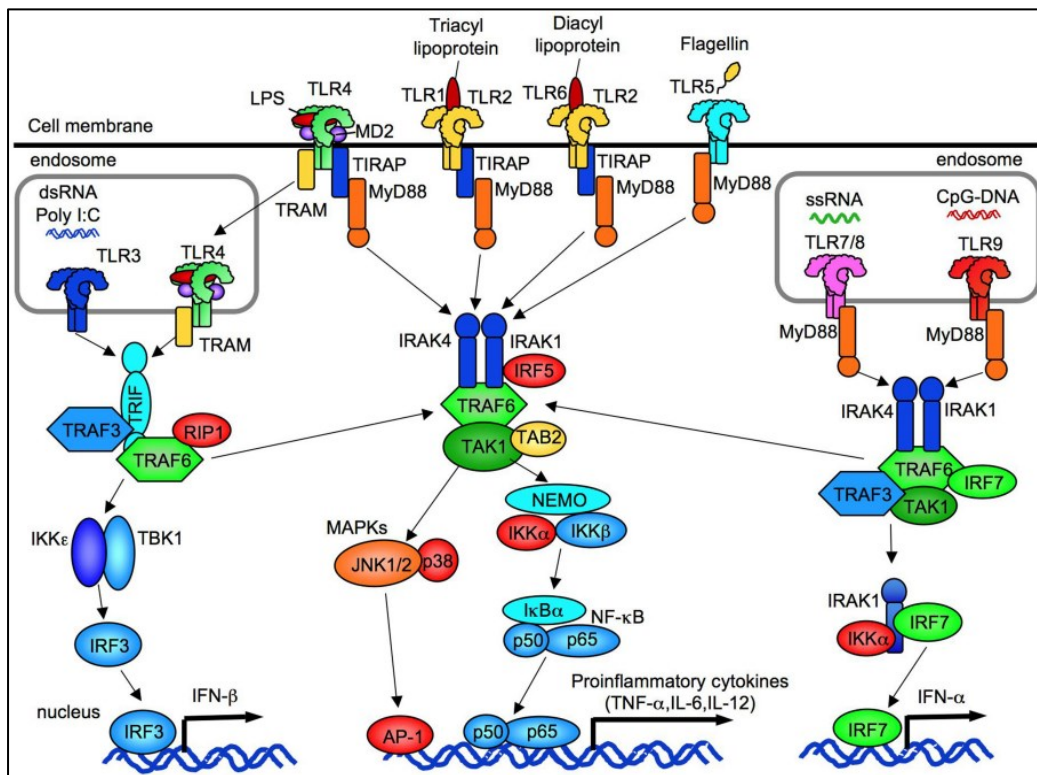


Figure 3 : Schéma des voies de signalisation des TLRs (Tiré de Yang *et al.*, 2012).

comme détecteur viral. À cet effet, des virus à ARN comme le virus respiratoire syncytial (Murawski *et al.*, 2009) et le virus de la rougeole (Bieback *et al.*, 2002) activent fortement la voie TLR2 chez les macrophages déclenchant la sécrétion de niveaux importants d'IL-6 et de TNF- α . Par ailleurs, la liaison du virus de la vaccine au TLR2 induit la production des IFNs de type I dans les monocytes inflammatoires et cette induction est dépendante de l'endocytose (Barbalat *et al.*, 2009) suggérant un mécanisme d'internalisation similaire au TLR4.

1.3.2. Les PRRs cytosoliques – les hélicases

En plus des TLRs à la surface cellulaire et à l'intérieur d'endosomes, la cellule possède des senseurs viraux cytosoliques. Les mieux étudiés des PRRs intracellulaires sont les hélicases semblables au gène 1 inducible par l'acide rétinoïque (RIG-I), la protéine associée à la différenciation de mélanomes 5 (MDA5) et plus récemment, le LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology gene 2*), dont l'activation mène à la production de cytokines inflammatoires et à la réponse IFN de type I. Ces récepteurs possèdent un domaine hélicase DExD/H-box (Satoh *et al.*, 2010) et reconnaissent différents motifs d'acides nucléiques via leur domaine régulateur carboxy-terminal (Yoneyama & Fujita, 2008). Les récepteurs RIG-1 et MDA5 contiennent deux domaines de recrutement de caspases (CARD) en N-terminal tandis que le LGP2 n'en contient aucun (Satoh *et al.*, 2010). Le récepteur RIG-1 détecte l'ARNdb de moins de 1 kilobase (kb) et la présence d'un triphosphate en 5' et amplifie la réponse IFN (Lu *et al.*, 2010) tandis que le MDA5 reconnaît l'ARNdb de plus de 2kb comme l'acide bicaténaire synthétique poly I:C (Kato *et al.*, 2008). La liaison des acides nucléiques à ces récepteurs induit un changement de conformation (Jiang *et al.*, 2011) permettant le recrutement de la molécule adaptatrice promoteur stimulatrice de l'IFN- β 1 (IPS-1) via son domaine CARD en N-terminal (Kawai *et al.*, 2005) et, dans le cas du RIG-1, la protéine transmembranaire stimulatrice des gènes de l'IFN (STING), retrouvée au niveau du réticulum endoplasmique (Ishikawa *et al.*, 2008) menant à l'activation des MAPKs et des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B (Satoh *et al.*, 2010). Le LGP2, initialement considéré comme un régulateur négatif des récepteurs RIG-1 et MDA5 (Rothenfusser *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2007) serait plutôt un activateur de la réponse antivirale (Kato *et al.*, 2008).

Une deuxième famille de récepteurs cytosoliques a été récemment découverte. Les récepteurs NOD1 et NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 et 2*) mènent

essentiellement à la signalisation dépendant du NF- κ B tandis que les protéines contenant un domaine liant les nucléotides et un domaine riche en leucine (NLR)P1, NLRP3 et NLRC4 sont connues pour leur aggrégation en complexes de signalisation nommée «inflammasomes» notamment observés dans le phénomène de «pyroptose», une forme très rapide de mort cellulaire. Les ligands précis de ces derniers ne sont toujours pas connus, mais il semblerait que les voies de signalisation activées par le stress seraient en cause (revue dans Newton *et al.*, 2012). Finalement, de nouvelles recherches ont montré le rôle et l'importance d'autres hélicases DExD/H-box, comme DDX1, DDX21 et DHX36, qui induisent aussi la réponse IFN de type I suite à la détection d'ARNdb via la voie TRIF chez les mDCs (Zhang *et al.*, 2011).

1.3.2.1. Gènes induits par l'activation des PRR.

Tous les TLR activés, à l'exception du TLR3, recrutent la protéine adaptatrice MyD88 et activent les voies MAPKs, tels que ERK1/2, p38 α , JNK1/2 et NF- κ B (revue en Newton & Dixit, 2012). La cascade de signalisation des ERKs mène à l'activation des facteurs de transcription CREB/ATF qui induisent des gènes comme le *Ptgs2* produisant la cyclooxygénase 2 (COX2) impliquée dans l'inflammation et la sensation de douleur. La MAPK p38 α est nécessaire pour l'activation des facteurs de transcription CREB et c/EBP β qui contribuent à l'induction et à la stabilité de l'ARNm des cytokines IL-1 α , IL-6, IL-12, TNF- α et les chimiokines CXCL1 et CXCL2. Les MAPKs JNK modulent l'activation du facteur de transcription AP1, impliqué dans l'induction du TNF- α . La dégradation du I κ B par le protéasome permet l'accumulation du NF- κ B au niveau du noyau ce qui se traduit par l'induction de plusieurs gènes de substances pro-inflammatoires tels que les chimiokines CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1 et CXCL2 ainsi que l'IL-6, le TNF- α et l'IFN- β . La voie de signalisation TRIF, empruntée par le TLR3 et le TLR4-endocyté, mène également à l'activation du NF- κ B et de l'IRF3, ce dernier induisant la réponse IFN de type I (Kawai & Akira, 2008).

1.3.3- L'IL-6 et le TNF- α : marqueurs d'inflammation

L'IL-6 est une cytokine pléiotropique dont la biologie est très complexe. Initialement définie comme une cytokine pro-inflammatoire, les propriétés protectrices de l'IL-6 sont maintenant clairement

démonstrées (Gao, 2012). De fait, l'IL-6 est produite par plusieurs différents types de cellules (Choi *et al.*, 1994), mais l'expression du récepteur à l'IL-6 (IL6-R) membranaire n'est observée que chez les hépatocytes et certaines sous-populations de leucocytes (Honda *et al.*, 1992). Une fois activé par la liaison à l'IL-6, l'IL-6R s'associe à deux molécules de gp130, un récepteur membranaire omniprésent, ce qui initie la signalisation intracellulaire (Taga & Kishimoto, 1995). Par contre, l'IL-6 forme des complexes avec la forme soluble du récepteur (sIL6-R) retrouvée de façon courante et ces complexes [sIL-6R/IL-6] peuvent se lier au récepteur membranaire gp130 pour activer les cellules dépourvues d'IL-6R, un phénomène appelé la «trans-signalisation» (Peters *et al.*, 1998). L'activation de la voie IL-6 mène à la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 (Heinrich *et al.*, 1998) impliqué dans plusieurs voies de signalisation pro-inflammatoire (Taub, 2003) notamment comme activateur du NF- κ B (Lee *et al.*, 2009) et des voies MAPK p38 α et ERK (Jones *et al.*, 2011), mais il est également impliqué dans la survie cellulaire et la régénération hépatique (Wang *et al.*, 2011). Au niveau du foie, l'IL-6 occupe une place d'autant plus majeure puisqu'elle est la cytokine qui induit la gamme la plus vaste de protéines de phase aiguë *in vivo* (Marinkovic *et al.*, 1989).

Le TNF- α est majoritairement produit par les macrophages et occupe plusieurs fonctions physiologiques très distinctes autant dans le développement embryonnaire et le cycle de réveil que dans la défense contre les infections microbiennes (revue dans Chu, 2013). Le TNF- α peut se lier à deux récepteurs, le TNFR1 et le TNFR2 qui peuvent être sous formes membranaire ou soluble. Le TNFR1 est exprimé de façon omniprésente et, suite à son activation, forme un complexe de signalisation menant à l'activation des facteurs NF- κ B et des MAPK p38 α et JNK (Peschon *et al.*, 1998) qui induisent plusieurs autres cytokines inflammatoires ainsi que la sécrétion additionnelle de TNF- α (revue dans Chu, 2013). Le TNF- α sécrété par les KC activées déclenche la cascade des caspases menant à la formation de l'apoptosome et finalement à la mort cellulaire par apoptose (Tacke *et al.*, 2009). De façon concomitante, le TNF- α peut également induire la transcription de gènes de survie via l'activation du NF- κ B (Karin *et al.*, 2009). Les facteurs impliqués dans l'équilibre entre l'activation de voies pro-survie et pro-apoptotique lors de l'inflammation aiguë sont encore mal compris (Malhi *et al.*, 2008).

1.3.4. La réponse interféron (IFN) de type I lors d'infections virales

Les IFN sont des cytokines pléiotropiques dont les rôles dans l'immunité innée antivirale sont essentiels. Chez l'homme, les interférons de type I sont composés de 12 sous-types d'IFN- α , d'IFN- β et d'IFN- ω . L'IFN- γ est l'unique membre de l'IFN de type II (Stark *et al.*, 1998). Une troisième classe d'IFNs, ou molécules *Interferon-like* (Pestka *et al.*, 2004) a été découverte, les IFN- λ 1, - λ 2 et - λ 3 également nommés IL-29, IL-28A et IL-28B respectivement (Kotenko *et al.*, 2003).

La réponse IFN de type I sert à coordonner la réponse inflammatoire suite à une infection virale afin de limiter l'infection et réduire la propagation virale (Horner & Gale, 2009). Tous les IFN de type I induisent une signalisation anti-virale de façon autocrine et paracrine via le même récepteur (IFNAR) situé à la surface cellulaire. La fixation des IFN de type I à ce récepteur active un grand nombre de gènes regroupés sous le terme de gènes stimulés par l'interféron (ISGs), comme les gènes pour les ARNse L et Mx (Stark *et al.*, 1998). Cette action du couple IFN/IFNAR passe par l'activation de la MAPK JNK, ce qui mène à l'activation des voies STAT et finalement à l'induction des ISGs (Horner & Gale, 2009). Ces gènes vont produire des molécules capables de créer un environnement antiviral au site d'infection (de Veer *et al.*, 2001). La réponse IFN module, dans un deuxième temps, la réponse adaptative en dirigeant la réponse de cellules T cytotoxiques et en activant des cellules NK (Stetson & Medzhitov, 2006). L'importance de la réponse IFN de type I dans la défense face aux infections virales a été clairement démontrée par la forte susceptibilité aux infections virales des souris ayant des IFNR défectueux (Muller *et al.*, 1994).

1.4. Les voies d'endocytose : entrée des virus et détection par les PRRs

1.4.1. Attachement à la cellule-hôte

Plusieurs virus, comme le virus du syndrome respiratoire aiguë sévère (SRAS), un coronavirus humain, initialement caractérisé comme pénétrant les cellules par fusion, sont maintenant connus pour leur entrée via des mécanismes d'endocytose (Wang *et al.*, 2008). L'endocytose est en fait la voie d'entrée la plus exploitée par les virus (Sieczkarski & Whittaker, 2002). Ces voies impliquent un grand nombre de protéines pour pénétrer les cellules animales de façon efficace. Elles présentent plusieurs avantages du fait que l'endosome permet une ségrégation physique à l'intérieur de vésicules

cytoplasmiques servant alors de protection contre les diverses molécules de détection intracytoplasmiques en plus de permettre la pénétration profonde et le transport de la particule virale au niveau des différents organelles cellulaires (Mercer *et al.*, 2010) avant le relargage du matériel génomique dans le cytosol (Marsh & Bron, 1997).

La première étape de l'infection virale est l'attachement à la cellule hôte. Ceci se fait grâce à des interactions spécifiques et multivalentes avec plusieurs récepteurs cellulaires, qui peuvent être des protéines, des lipides ou des carbohydrates. Ces récepteurs cellulaires peuvent aussi être des facteurs d'attachement, tels que l'héparane sulfate et les acides sialiques, qui retiennent le virion de sorte à favoriser subséquemment sa liaison avec les récepteurs viraux spécifiques. Ces récepteurs spécifiques jouent un rôle plus actif dans la progression de l'infection, notamment comme inducteurs de voies de signalisation et déclencheurs de changements de conformation des protéines virales initiant l'induction des mécanismes d'endocytose. Quoique de nature très différente, il est souvent difficile de différencier entre les divers types de liaisons nécessaires à l'infection virale. Un exemple de ce phénomène est le VHC qui passe par plusieurs facteurs d'attachement présents sur les hépatocytes tels que des glycosaminoglycanes, le récepteur de lipoprotéine de faible densité, le récepteur éboueur (*scavenger*) de classe B type I, le CD81 et la claudine-1 avant son internalisation (Helle & Dubuisson, 2008). Ces fixations induisent l'agglomération de récepteurs, et ainsi, le recrutement de micro-domaines lipidiques menant à l'activation de voies de signalisation cellulaires qui déclenchent les mécanismes d'endocytose cellulaire en cause, de sorte à internaliser le ligand détecté. À cette étape, la membrane plasmique s'invagine au lieu d'attachement de façon à accommoder la forme sphérique de la particule virale. La vésicule se détache finalement de la membrane plasmique grâce à des facteurs de scission comme la dynamine-2 (revue dans Mercer *et al.*, 2010).

L'entrée par endocytose est avantageuse pour l'infection virale vu l'absence d'éléments viraux à la surface ou dans le cytosol cellulaire, ce qui retarde la détection du virus par les senseurs cellulaires (Mercer *et al.*, 2010). En fait, plusieurs virus tels que le virus de l'herpès simplex de types 1 et 2 (Nicola *et al.*, 2003) et le VIH (Miyachi *et al.*, 2009), qui peuvent entrer par fusion membranaire directe, favorisent l'entrée par endocytose.

Les particules virales ainsi internalisées à l'intérieur de vésicules cytosoliques suivent les mêmes voies de transport cellulaire et de traitements que celles du réseau physiologique impliquées dans la récupération/capture, la fusion, le recyclage et la fission par exemple (Maxfield & McGraw, 2004). Ces

organelles en évolution sont catégorisées en différentes classes selon leur emplacement dans la cascade endosomale : les endosomes précoces (EEs), les endosomes en maturation (MEs) ou les endosomes de recyclage (REs), les endosomes tardifs (LEs) et finalement, les lysosomes (Rink *et al.*, 2005; Luzio *et al.*, 2007). Plusieurs facteurs déterminent le cheminement du ligand internalisé dont les protéines Rab (*Ras-related in brain*) retrouvées dans les différents microdomaines de la membrane des EEs (van Meel & Klumperman, 2008). Les EEs peuvent se diriger vers la membrane plasmique (Rab4), devenir des LEs (Rab7) des REs (Rab22) ou se diriger vers le réseau du *trans*-Golgi (Rab9). Les facteurs régulant ces voies de maturations sont tous interdépendants de sorte que la perturbation d'un seul élément, comme l'inhibition de l'acidification endosomale, induit la dérégulation de toute la cascade (revue dans Mercer *et al.*, 2010).

Cette succession en étapes est importante dans l'étude des mécanismes de l'entrée virale, notamment en présence d'inhibiteurs chimiques spécifiques aux différentes étapes de chacune des voies d'endocytose. Par exemple, l'usage de bases lysosomotropiques faibles telle que la chloroquine, qui inhibe l'acidification finale de l'endosome, permet d'identifier le besoin d'un faible pH pour l'infection virale. Des produits diminuant ou séquestrant le cholestérol sont également utilisés pour vérifier l'entrée par la voie endosomale dépendante de la cavéoline/radeau lipidique (Mercer *et al.*, 2010). L'inhibiteur chimique le plus fréquemment utilisé de cette voie d'endocytose, le méthyl- β -cyclodextrane, peut cependant affecter négativement la voie endosomale dépendante de la clathrine (Subtil *et al.*, 1999; Rodal *et al.*, 1999). En revanche, le nystatin, un agent chimique qui lie le cholestérol, est beaucoup moins cytotoxique et a une activité inhibitrice beaucoup plus spécifique à cette voie endosomale (revue dans Mercer *et al.*, 2010).

1.4.2 Les mécanismes d'endocytose utilisés par les virus

Les mécanismes d'endocytose les plus étudiés sont l'endocytose dépendante de la clathrine (CME), l'endocytose dépendante de la cavéoline/radeau lipidique et la macropinocytose. Ces deux premières voies sont dépendantes de la dynamine-2 tandis que le facteur de scission impliqué dans la macropinocytose n'est pas encore identifié. Par ailleurs, il existe plusieurs autres mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine et de la cavéoline/radeau lipidique qui font l'objet

actuellement d'études, mais dont les mécanismes sont moins bien élucidés (revue dans Mercer *et al.*, 2010).

Quoique certains virus ne fassent qu'exploiter les activités endosomales physiologiques de la cellule, plusieurs virus tels que le SV40 (Pelkmans *et al.*, 2005), le virus de la vaccine (Mercer & Helenius, 2008) et le virus de la stomatite vésiculaire (Johannsdottir *et al.*, 2009) induisent par eux-mêmes leur internalisation par les voies d'endocytose dépendantes de la cavéoline/radeau lipidique, de la macropinocytose et de la CME, respectivement. Certains virus n'exploitent qu'une seule voie d'endocytose alors que d'autres utilisent plus d'une voie pour infecter leurs cellules-cibles. De plus, le choix des voies d'endocytose peut varier selon la cellule infectée pour un même virus (revue dans Mercer *et al.*, 2010).

1.4.2.1. Endocytose dépendante de la clathrine (CME)

En 1980, le virus de la forêt Semliki fût le premier virus identifié pénétrant sa cellule cible par la CME (Helenius *et al.*, 1980), la voie la plus communément utilisée par les infections virales. La voie de la CME permet un transit très rapide vers les milieux endosomaux acides nécessaires à la fusion membranaire de certains virus enveloppés comme le virus de l'influenza. Dans ce cas, la particule virale pénètre la cellule hôte par la voie CME et se rend au stade EE en moins de 2 minutes et atteint les lysosomes 30 à 60 minutes post-infection (Lakadamyali *et al.*, 2006).

L'entrée par la CME se fait au niveau des régions plus denses de la membrane plasmique, regroupant plusieurs molécules de clathrine : les *clathrin-coated pits* (CCPs). Ces régions de composition hétérogène peuvent être présentes de façon constitutive ou induite par le ligand (revue dans Mercer *et al.*, 2010). Ceci est particulièrement vrai pour l'infection par le virus de l'influenza où ce dernier induit la synthèse *de novo* de 94% des CCPs retrouvés (Rust *et al.*, 2004).

La chlorpromazine, un inhibiteur cationique amphiphilique fréquemment utilisé pour inhiber l'endocytose dépendante de la clathrine, perturbe l'assemblage coordonné des molécules de clathrine via la sous-unité AP-2, de façon à empêcher la formation de CCPs à la surface cellulaire (Wang *et al.*, 1993).

1.4.2.2. Endocytose par la voie cavéolaire/radeau lipidique

Cette voie d'endocytose est dépendante d'un récepteur et s'effectue au niveau de microdomaines riches en radeaux lipidiques de tailles variables (Mayor *et al.*, 2006), modèle de membrane plasmique initialement proposé en 1988 (Simons & van Meer, 1988). Ces radeaux lipidiques sont enrichis de cholestérol et de sphingolipides qui modulent la fluidité membranaire permettant ainsi l'agglomération de récepteurs et de molécules de signalisation (revue dans Mercer *et al.*, 2010). De fait, l'inhibition de cette voie est réalisée par la séquestration du cholestérol à l'aide de composés liant les stérols tel que le nystatin (Sieczkarski & Whittaker, 2002). Un exemple probant de ce déplacement intramembranaire essentiel à l'infection est la fixation du coronavirus humain 229E au CD13 retrouvé dans les microdomaines résistants au détergent Triton X-100. Cette première fixation mène à l'agglomération de plusieurs molécules de CD13 additionnelles dont la migration vers des régions cavéolaires est dépendante du cholestérol et ce, avant l'entrée du virus (Nomura *et al.*, 2004).

L'internalisation des particules virales par cette voie mène les EEs aux LEs qui se dirigent vers le réticulum endoplasmique afin d'exploiter les voies de dégradations protéiques pour le relargage du génome viral dans le cytosol. L'infection par cette voie est dépendante de la dynamine-2 (Pelkmans *et al.*, 2002) et peut prendre de 6 à 12 heures selon le virus et le type de cellule infectée (Schelhaas *et al.*, 2007). Des études démontrent que certains virus, dont le SV40 et le virus du SRAS, peuvent infecter des cellules par la voie d'endocytose classique cavéolaire (CAV1)/radeau lipidique mais également par des voies radeaux lipidiques indépendantes du CAV1 (Kirkham *et al.*, 2005; Eash *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008), ce qui démontre la complexité et la malléabilité des voies d'endocytose utilisées.

1.4.2.3. La macropinocytose

Sous des conditions physiologiques, la macropinocytose est une voie d'endocytose dépendante de l'actine, qui est activée par des facteurs de croissance permettant l'internalisation de volumes importants de liquides et de membranes extracellulaires (revue dans Mercer *et al.*, 2010). Cette voie d'entrée est unique dans la mesure où elle nécessite le frémissement de toute la membrane plasmique cellulaire (Watts & Marsch, 1992). Plusieurs autres ligands peuvent être internalisés par cette voie, notamment les corps apoptotiques ou nécrotiques (Hoffmann *et al.*, 2001), les bactéries

du genre *Salmonella* (Francis *et al.*, 1993) et les particules virales de picornavirus (Liberali *et al.*, 2008). De fait, plusieurs virus de familles virales très différentes comme l'adénovirus de type B humain, le VIH (Kerr et Teasdale, 2009) et le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (Raghu *et al.* 2009) utilisent la macropinocytose comme mode d'infection. Cette voie présente plusieurs avantages dont la capacité d'internalisation des particules virales de taille importante, l'acidification des macropinosomes qui est nécessaire pour l'activation des virus dont l'infectivité est dépendante du pH et comme mécanisme additionnel ou alternatif d'entrée virale dans la cellule à infecter (revue dans Mercer *et al.*, 2010).

1.5. Les coronavirus

1.5.1- Historique

L'épidémie du syndrome respiratoire aiguë et sévère (SRAS) de 2002-2003, qui s'est propagée sur quatre continents infectant quelques 8096 individus et menant à la mort de 774 personnes (Drosten *et al.*, 2003), a mis en lumière l'importance des coronavirus pour la santé humaine. Depuis la découverte du premier coronavirus en 1932, le virus de la bronchite infectieuse ou IBV (Hudson & Beaudette, 1932), plusieurs coronavirus ont été identifiés chez plusieurs espèces animales et aviaires, dont le MHV en 1949 (Cheever *et al.*, 1949). Dans les années 1960s, la forme caractéristique en couronne des coronavirus a été mise en évidence par la coloration négative en microscopie électronique (Almeida *et al.*, 1968). La dénomination Coronavirus (« *corona* », mot latin signifiant auréole) a été adoptée pour la première fois en 1968 (Tyrrell *et al.*, 1968). La visualisation de cette structure en couronne a permis de démontrer que les infections dues à des coronavirus étaient présentes chez plusieurs espèces animales et aviaires et étaient responsables de différentes maladies, tels des troubles gastro-intestinaux, respiratoires, hépatiques et/ou neurologiques (revue dans Baker *et al.*, 2009). Chez l'homme, plusieurs souches de coronavirus (HCoV) infectieux ont été isolées, telles que les souches HCoV-229E et HCoV-OC43 qui ont ensuite été reliées à près de 30% des cas de rhumes et gastroentérites (revue dans Baker *et al.*, 2009).

1.5.2- Classification des coronavirus

Depuis la dernière décennie, les études phylogénétiques des coronavirus a substantiellement modifiée la classification de ces virus, notamment à cause de la découverte d'un nombre important

de nouvelles espèces. Actuellement, les sous-familles *Coronavirinae* et *Torovirinae* forment la famille des *Coronaviridae* qui est incluse dans l'ordre des *Nidovirales*, avec les familles *Arteriviridae* et *Roniviridae*. Les *Nidovirales* se caractérisent par la production d'un ensemble d'ARNm sous génomiques nichés en 3' (revue dans Belouzard *et al.*, 2012). Les *Coronavirinae* sont maintenant classifiés en quatre genres, soient les alpha-, bêta-, gamma- et delta-coronavirus selon la nature phylogénétique du génome viral (de Groot *et al.*, 2011). De plus, le genre bêta est subdivisé en sous-genres 2a, 2b et des nouveaux sous-genres 2c et 2d ont été proposés tandis que les sous-genres 3b et 3c du genre gamma ont également été récemment proposés (Woo *et al.*, 2007, 2009).

Les coronavirus des groupes alpha et bêta sont des virus infectant les mammifères tandis que les virus du groupe gamma, tels que le virus de la bronchite infectieuse du poulet (IBV) et le coronavirus de dinde (TCoV), infectent surtout les espèces aviaires (Guy *et al.*, 1997). Le coronavirus humain HCoV-229E, les coronavirus porcins TGEV et PRCoV, sont responsables de maladies gastroentériques ou respiratoires. Les coronavirus félin (FCoV) et canin (CCoV) font partie du groupe des alphacoronavirus. Le MHV, les coronavirus humains HCoV-OC43 et SARS-HCoV (Eickmann *et al.*, 2003), les coronavirus de rats (RCoV) et bovins (BCoV) font tous partis du groupe bêta (Pedersen *et al.*, 1978) qui se caractérise par une protéine nonstructurale 1 (nsp1) unique en taille et en séquence (revue dans King *et al.*, 2011). Depuis plus de 50 ans, le seul membre du groupe gamma des coronavirus était le IBV. À ce virus s'est ajouté le coronavirus de dinde et de nouveaux virus aviaires mais aussi des virus tels que le SW1 infectant les bélugas (Mihindukulasuriya *et al.*, 2008). Les coronavirus du groupe delta peuvent infecter les espèces aviaires, porcines ainsi que félines. De fait, sept nouveaux coronavirus infectant des espèces porcines ou aviaires ont été découverts tout récemment (Woo *et al.*, 2012).

Comme tous les virus à ARN, les coronavirus existent «en ensembles de génotypes similaires», ou de quasi-espèces (revue dans Denison *et al.*, 2011), dû à des taux élevés de recombinaison (Lai *et al.*, 1992). Cette diversité, particulièrement considérable, s'explique par la taille importante de leur génome, par l'infidélité de leur ARN polymérase ARN dépendante responsable de taux de mutations allant jusqu'à 1/1000 nucléotides répliqués et par leur mécanisme de réplication unique faisant appel à la permutation aléatoire de cadres de lecture (revue dans Denison *et al.*, 2011). Ces facteurs de plasticité virale, menant à des fréquences de recombinaison allant jusqu'à 25% du génome viral (Baric *et al.*, 1990), contribuent également à la facilité avec laquelle les coronavirus s'adaptent

rapidement à de nouveaux hôtes et de nouvelles niches écologiques, menant à des sauts inter-espèces responsables d'éruptions zoonotiques (Woo *et al.*, 2006), tel qu'illustré par la récente épidémie du SRAS. Dans cet exemple, l'hôte réservoir du virus, des chiroptères de la famille des rhinolophidés portant le virus bat-SARS-CoV, aurait transmis l'infection à des civettes palmistes à masque et à des chiens viverrins rôdant les marchés extérieurs chinois avant de finalement être transmis à l'homme (revue dans Baker *et al.*, 2009). L'existence de réservoirs animal de coronavirus et leur facilité d'adaptation représentent des risques considérables pour la santé humaine, d'où le besoin d'approfondir les connaissances sur les processus pathogéniques des maladies causées par les coronavirus.

1.5.3- Le coronavirus de l'hépatite murine (MHV)

Le virus de l'hépatite murine, découvert par Almeida et Tyrrell (1967), est un excellent modèle d'infection virale utilisé pour l'étude des désordres neurologiques et hépatiques humains. Depuis, plusieurs sérotypes ont été identifiés, variant entre eux selon leurs tropismes et leur niveau de virulence, tels que les MHV-Y et MHV-R1 causant des entérites, et les MHV-2, -3, -A59 et -JHM (MHV-4) responsables de troubles neurologiques et/ou hépatiques (Compton *et al.*, 1993; Dubois-Dalq *et al.*, 1982; Stohlman *et al.*, 1998).

Le MHV-3 est le variant le plus virulent, induisant une hépatite fulminante menant à la mort des souris, dans la plupart des lignées, de 3 à 5 jours suivant l'infection (Le Prévost *et al.*, 1975). Les souris des lignées A2G et C3H sont considérées comme semi-susceptibles à l'infection par le MHV-3 car l'infection devient persistante et mène plutôt à des désordres neurologiques chroniques (Virelizier *et al.*, 1975).

1.5.3.1- Structure du virus MHV

Le MHV possède un génome à ARN simple brin (ARNsb) de polarité positive formé de 31 526 bases et imbriqué dans une nucléocapside (protéine N) hélicoïdale d'environ 100nm de diamètre. Ce complexe nucléoprotéique est enveloppé d'une membrane lipidique particulièrement épaisse (7.8 nm comparativement à 4 nm pour une membrane biologique typique) dérivée de la cellule hôte (revue dans King *et al.*, 2011) dans laquelle est imbriquée plusieurs protéines membranaires dont la

protéine polyglycosylée de surface (S), la glycoprotéine de la membrane (M), la protéine d'enveloppe (E), ainsi que la glycoprotéine hémagglutinine estérase (HE) chez certains sérotypes (Figure 4). Les virions de MHV sont formés d'un ratio stoechiométrique des protéines N, M et HE de 1 : 2,6 : 0,4.

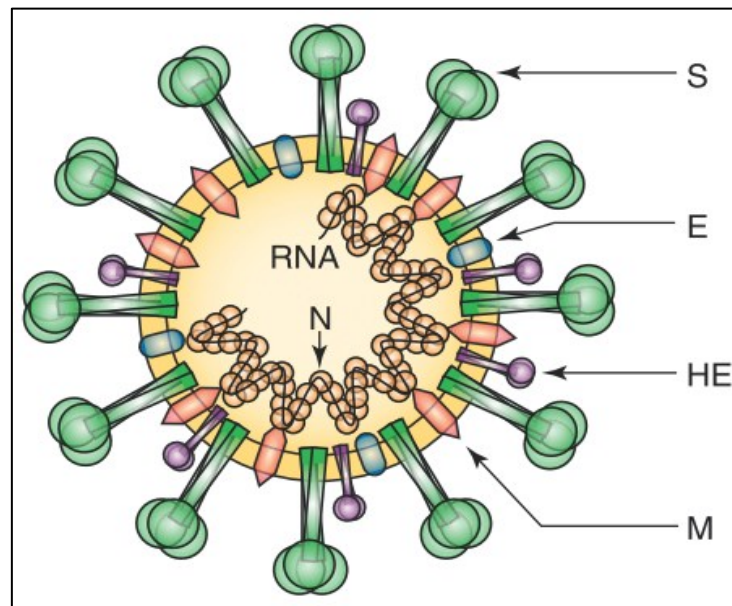


Figure 4 : Structure de la particule virale du MHV (Phillips & Weiss, 2011). (S= protéine de surface; E= protéine d'enveloppe; HE= hémagglutinine-estérase; M= protéine de matrice; N=nucléoprotéine).

1.5.3.2- Le génome du virus MHV

L'ARN génomique du MHV est linéaire, unimoléculaire, poly-adiénylé en 3' et coiffé en 5'. Cet ARN poly-cistronique sert d'ARN messager (ARNm) fonctionnel infectieux et pouvant être directement traduit (Lomniczi *et al.*, 1977). Encadré de séquences non-traduites (UTRs) de 200 à 600 nucléotides, ce génome viral possède une séquence d'initiation à son extrémité 5' d'environ 65 à 98 nucléotides, également présente sur les sept ARNm sous-génomiques emboîtés (revue dans King *et al.*, 2011). Le génome du MHV possède 11 cadres de lectures ouverts (ORFs) (Figure 5). Le premier gène en 5' est formé des deux premiers ORFs, soient les ORF1a et ORF1b, occupant le 2/3 du génome (revue dans

King *et al.*, 2011). Ce gène code pour toutes les protéines de réplication et de transcription, dont la polymérase virale et les protéines non-structurales (nsp) (Denison *et al.*, 2011).

Les protéines nsp sont issues de la transformation des polyprotéines pp1a et pp1ab par l'activité protéinasique des nsp3 (PLP1 et PLP2) et de la nsp5 M^{pro} (Lu *et al.*, 1995). Chez la plupart des coronavirus, dont le MHV et le SRAS-CoV, ces transformations mènent à la production de 16 nsp (Gorbalenya *et al.*, 1989) qui s'associent au complexe de réplication intracytoplasmique (Shi *et al.*, 1999). Les nsp 4 à 16 ont des activités enzymatiques indispensables à la synthèse des ARN viraux (Denison *et al.*, 2011) telle que l'activité exoribonucléique (ExoN) de la nsp14 responsable des corrections de lecture essentielles au maintien de l'intégrité d'un si gros génome à ARN (Snijder *et al.*, 2003) et potentiellement à l'évasion immunitaire en ciblant les ARNm et les microARN cellulaires (Peng *et al.*, 2010). À ce jour, seule la nsp2 du MHV et du SRAS-CoV et la partie C-terminale de la nsp1 du MHV sont considérées non-essentiels à la réplication virale, quoique celle-ci s'effectue de façon beaucoup moins efficace *in vitro* et *in vivo* en leur absence (Graham *et al.*, 2005).

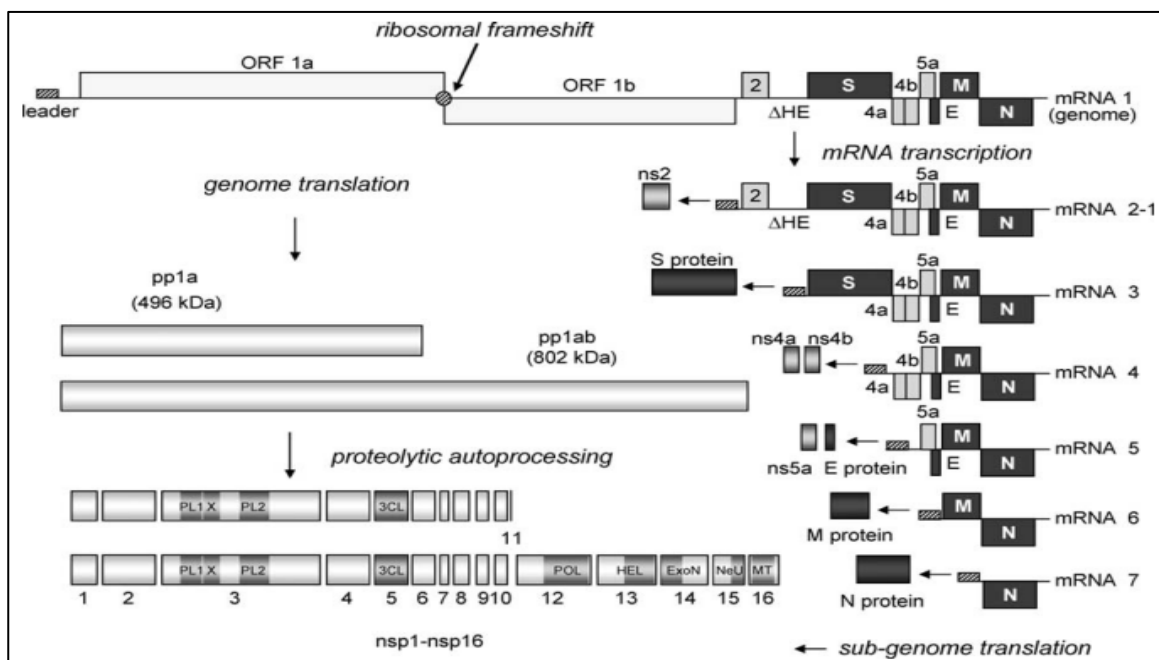


Figure 5 : Organisation et expression du génome du MHV-A59 (Sawicki *et al.*, 2005).

Les protéines de structures sont codées par différents cadres de lecture (gènes 2 à 9) situés en aval du gène 1 et disposés selon une séquence déterminée identique pour tous les coronavirus (HE-S-E-M-N) (Spaan *et al.*, 1988). Des protéines dites accessoires qui varient beaucoup en nombre, en séquence et en mode d'expression selon les différents MHV sont intercalées entre les gènes de structure (Lai *et al.*, 1997).

1.5.3.3- Les protéines de structure du MHV

La phosphoprotéine N est responsable de l'encapsidation de l'ARN viral génomique formant ainsi des complexes ribonucléoprotéiques correspondant à la nucléocapside virale. Cette protéine de 50 à 60 kd est formée de trois domaines semi-conservés intercalés d'éléments hypervariables. Les deux premiers domaines conservés servent à la liaison avec l'ARN, notamment à la séquence 5'UTR de l'ARN génomique viral (Masters *et al.*, 1992) et le troisième domaine conservé est responsable de la liaison avec la protéine M pour l'assemblage des virions infectieux (Sturman *et al.*, 1980). Par ailleurs, la protéine N semblerait jouer le rôle de protéine chaperone dans la synthèse de l'ARN viral et dans la traduction (Compton *et al.*, 1987) et serait aussi un antagoniste des IFN de type I (revue dans Baker *et al.*, 2009; revue dans King *et al.*, 2011).

Il y environ 80 exemplaires trimériques de la protéine de surface (S) sur chaque virion de MHV (Neuman *et al.*, 2006) formant ainsi l'aspect en couronne du virus tel qu'observé en microscopie électronique. Cette protéine trimérique est formée de monomères assemblés au niveau du complexe réticulum endoplasmique-Golgi des cellules infectées (Opstelten *et al.*, 1993). Elle est également le facteur principal de la détermination du tropisme et de la réponse humorale anti-virale (Perlman & Netland, 2009).

La glycoprotéine M, la plus abondante du virion, est une protéine de surface membranaire de type III d'environ 200 à 250 acides aminés pourvue de trois domaines trans-membranaires N^{exo}C^{endo} (revue dans King *et al.*, 2011), un ectodomaine glycosylé en position N-terminale d'environ 20 acides aminés et une longue partie interne en position C-terminale formée d'une région amphiphile suivie d'une queue hydrophilique responsable des interactions avec la nucléocapside (revue dans Baker *et al.*, 2009; revue dans King *et al.*, 2011). Chez le MHV, la protéine M se retrouve également dans la structure interne du virion (Risco *et al.*, 1996).

La protéine pentamérique E, ancrée dans la membrane via une séquence spécifique en position N-terminale (Cavanagh & Britton, 2009), n'est que très peu présente dans la membrane du virion, environ 20 copies par particule virale, mais joue un rôle prédominant dans l'assemblage des virions, possiblement en agissant comme canal ionique ou comme une viroporine (revue dans Baker *et al.*, 2009; revue dans King *et al.*, 2011). Cette petite protéine d'environ 9 à 12 kd est essentielle, tout comme la protéine M, à l'exocytose des virions nouvellement formés (Routledge *et al.*, 1991).

La protéine de surface hémagglutinine-estérase (HE) est une glycoprotéine homo-dimérique de type I médiant l'attachement réversible des virions aux acides sialiques *O*-acétylés en agissant à la fois comme lectine et sialate-*O*-acétylestérase (Yokomori *et al.*, 1989). Elle est retrouvée chez certains coronavirus bêta quoique sa présence soit très variable et qu'elle subit fréquemment des mutations et même des délétions lors d'un nombre élevé de passages *in vitro*, démontrant son rôle secondaire dans la réplication virale (Yokomori *et al.*, 1991, 1992). Le gène de l'HE a été acquis par recombinaison lors de co-infections avec d'autres virus, tel que suggéré par une similarité de l'ordre de 30% des séquences d'acides aminés de la HE des coronavirus avec celles de l'hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza C (Luytjes *et al.*, 1988).

1.5.4- Le cycle de réplication des virus MHV

1.5.4.1- La molécule CEACAM1 : le récepteur des virus MHV

Pour les différents sérotypes de MHV, la fixation et la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire se font via la protéine S (Williams *et al.*, 1991) et la molécule CEACAM1a (*carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1*) (Dveksler *et al.*, 1991). La molécule CEACAM1 est membre de la superfamille de protéines CEA, des protéines de type immunoglobulines possédant un domaine extracellulaire formé de quatre boucles en position N-terminale auxquelles la protéine S du MHV peut se lier (Dveksler *et al.*, 1993). Son domaine trans-membranaire permet l'ancrage à la membrane cellulaire grâce à une protéine hydrophobique constituée de glycosylphosphatidylinositol, un « *GPI-anchor* » (Kuespert *et al.*, 2006). La queue intra-cytoplasmique de la molécule CEACAM1 est soit longue (71-73 aa; CC1-L) ou courte (10-12 aa; CC1-S) et plusieurs variants d'épissage alternatif de chaque isoforme existent (Kuespert *et al.*, 2006). La molécule CEACAM1 est normalement impliquée dans l'adhésion et la croissance cellulaire ainsi que dans plusieurs événements de signalisation

cellulaire (Öbrink *et al.*, 1997). Chez la souris, le gène *Ceacam1* contient neuf exons dont l'épissage alternatif détermine le rôle physiologique (Chen *et al.*, 2009).

La forme longue de la molécule CECAM1a, la CC1-L, possède des motifs inhibiteurs de tyrosine ITIMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) qui, une fois activés, recrutent les tyrosines phosphatases homologue à l'oncogène Src (SHP)-1 et SHP-2 à la membrane où elles effectuent leur activités inhibitrices sur plusieurs voies de signalisation. La forme courte de la molécule CEACAM1 agit plutôt comme activatrice (Gray-Owen *et al.*, 2006) et régule l'activité inhibitrice de la forme CC1-L par hétéro-dimérisation (Müller *et al.*, 2009).

La molécule CEACAM1 est surtout présente dans le petit intestin tandis que des niveaux intermédiaires ont été trouvés dans la rate, les poumons, les reins et le foie. La molécule CEACAM1 est quasi absente au niveau du cerveau et des muscles (Slobodskaya *et al.*, 2012). Elle est exprimée par plusieurs types de cellules dont les cellules épithéliales, endothéliales et les hépatocytes (Godfraind & Coutelier, 1998) ainsi que par des cellules du système immunitaire inné comme les neutrophiles (Kuroki *et al.*, 1992), les macrophages (Coutelier *et al.*, 1994) et les cellules dendritiques (Kammerer *et al.*, 2001).

Par ailleurs, des études récentes ont démontré l'importance de la molécule CEACAM1 au niveau du foie, notamment par rapport à l'élimination de l'insuline par les hépatocytes (Poy *et al.*, 2002). De fait, la phosphorylation du CEACAM1 au niveau du résidu Tyr488 de son domaine intracellulaire par les kinases du récepteur de l'insuline (Najjar *et al.*, 1995) est nécessaire à l'internalisation du complexe par la voie endocytaire clathrine dépendante menant à la dégradation de l'insuline (Choice *et al.*, 1998). Seule l'isoforme CC1-L subit cette phosphorylation (Xu *et al.*, 2009).

Plusieurs isoformes de la molécule CEACAM1 peuvent servir de récepteurs pour les virus MHV (Dveksler *et al.*, 1993). Par contre, la forme soluble, dépourvue du domaine trans-membranaire, est capable de neutraliser le virus lors d'infections *in vitro* (Terahara *et al.*, 2009). Lors d'infection *in vivo*, le rapport entre les transcrits codant pour l'isoforme soluble et l'isoforme membranaire est d'environ 50 : 50, et ce, dans plusieurs organes comme le cerveau, le foie, la rate et les poumons (Slobodskaya *et al.*, 2012). Néanmoins, les niveaux d'expression de la protéine CEACAM1 et le rapport entre les différents isoformes –L et –S varient beaucoup selon le type de cellule, sa maturation et son niveau d'activation (Singer *et al.*, 2000).

La résistance de la lignée de souris SJL/J à l'infection par le MHV-A59 est due à l'absence de l'allèle *a* de la molécule CEACAM1 présente chez les souris susceptibles BALB/c (Boyle *et al.*, 1987). De fait, l'allèle *b* de la molécule CEACAM1 donne une certaine résistance aux souris SJL/J (Beauchemin *et al.*, 1999).

Des études sur l'infection et la réplication du sérotype neurotrope MHV-JHM dans le cerveau de souris ou sur des neurones en culture déficientes pour le gène *ceacam1* (Nakagaki *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2008) ont soulevé la possibilité d'autres récepteurs méconnus (Phillips & Weiss, 2011). Par ailleurs, des études récentes ont montré que les niveaux d'expressions génique et protéique de la molécule CEACAM1 ne corrèlent pas, ni avec le tropisme (organes), ni avec la charge virale du MHV *in vivo* (Slobodskaya *et al.*, 2012). Toutefois, des études avec le MHV-A59 ont démontré un certain tropisme de ce sérotype pour le cerveau pourtant quasi dépourvu de toute expression de CEACAM1 (Barthold *et al.*, 1984; Lavi *et al.*, 1986) mais pas pour le rein qui exprime pourtant des niveaux intermédiaires de la molécule CEACAM1 (Barthold *et al.*, 1984).

Ces divergences peuvent en partie être expliquées par la flexibilité architecturale des domaines de liaison du récepteur viral qui semble évoluer de façon à diversifier son éventail de récepteurs cellulaires (Heald-Sargent *et al.*, 2012). Dans le cas des MHVs, ces virus possèdent deux domaines de liaison au récepteur, un en C-terminal et un deuxième en N-terminal, ce qui permet de développer indépendamment des liaisons à l'un ou l'autre des récepteurs. De fait, le sérotype MHV-JHM peut abroger son segment en N-terminal et éviter la fixation sur le CEACAM1 (Rowe *et al.*, 1997), ce qui réduit significativement sa neurovirulence (Phillips & Weiss, 2011).

1.5.4.2- La glycoprotéine S du MHV

La protéine S glycosylée reflète la diversité évolutive des coronavirus. Des différences de séquences, aussi mineures soient-elles, modulent les interactions avec le récepteur, les modes d'entrée du virus ainsi que le tropisme et la virulence.

La protéine S est synthétisée sous forme d'un précurseur qui est ensuite clivé par des protéases cellulaires en sous-unités S1 en N-terminal et S2 en C-terminal (Frana *et al.*, 1985; Sturman *et al.*, 1985). Cette modification post-traductionnelle est essentielle à la fonction de fixation/fusion de la

protéine S, la sous-unité S1 étant responsable de la fixation à la cellule-cible et la sous-unité S2 de l'activité de fusion membranaire (Kubo *et al.*, 1994). La sous-unité S1 contient deux sous-domaines, soient en N-terminal et en C-terminal (Belouzard *et al.*, 2012). La région responsable de la liaison au MHV est située dans les 330 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de celle-ci (Suzuki *et al.*, 1996). La sous-unité S2 est acétylée et contient deux motifs heptades répétés lui conférant une forme surenroulée (De Groot *et al.*, 1989). La sous-unité S2 est très conservée parmi les coronavirus tandis que la séquence de la sous-unité S1 diverge de façon très importante parmi les MHVs.

1.5.4.3- La glycoprotéine S du MHV et la fusion membranaire

La protéine S est considérée comme une protéine de fusion virale de type I, avec sa forme en hélice- α surenroulée caractéristique, similaire à celle de la HA du virus de l'influenza et de la Env du VIH (Bosch *et al.*, 2003). La protéine S polyglycosylée est responsable de la fusion entre les membranes virale et cellulaire et de la fusion inter-cellulaire. En effet, l'expression de la protéine S est suffisante pour induire la fusion de cellules exprimant les récepteurs appropriés (Taguchi *et al.*, 1993).

La fusion membranaire se déroule en plusieurs étapes. Un changement de conformation de la protéine S suite à la fixation au récepteur permet l'exposition des régions hydrophobiques du sous-domaine S2 contenant la protéine de fusion (Luo *et al.*, 1998). Initialement isolée au cœur d'un trimère d'hélices- α surenroulés dans une conformation pré-fusion très stable et résistante aux activités protéolytiques (Xu *et al.*, 2004), celle-ci se voit projetée vers la membrane plasmique de la cellule-cible lui permettant de s'y intégrer. Dans le cas de la plupart des sérotypes de MHV, dont le MHV-3, cette forme intermédiaire de la protéine S lui confère une susceptibilité nouvelle aux protéases cellulaires. Un deuxième changement de conformation se produit par le clivage des sous-unités S1 et S2, dès lors liées uniquement de façon non-covalente (Gombold *et al.*, 1993), permettant le rapprochement du peptide fusogénique avec le domaine transmembranaire de la protéine S formant ainsi un regroupement à six hélices. Cette nouvelle conformation de fusion permet le contact et le mélange lipidique des membranes cellulaires et virales (Belouzard *et al.*, 2012). De plus, la formation de syncytia par certains coronavirus est un moyen de favoriser la dissémination des virions à plusieurs cellules lors d'infections aiguës. Le clivage des sous-unités S1-S2 initie la fusion

intercellulaire sans pour autant affecter, ni positivement ni négativement, l'entrée virale selon des mécanismes encore mal compris (Heald-Sargent *et al.*, 2012).

La localisation cellulaire où se déroulent ses changements de conformations de la protéine S n'est pas très bien élucidée. De plus, celle-ci semble différer selon le sérotype de coronavirus (Kooi *et al.*, 1991), certains virus subissant ce clivage dans la cellule infectée par des sérines protéases de type furine au niveau du Golgi (Felicangeli *et al.*, 2006) ou plus tard par des ectoprotéases à la surface des cellules en infection, notamment les sérines protéases transmembranaires de type II (TTSPs) (Matsuyama *et al.*, 2010) ou encore des cystéines protéases L-cathepsine dans les endosomes (Heald-Sargent *et al.*, 2012).

1.5.4.4- La glycoprotéine S du MHV et l'endocytose

La majorité des coronavirus, dont le virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV), l'IBV, le MHV-2, le MHV-4 et le MHV-A59, le SRAS et le HCoV-229E (Van Hamme E, 2008; Chu *et al.*, 2006; Pu & Zhang, 2008; Nash & Buchmeier, 1997; Eifart P. *et al.*, 2007; Wang H. *et al.*, 2008; Blau & Holmes, 2001) exploitent différentes voies endocytaires pour infecter leurs cellules cibles (Heald-Sargent *et al.*, 2012). Par ailleurs, plusieurs études, dont une avec le SRAS (Wang *et al.*, 2008), démontrent que les coronavirus utilisent simultanément plusieurs voies d'endocytose pour l'entrée du virus afin d'optimiser l'infection (Heald-Sargent *et al.*, 2012). Plus récemment, Phillips et Weiss (2011) ont suggéré une autre alternative d'infection, soit la propagation indépendante du récepteur ou RIS (*Receptor independent spread*) chez le variant JHM.SD pour expliquer sa forte neurovirulence pour les neurones qui sont quasi dépourvus du récepteur CEACAM1 (Phillips & Weiss, 2011).

Plusieurs études ont démontré que l'ajout de cholestérol augmente l'infectivité du MHV *in vitro* (Daya *et al.*, 1988; Cervin & Anderson, 1991; Roos *et al.*, 1990). Un modèle murin de stéatose hépatique virale utilisant un variant du MHV-3 a permis de démontrer l'importance primaire du cholestérol dans la permissivité à l'infection. Chez les souris susceptibles BALB/c et, à un degré moindre, les souris résistantes A/J, l'infection par le MHV-3 induit des dépôts lipidiques importants dans le foie des souris infectées, notamment au niveau des hépatocytes (Bingen *et al.*, 1992). D'autre part, une diète hypercholestérolémique rend les souris A/J susceptibles à l'infection par le MHV-3 (Braunwald *et al.*, 1991). Tout comme le SRAS (Li *et al.*, 2007), l'importance du cholestérol se manifeste dans les étapes

initiales de l'infection par le MHV et non dans le relargage des particules virales (Thorp & Gallagher, 2004; Choi *et al.*, 2005). De fait, les auteurs notent une augmentation de l'adsorption des particules virales sur les hépatocytes et des titres viraux dans le foie de ces souris (Braunwald *et al.*, 1991). Par contre, cette corrélation entre le niveau de cholestérol et la réplication du MHV-3 n'est pas due à la modulation de la fluidité membranaire (Nonnenmacher *et al.*, 1994). Par ailleurs, aucun marqueur de radeaux lipidiques, riches en cholestérol, ne sont impliqués dans les étapes subséquentes du cycle viral du MHV (Choi *et al.*, 2005).

Le récepteur du MHV, la molécule CEACAM1a, est un récepteur bien connu pour son rôle dans l'endocytose de pathogènes dont l'internalisation est dépendante de l'intégrité des radeaux lipidiques (Voges *et al.*, 2012). De fait, la molécule CEACAM1a est localisée au sein de régions membranaires de haute densité au repos, mais migre vers les régions de faible densité *i.e.* dont les niveaux lipidiques sont plus importants, suite à sa liaison avec une molécule à la surface du pathogène. L'usage d'inhibiteurs de cholestérol tel que le nystatin réduit cette internalisation (Muenzner *et al.*, 2008). Cette mobilité du CEACAM1a semble également importante dans l'infection avec le MHV puisque la liaison de la protéine S du MHV-A59 se produit à l'extérieur des radeaux lipidiques mais induit son recrutement au niveau de ces microdomaines. La diminution de cholestérol membranaire réduit l'entrée virale sans pour autant affecter l'adsorption (Choi *et al.*, 2005). Par ailleurs, le cholestérol est essentiel à l'infection avec le MHV-A59 même en absence du récepteur CEACAM1a et l'ancrage de ce récepteur aux radeaux lipidiques par l'ajout de glycosylphosphatidylinoditol n'a, par contre, aucun effet sur la virulence (Thorp & Gallagher, 2004).

1.5.5. Transcription, traduction et assemblage des virus MHV

Suite à l'entrée du MHV et sa décapsidation par les enzymes endosomaux, l'ARN génomique (ARNg) du coronavirus est relargué et peut agir directement comme un ARNm permettant la traduction directe des premiers cadres de lecture, les ORF1a et ORF1b par les ribosomes cellulaires. Les polypeptides pp1a et pp1ab ainsi obtenus forment l'ARN polymérase ARN-dépendante virale, nommée réplacase (revue dans Baker *et al.*, 2009). Le polypeptide pp1ab est issu d'un décalage -1 du cadre de lecture, décalage caractéristique des coronavirus facilité par une structure secondaire en boucle et, dans le cas du MHV, par la séquence glissante CUA AAC. La réplacase du MHV subit par la suite des clivages post-traductionnels par les protéases virales encodées dans la polyprotéine 1ab,

À la rencontre de séquences régulatrices, la réplicase peut soit poursuivre sa lecture au-delà de celle-ci pour générer une matrice plus grande ou se dissocier du brin et poursuivre sa lecture au niveau du TRS de l'UTR 5' (Denison *et al.*, 2011). La séquence d'initiation en 5' de tous les ARNsg est identique à l'ARNg et s'intègre aux différents produits transcriptionnels par homologie de séquence (Zuniga *et al.*, 2004). Ces brins d'ARNsg sont par la suite transcrits en brins positifs nichés en 3' et contenant la séquence d'initiation. La majorité de ces ARNsg contiennent plus d'un gène de sorte que seul le premier ORF en 5' de chaque brin est finalement traduit (Lai *et al.*, 2001).

Peu d'études ont été réalisées concernant les molécules et voies de signalisation cellulaires favorisant la réplication des virus MHV. La MAPK p38 est fortement activée et phosphorylée dès les 5 premières minutes suivant l'infection des macrophages péritonéaux murins par le virus MHV-3 (McGilvray *et al.*, 1998). La voie ERK-1/2 MAPK est également activée entre 20 à 30 minutes post-infection. L'activation de la voie de la MAPK p38, mais non pas celle de la ERK-1/2, induit l'activation de la prothrombinase fgl-2 chez des macrophages infectés par le virus MHV-3. Cette enzyme est connue comme responsable de la coagulation intravasculaire au niveau des cellules endothéliales lors de l'hépatite aiguë (McGilvray *et al.*, 1998; Parr *et al.*, 1995). Par contre, chez les cellules de la lignée macrophagique J774A.1 infectées avec le sérotype faiblement hépatotrope MHV-A59, seule l'activation des MAPK p38 et JNK, et non pas celle de la ERK-1/2 MAPK, ont été observées après au moins 1 h post-infection (p.i.) (Banerjee *et al.*, 2002). Par ailleurs, le virus MHV-A59 préalablement traités avec les rayons UV n'a pas permis l'activation de ces voies de signalisation, démontrant le rôle essentiel de la réplication virale dans cette induction moins précoce. La phosphorylation de eIF4E et la production d'IL-6 seraient aussi dépendantes de l'activation de la MAPK p38 puisqu'il a été montré que l'inhibition de la voie MAPK p38 empêchait une synthèse adéquate des ARN viraux inhibant le facteur 4E de l'initiation de la transcription chez les eucaryotes (eIF4E) impliqué dans la traduction des ARNm (Waskiewicz *et al.*, 1999; Banerjee *et al.*, 2002).

La dernière étape de la replication virale est l'assemblage des virions et la formation de nucléocapsides hélicoïdales contenant l'ARN viral et la protéine N (Lai *et al.*, 2001). Ces nucléocapsides nouvellement formées se lient à la protéine M, uniquement présente au niveau du complexe Golgi-réticulum endoplasmique, et cette dernière forme la particule virale à l'aide de la protéine E. Quoique le rapport protéine M : protéine E peut être de l'ordre de 100 :1, la protéine E est essentielle au bourgeonnement des particules virales (Vennema *et al.*, 1996). Les protéines S et, le

cas échéant, HE sont incorporées aux particules virales via leur interaction avec la protéine M (Nguyen *et al.*, 1997; Opstelten *et al.*, 1995).

1.6. Les modèles d'hépatite aiguë induits pas les virus fortement hépatotrope MHV-3 et faiblement hépatotrope MHV-A59

Le MHV-3 est un excellent modèle murin pour l'étude de l'hépatite fulminante car cette infection entraîne la mort des souris génétiquement susceptibles, comme les souris C57BL/6 et BALB/c, généralement en 72 à 96 h (Le Prévost *et al.*, 1975). Bien que le virus MHV-3 soit lymphotrope (Lamontagne et Dupuy, 1984), neurotrope (Tardieu *et al.*, 1986) et hépatotrope (Taguchi *et al.*, 1986), le foie demeure l'organe principal pour la réplication du virus MHV-3 (Le Prévost *et al.*, 1975). Au niveau hépatique, les ARN viraux ont été détectés dès 24 heures d'infection par voie intrapéritonéale (i.p.) alors que les lésions hépatiques ont été observées dès 48 heures p.i. En plus de la nécrose hépatique, une immunodéficience apparaît également durant la phase aiguë de la maladie suite à une perte importante de cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes dont la rate, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et le thymus (Le Prévost *et al.*, 1975; Lévy-Leblond *et al.*, 1979). Par contre, les cellules T naïves ne possèdent pas le récepteur au virus MHV-3 et ne peuvent pas être infectées (Godfraind et Coutelier, 1998; Godfraind *et al.*, 1995a). Plusieurs facteurs déterminent la susceptibilité ainsi que la gravité de la maladie encourue par les souris infectées au MHV tels que l'âge, l'état immunitaire et la génétique de l'animal (Lamontagne et Dupuy, 1985; Lardans *et al.*, 1996). Néanmoins, certaines souris semi-susceptibles comme les souris C3H, A2G et SJL peuvent survivre à cette phase aiguë de l'infection pour ensuite développer une maladie neurologique chronique trois à quatre semaines suivant l'infection menant à une méningite, une épendymite, une encéphalite et la paralysie graduelle des membres inférieurs (Tardieu *et al.*, 1986). Ces souris peuvent souffrir de cette immunodéficience progressive jusqu'à 12 mois (Virelizier *et al.*, 1975).

Quant au sérotype MHV-A59, il est plutôt neurotrope induisant une démyélination chronique (Bender et Weiss, 2010), quoiqu'il puisse induire une hépatite faible à modérée (Mazaleuskaya *et al.*, 2012). Les souris susceptibles infectées avec le sérotype MHV-A59 par voie intracérébrale ou intranasale développent une méningo-encéphalite et une hépatite aiguë durant les deux premières semaines. Au bout de 8 à 10 jours le virus n'est plus détecté au niveau du foie et après 16 à 20 jours p.i., aucune

particule virale n'est détectable dans le cerveau des souris infectées (Lavi *et al.*, 1984; Matthews *et al.*, 2001). Le virus persiste néanmoins dans certaines cellules du système nerveux central et se réplique de façon très lente (Lavi *et al.*, 1984) de sorte qu'il induit une maladie neurologique chronique caractérisée par des lésions de démyélinisation qui peuvent persister plus de 6 mois (Matthews *et al.*, 2001; Rempel *et al.*, 2004).

1.6.1- Le tropisme cellulaire du MHV-3 et du MHV-A59.

Le MHV-3 infecte plusieurs types de cellules *in vitro* et *in vivo* notamment les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Quoique plusieurs types de cellules neuronales et lymphoïdes soient permissives à l'infection au MHV-3, dont les lymphocytes B et les cellules NK (Jolicoeur et Lamontagne, 1989; Lehoux *et al.*, 2004), les cellules de la microglie et les astrocytes (Tardieu *et al.*, 1986), ce virus hautement hépatotrope cible davantage le foie notamment par l'infection des hépatocytes, des KCs et des cellules endothéliales hépatiques (Taguchi *et al.*, 1986) qui expriment toutes le récepteur CEACAM-1a (Godfraind *et al.*, 1995; Lamontagne *et al.*, 1996). Plusieurs autres types de cellules exprimant le récepteur CEACAM1a sont susceptibles à l'infection au MHV-3 telles que les macrophages, les lymphocytes B et pré-B et les cellules dendritiques thymiques (Jolicoeur et Lamontagne, 1990; Godfraind *et al.*, 1998). Le MHV-3 se réplique de façon très importante dans les macrophages péritonéaux de souris susceptibles C57BL/6 formant de très larges syncytia (Schindler *et al.*, 1983; Lamontagne et Dupuy, 1984). Cette réplification ainsi que la formation de ces cellules multinucléées est très réduite lors d'étude *in vitro* sur des macrophages issus de souris semi-susceptibles C3H ou SJL (Virelizier et Allison, 1976).

Les cellules-cibles sont à peu près les mêmes pour le virus faiblement hépatotrope MHV-A59 puisque ce sérotype utilise aussi le récepteur CEACAM1a (Godfraind *et al.*, 1998). Contrairement au MHV-3, la souris SJL est totalement résistante à l'infection par le MHV-A59 car cette dernière possède l'allèle *b* plutôt que l'allèle *a* de la molécule CEACAM1a. Ces observations suggèrent que la différence dans le niveau d'hépatotropisme et la susceptibilité génétique entre le MHV-3 et le MHV-A59 ne dépend que partiellement de la nature du récepteur viral CEACAM1a. Le sérotype MHV-3 posséderait donc des propriétés, à date, non-identifiées, le rendant plus hépatotrope.

1.6.2- Pathologies et mécanismes d'immunodéficiences induites par le MHV-3 et le MHV-A59

La sensibilité de l'infection par le virus MHV-3, selon la lignée murine, ne dépend pas du niveau de réplication virale dans le foie (Lamontagne et Dupuy, 1985). Il a été suggéré que la résistance virale *in vivo* et *in vitro* était plutôt reliée à la permissivité des macrophages (Lamontagne et Dupuy, 1985). Effectivement, des différences fines ont été remarquées après 48 h p.i. *in vitro* au niveau des effets cytopathiques, de la viabilité cellulaire et des titres viraux chez les macrophages péritonéaux provenant de différentes lignées murines. Aussi, la plus faible réplication virale chez les macrophages de souris résistantes A/J dépendrait d'un contrôle cellulaire intrinsèque agissant probablement au niveau de la production de particules virales infectieuses (Lamontagne *et al.*, 1989a). Il a aussi été proposé que l'intégrité de la moelle osseuse serait primordiale dans la protection contre l'hépatite aiguë induit par le MHV-3 puisque chez les souris résistantes A/J, les désordres cellulaires et immunitaires dans la moelle osseuse et les différents organes lymphoïdes sont absents (Lamontagne *et al.*, 1989b; Jolicoeur et Lamontagne, 1994).

D'autre part, il a été démontré par Zhao *et al.* (2011) que la réplication du MHV-A59 dans les macrophages est essentielle à l'expression du faible hépatotropisme de ce sérotype mais non pas à son neurotropisme. Cet effet atténuateur de la pathogénicité du MHV-A59 pour le tissu hépatique serait déterminé par des événements après l'entrée virale dont la production d'IFN de type I. De plus, la protéine virale S est responsable de cette capacité du MHV-A59 à se répliquer dans le foie et à causer une hépatite (Navas *et al.*, 2001).

Par ailleurs, plusieurs variants atténués du MHV-3, infectant sélectivement différentes cellules hépatiques, ont été utilisés afin de distinguer le rôle de chaque type de cellules dans la progression de l'hépatite. Par exemple, le variant 51.6-MHV-3 n'infecte pas les LSEC et induit la mort des souris que 5 à 9 jours p.i., le variant CL12-MHV-3 n'infecte ni les LSEC ni les KC et les souris meurent 8 à 10 jours p.i. (Martin *et al.*, 1994). Le variant non-pathogène YAC-MHV-3 n'induit qu'une hépatite très faible et les souris récupèrent en moins de 15 jours p.i. (Lamontagne et Dupuy, 1984).

1.6.3- L'hépatite aiguë induite par le MHV-3 et le MHV-A59 et la réponse immune innée.

Les mécanismes de l'immunité innée activés dès les premiers jours de l'infection par le MHV-3 sont peu connus. Par contre, il a été montré que l'hépatite fulminante induite par le L2-MHV-3 entraîne un dérèglement des populations de cellules impliquées dans l'immunité innée, notamment en induisant la mort cellulaire des cellules NK1.1+ intrahépatiques et recrutées de la moelle osseuse car elle se sont avérées permissives à l'apoptose post-replication, ce qui n'est pas observé avec un variant non-pathogène, le YAC-MHV-3 (Lehoux *et al.*, 2004). De plus, l'infection par le L2-MHV-3 induit aussi l'apoptose des cellules NK-T du foie tandis que ces populations cellulaires sont épargnées lors de l'infection avec les variants atténués 51.6-MHV-3 et CL12-MHV-3, ce qui indique un rôle important pour les LSECs et les KCs dans le maintien d'une réponse immune innée efficace (Jacques *et al.*, 2008). Les cellules NK jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection au MHV-3 via la production d'IFN- γ et cette production est augmentée en présence d'IL-12 et IL-18 (Jacques *et al.*, 2009), qui sont produites majoritairement par les KCs au niveau du foie (Seki *et al.*, 2001).

La réponse immune innée dépend des patrons de reconnaissance des pathogènes, principalement de l'ARN simple brin ou double brin dans le cas des coronavirus puisque ces virus se répliquent dans le cytoplasme et génèrent de grandes quantités d'ARN double brin (Versteeg *et al.*, 2007). Le rôle des molécules TLR et des hélicases dans le processus d'hépatite aiguë induite par les MHV est très peu connu. Le TLR3, le TLR-7 et les hélicases peuvent alors être impliqués dans la détection de l'infection par les MHV mais très peu d'information est disponible à cet égard. Jacques *et al.* (2009) ont montré que le TLR2 était impliqué dans l'induction de cytokines inflammatoires par les macrophages infectés par le MHV-3. Le TLR-4 a aussi été impliqué dans la pathogénèse de l'infection respiratoire par le MHV-1 (Khanolkar *et al.* 2009). Le rôle du TLR-3 dans la pathogénèse de l'infection par le MHV-A59 n'a pas été encore clairement établi malgré le fait que le TLR-7 détecte le MHV-A59 dans les cellules dendritiques (Cervantes-Barragan *et al.*, 2007). D'autre part, il a été récemment montré que la stimulation des TLR2, TLR4 ou TLR7 n'affectait pas la production de MHV dans les macrophages J774A.1, mais que la pré-stimulation du TLR-3 par le poly I : C diminuait l'infection par le MHV-A59 et le MHV-3 dans ces macrophages via la production d'IFN- β . (Mazaleuskaya *et al.*, 2012). Aucune autre information n'est disponible sur les senseurs microbiens impliqués ou activés lors de l'hépatite aiguë induite par le MHV-3 ou le MHV-A59.

Il est bien connu que l'infection de souris susceptibles au MHV-3 induit une réponse importante caractérisée par un changement marqué du profil de production protéique dans le foie (Lucchiari *et al.*, 1992). Un des premiers éléments identifiés fût le TNF- α , son activité mesurée dans le sérum des souris étant significativement augmentée dès 24 h p.i. (Devictor *et al.*, 1992). Jacques *et al.* (2009) ont montré une induction rapide d'IL-6 et de TNF- α par des macrophages péritonéaux lors d'infection par le virus MHV-3 *in vitro*. Par contre, il a aussi été montré que les niveaux de cytokines anti-inflammatoires diminuaient dans le foie et ce, même en présence d'une diminution de cytokines pro-inflammatoires (Jacques *et al.* 2008). L'induction rapide du TNF- α et du IL-6 par des macrophages issus de la moelle osseuse est partiellement due à la fixation du virus, qu'il soit infectieux ou non, sur le TLR2 et l'héparane sulfate (Jacques *et al.*, 2009), suggérant un rôle important du TLR2 dans la réponse inflammatoire sous le contrôle des macrophages hépatiques ou ceux recrutés dans le foie. Par contre, cet effet du TLR2 dans l'induction de cytokines inflammatoires ne s'exprimait pas lorsque ces macrophages étaient infectés avec le sérotype MHV-A59 (Zhou *et al.*, 2012).

Un des facteurs important dans l'immunité innée anti-virale est la production d'IFN de type I. Le sérotype MHV-A59 est connu pour induire la production d'IFN de type I dans les macrophages infectés. Par contre, ce virus possède des mécanismes d'évasion au niveau de la transcription et de la traduction des gènes cellulaires anti-viraux induits par la fixation de l'IFN- β sur son récepteur IFNAR (revue dans Rose et Weiss, 2009). Le virus MHV-A59 est particulièrement résistant aux effets anti-viraux des IFN de type I selon la nature de la cellule-cible puisque les macrophages et les cellules dendritiques sont capables d'établir un état anti-viral suite à l'infection par le MHV-A59 au contraire des neurones, des astrocytes et des hépatocytes. Ce virus peut s'évader des mécanismes anti-viraux de ces interférons par diverses actions des protéines virales, tel que la nucléocapside et les protéines nsp 1 et 3 qui ont des effets antagonistes des IFN de type I. Par contre, l'infection par le MHV-A59 n'empêche pas la production de IFN de type I suite à la surinfection par d'autres virus, suggérant que le MHV-A59 est invisible aux senseurs intracellulaires (Veersteg *et al.*, 2007). Cette situation pourrait résulter du fait que les coronavirus possèdent une méthode d'évasion en se répliquant dans des vésicules à double membrane limitant alors la détection des ARN viraux par les senseurs intracellulaires. Par contre, la production d'IFN de type I par les cellules dendritiques dépend du TLR-7 et de la voie IRF-7 alors que les macrophages utiliseraient plutôt la voie MDA-5 (Roth-Cross *et al.*, 2008). Les effets antiviraux des IFN de type I contre l'infection par le MHV-3 ne sont que peu connus. Vassao *et al.* (1994) ont rapporté que l'activation des macrophages par le LPS ou des IFN- α n'induisait

pas un effet antiviral et une diminution de la réplication malgré la production des IFN de type I. De plus, l'IFN- β s'est avéré plus efficace que les IFN- α dans la résistance à l'infection par le MHV-3.

1.7 Problématique et hypothèses

Le modèle d'hépatite virale aiguë induite par le coronavirus hautement hépatotrope MHV-3 constitue un excellent modèle animal d'étude pour les dérèglements de l'immunité innée précoce aggravant les lésions hépatiques tout en favorisant une réplication virale importante. Les connaissances rapportées par cette revue de littérature montre que l'hépatotropisme des MHV diffère selon le sérotype et la nature de la cellule-cible. Compte tenu de la rapidité de l'hépatite fulminante induite par le sérotype MHV-3 comparée à celle provoquée par l'infection par le MHV-A59, il devient important d'étudier les mécanismes par lesquels le sérotype MHV-3 peut s'évader des facteurs de l'immunité innée précoce et entraîner une hépatite aiguë létale.

L'immunité innée anti-virale agissant dans les premières heures d'une infection est dépendante au départ de la détection et de la reconnaissance du pathogène. Les senseurs TLR endosomaux, tels les TLR-3 et TLR-7 ainsi que les hélicases RIG-1 et MDA-5 sont reconnus pour leur capacité à détecter la présence d'ARN simple et/ou double brin pouvant être généré par un coronavirus au cours des étapes de la réplication virale. Par contre, il a été mentionné que les coronavirus peuvent utiliser différentes voies d'entrée, telles que l'endocytose via la clathrine ou via la cavéoline ou d'autres voies encore mal identifiées ainsi que par leur capacité de fusion intercellulaire. Les voies d'endocytose peuvent varier selon le sérotype et la cellule-cible. Jacques *et al.* (2009) ont rapporté que le TLR2, un TLR présent à la surface de la cellule-cible, en association avec l'héparane sulfate, pouvait aussi être impliqué dans la fixation du sérotype hautement hépatotrope MHV-3 en plus du récepteur général des MHVs, la molécule CEACAM1a, ce qui n'est pas le cas du MHV-A59 (Zhou *et al.*, 2010). D'autre part, cette fixation du MHV-3 sur le TLR2 induisait rapidement la production d'IL-6 et de TNF- α par les macrophages, au contraire du MHV-A59. Cette augmentation rapide était aussi observable avec des virus MHV-3 non-infectieux, suggérant que la fixation du virus sur le TLR2 pourrait entraîner une autre voie de signalisation responsable de la production de ces cytokines inflammatoires qui n'est pas encore connue. Par contre, une réponse inflammatoire exagérée est connue pour entraîner des lésions hépatiques et aggraver la maladie plutôt que de favoriser les processus d'élimination virale.

D'autre part, il a été montré que la sensibilité à l'infection par les MHV variait selon les sérotypes et la nature de la cellule-cible, suggérant que le processus d'hépatite fulminante pourrait résulter de plusieurs mécanismes anti-viraux ou d'évasion virale produits simultanément dans les différentes cellules hépatiques lors des infections *in vivo*.

L'objectif principal des travaux réalisés pour ce mémoire est de déterminer quels sont les rôles du TLR2 dans l'induction de l'hépatite aiguë fulminante induite par le MHV-3 *in vivo* et dans la détection de l'entrée et de la réplication virale dans les macrophages et les hépatocytes *in vitro*.

Pour atteindre cet objectif, nous allons identifier au départ quels sont les éléments de l'immunité innée, tels les TLRs de surface et endosomaux et les hélicases, les cytokines inflammatoires, les chimiokines et l'IFN de type I, dont la transcription et la traduction sont activées dans le foie de souris C57BL/6 infectées par le virus MHV-3 et aussi dans celui des souris dont le gène du TLR2 a été inactivé (souris *tlr2^{-/-}*). Fort de ces résultats, l'importance des cellules macrophagiques dans la virulence du sérotype hautement hépatotrope MHV-3 par rapport au sérotype faiblement hépatotrope MHV-A59 sera déterminée en fonction des paramètres de la réplication virale et de l'activation des différents éléments de l'immunité innée, de leur capacité à se fixer sur le TLR2 et/ou le CEACAM1a, à moduler les voies d'endocytose en fonction de cette fixation, et à induire des cytokines inflammatoires et/ou de l'IFN- β . Finalement, l'importance des hépatocytes infectés par le virus MHV-3 dans la réponse innée de ces cellules sera évaluée en fonction de leur permissivité à l'infection virale, à l'activation des TLRs et des hélicases et à la transcription et traduction des cytokines inflammatoires, des chimiokines et de l'IFN- β .

Matériel et méthodes

2.1. Animaux

Les souris C57BL/6 proviennent de la compagnie Charles River Laboratories (St-Constant, Qc, Canada) alors que les souris *tlr2*^{-/-} proviennent de Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA, É.-U.). Les animaux ont été certifiés « *exempts de MHV* » par les manufacturiers et ont été hébergés dans une salle de niveau de confinement 2 avec une atmosphère stérilisée par un filtre HEPA (Forma Scientific, Marietta, OH, É.-U.). Des souris femelles âgées de 8 à 12 semaines ont été utilisées pour chaque expérience. Les études effectuées ont été approuvées en rapport avec les règlements du comité Comité Institutionnel de la Protection des Animaux (CIPA) de l'Université du Québec à Montréal.

2.2. Cellules

2.2.1. Cellules L2

Les cellules L2, une lignée fibroblastique provenant de souris C3H, ont été utilisées pour la production du MHV-A59 et du L2-MHV-3 et pour les titrages. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de L-glutamine (2 mM), d'antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine) (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD, É.-U.) et 5% de sérum de veau foetal (SVF) (Gemini Bio-Products, Woodland, CA, É.-U.).

2.2.2. Cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7

Les lignées macrophagiques murines J774A.1 (TIB-67™) et RAW 264.7 (TIB-71™) proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC®) (Manassas, VA, É.-U.). Ces cellules ont été mises en culture dans du milieu RPMI 1640 additionné de L-glutamine (2 mM), d'antibiotiques (100 U/ml pénicilline and 100 mg/ml de streptomycine) (GIBCO Laboratories) et de 5% SVF (Gemini Bio-Products). Ces cellules ont subi des passages par dilution de 1 :10 avant d'atteindre 80% de confluence et toutes les expériences ont été effectuées sur des cellules ayant subi moins de dix passages.

2.2.3. Cellules FL83B

La lignée hépatocytaire murine FL83B (CRL-2390™) provenant de l'ATCC® (Manassas, VA, É.-U.) a été mise en culture dans du milieu Ham's F-12K (Kaighn's) (GIBCO Laboratories) supplémenté de 5% SVF (Gemini Bio-

Products). Les cellules ont subi des passages par dilution 1 :5 avant d'atteindre 80% de confluence et toutes les expériences ont été effectuées sur des cellules à moins de dix passages.

2.3. Virus

2.3.1. Souches virales

Le virus fortement hépatotrope L2-MHV-3 provient d'une souche isolée du foie d'une souris DBA2 infectée (Dupuy et Rodrigue, 1981) et clonée sur des cellules L2. Les propriétés pathogéniques du MHV-3 ont été vérifiées régulièrement lors de l'expérimentation et toutes les infections *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées à partir du même lot viral. Le virus MHV-A59 a été gracieusement fourni par Dr P. J. Talbot (INRS-Santé, Université du Québec, Laval, Qué. Canada). Les cellules L2 ont été utilisées pour la production du MHV-A59 et du L2-MHV-3. Ces cellules ont été infectées avec une multiplicité d'infection (m.o.i.) de 0,01 à 0,1. Lorsque les effets cytopathiques (ECP), caractérisés par la lyse cellulaire et la formation de syncytia, avaient atteint 50% de la monocouche cellulaire, les cellules L2 infectées étaient congelées à -80°C. Suite à deux cycles de décongélation/congélation, les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation de 10 minutes à 2000g. Le surnageant, contenant les virions infectieux, a été récupéré, titré sur cellules L2, aliquoté puis congelé à -80°C avant d'être utilisé dans les infections *in vivo* et *in vitro*. Des cellules L2 non-infectées ont aussi été préparés de façon similaire et utilisé comme contrôles dans les infections *in vitro*.

2.3.2. Titrage des virus

Les foies de souris infectées et les surnageants de cellules infectées ont été conservés à -80°C jusqu'au moment du titrage. Les surnageants des foies broyés dans du milieu RPMI 1640 et les surnageants de cellules infectées ont été dilués en série de 10, de 10^{-1} à 10^{-8} , dans du milieu RPMI 1640 additionné de 5% SVF et ajoutés à des cellules L2 mises en plaque de 96 puits à une concentration de 5×10^4 cellules par puits. Les titres viraux ont été déterminés 72 h p.i. par l'observation d'ECP tels que la formation de syncytia et la lyse cellulaire et le titre a été calculé selon la méthode de Reed-Muench et exprimé sous forme du \log_{10} $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$.

2.4. Infections virales chez les souris

2.4.1. Infections *in vivo* des souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-}

Des groupes de 5 ou 6 souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} ont été infectées avec 1000 DICT₅₀ des virus MHV-A59 ou L2-MHV-3 par voie intrapéritonéale (i.p.) dans un volume de 25µl. Les souris contrôles ont reçu un volume similaire de PBS. À différents temps post-infection (p.i.), les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂ et leur foie prélevé et congelé à -80°C. Des échantillons sanguins ont été prélevés afin de pouvoir faire le dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) dans le sérum des souris, selon la procédure primaire de l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) et en utilisant un autoanalyseur AU2700 (Olympus Optical, Rungis, France). Des tranches de 5mm de fragments de foie fixées et enrobées dans la paraffine ont été colorées avec l'hématoxyline/éosine/safran et examinées sous microscopie optique. Les dosages des transaminases et les coupes de foie colorées ont été réalisés par l'équipe de Dr. Michel Samson, de l'Université de Rennes 1 (Bretagne, France).

2.4.2. Infections virales *in vitro*

Les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 ou les cellules hépatocytaires en lignée FL83B ont été infectées avec les sérotypes MHV-A59 et/ou MHV-3 à un m.o.i de 0.1 ou 5 selon la durée des expériences dans un milieu complet frais approprié à un volume minimal pour les deux premières heures lorsque le temps d'infection total était de quatre heures ou plus. A différents temps p.i., les surnageants ont été récupérés pour les titrages et/ou pour des tests ELISA et congelés à -80°C et l'ARN a été extrait des cellules pour des analyses subséquentes par qRT-PCR. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

2.5. La quantification relative des d'ARNm par la technique RT-PCR en temps réel

L'ARN total des foies de souris a été extrait à l'aide du TRIzol® (Ambion®, Austin, TX) selon les indications du fabricant. L'ARN a été par la suite traité avec de la DNase à l'aide du kit *Turbo DNA-free* (Ambion®, Austin, TX) selon les instructions du fabricant.

L'ARN total des cellules en culture a été extrait à l'aide du kit *NucleoSpin*[®] ARN II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Allemagne) à différents temps p.i., selon les expériences, et l'ADNc a été généré par transcription inverse à partir de 1 µg d'ARN avec le kit *High-capacity cDNA Anti-sens Transcription* (Applied Biosystems[™], Foster City, CA). La réaction PCR est effectuée avec 25 ng d'ADNc à l'aide du kit HotStart-IT[™] SYBR[®] Green qPCR Master Mix (2X) (USB Corporation, Cleveland, OH) et 300 nM de chacune des paires d'amorces listées au tableau I (IDT DNA Technologies). Le PCR en temps réel a été effectué à l'aide de l'appareil Applied Biosystems 7500[®]. Les valeurs seuils ont été normalisées au niveau de l'ARN du gène de ménage le plus stable, soit de l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT) et l'analyse de la quantification relative a été effectuée selon la méthode $\Delta\Delta C_T$. Les niveaux d'augmentation de l'expression d'un gène spécifique ont été établis relativement aux niveaux des cellules non-infectées et/ou non-traitées selon les expériences. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

2.6. Détermination de la sécrétion de cytokines, des chimiokines et de l'IFN par des tests ELISA

2.6.1. Dosage des cytokines dans le foie

Les niveaux des cytokines IL-6 et TNF- α , produits dans le foie des souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} infectées *in vivo* ont été évalués par des tests ELISA BD OptEIA selon les indications des manufacturiers (BD Biosciences, San Diego, CA).

2.6.2. Dosages des cytokines, IFN- β et chimiokines dans les surnageants de cellules

Les niveaux des cytokines IL-6, TNF- α et de l'IFN- β sécrétés par les cellules infectées *in vitro* ont été évalués par des tests ELISA BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA, É.-U.) et PBL Interferon Source (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ) selon les indications des manufacturiers. Les niveaux de chimiokines CXCL-1, CXCL-10 et CCL2 sécrétés par les hépatocytes en culture ont été déterminés par les tests *Platinum* ELISA (CXCL1 et CXCL10) ou ELISA *Ready-SET-Go!*[®] (CCL2) selon les indications des manufacturiers (eBioscience, San Diego, CA, É.-U.). Les expériences ont été réalisées en triplicata.

2.7. Dosage de la MAPK p38 non-phosphorylée et phosphorylée

Les cellules J774A.1 ont été mises en culture dans des microplaques de 24 puits à une concentration de 3×10^4 cellules par puits et infectées le lendemain avec les virus MHV-A59 ou MHV-3 à un m.o.i. de 5 pour des durées de 5, 15, 30, 45 ou 60 minutes. Les niveaux de phosphorylation de la MAPK p38 (T180/Y182) des cellules infectées *in vitro* ont été évalués par un test ELISA *ONE™* (TGR BioSciences, Australie) selon les indications des manufacturiers et exprimés en pourcentage de p38 phosphorylé/ p38 total par rapport au contrôle cellulaire. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

2.8. Traitements des cellules avec agonistes de TLR2, des inhibiteurs des voies d'endocytose ou de la phosphatase SHP-1 et/ou avec des anticorps anti-TLR2

2.8.1. Produits et anticorps

Les ligands bactériens synthétiques du TLR2-TLR1 (Pam₃CSK4) et TLR2-TLR6 (Pam₂CSK4) proviennent de InvivoGen (San Diego, CA, É.-U.). Le sodium stibogluconate (567565), un inhibiteur de la phosphatase SHP-1 a été obtenu de la compagnie EMD Biosciences (San Diego, CA, É.-U.). Le cholestérol hydrosoluble (C4951), le sel de chloroquine diphosphate (C6628), la chlorpromazine hydrochloride (C8138), le nystatin (N6261) et le dynasore (D7693) proviennent de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). L'anticorps monoclonal neutralisant anti-TLR2 (CD282) a été utilisé à une concentration de $1\text{g}/10^6$ cellules (eBioscience, San Diego, CA, É.-U.)

2.8.2. Traitements des cellules avant infection

Les cellules J774A.1 et RAW264.7 ont été mises en culture en microplaques de 24 puits à 5×10^5 cellules par puit, 18 h avant le début des traitements. Les cellules ont été préalablement lavées avec du PBS 1X froid et traitées avec des concentrations optimales des différents inhibiteurs ou de l'anticorps monoclonal anti-TLR2 dilués dans du milieu RPMI complet frais à des temps optimaux avant l'infection : anticorps α -TLR2 (2h; $1\mu\text{g}/10^6$ cellules), nystatin (30 minutes; $12,5\mu\text{g}/\text{ml}$), chloroquine diphosphate (30 minutes; $50\mu\text{M}$), chlorpromazine (30 minutes; $10\mu\text{g}/\text{ml}$), dynasore (30 minutes; $80\mu\text{M}$), sodium stibogluconate (15 minutes; $10\mu\text{g}/\text{ml}$). Des cellules ont aussi été préalablement traitées avec des ligands du TLR2 Pam_{2/3}CSK4 à une concentration de $1,5\mu\text{g}/\text{ml}$ ou avec du cholestérol hydrosoluble à $0,1\text{mM}$ en présence ou non de nystatin. Des tests MTS/PMS de viabilité cellulaire par colorimétrie ont été effectués parallèlement à toutes les conditions expérimentales. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

2.9. Atténuation de l'expression génique par traitement aux petits ARN interférants

Dans certaines expériences, des traitements avec des petits ARN interférants (siRNA) pour les gènes TLR2 et/ou CEACAM1a ont été effectuées. Les cellules J774A.1 et FL83B ont été mises en culture dans des microplaques de 24 puits à 6×10^4 cellules par puits et traitées à 25nM des FlexiTube siRNA premix Mm_Ceacam1_3 (Séquence ciblée : CCACTCATGCATTCCTACTA) et/ou Mm_Tlr2_4 (Séquences ciblées : CTCGTTCTCCAGCATTTAAA) (Qiagen®, Cambridge, MA, É.-U.) pendant 6 h selon les indications du manufacturier. Des contrôles siRNA positifs et négatifs, Ctrl_AllStars_3 (S104939025) et (AllStars Negative Control siRNA (1027280) (Qiagen®, Cambridge, MA, É.-U.) respectivement, ont été ajoutés à toutes les expériences de transfection avec les siRNA. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

2.10. Analyses statistiques

Les expériences *in vivo* et *ex vivo* ont été effectuées avec des groupes de 5 ou 6 souris, selon les expériences, alors que les expériences *in vitro* ont été effectuées en duplicata, triplicata ou quadruplicata. Les niveaux d'ARNm pour chacun des gènes testés en RT-PCR en temps réel et les niveaux de cytokines et IFN- β présents dans le foie en provenance de souris infectées ont été comparés à ceux observés avec les souris contrôles et analysés par un test ANOVA à une variable (PAWS Statistics base, SPSS, Microsoft Corp). Les résultats des expériences *in vitro* sur des cellules en culture infectées et/ou traitées, selon les expériences ont été comparés avec ceux des cellules non-traitées et/ou non-infectées. L'analyse statistique des différences entre la moyenne des groupes a été réalisée par un test *t* de Student (Excel, Microsoft Corp). Tous les résultats sont exprimés en termes de moyennes \pm erreurs-types. Pour tous les tests statistiques effectués, le seuil de signification a été établi à $p < 0.05$.

TABLEAU I : Liste des paires d'amorces utilisées pour les tests de qRT-PCR.

Gène	Séquence des amorces
HPRT	Sens : 5'-GAAAGACTTGCTCGAGATGTCATG-3'
	Anti-sens : 5'-CACACAGAGGGCCACAATGT-3'
Nucléocapside MHV	Sens : 5'-TGGAAGGTCTGCACCTGCTA-3'
	Anti-sens : 5'-TTTGGCCACGGGATTG-3'
CEACAM1	Sens : 5' -CTGCCCTGGCGCTTGG A -3'
	Anti-sens : 5' -TACATGAAATCGCACAGTCGC -3'
IL-6	Sens : 5'-TCGGAGGCTTAATTACACATGTTC -3'
	Anti-sens : 5'-TGCCATTGCACAACCTTTTTCT-3'
TNF- α	Sens : 5'-TCCCAGGTTCTCTTCAAGGGA-3'
	Anti-sens : 5'-GGTGAGGAGCACGTAGTCGG-3'
IRF-3	Sens : 5'-CAAGGACGGAGCCGTGTT-3'
	Anti-sens : 5'-TCCATGAAGGCAATCAGATCTG-3'
IRF-7	Sens : 5'-AAATGCTGGGCTCCAAACC-3'
	Anti-sens : 5'-GAGGTCCCCGGCATCAC-3'
IFN- β	Sens : 5'-CGGACTTCAAGATCCCTATGGA-3'
	Anti-sens : 5'-TGGCAAAGGCAGTGTAACCTCTTC-3'
MDA5	Sens : 5'-GCCCTCTCCTCCTCTGAGACT-3'
	Anti-sens : 5'-GCTGGAGGAGGGTCAGCAA-3'
RIG-1	Sens : 5'-GCCAGAGTGTCAGAATCTCAGTCAG-3'
	Anti-sens : 5'-GAGAACACAGTTGCCTGTGCTCA-3'
TLR2	Sens : 5'- CCCTGTGCCACCATTTC -3'
	Anti-sens : 5'- CCACGCCACATCATTCTC -3'
TLR-3	Sens : 5'-TGGGCTGAAGTGGACAAATCT-3'
	Anti-sens : 5'-TGCCGACATCATGGAGGTT-3'
TLR-4	Sens : 5'- AGCTTCAATGGTGCCATCATT -3'
	Anti-sens : 5'- CCAGGTGCTGCAGCTCTTCT -3'
TLR-7	Sens : 5'-CAGTGAACCTCTGGCCGTTGA-3'
	Anti-sens : 5'-CAAGCCGGTTGTTGGAGAA-3'

Résultats

3.1. Le rôle du TLR2 dans l'activation de la réponse innée lors de l'hépatite aiguë induite par le virus MHV-3.

Le virus L2-MHV-3 est le sérotype le plus virulent des virus MHV puisqu'il induit une hépatite fulminante menant à la mort des souris susceptibles en 3 à 5 jours p.i. (Le Prévost *et al.*, 1975). Jacques *et al.* (2009) ont montré que le L2-MHV-3 se liait au TLR2 en plus du récepteur des MHV, le CEACAM1a, et que la liaison du virus à ce récepteur additionnel était impliquée dans la réponse pro-inflammatoire. Afin de vérifier le rôle *in vivo* de cette propriété du virus MHV-3 à se fixer sur le TLR2 dans le développement de l'hépatite aiguë, des souris susceptibles C57BL/6 et des souris dont le gène du TLR2 a été inactivé (souris *tlr2*^{-/-}) ont été infectées avec le virus L2-MHV-3 et euthanasiées à 24, 48 ou 72 h p.i. Les lésions histopathologiques, le dosage des transaminases hépatiques AST/ALT, les titres viraux dans le foie et les niveaux d'induction des gènes des senseurs microbiens, des IFNs, des cytokines et des chimiokines dans les premiers jours de l'infection ont été comparés entre les souris C57BL/6 et les souris *tlr2*^{-/-}.

3.1.1. La présence du TLR2 augmente la réplication virale du L2-MHV-3 et la sévérité des dommages hépatiques précoces.

Les souris *tlr2*^{-/-} infectées avec le L2-MHV-3 n'ont pas montré de symptômes cliniques durant les 72 h de l'infection alors que la plupart des souris C57BL/6 infectées ont montré des signes évidents de ralentissement d'activité, d'arrondissement du dos et de légère déshydratation. Afin de vérifier si les dommages hépatiques peuvent être modulés par l'activité du TLR2, les altérations tissulaires chez les souris *tlr2*^{-/-} par rapport aux souris de la lignée C57BL/6 ont été évaluées. Les foies de ces souris ont été fixés et des coupes paraffinées ont été colorées avec l'hématoxyline/éosine/safran. L'image de la section I-B de la figure 7 révèle des régions de nécrose et d'amas des hépatocytes beaucoup plus étendues chez les souris C57BL/6 infectées depuis 72 h avec le virus L2-MHV-3 comparativement aux souris non-infectées (Fig. 7, section I-A). Des noyaux pycnotiques ou apoptotiques sont aussi visibles dans ces zones de nécrose. Une infiltration cellulaire modérée est observée dans les régions non-nécrosées. À l'opposé, ces zones de nécrose ne sont pas évidentes chez les souris *tlr2*^{-/-} et la structure des hépatocytes est normale malgré une infiltration cellulaire et une légère vasodilatation (Fig. 7, section I-D par rapport à C).

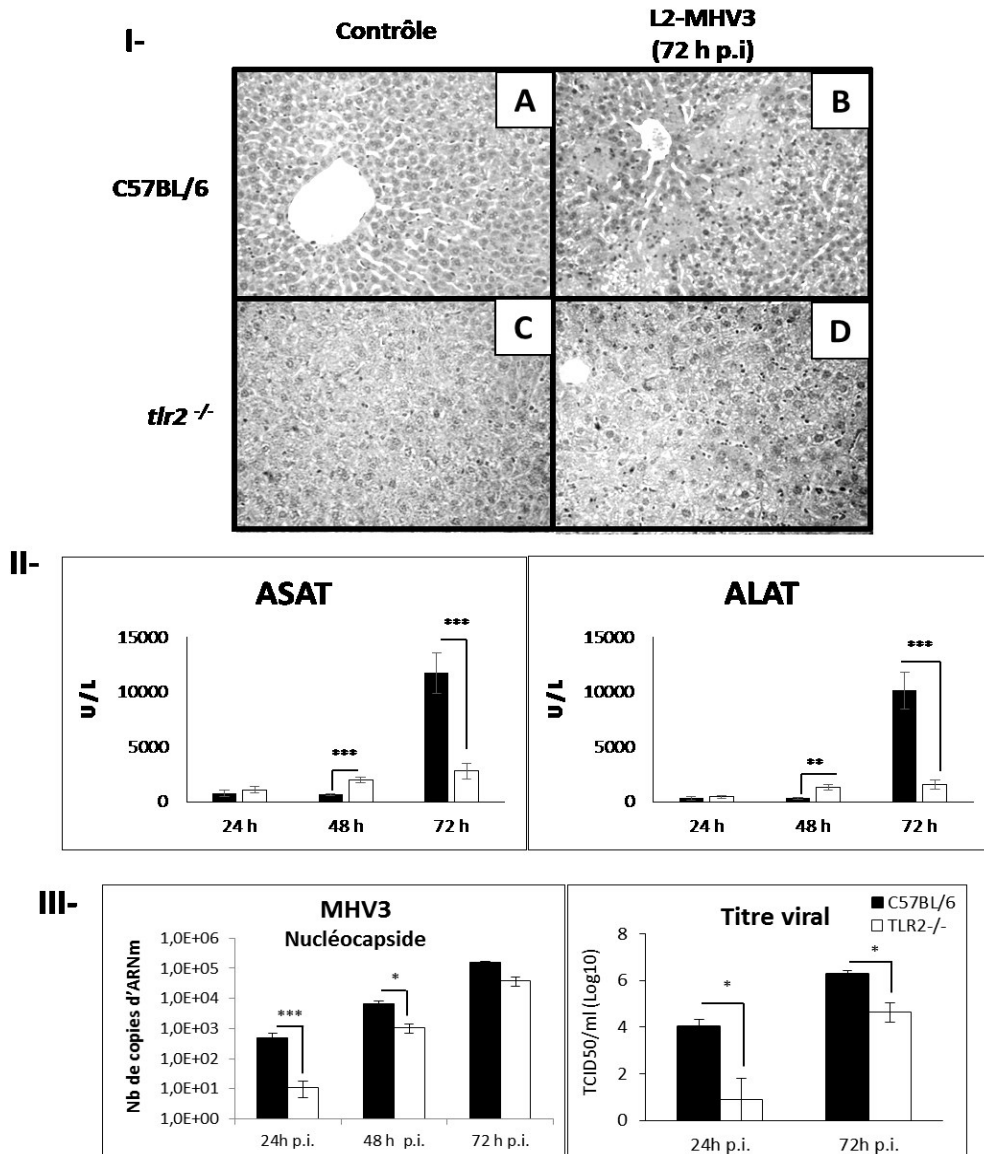


Figure 7: Histopathologie (section I), niveaux sériques des transaminases ASAT/ALAT (section II), niveaux de transcription du gène de la nucléocapside (N) du virus MHV-3 et titres viraux (section III) dans le foie de souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} infectées avec le L2-MHV-3. Des groupes de 5 ou 6 souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} ont été infectées avec 1000 DICT₅₀ du virus L2-MHV-3 par voie i.p. Les souris contrôles ont reçu un volume identique de PBS. À différents temps p.i., les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂ et leur foie prélevé. Les coupes histologiques de foie ont été colorées à l'hématoxyline/éosine/safran. Les niveaux sériques des transaminases ASAT/ALAT ont été évalués par un test selon les méthodes désignées par l'IFCC. L'ARN total du foie a été extrait par la méthode du trizol et les niveaux d'ARN du gène viral N ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta\text{CT}$ sur la base des niveaux dans le foie de souris contrôles. Les particules virales infectieuses ont été titrées par la technique de dilutions décimales sur des cellules L2 et les résultats exprimés en DICT₅₀/ml. Les résultats représentent la moyenne des individus du groupe et leur erreur type. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par rapport aux souris contrôles non-infectées.

Le dosage des niveaux sériques des transaminases ASAT et ALAT révèle une très forte augmentation chez les souris C57BL/6 à 72 h p.i. par rapport aux souris *tlr2*^{-/-} infectées ($p \leq 0.001$) (Fig. 7, section II). Par contre, les souris *tlr2*^{-/-} ont atteint des niveaux légèrement plus élevés à 48 h p.i. que les souris C57BL/6, mais ces niveaux n'ont pas augmenté à 72 h p.i. ($p \leq 0.001$ et 0.01). Ces résultats confirment que les dommages hépatiques se sont aggravés entre 48 et 72 h p.i. chez les souris C57BL/6 par rapport à ceux observés chez les souris dépourvues du récepteur TLR2.

La réplication virale dans le foie de souris C57BL/6 et de *tlr2*^{-/-}, telle que mesurée par les niveaux d'ARN du gène de la nucléocapside (N-MHV) par qRT-PCR de 24 à 72 h p.i. et par le titre viral à 24 et 72 h p.i., par la méthode de dilution décimale sur cellules L2, a été plus fortement augmentée dans le foie de souris C57BL/6 par rapport à celui des souris *tlr2*^{-/-} dès 24 h p.i. ($p \leq 0.001$), quoique cette différence a été amenuisée à 48 h p.i. ($p \leq 0.01$). Les titres de virus ont aussi suivi la même évolution puisque ces titres ont été plus élevés à 24 et à 72 h p.i. chez les souris C57BL/6 par rapport à ceux atteints par les souris *tlr2*^{-/-} ($p \leq 0.05$) (Fig. 7, section III). Ces résultats démontrent que l'absence du récepteur TLR2 chez les souris transgéniques réduit la réplication virale du L2-MHV-3 et diminue la sévérité des dommages hépatiques.

3.1.2. Le TLR2 est transcrit chez les souris C57BL/6 infectées par le virus L2-MHV-3 mais n'a aucun effet sur les faibles niveaux de transcription des autres senseurs viraux.

La protection partielle chez les souris *tlr2*^{-/-} contre la sévérité de l'hépatite pourrait résulter d'une activation accrue des senseurs viraux de l'immunité innée, tels que les récepteurs endosomaux TLR-3 et -7 et les hélicases intracytoplasmiques MDA5 et RIG-I. Afin de vérifier cette hypothèse, des souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} ont été infectées avec le virus L2-MHV-3 et l'ARNm a été extrait de leur foie à 24, 48 et 72 h p.i. Des groupes de souris non-infectées ont aussi été étudiés. Les niveaux d'induction génique des différents senseurs viraux et des TLR2 et -4 de surface ont été déterminés par qRT-PCR. La figure 8A montre une forte augmentation de la transcription du gène du TLR2 dans le foie les souris C57BL/6 infectées dès 24 h p.i. jusqu'à 72 h p.i. par rapport aux souris non-infectées ($p \leq 0.01$ à 0.001) et cette transcription s'accroît significativement entre chacun des temps p.i. ($p \leq 0.001$). Par contre, la transcription du TLR-4 n'a pas été significativement induite à aucun temps p.i. et aucune différence n'a été observée entre les souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} infectées (Fig. 8B). La transcription du gène du TLR-3 a été plus importante chez les souris C57BL/6 infectées seulement à 24 h p.i. ($p \leq 0.001$) (Fig. 8C) quoique cette transcription ait été légèrement

augmentée chez les deux groupes de souris ($p \leq 0.01$). Le TLR-7 a été induit plus rapidement dans les souris C57BL/6 infectées à 24 h p.i. ($p \leq 0.05$), mais de façon temporaire puisqu'à 72 h p.i. l'induction a été plus importante chez les souris *tlr2*^{-/-} ($p \leq 0.01$) (Fig. 8D) quoique les niveaux étaient faibles. L'hélicase RIG-I a été fortement induite lors de l'infection des souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} par rapport aux souris non-infectées (niveau de base à 1)(Fig. 8E) de même pour le MDA5 qui a été induit de façon similaire pour les deux types de souris sauf à 48 h p.i. où l'induction a été momentanément plus importante chez les souris *tlr2*^{-/-} ($p \leq 0.05$) (Fig. 8F). Ces résultats démontrent que le TLR2 est le seul récepteur de surface de l'immunité innée à être fortement transcrit lors de l'infection par le virus L2-MHV-3 et que son absence n'a que peu d'effets sur les niveaux de transcription des gènes des autres senseurs viraux. De plus, les niveaux de transcription des TLRs endosomaux et du MDA5 sont demeurés très faibles chez les deux groupes de souris, suggérant l'existence possible d'un mécanisme d'évasion de ces senseurs viraux par le L2-MHV-3.

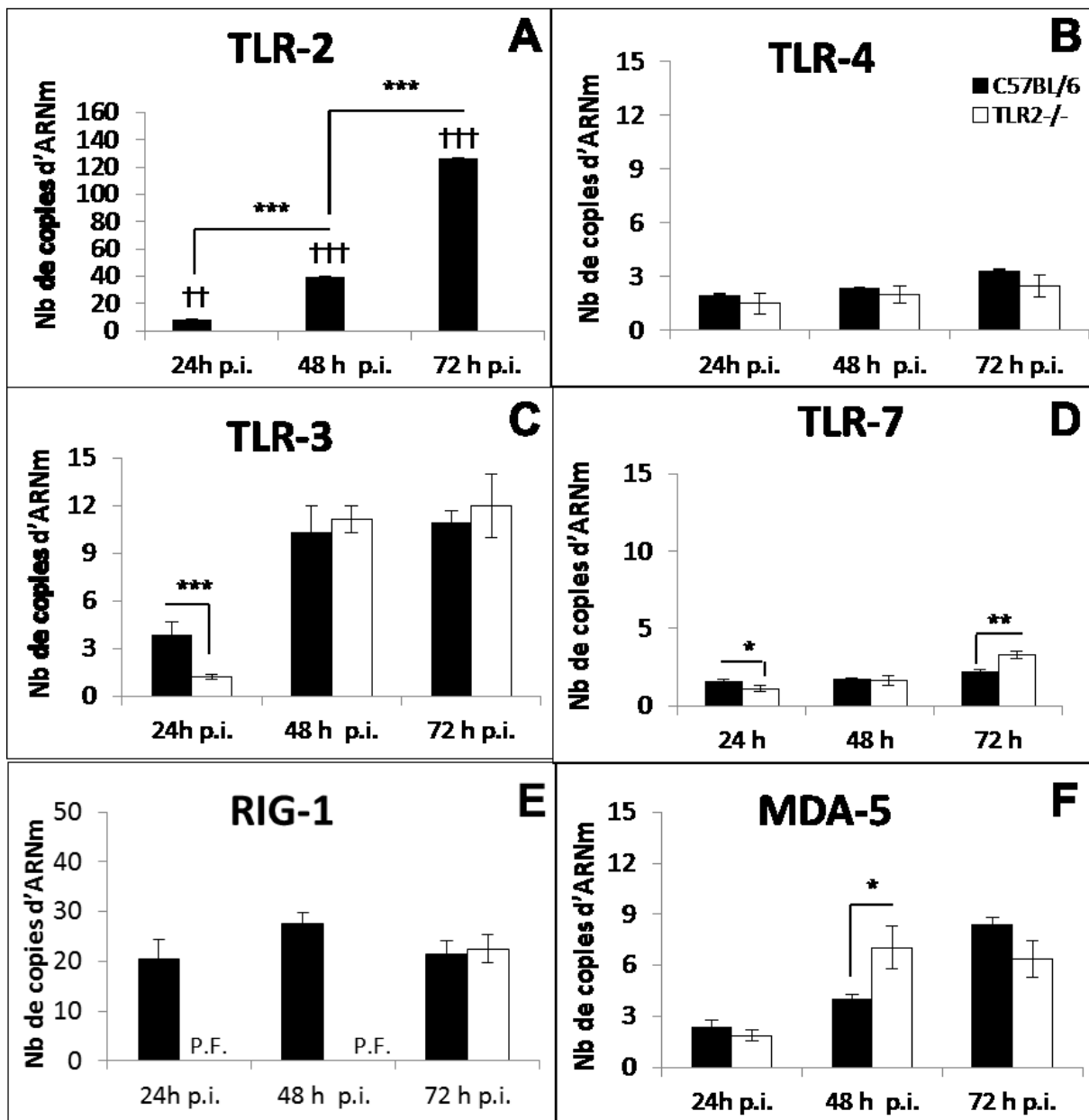


Figure 8: Cinétique des niveaux d'expression génique des TLR2, 3, 4, 7 (A à D) et des hélicases RIG-I (E) et MDA-5 (F) dans le foie de souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} infectées avec le virus L2-MHV-3. Des groupes de 5 ou 6 souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} ont été infectées avec 1000 DICT₅₀ du virus L2-MHV-3 par voie i.p. Les souris contrôles ont reçu un volume identique de PBS. À différent temps p.i., les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂ et leur foie prélevé. L'ARN total du foie a été extrait par la méthode du trizol et les niveaux d'ARN cellulaire ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des niveaux dans le foie de souris contrôles. Les résultats représentent la moyenne des individus du groupe et leur erreur type. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ lorsque comparés entre types de souris infectées et †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$ par rapport aux souris contrôles non-infectées.

3.1.3. L'activation du TLR2 par le virus L2-MHV-3 augmente faiblement le niveau de transcription de l'IFN- β via la voie IRF-7.

Le sérotype MHV-A59 est connu pour posséder des mécanismes d'évasion de la réponse anti-virale particulièrement par le blocage des IFNs de type I (α et β) (revue dans Rose et Weiss, 2009). Afin de vérifier si la plus forte réplication virale du L2-MHV-3 chez les souris C57BL/6 est consécutive à une perturbation de la réponse IFN de type I via son activation du TLR2, des souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} ont été infectées avec L2-MHV-3 et leur foie prélevé à 24, 48 et 72 h p.i. L'ARNm du foie des souris a été extrait et les niveaux d'induction des gènes de l'IFN- β et des facteurs de transcription IRF-3 et -7 ont été quantifiés par qRT-PCR. La figure 9A montre que les souris infectées dépourvues du récepteur TLR2 ont engendré une plus faible transcription du gène de l'IFN- β que les souris infectées C57BL/6 possédant ce récepteur, et ce, à tous les temps p.i. ($p \leq 0.01$ à 0.001). Par ailleurs, la transcription du gène de l'IRF-7 a été augmentée chez les deux groupes de souris infectées à 48 et 72 h p.i. par rapport au niveau de 24 h p.i. ($p \leq 0.01$ et 0.001). Par contre, les différences entre les niveaux de transcription du gène de l'IRF-7 chez les deux groupes de souris ne se sont pas avérées clairement significatives (Fig. 9C). La traduction de l'IRF-3 n'a été que très légèrement augmentée chez les souris *tlr2*^{-/-} infectées à 24 et 48 h p.i. ($p \leq 0.05$ à 0.01) (Fig. 9B) et le niveau de transcription est demeuré très faible tout au long de l'infection. Les niveaux d'induction de l'IFN- α ont été très faibles et se sont avérés non-significatifs chez les deux groupes de souris peu importe le temps p.i. (résultats non-montrés). Ces résultats indiquent que la capacité du L2-MHV-3 à induire la transcription du gène de l'IFN- β est très faible et que la présence du TLR2 n'a qu'un effet stimulateur faible sur la transcription du gène de l'IFN- β et du facteur IRF-7.

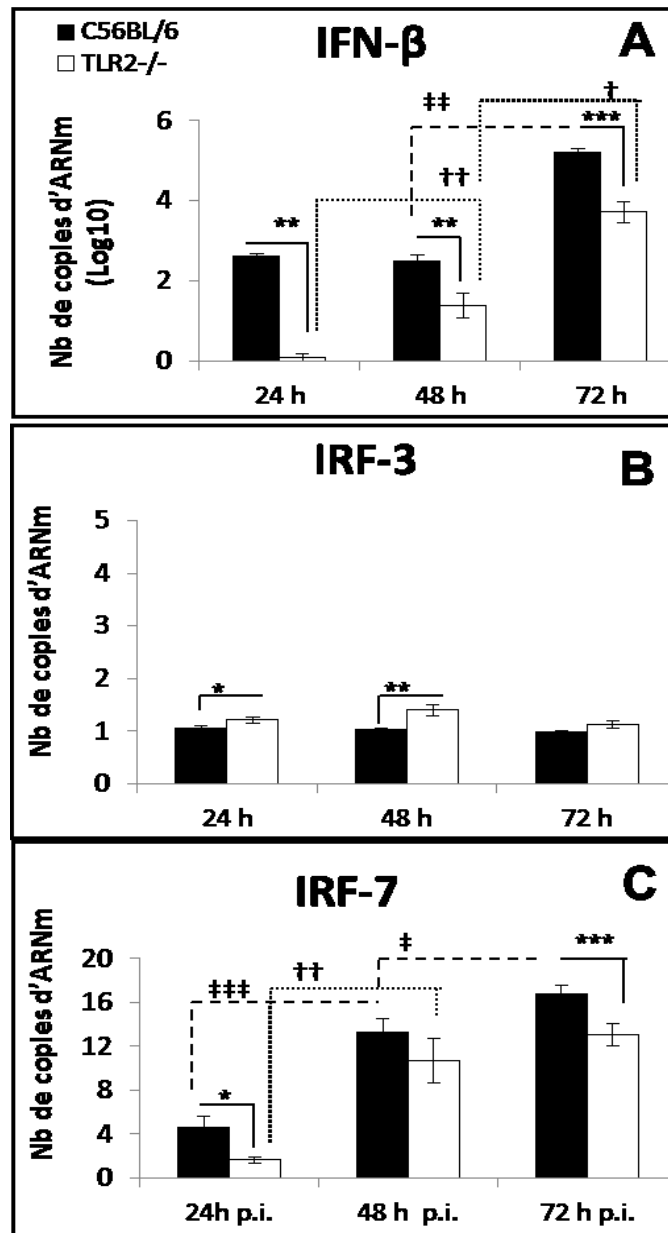


Figure 9 : Cinétique des niveaux d'expression génique de l'IFN- β (A) et des IRF-3 (B) et IRF-7 (C) dans le foie de souris C57BL/6 ou $tlr2^{-/-}$ infectées avec le virus L2-MHV-3. Des groupes de 5 ou 6 souris C57BL/6 ou $tlr2^{-/-}$ ont été infectées avec 1000 DICT₅₀ du virus L2-MHV-3 par voie i.p. Les souris contrôles ont reçu un volume identique de PBS. À différent temps p.i., les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂ et leur foie prélevé. L'ARN total du foie a été extrait par la méthode du trizol et les niveaux d'ARN cellulaire ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des niveaux dans le foie des souris contrôles. Les résultats représentent la moyenne des individus du groupe et leur erreur type. Lorsque comparés entre types de souris infectées * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; lorsque comparés dans le temps chez les souris C57BL/6 infectées †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$ et lorsque comparés dans le temps chez les souris $tlr2^{-/-}$ infectées † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$

3.1.4. Le TLR2 est impliqué dans la réponse inflammatoire innée face à l'infection au L2-MHV-3

Jacques *et al.* (2009) ont démontré que le L2-MHV-3 activait la production des cytokines pro-inflammatoires via sa fixation au TLR2 dans les macrophages péritonéaux. Arshad *et al.*, (2013) ont aussi récemment montré une augmentation d'IL-33 dans le foie de souris infectées avec le MHV-3. Afin de vérifier si l'activation de la voie TLR2 menait aussi à l'induction des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α et à l'alarmine IL-33 *in vivo*, des souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} ont été infectées avec le L2-MHV-3 et leur foie prélevé à 24, 48 et 72 h p.i. L'ARNm du foie des souris a été extrait et les niveaux d'induction des gènes de l'IL-6 et du TNF- α ont été déterminés par qRT-PCR. La figure 10A révèle une forte augmentation de la transcription du gène de l'IL-6 chez les souris C57BL/6 infectées avec le virus L2-MHV-3 à 48 et 72 h p.i. ($p \leq 0.05$ à 0.001). Le rôle du TLR2 dans ces augmentations a été mis en évidence par les baisses de la transcription de l'IL-6 dans le foie de souris *tlr2*^{-/-} infectées par rapport à celles des souris C57BL/6 infectées et ce, à 48 et 72 h p.i. ($p \leq 0.05$ à 0.01).

L'induction du TNF- α a aussi été plus important dans les souris C57BL/6 infectées à 72 h p.i. ($p \leq 0.001$) lorsque comparée aux niveaux atteints à 24 et 48 h p.i. (Fig. 10B). L'absence de TLR2, chez les souris *tlr2*^{-/-} infectées, a entraîné une diminution de la transcription du TNF- α à 72 h p.i. par rapport au niveau atteint chez les souris C57BL/6 infectées ($p \leq 0.01$). Ces résultats indiquent que le TLR2 favorise l'induction des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α chez les souris infectées avec le virus L2-MHV-3.

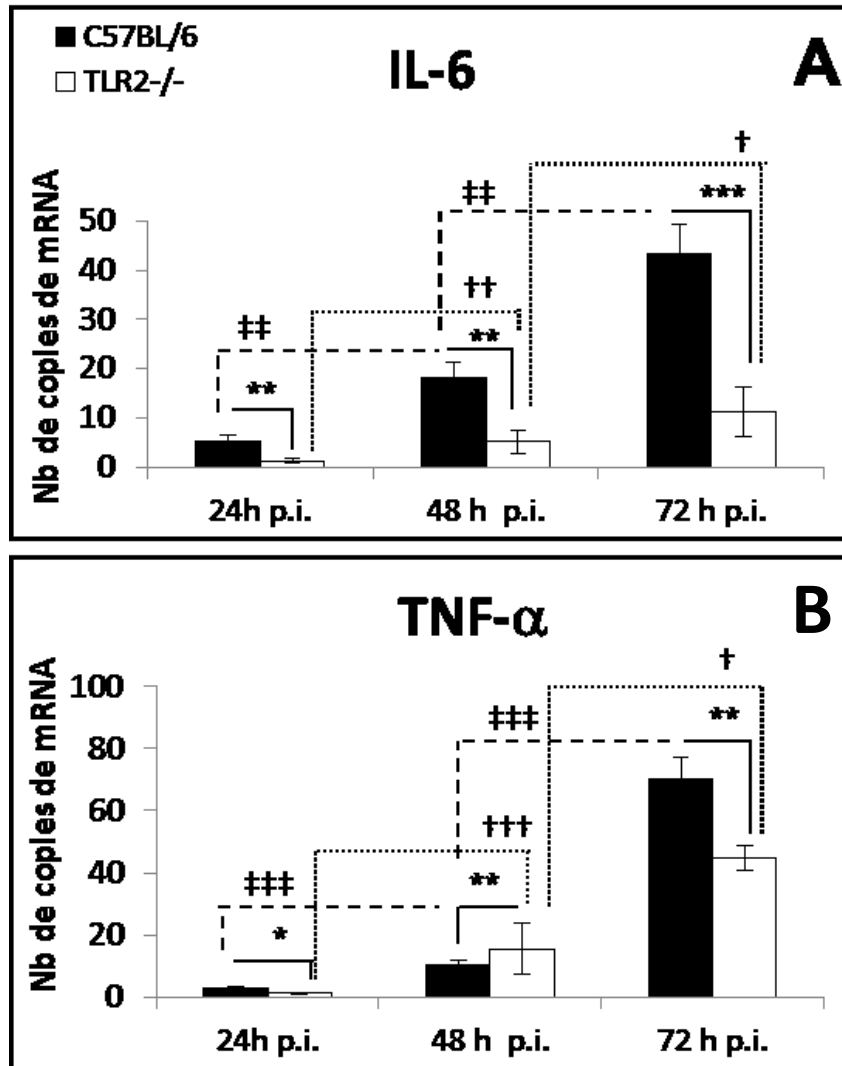


Figure 10: Cinétique des niveaux d'expression génique des cytokines IL-6 (A) et TNF- α (B) dans le foie de souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} infectées avec le virus L2-MHV-3. Des groupes de 5 ou 6 souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} ont été infectées avec 1000 DICT₅₀ du virus L2-MHV-3 par voie i.p. Les souris contrôles ont reçu un volume identique de PBS. À différents temps p.i., les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂ et leur foie prélevé. L'ARN total du foie a été extrait par la méthode du trizol et les niveaux d'ARN cellulaire ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des niveaux dans le foie de souris contrôles. Les résultats représentent la moyenne des individus du groupe et leur erreur type. Lorsque comparés entre types de souris infectées * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; lorsque comparés dans le temps chez les souris C57BL/6 infectées †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$ et lorsque comparés dans le temps chez les souris *tlr2*^{-/-} infectées † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$.

3.1.5. L'activation du TLR2 par le virus L2-MHV-3 augmente la transcription des gènes des chimiokines pro-inflammatoires CXCL1, CXCL 10 et CCL2 *in vivo*

L'hépatite, comme tout autre processus inflammatoire, est associée à un recrutement précoce de cellules inflammatoires suite à la production de chimiokines résultant de l'activation des senseurs microbiens, tels que les TLR de surface et endosomaux. Afin d'étudier l'importance du TLR2 dans la transcription des gènes de chimiokines suite à l'infection par le virus L2-MHV-3, des souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} ont été infectées et leur foie isolé à 24, 48 et 72 h p.i. L'ARNm a été extrait et les niveaux d'induction génique des chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2 ont été mesurés par qRT-PCR. La figure 11 révèle que les niveaux de transcription des trois chimiokines testées ont été fortement augmentés dans le foie des souris C57BL/6 infectées avec le L2-MHV-3 ($p \leq 0.01$ à 0.001). La transcription du gène du CXCL1 a été significativement plus importante dans les souris possédant le récepteur TLR2 dès 24 h p.i., et ce, jusqu'à 72 h p.i. ($p \leq 0.01$ à 0.001) et a été augmentée graduellement dans le foie des deux groupes de souris infectées ($p \leq 0.01$ à 0.001) (Fig. 11A). Les niveaux d'induction du gène du CXCL10 ont été significativement plus importants dans le foie des souris C57BL/6 que chez les souris *tlr2*^{-/-} à 72 h p.i. ($p \leq 0.001$) (Fig. 11B). Ceci est également vrai pour le gène de la chimiokine CCL2 où les niveaux d'induction ont été plus importants dans le foie des souris C57BL/6 que celui des souris *tlr2*^{-/-} à 72 h p.i. ($p \leq 0.001$) (Fig. 11C). Par ailleurs, les niveaux d'induction des gènes CXCL10 et CCL2 dans le foie des souris C57BL/6 infectées avec le L2-MHV-3 ont augmenté plus fortement entre 48 à 72 h.p.i. ($p \leq 0.001$). Ces résultats démontrent que le TLR2 est étroitement impliqué dans la transcription plus forte des gènes de chimiokines dans le foie suite à l'infection par le virus L2-MHV-3.

3.1.6. Le TLR2 augmente les niveaux de traduction des gènes de cytokines et de chimiokines dans le foie lors de l'infection *in vivo* avec le virus L2-MHV-3

Les résultats présentés dans les sections 3.1.3 à 3.1.5 démontrent que le TLR2 est impliqué dans l'induction génique de la réponse IFN de type I, des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α et des chimiokines pro-inflammatoires lors de l'infection *in vivo* avec le virus L2-MHV-3. Afin de vérifier si l'induction de ces gènes par le TLR2 lors de l'infection *in vivo* avec le virus L2-MHV-3 est accompagnée de leur traduction effective, des souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} ont été infectées et leur foie isolé à 72 h p.i. Les protéines totales du foie ont été extraites et les niveaux de l'IL-6, du TNF- α , de l'IFN- β , et des CCL2, CXCL1

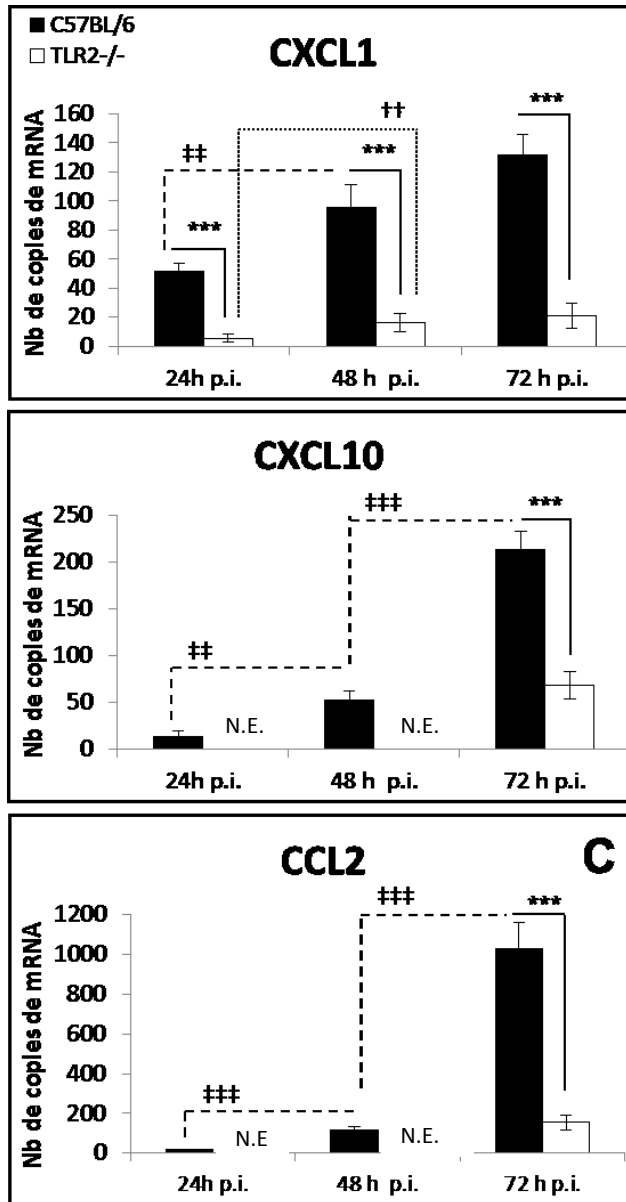


Figure 11: Cinétique des niveaux d'expression génique des chimiokines CXCL1 (A), CXCL10 (B) et CCL2 (C) dans le foie de souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} infectées avec le virus L2-MHV-3. Des groupes de 5 ou 6 souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} ont été infectées avec 1000 DICT₅₀ du virus L2-MHV-3 par voie i.p. Les souris contrôles ont reçu un volume identique de PBS. À différents temps p.i., les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂ et leur foie prélevé. L'ARN total du foie a été extrait par la méthode du trizol et les niveaux d'ARN cellulaire ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des niveaux dans le foie de souris contrôles. Les résultats représentent la moyenne des individus du groupe et leur erreur type. N.E. = Non effectué; Lorsque comparés entre types de souris infectées *** $p \leq 0.001$; lorsque comparés dans le temps chez les souris C57BL/6 infectées $\#\# p \leq 0.01$; $\#\#\# p \leq 0.001$ et lorsque comparés dans le temps chez les souris *tlr2*^{-/-} infectées $\#\# p \leq 0.01$.

et CXCL10 ont été quantifiés par des tests ELISA à 72 h p.i. Tel que montré dans les figures 12A et B, les cytokines IL-6 et TNF- α ont été significativement produites dans le foie lors de l'infection des souris C57BL/6 avec le virus L2-MHV-3 ($p \leq 0.01$ et 0.001 , respectivement), mais cette production a été significativement réduite chez les souris *tlr2*^{-/-} infectées ($p \leq 0.01$). Le TNF- α a été légèrement augmenté dans le foie des souris dépourvues du récepteur TLR2 et infectées avec le virus L2-MHV-3 ($p \leq 0.05$) mais à un niveau inférieur à celui observé chez les souris C57BL/6 infectées. La figure 12C indique également une très faible production d'IFN- β lors de l'infection des souris C57BL/6 avec le virus L2-MHV-3 ($p \leq 0.01$) et cette production a été significativement réduite chez les souris *tlr2*^{-/-} infectées ($p \leq 0.01$). Les figures 12D, E et F démontrent cette même tendance dans le cas des chimiokines pro-inflammatoires CCL2 (Fig. 12D), CXCL1 (Fig. 12E) et CXCL10 (Fig. 12F) qui sont produites de façon importante lors de l'infection des souris C57BL/6 avec le virus L2-MHV-3 ($p \leq 0.001$). Cette production de chimiokines est également dépendante du TLR2 puisque les niveaux de ces chimiokines ont été significativement réduits chez les souris *tlr2*^{-/-} infectées ($p \leq 0.001$). Seuls les chimiokines CCL2 et CXCL1 ont été produits dans le foie des souris dépourvues du récepteur TLR2 infectées avec L2-MHV-3 ($p \leq 0.05$ et 0.001) respectivement par rapport aux souris non-infectées). Ces résultats démontrent que la présence du TLR2 entraîne une augmentation de la production des cytokines, de l'IFN- β et des chimiokines *in vivo* dans le foie lors de l'infection avec le L2-MHV-3 puisque l'absence du récepteur TLR2 diminue significativement leur traduction, reflétant les effets sur la transcription de ces gènes rapportés dans les sections antérieures.

3.2. Un nouveau mécanisme d'évasion virale via la voie TLR2/radeaux lipidiques chez les macrophages infectés avec le virus hautement virulent MHV-3 et non par le virus modérément virulent MHV-A59

Les résultats des infections *in vivo* chez les souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} infectées présentés dans la section précédente, suggèrent que la propriété particulière du sérotype hautement virulent MHV-3 à se fixer sur le TLR2, tel qu'antérieurement démontré *in vitro* dans les macrophages péritonéaux (Jacques *et al.*, 2009), serait responsable ou fortement impliquée dans l'aggravation de l'hépatite aiguë. Par contre, le mécanisme

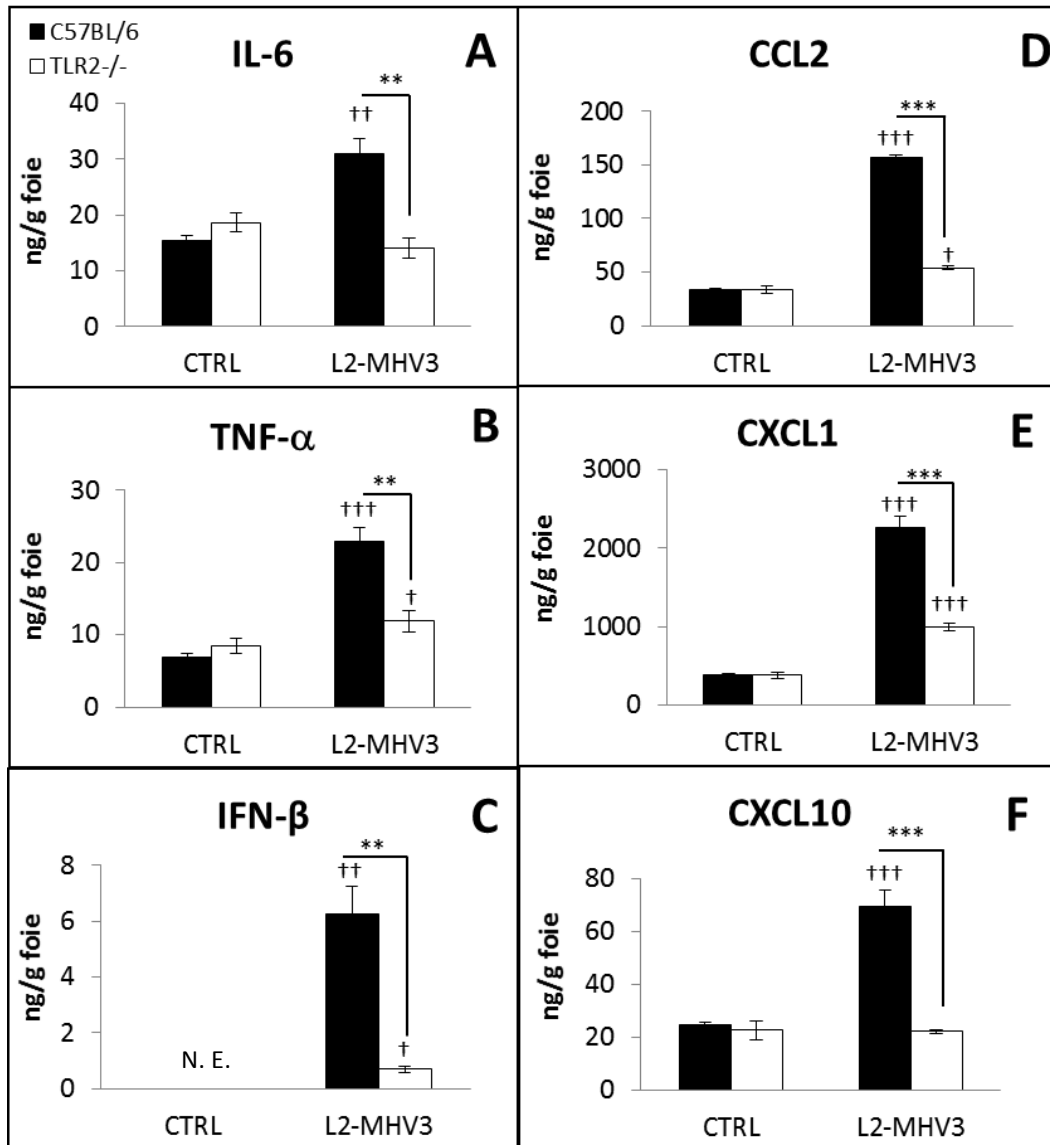


Figure 12: Niveaux de production protéique de l'IL-6 (A), TNF- α (B), IFN- β (C), CCL2 (D), CXCL1 (E) et CXCL10 (F) dans le foie de souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} non-infectées (CTRL) ou infectées avec le virus L2-MHV-3. Des groupes de 5 ou 6 souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} ont été infectées avec 1000 DICT₅₀ du virus L2-MHV-3 par voie i.p. Les souris contrôles ont reçu un volume identique de PBS. À 72 h p.i., les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂ et leur foie prélevé. Le tissu a été broyé et les niveaux de cytokines et de chimiokines dans les surnageants ont été quantifiés par des tests ELISA. Les résultats représentent la moyenne des individus du groupe et leur erreur type. N.E. = Non effectué. Lorsque comparés entre types de souris infectées * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ et † $p \leq 0.05$ †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$ lorsque comparés aux souris non-infectées.

par lequel cette fixation du MHV-3 sur le TLR2 entraîne une évasion des senseurs viraux (absence ou faibles niveaux de transcription) et des IFN de type I, et en même temps, une forte augmentation des cytokines et des chimiokines inflammatoires, tel qu'observé dans le foie lors de l'infection *in vivo*, et ce, tout en favorisant la réplication virale, n'est pas connu. Afin de tenter d'identifier le ou les mécanismes par lequel, le MHV-3 utilise le TLR2 pour aggraver l'hépatite, des infections *in vitro* avec ce sérotype hautement virulent et avec le sérotype modérément hépatotrope MHV-A59 ne se fixant pas sur le TLR2 ont été réalisées dans des lignées macrophagiques murines.

3.2.1. La réplication des virus fortement virulent MHV-3 et modérément virulent MHV-A59 dans les cellules de lignées macrophagiques J774A.1 et RAW264.7

Dans le but d'étudier le rôle du TLR2 dans la réponse innée des macrophages suite à l'infection par le sérotype hautement virulent MHV-3 comparé aux effets induits par le sérotype modérément virulent MHV-A59, les lignées macrophagiques J774A.1 et RAW264.7, reconnues comme permissives à l'infection par ces deux virus (McGilvray *et al.*, 1998; Banerjee *et al.*, 2002), ont été utilisées. Les cellules J774A.1 et RAW264.7 ont été infectées avec chacun des virus et les cinétiques d'infection ont été comparées en rapport avec les effets cytopathiques (ECP) observés au microscope à contraste de phase (Fig. 13A), la production de l'ARN de la nucléocapside virale (N-MHV) (Fig. 13B) et les titres viraux (Fig. 13C). La figure 13A montre que les ECP variaient selon le type cellulaire et le sérotype viral. À 24 h p.i., plusieurs gros syncytia se sont formés dans les cellules J774A.1 infectées avec le MHV-3 et le MHV-A59. Par contre, les syncytia formés dans les J774A.1 infectées avec le MHV-3 étaient plus vacuolisés, au contraire de ce qui a été observé dans ces cellules infectées avec le MHV-A59. Dans les cellules RAW264.7 infectées avec l'un ou l'autre des virus, de plus petits syncytia ont été mis en évidence (Fig. 13A). Le pourcentage des ECP dans les cellules J774A.1 infectées avec le MHV-3 ou le MHV-A59 a atteint près de 60% du tapis cellulaire à 24 h p.i. tandis que ce pourcentage n'était que d'environ 20% dans les cellules RAW264.7 infectées avec l'un ou l'autre des virus (résultats non-montrés). De plus, les cinétiques des niveaux d'expression de l'ARN de la nucléocapside virale (N-MHV) détectée par qRT-PCR (Fig. 13B) révèlent que dès 4 h p.i., les niveaux d'expression de l'ARN de la N-MHV étaient plus importants chez les cellules J774A.1 infectées avec le MHV-3 que lorsqu'infectées avec le MHV-A59 ($p \leq 0.001$). Cette différence est demeurée plus importante

pour les cellules infectées avec le MHV-3 qu'avec le MHV-A59 durant toute la cinétique d'infection ($p \leq 0.01$ à 0.001) sauf à 8 h p.i. Les niveaux d'ARN de la N-MHV ont été initialement plus importants dans les cellules RAW264.7 infectées avec le MHV-3 ($p \leq 0.01$) et cette différence était encore évidente après 16 h p.i. ($p \leq 0.001$). Les niveaux d'expression de l'ARN de la N-MHV étaient aussi comparables à ceux observés dans les cellules J774A.1 à 24 h p.i. Les titres de particules infectieuses présentes dans les surnageants cellulaires à 24 h p.i. ont été significativement plus élevés dans les cellules J774A.1 et les cellules RAW264.7 infectées avec le MHV-3 comparativement à ceux atteints lors des infections avec le MHV-A59 ($p \leq 0.01$ et 0.05 , respectivement). Les niveaux plus élevés de titres viraux dans les infections au MHV-3 ne sont pas la conséquence d'une mortalité cellulaire accrue puisque le niveau de viabilité cellulaire, tel que mesuré par le MTS/PMS est demeuré similaire chez les cellules infectées avec l'un ou l'autre des virus (résultats non-montrés).

3.2.2. Une relation inverse entre la virulence des sérotypes MHV-3 et MHV-A59 et les niveaux d'ARNm des récepteurs *toll-like* (TLR) -2, -3, -4, -7 et des hélicases MDA5 et RIG-I dans les cellules J774A.1 et RAW264.7 infectées.

Jacques *et al.* (2009) ont démontré que le TLR2 était impliqué dans l'activation de cytokines inflammatoires par les macrophages infectés avec le virus MHV-3 tandis qu'aucun rôle pour le TLR2 n'a été observé dans les macrophages infectés au MHV-A59 (Zhou *et al.*, 2010) suggérant un rôle potentiel du TLR2 dans la pathogénicité du MHV-3. Afin de vérifier si les détecteurs de pathogènes viraux des cellules J774A.1 et RAW264.7 sont activés de façon différente lors d'infections avec les virus hautement virulent MHV-3 ou modérément virulent MHV-A59, les niveaux d'expression d'ARNm des TLR2, -3, -4, -7, MDA5 et RIG-I ont été mesurés par qRT-PCR chez les macrophages infectés avec l'un ou l'autre des virus à 22h p.i. Les résultats montrent que les TLR2, -3, -4, -7, MDA5 et RIG-I n'ont pas été induits dans les macrophages J774A.1 ou RAW264.7 infectés avec le virus hautement virulent MHV-3 tandis que leur transcription a été significativement stimulée dans les cellules infectées avec le sérotype modérément virulent MHV-A59 ($p \leq 0.01$ à 0.001) (Fig. 14A à F). Seul le TLR2 a été induit de façon importante dans les cellules infectées avec MHV-3 ($p \leq 0.01$ par rapport aux cellules non-infectées). Ces résultats démontrent que le virus hautement virulent MHV-3, au contraire du MHV-A59, n'induit pas de façon appréciable dans les macrophages l'expression génique des senseurs viraux de l'immunité innée sauf pour le récepteur de surface TLR2.

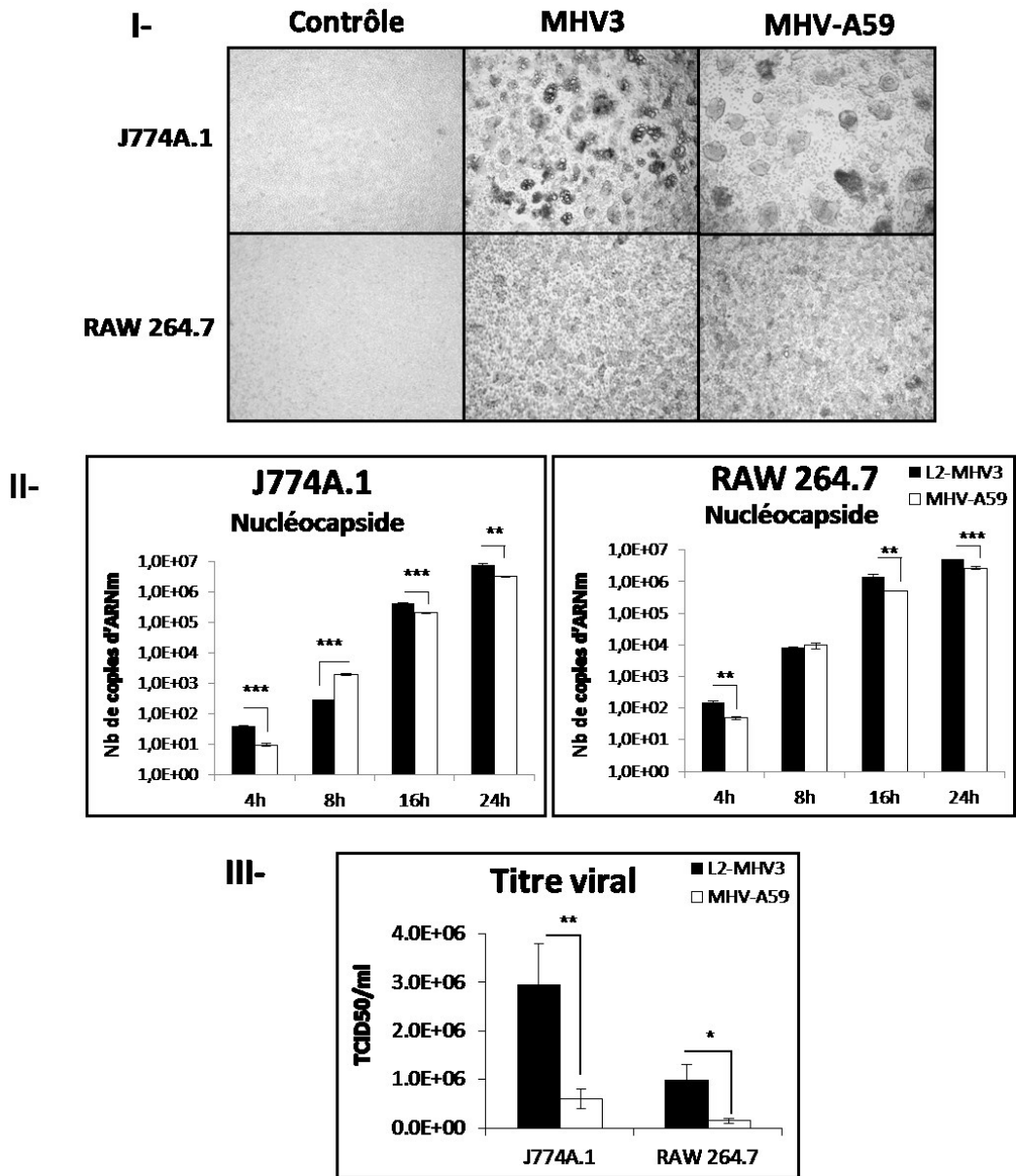
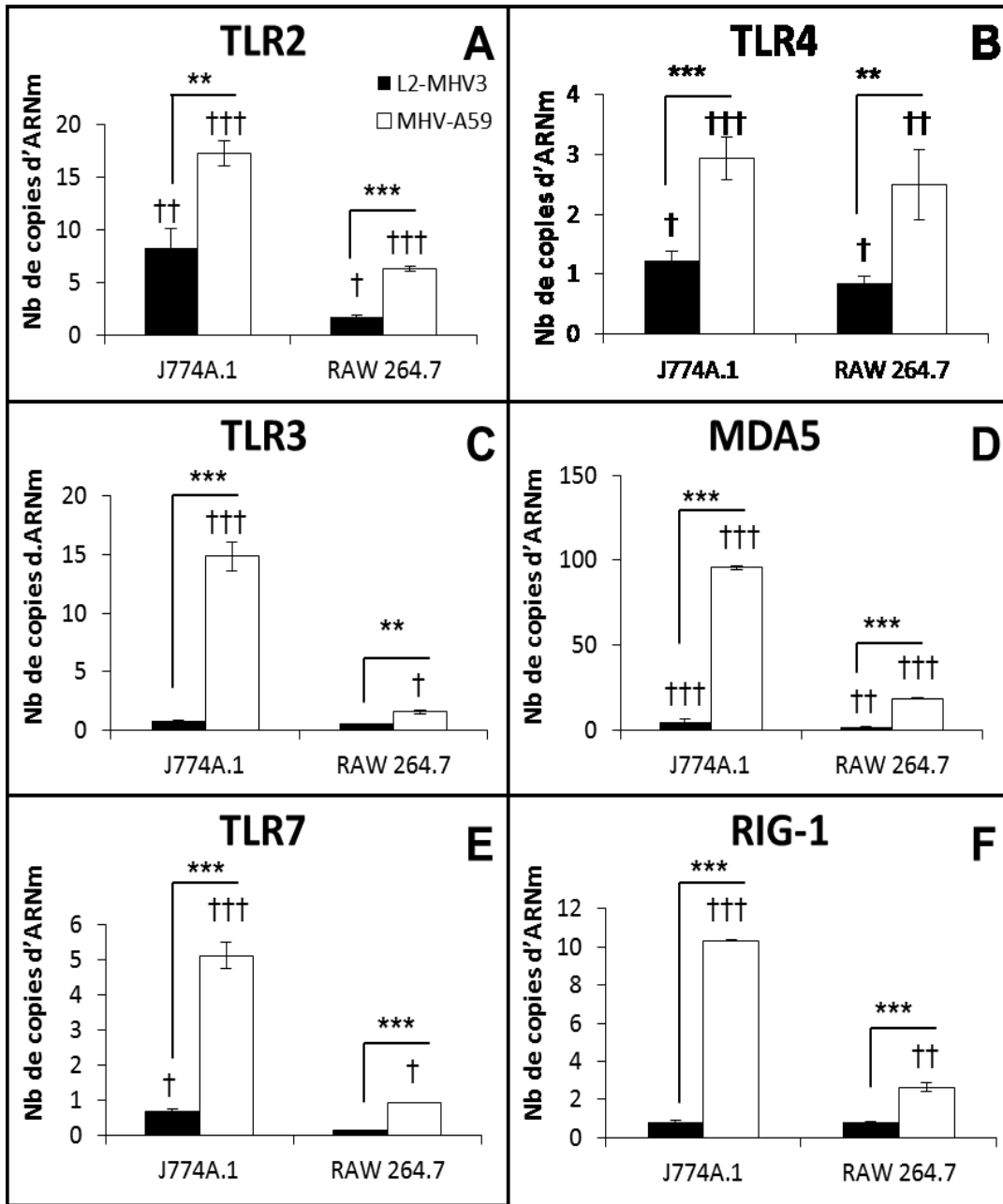


Figure 13: Effets cytopathiques (A), niveaux d'expression de l'ARN de la nucléocapside des virus MHV (B) et réplication virale (C) dans les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 infectées avec le virus L2-MHV-3 ou MHV-A59. Les cellules ont été infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3 ou MHV-A59 et l'ARN des cellules infectées a été extrait à différents temps p.i. Les niveaux d'ARN viral de la nucléocapside ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des niveaux des cellules contrôles non-infectées (non présentés). Les particules virales infectieuses présentes dans le surnageant 24 h p.i. ont été titrées par la technique de dilutions décimales sur des cellules L2 et les résultats exprimés sous forme de $DICT_{50}/ml$. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$



3.2.3. Les niveaux d'ARN des gènes des interférons (IFN)- α et β induits dans les cellules J774A.1 et RAW264.7 sont plus faibles lors de l'infection avec le virus hautement virulent MHV-3 qu'avec le virus modérément virulent MHV-A59.

La plus forte réplication du MHV-3 pourrait être reliée à son évasion des interférons de type I (α et β). Afin de vérifier les différences dans les niveaux de transcription et de traduction des gènes des IFN- α/β suite à l'infection avec les virus MHV-3 ou MHV-A59, des cellules J774A.1 et RAW264.7 ont été infectées avec l'un et l'autre des virus et les niveaux d'ARNm ainsi que de la production des IFN- α et β ont été mesurés par qRT-PCR et par des tests ELISA, respectivement. Les résultats présentés à la figure 15A ne révèlent aucune transcription du gène de l'IFN- β dans les cellules macrophagiques infectées avec le MHV-3 tandis que des niveaux importants d'ARNm de l'IFN- β ont été induits lors de l'infection avec le MHV-A59 ($p \leq 0.001$). De façon similaire, les niveaux d'IFN- β sécrétés dans les surnageants des cellules infectées sont demeurés très faibles dans les cellules infectées avec le MHV-3 alors que des niveaux plus importants ont été atteints dans les cellules infectées avec le MHV-A59 ($p \leq 0.05$ à 0.01) (Fig. 15B). Par contre, l'infection des cellules J774A.1 ou RAW264.7 avec le MHV-3 ou le MHV-A59 n'a entraîné aucune expression génique ou production de l'IFN- α (résultats non-montrés).

D'autre part, les niveaux d'expression des ARNm des facteurs de transcription des voies de l'IFN, tels que les IRF-3 et -7, ont aussi été mesurés par qRT-PCR. Seulement l'ARNm de l'IRF-7 a été induit de façon importante lors de l'infection des cellules J774A.1 avec le MHV-A59, mais non pas dans les cellules infectées avec le MHV-3 ($p \leq 0.001$) (Fig. 15 C et D). Des niveaux très faibles de transcription du gène de l'IRF-7 ont été détectés dans les cellules RAW264.7 infectées avec le MHV-A59 et seul ce virus a induit une certaine expression génique de l'IRF-3 dans ces cellules ($p \leq 0.05$) (Fig. 15D). Ces résultats suggèrent que le sérotype hautement virulent MHV-3 bloque la transcription et la traduction de l'IFN- β , au contraire du virus modérément virulent MHV-A59.

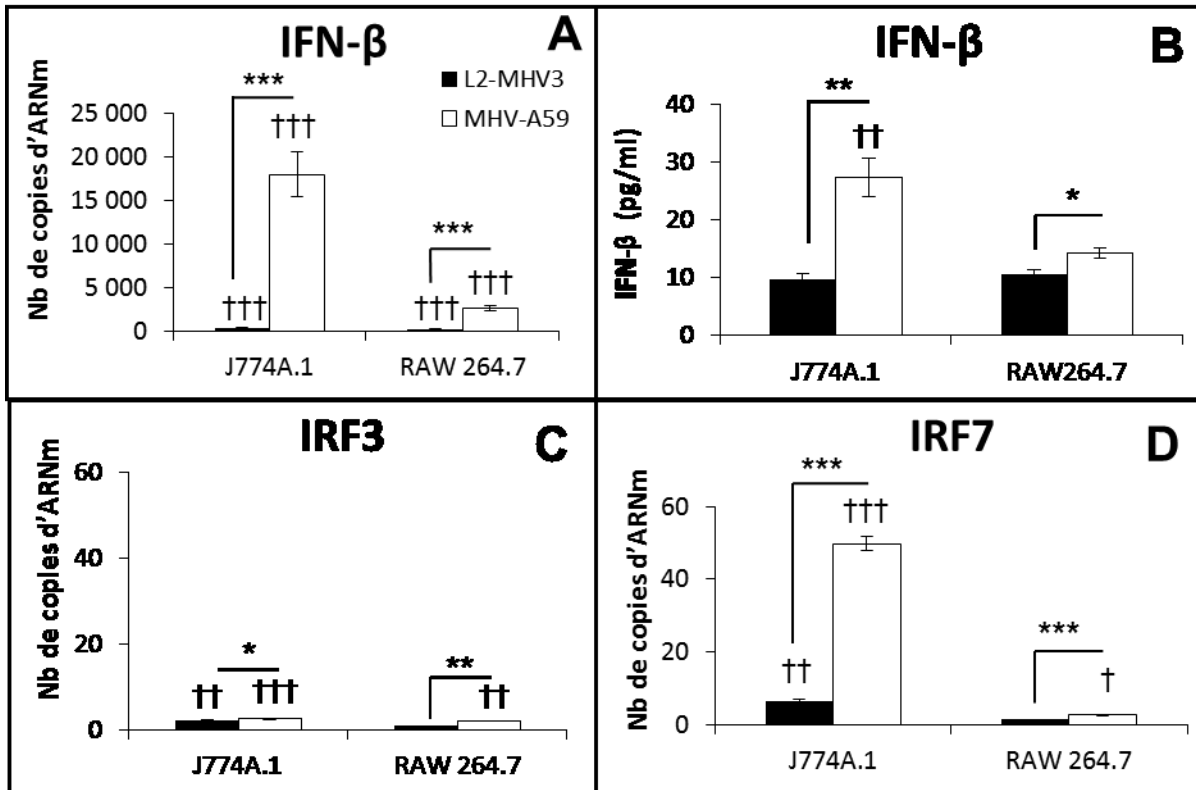


Figure 15: Niveaux d'expression génique de l'IFN-β (A), IRF-3 (C) et IRF-7 (D) et niveaux de sécrétion protéique de l'IFN-β (B) dans les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 infectées avec le virus L2-MHV-3 ou MHV-A59. Des cellules ont été infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3 ou MHV-A59 et l'ARN des cellules infectées extrait à 22h p.i. Les niveaux d'ARNm ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des cellules contrôles non-infectées (non présentés). Les niveaux d'IFN-β sécrété dans le surnageant ont été quantifiés par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. Lorsque comparés entre variants de MHV * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$ lorsque comparés aux cellules contrôles non-infectées.

3.2.4. Le virus hautement virulent MHV-3 induit des niveaux plus importants de transcription et de traduction des cytokines IL-6 et TNF- α dans les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 que ceux stimulés par le virus moins virulent MHV-A59

Jacques *et al.* (2009) ont observé que les niveaux des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α étaient rapidement induits dans les macrophages péritonéaux infectés avec le MHV-3. De telles inductions rapides d'IL-6 et TNF- α chez des macrophages infectés avec le MHV-A59 n'ont pas été observées (Zhao *et al.*, 2011; Mazaleuskaya *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2009; Eriksson *et al.*, 2008). Afin de vérifier si l'infection des lignées macrophagiques par le virus MHV-3 peut induire une réponse plus rapide et plus importante de ces cytokines pro-inflammatoires que le sérotype MHV-A59, les cinétiques d'induction génique et de production de l'IL-6 et du TNF- α ont été réalisées dans les cellules J774A.1 et RAW264.7 infectées avec l'un ou l'autre des deux sérotypes, par des tests de qRT-PCR et ELISA, respectivement. La figure 16 section I-A montre que l'induction de l'ARNm de l'IL-6 dans les cellules J774A.1 infectées avec le MHV-3 a été significativement plus importante dès 4 h p.i. que lors de l'infection avec le MHV-A59 et ce, jusqu'à 16 h p.i. ($p \leq 0.001$). Par contre, à 24 h p.i., les niveaux d'ARNm de l'IL-6 dans les J774A.1 étaient plus importants dans les cellules infectées avec le MHV-A59 ($p \leq 0.01$). La concentration d'IL-6 accumulée dans le surnageant cellulaire a été plus importante chez les cellules J774A.1 infectées avec le MHV-3 à 24 h p.i. ($p \leq 0.001$) (Fig. 16 section I-C). Des résultats similaires ont été observés chez les cellules RAW264.7 infectées par les virus MHV-3 et MHV-A59 ($p \leq 0.05$ à 0.001) mais les niveaux de production d'IL-6 sont demeurés plus faibles que ceux observés chez les J774A.1 infectées (Fig. 16 section I-B et D).

Les niveaux de transcription du TNF- α ont été plus importants dans les deux lignées cellulaires infectées avec le MHV-3 plutôt qu'avec le MHV-A59 et ce, dès 4 et 8 h p.i. ($p \leq 0.001$) (Fig 10 section II-E et F). À 16 et 24 h p.i. par contre, les niveaux d'ARNm du TNF- α étaient plus importants chez les cellules infectées avec le virus MHV-A59 ($p \leq 0.001$). Au niveau de la traduction du TNF- α , telle que mesurée par la concentration du TNF- α accumulé dans les surnageants cellulaires, la production a été plus importante dans les cellules J774A.1 infectées avec le virus MHV-3 à 24 h p.i. par rapport à celles atteintes avec le virus MHV-A59 ($p \leq 0.001$) (Fig. 16, section II-G). Cette différence a également été observée chez les cellules RAW264.7 à 24 h p.i. quoique les résultats fussent moins évidents que chez les cellules J774.1 ($p \leq 0.05$) (Fig. 16, section II-H). Ces résultats démontrent que le sérotype hautement virulent MHV-3 induit plus rapidement et plus fortement dans les macrophages les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α que le sérotype moins virulent MHV-A59.

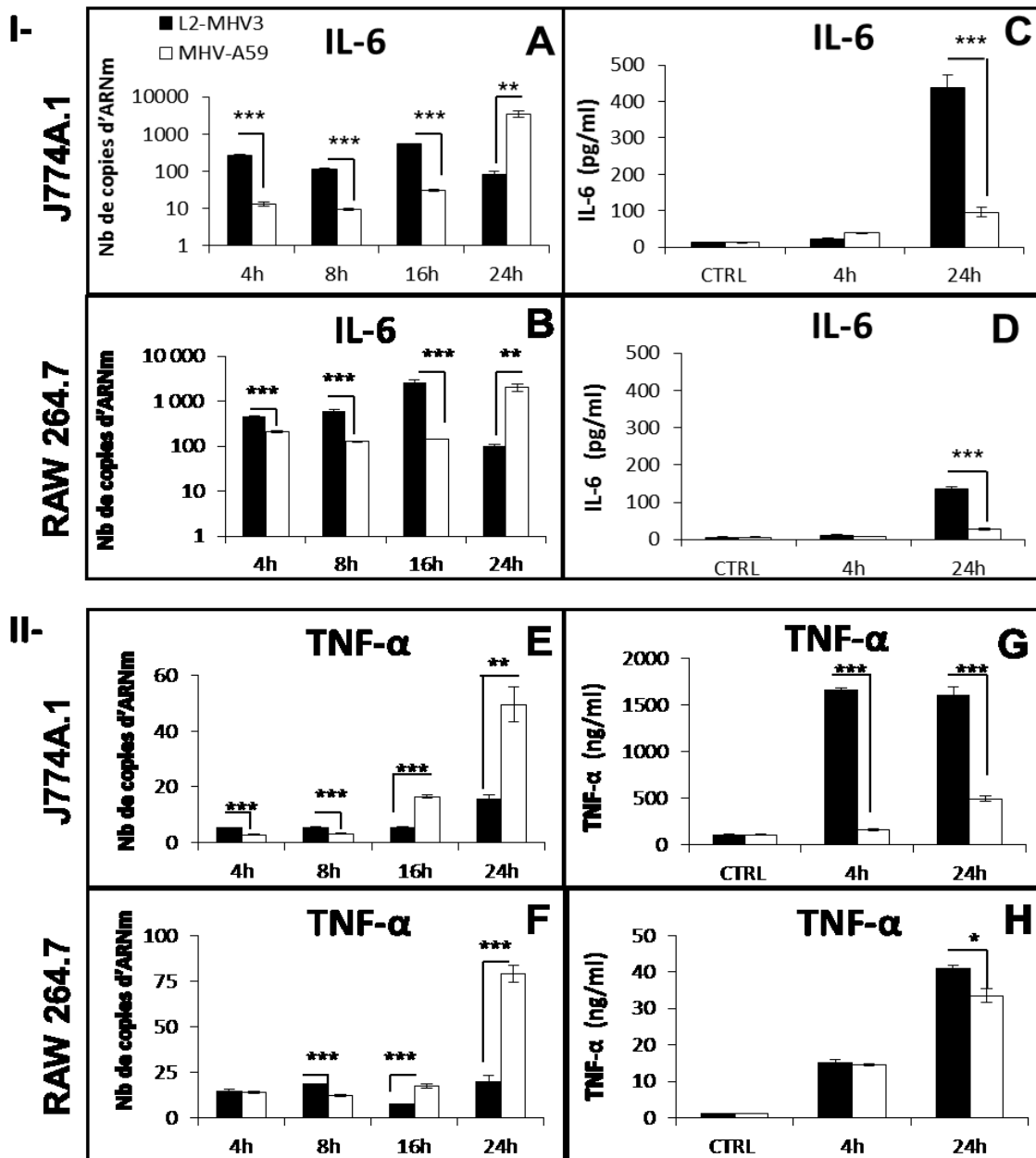


Figure 16: Cinétique des niveaux d'expression génique et de sécrétion protéique de l'IL-6 (I-A à D) et du TNF- α (II- E à H) dans les cellules macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 infectées avec le virus L2-MHV-3 ou MHV-A59. Des cellules ont été infectées avec une m.o.i. de 1 du virus L2-MHV-3 ou MHV-A59 et l'ARN des cellules infectées a été extrait à différents temps p.i. Les niveaux d'ARNm ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des cellules contrôles non-infectées (non présentés). Les niveaux de cytokines sécrétées dans le surnageant ont été quantifiés par des tests ELISA pour les cellules contrôles non-infectées (CTRL) et infectées. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

3.2.5. Le TLR2 et le CEACAM1a sont essentiels à l'infection par le MHV-3 tandis que seul le CEACAM1a est nécessaire à l'infection par le MHV-A59

La molécule CEACAM1a a été identifiée comme le récepteur de tous les sérotypes de MHV (Godfraind et Coutelier, 1998). Jacques *et al.* (2009) ont démontré que le TLR2 et l'héparane sulfate jouent également un rôle dans la fixation du virus MHV-3 aux macrophages, ce qui n'est pas le cas avec le sérotype MHV-A59 (Zhao *et al.*, 2011). L'induction rapide et importante de l'IL-6 et du TNF- α dans les macrophages infectés avec le MHV-3 suggère que ce virus active spécifiquement certains senseurs viraux, probablement lors de la fixation du virus à la surface du macrophage. Nous avons observé que seule la transcription du TLR2 a été induite de façon importante dans les macrophages infectés avec le MHV-3 et non pas celle des autres senseurs viraux, au contraire de ce qui a été induit avec le sérotype moins virulent MHV-A59 (Fig. 8A). Ces observations suggèrent que le TLR2 pourrait jouer un rôle dans la virulence accrue du sérotype MHV-3 et l'augmentation rapide des cytokines inflammatoires lors de la fixation du virus.

Afin de vérifier cette hypothèse, des macrophages J774A.1 ont été traités avec des petits ARN interférants (siRNAs) dirigés contre l'expression des gènes du TLR2 (siTLR2) et/ou du CEACAM1 (siCC1) puis infectés avec le MHV-3 ou le MHV-A59. Les niveaux d'ARN de la N-MHV ont été mesurés par qRT-PCR à 22 h p.i. et interprétés comme mesure indicatrice du niveau de réplication virale. Tel que montré dans les figures 17A et B, les niveaux de transcription de la N-MHV ont diminué dans les cellules infectées par le MHV-3 ou le MHV-A59 lorsque l'expression génique du CEACAM1 était réduite par le traitement avec les siCC1 ($p \leq 0.01$). Par contre, l'utilisation des siTLR2 a entraîné une baisse de la transcription virale seulement lors de l'infection avec le virus MHV-3 ($p \leq 0.01$) (Fig. 17A). Par ailleurs, l'atténuation simultanée de l'expression du TLR2 et du CEACAM1 a réduit d'avantage les niveaux de la N-MHV dans les macrophages infectés avec le MHV-3 ($p \leq 0.01$), comparés respectivement aux cellules infectées traitées seulement avec le siCC1 ou le siTLR2 (Fig. 17A). Les niveaux d'expression de la N-MHV dans les cellules traitées simultanément par les siTLR2 et les siCC1 et infectées avec le MHV-A59 sont demeurés similaires aux niveaux observés dans les cellules infectées seulement traitées avec les siCC1 ($p \leq 0.01$) (Fig. 17B).

Les titres viraux retrouvés dans les surnageants des cellules infectées et traitées avec les siRNAs ont aussi été vérifiés. Les résultats montrent que les titres de MHV-3 ont diminué suite aux traitements par le siTLR2, le siCC1 et la combinaison des deux siTLR2/siCC1 ($1.2 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$; $4.5 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$ and $1.5 \times 10^4 \pm 0.3 \times 10^4$ respectivement lorsque comparés aux cellules infectées mais non-traitées $2.5 \times 10^6 \pm 0.8 \times 10^6$ DICT 50/ml ($p \leq 0.05$ to 0.01).

Comme le récepteur CEACAM1 possède une région inhibitrice intracytoplasmique (ITIM) activant la voie SHP-1 (Gray-Owen *et al.*, 2006) et afin d'éliminer la possibilité que la fixation des virus aux molécules CEACAM1 puisse activer la voie ITIM et inhiber la réplication virale, des cellules J774A.1 ont aussi été traitées avec un inhibiteur de SHP-1, le sodium stibogluconate (SS), avant l'infection avec le virus MHV-3. Les mesures de l'ARN de la N-MHV n'ont indiqué aucune différence entre les macrophages infectés traités avec le SS et ceux non-traités (résultats non-montrés).

Ces résultats supportent l'hypothèse à l'effet que le récepteur CEACAM1a et le TLR2 sont essentiels à une réplication optimale du MHV-3 alors que seul le récepteur CEACAM1a est suffisant pour assurer la réplication du MHV-A59.

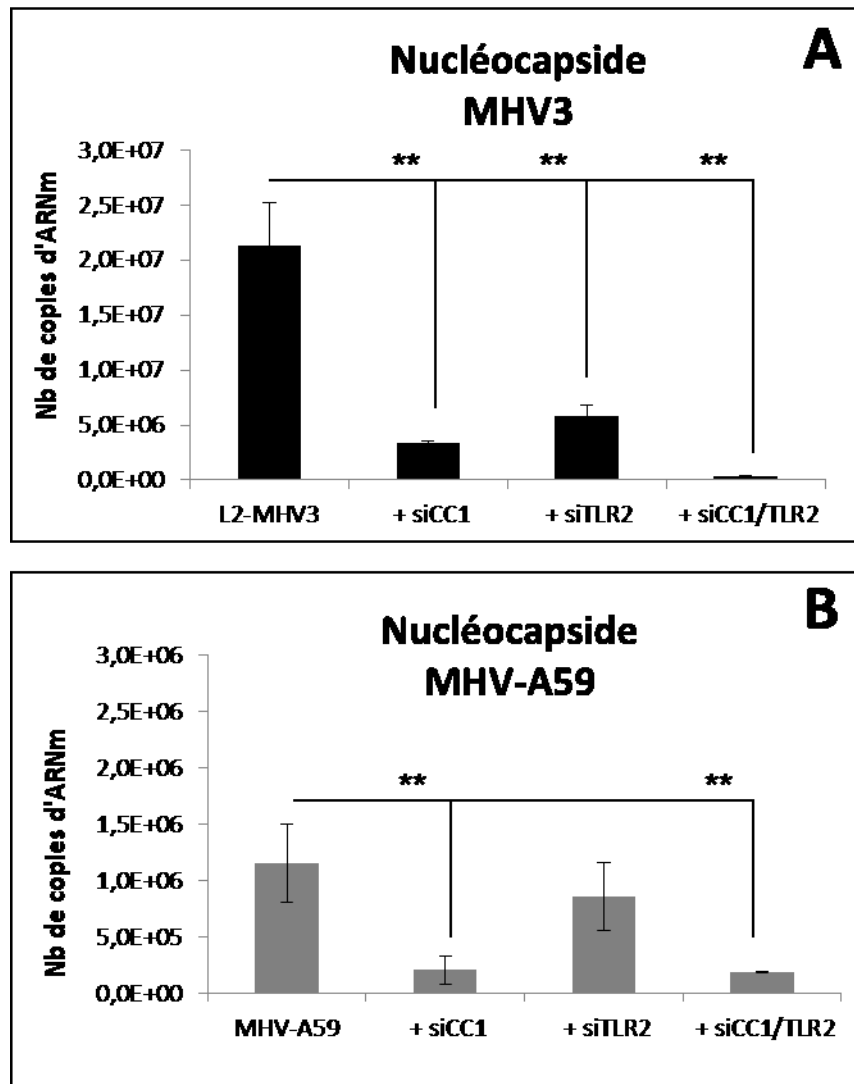
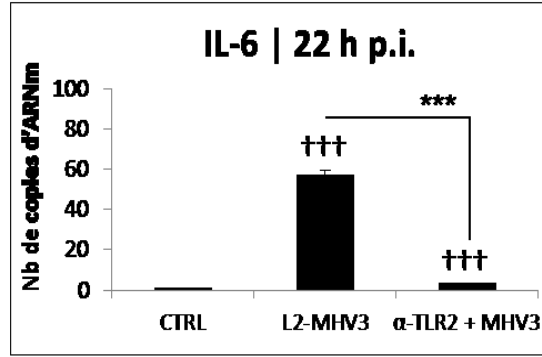


Figure 17: Niveaux d'expression de l'ARN viral de la nucléocapside des virus MHV dans les cellules macrophagiques J774A.1 contrôles d'infection (L2-MHV-3 ou MHV-A59) ou traitées avec des petits ARNs interférants pour les gènes CEACAM1a (+siCC1) ou TLR2 (+siTLR2) ou les deux (+siCC1/TLR2) et infectées avec le virus L2-MHV-3 (A) ou MHV-A59 (B). Des cellules ont été transfectées avec 25nM d'ARN interférants murins CEACAM1a (siCC1) et/ou siTLR2 avant d'être infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3 ou MHV-A59 et l'ARN extrait des cellules simplement infectées et traitées avant infection à 22h p.i. Les niveaux d'ARN de la nucléocapside ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des cellules non-infectées. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. ** $p \leq 0.01$.

3.2.6. Les récepteurs TLR2 et CEACAM1 sont impliqués dans la production rapide de l'IL-6 dans les macrophages J774A.1 infectés au MHV-3

Les résultats présentés dans les figures 14A et 16, section I-A et II-E indiquent que les ARNm de l'IL-6, du TNF- α et du TLR2 étaient rapidement induits dans les cellules J774A.1 infectées avec le MHV-3. Afin de vérifier si le TLR2 joue un rôle dans cette induction rapide d'IL-6, les macrophages J774A.1 ont été traités avec un anticorps anti-TLR2 neutralisant (α -TLR2) avant leur infection avec le MHV-3 à un m.o.i. de 1 pour 22 h. La figure 18, section I démontre que le traitement avec un anticorps anti-TLR2 a réduit significativement l'induction génique de l'IL-6 stimulée par l'infection avec le MHV-3 chez ces cellules ($p \leq 0.001$). Afin de confirmer le rôle du TLR2 dans la transcription du gène de l'IL-6, des cellules J774A.1 ont été traitées avec des siRNAs dirigés contre les gènes TLR2 (siTLR2) et/ou CEACAM1 (siCC1) avant d'être infectées avec le MHV-3 à une m.o.i. de 1 durant 5 ou 22 h. Les niveaux d'expression génique de l'IL-6 et sa sécrétion dans le surnageant ont été mesurés par qRT-PCR et par un test ELISA, respectivement. La transfection des J774A.1 avec les siTLR2 et siCC1 a bloqué l'expression de ces gènes avec une efficacité de 50% et 40% respectivement, tel qu'évalué par qRT-PCR (résultats non-montrés). L'efficacité de ce blocage génique du TLR2 a été aussi confirmée par la réduction significative de l'induction de l'ARNm du TLR2 dans les cellules J774.1 prétraitées avec les siRNAs et stimulées par l'ajout d'agonistes spécifiques du TLR2 (Pam₃CSK4 and Pam₂CSK4) (résultats non-montrés). La figure 18 section II-A montre que le traitement des cellules J774A.1 avec les siCC1, siTLR2 ou siCC1/TLR2 avant l'infection par le MHV-3 a aussi réduit l'induction génique de l'IL-6 dès 5 h p.i. ($p \leq 0.001$). Les niveaux d'expression génique de l'IL-6 induits par l'infection ont aussi été diminués par le traitement avec les siTLR2 ou siCC1 et surtout par le traitement combiné siTLR2/CC1 à 22 h p.i. même si les niveaux d'ARNm induits par l'infection étaient plus faibles qu'à 5 h p.i. (Fig. 18 section II-C). Cette baisse de transcription du gène de l'IL-6 à 22 h p.i. par rapport à 5 h p.i. a été démontrée précédemment à la figure 16A. L'atténuation des gènes CEACAM1, TLR2 ou les deux simultanément a aussi significativement diminuée les niveaux de traduction de l'IL-6 dans les surnageants cellulaires, tel que mesuré par un test ELISA ($p \leq 0.01$) (Fig. 18 section II-B). Ces résultats confirment que la production de l'IL-6 par les macrophages infectés avec MHV-3 dépend à la fois du TLR2 et du CEACAM1.

I-



II-

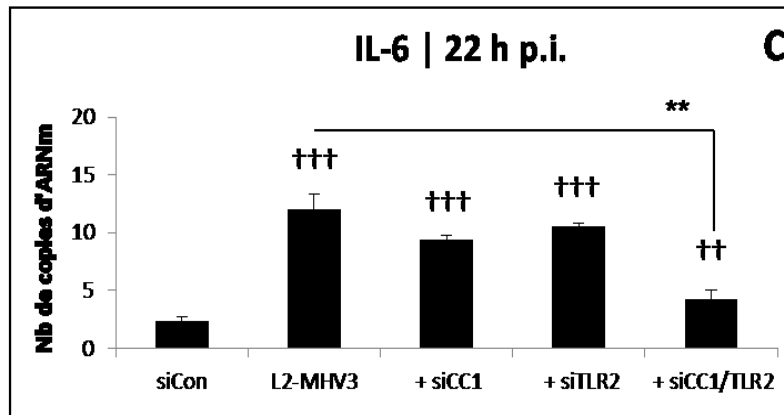
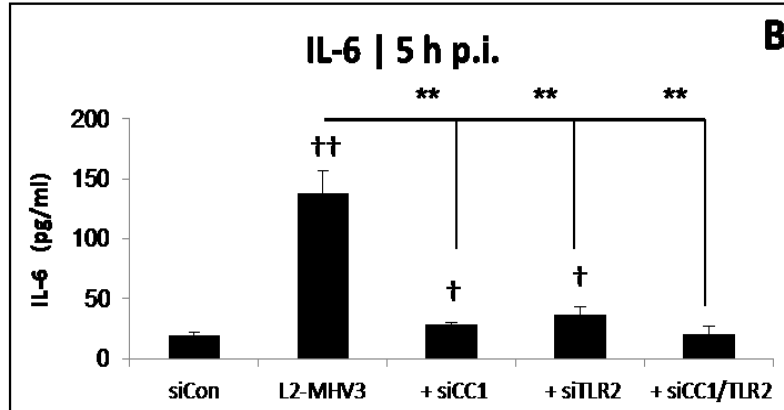
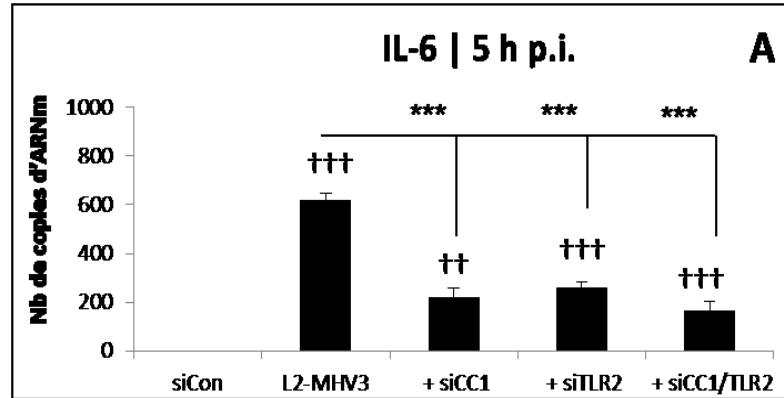
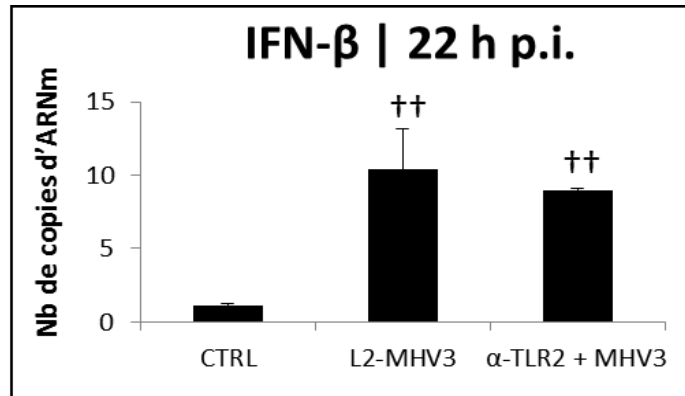


Figure 18: Niveaux d'expression génique de l'IL-6 dans les cellules macrophagiques J774.1 traitées avec un anticorps anti-TLR2 (Section I) ou avec des petits ARNs interférants pour les gènes CEACAM1a et/ou TLR2 (section II-C) avant infection au L2-MHV-3 pour 22 h et niveaux d'expression génique (section II-A) et de sécrétion de l'IL-6 (Section II-B) 5 h p.i. avec le virus L2-MHV-3. Les cellules ont été traitées avec un anticorps anti-TLR2 (α -TLR2) ou transfectées avec 25nM d'ARN interférants murins CEACAM1a (siCC1) ou TLR2 (siTLR2) ou les deux (siCC1/siTLR2) avant d'être infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3. L'ARN a été extrait des cellules à 5 h ou 22 h p.i. Un contrôle de transfection (siCon) contenant un shARN non-mammifère est inclus dans chaque expérience de transfection. Les niveaux d'ARN cellulaires pour le gène de l'IL-6 ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta$ CT sur la base des cellules non-infectées (CTRL ou non présentés). Les niveaux d'IL-6 sécrétés dans les surnageants ont été quantifiés par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$ lorsque comparés aux cellules traitées aux siCon.

3.2.7. Les récepteurs CEACAM1 et TLR2 sont impliqués dans le blocage de l'IFN- β par les macrophages J774A.1 infectés au MHV-3

Les résultats présentés dans la figure 9 indiquent que les ARNm et la production de l'IFN- β étaient peu ou pas induits dans les macrophages infectés avec le virus MHV-3, au contraire de ce qui a été observé avec le virus MHV-A59. Afin de vérifier si le TLR2 est impliqué dans ce blocage de la transcription et/ou de la traduction de l'IFN- β chez les macrophages J774A.1 infectés au MHV-3, ces cellules ont été traitées avec un anticorps anti-TLR2 neutralisant (α -TLR2) avant leur infection avec le virus MHV-3 à une m.o.i. de 1 pour 22 h. Les résultats présentés dans la section I de la figure 18 indiquent que l'ajout d'un anticorps anti-TLR2 n'a aucun effet significatif sur la transcription du gène de l'IFN- β chez les macrophages infectés avec le MHV-3 même si le niveau de transcription était très faible mais significatif par rapport aux cellules non-infectées ($p \leq 0.01$). Le rôle des molécules CEACAM1 et TLR2 dans la réponse IFN de type I chez les macrophages J774A.1 infectés avec le virus MHV-3 a également été étudié à l'aide de transfections avec des siTLR2 et/ou siCC1. La section II-A de la figure 19 montre que les niveaux d'induction génique de l'IFN- β dans les J774A.1 infectés au MHV-3 ont été plus élevés que dans les cellules contrôles non-infectées ($p \leq 0.01$). Par contre, cette augmentation a été réduite par les traitements avec les siCC1 et/ou siTLR2 ($p \leq 0.05$ à 0.01) quoique les niveaux de sécrétion protéique de l'IFN- β chez les cellules infectées soient demeurés très faibles suite à l'infection et que seul le traitement avec les siCC1/siTLR2 a entraîné une légère baisse ($p \leq 0.05$) (Fig. 18 section II-C). L'induction du gène de l'IRF-7 préalablement observée lors de l'infection des J774A.1 avec le virus MHV-3 (Fig. 15D) a également été inhibée par le traitement aux siCC1 et/ou siTLR2 ($p \leq 0.001$) (Fig. 19, section II-B). Ces résultats suggèrent que les bas niveaux d'induction de l'IFN- β lors de l'infection au MHV-3 impliqueraient les récepteurs CEACAM1 et TLR2, mais les niveaux de transcription et de traduction de l'IFN- β demeurent très faibles malgré l'utilisation de siTLR2, suggérant que d'autres mécanismes seraient responsables de l'évasion de l'IFN- β observé avec le virus MHV-3.

I-



II-

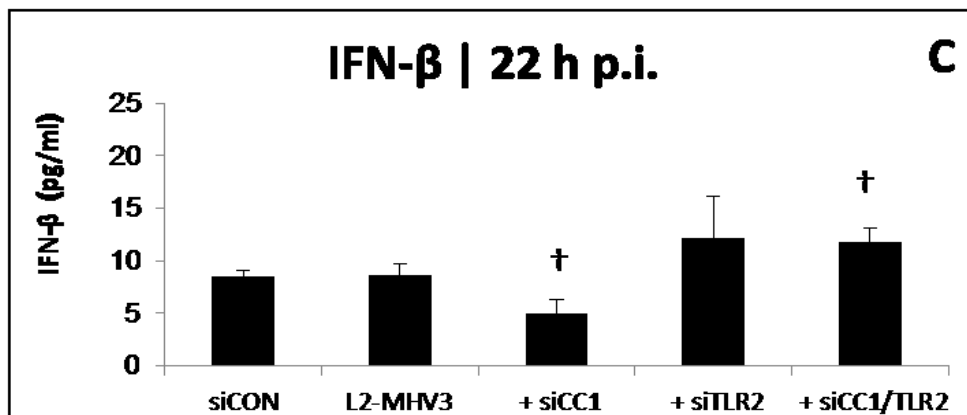
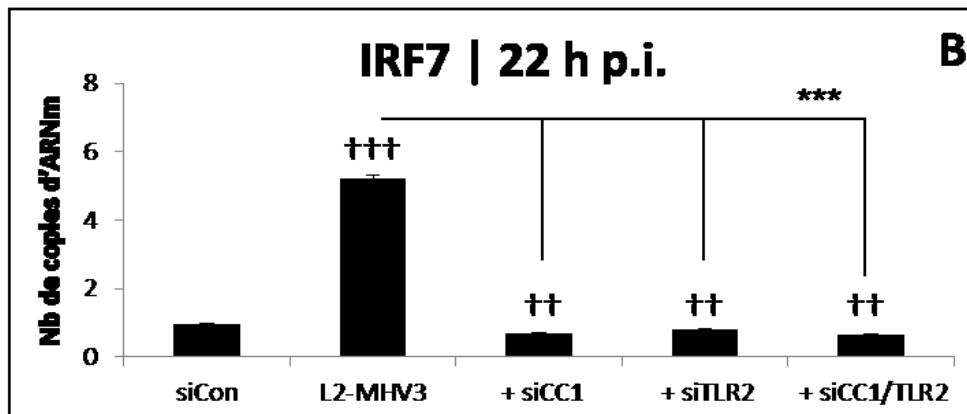
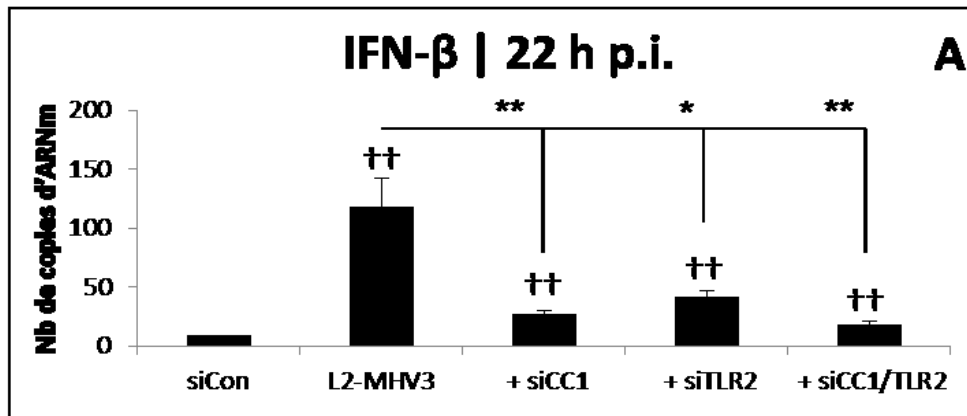


Figure 19: Niveaux d'expression de l'ARNm de l'IFN- β de cellules macrophagiques J774.A1 traitées avec un anticorps anti-TLR2 (Section I) et niveaux d'expression (Section II-A) ou de sécrétion (Section II-C) de l'IFN- β ou niveaux d'expression de l'IRF-7 (Section II-B) de cellules J774.1 traitées avec des petits ARNs interférants pour les gènes CEACAM1a et/ou TLR2 avant infection avec le virus L2-MHV-3 durant 22 h. Des cellules ont été traitées avec un anticorps anti-TLR2 (α -TLR2) avant l'infection ou ont été transfectées avec 25nM d'ARN interférants murins CEACAM1a (siCC1) ou TLR2 (siTLR2) ou les deux (siCC1/siTLR2) avant d'être infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3. L'ARN a été extrait des cellules à 22h p.i. Un contrôle de transfection (siCon) contenant un shARN non-mammifère est inclus dans chaque expérience de transfection. Les niveaux d'ARN cellulaires pour les gènes de l'IFN- β et de l'IRF-7 ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta$ CT sur la base des cellules non-infectées (CTRL ou non présentés). Les niveaux d'IFN- β sécrétés dans les surnageants ont été quantifiés par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. Lorsque comparé aux cellules infectées non-traitées * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ et † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$ lorsque comparés aux cellules traitées aux siCon.

3.2.8. La MAPK p38 est impliquée dans la production rapide de l'IL-6 et la réplication virale du MHV-3 dans les macrophages J774A.1

Jacques *et al.* (2009) ont démontré que le TLR2 et la MAPK p38 étaient impliqués dans la sécrétion de l'IL-6 et du TNF- α dans les macrophages péritonéaux infectés au MHV-3. Par ailleurs, il avait été préalablement montré que la MAPK p38 jouait un rôle important dans la réplication virale du MHV-3 dans les macrophages J774A.1, et ce, dès 30 minutes p.i. (McGilvray *et al.*, 1998). Néanmoins, les mécanismes par lesquels le TLR2 et/ou la MAPK p38 affectent la production de cytokines et la réplication virale ne sont pas connus.

Afin de vérifier si l'activation précoce de la MAPK p38 a pour effet de stimuler ou d'induire plus rapidement la réplication virale du MHV-3 par rapport à celle du MHV-A59, des macrophages J774A.1 ont été infectés avec les virus MHV-3 ou MHV-A59 et, dans un premier temps, les niveaux de réplication virale ont été mesurés par le niveau de transcription du gène viral N-MHV par qRT-PCR dans les premières minutes de l'infection. Effectivement, des niveaux plus élevés d'ARN du gène N-MHV ont été détectés dans les J774A.1 infectés avec le MHV-3 dès 5 minutes p.i., et ce, jusqu'à 60 minutes p.i. ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 20A). Ces niveaux plus élevés d'ARN du gène N-MHV lors de l'infection au MHV-3 peuvent refléter soit la présence de particules virales fixées à la surface des cellules ou déjà localisées à l'intérieur de vésicules endosomales (via l'ARN génomique contenant le gène N) et/ou soit la transcription des premiers ARN viraux au début du cycle répliatif, même si la période de 60 minutes est relativement courte. Afin de distinguer entre la fixation virale et les ARNs N-MHV produits *de novo*, des cellules J774A.1 ont été infectées avec les virus MHV-3 et MHV-A59 précédemment inactivés aux rayons ultraviolets (UV) (non-répliatifs) et les niveaux de l'ARN du gène N-MHV, mesurés par qRT-PCR. La figure 20B révèle que les niveaux de N-MHV détectés lors de l'infection avec un UV-MHV-3 augmentait rapidement pendant les 30 premières minutes p.i., mais avec un sommet atteint en moins de 10 minutes p.i. Dans le cas de l'infection avec un UV-MHV-A59, les niveaux de N-MHV n'augmentaient pas durant la période de 30 minutes p.i.

Une étude de la cinétique de phosphorylation de la MAPK p38 par un test ELISA a alors été réalisée sur des J774A.1 infectés avec les virus MHV-3 ou MHV-A59 pendant les 60 premières minutes de l'infection. L'agoniste du TLR2, le Pam3C5K4, a été utilisé comme contrôle positif de la cinétique d'induction de la voie TLR2 menant à la phosphorylation de la MAPK p38. Les résultats de la figure 20C révèlent que la phosphorylation de la MAPK p38 augmentait rapidement dans les cellules traitées avec l'agoniste du TLR2 et atteignait un sommet après 30 minutes p.i. Une telle cinétique dans les 30 premières minutes de la

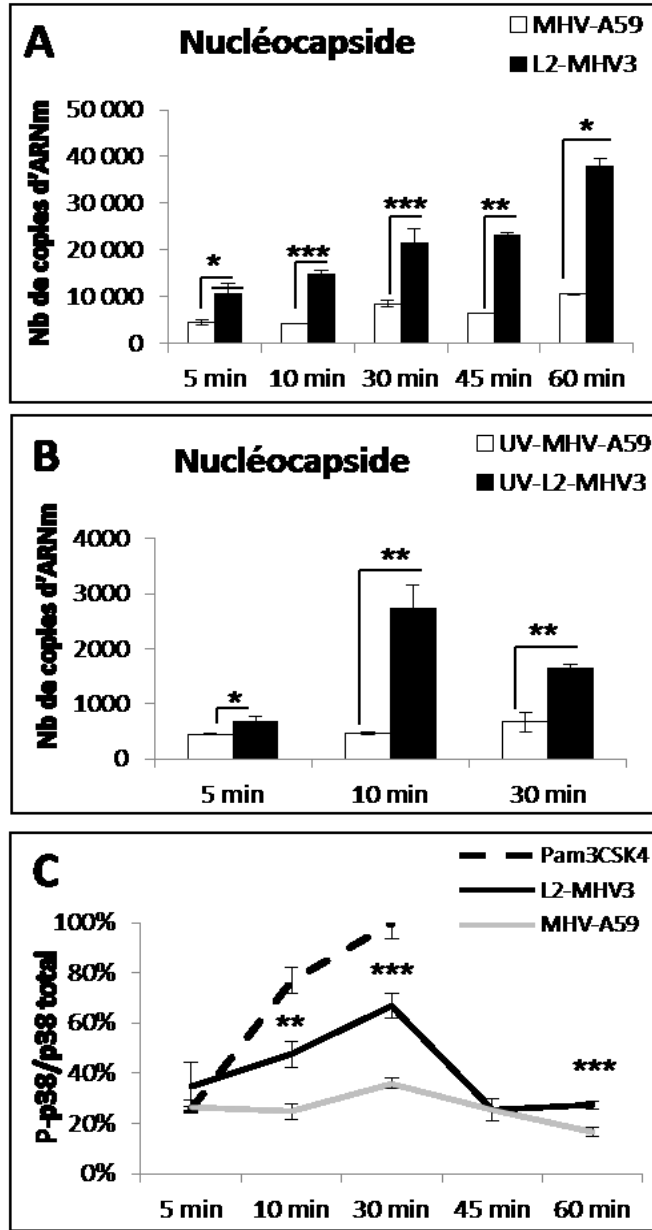


Figure 20: Cinétique des niveaux d'expression de l'ARN viral de la nucléocapside (A et B) et des niveaux de phosphorylation de la p38 MAPK (C) dans les cellules macrophagiques J774A.1 infectées avec le virus L2-MHV-3 ou MHV-A59 (A, C) ou mis en contact avec ces virus inactivés aux rayons U.V. (B) ou traitées avec un agoniste de TLR2 (Pam₃CSK4) (C). Des cellules ont été infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3 ou MHV-A59 infectieux ou inactivés aux rayons U.V. et l'ARN a été extrait des cellules infectées et non-infectées à différents temps p.i. Les niveaux d'ARN viraux ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des cellules non-infectées (non présentés). Les niveaux de p38 MAPK phosphorylés ont été quantifiés par un test ELISA. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

phosphorylation de la MAPK p38 n'a été observée que dans les cellules infectées avec le virus MHV-3 ($p \leq 0.01$ à 0.001) et non pas chez celles infectées avec le virus MHV-A59. Cette croissance rapide de la phosphorylation de la MAPK p38 dans les cellules infectées au MHV-3 a été suivie d'une chute de ces niveaux de phosphorylation à 45 minutes p.i., retouARNnt aux niveaux mesurés à 5 minutes p.i. Ces résultats suggèrent que le MHV-3 induit rapidement la phosphorylation de la MAPK p38 de façon similaire à celle induite par un agoniste du TLR2, et ce dès la fixation et/ou l'intéARNlisation du virus.

3.2.9. Les voies d'endocytose dépendantes de la clathrine et des TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline sont différemment impliquées dans la réplication du MHV-3 et du MHV-A59 dans les macrophages J774A.1

La fixation d'un virus à son ou ses récepteurs est normalement suivie d'une intéARNlisation par des voies d'endocytose dépendantes de la clathrine ou des radeaux lipidiques/cavéoline. Il est postulé que la capacité du virus MHV-3, et non pas du MHV-A59, à se fixer sur le TLR2 à la surface des macrophages infectés pourrait impliquer la voie endocytaire dépendante des radeaux lipidiques/cavéoline plutôt que la voie dépendante de la clathrine. Afin d'étudier l'implication de ces deux voies endosomales dans les infections avec les virus hautement virulent MHV-3 et moyennement virulent MHV-A59, des cellules macrophagiques J774A.1 ont été traitées, soit avec un anticorps anti-TLR2 ou avec des inhibiteurs de la voie endosomale dépendante de la clathrine (chlorpromazine), de l'acidification endosomale (chloroquine) et de la voie endosomale dépendante de la cavéoline/radeaux lipiques (nystatin) avant l'infection avec les virus MHV-3 ou MHV-A59. Les niveaux d'ARN du gène N-MHV ont été utilisés comme indicateur de la réplication virale. Les résultats présentés aux figures 21A et C révèlent que le traitement des cellules avec l'anticorps α -TLR2 n'a pas réduit significativement la réplication ni du MHV-3, ni celle du MHV-A59. Le traitement des cellules J774A.1 infectées avec de la chlorpromazine ou de la chloroquine a réduit les niveaux d'ARN du gène N-MHV chez les cellules infectées avec l'un et l'autre des sérotypes à 22 h p.i. ($p \leq 0.001$) (Fig. 21A et B). À l'opposé, le traitement de ces macrophages infectés avec le virus MHV-3 avec du nystatin a augmenté significativement les niveaux de l'ARN du gène N-MHV ($p \leq 0.001$) tandis qu'aucun effet sur la réplication du MHV-A59 n'a été observé. De plus, cet effet du nystatin s'est avéré détectable dès 5 h p.i. ($p \leq 0.001$), ce qui n'est pas le cas pour les autres inhibiteurs d'endocytose dont l'effet n'est significatif qu'à 22 h p.i. (Fig. 21C). Ces résultats révèlent : 1) que le MHV-3 et le MHV-A59 utilisent la voie endosomale dépendante de la clathrine et que la réplication de ces deux virus est dépendante du pH.

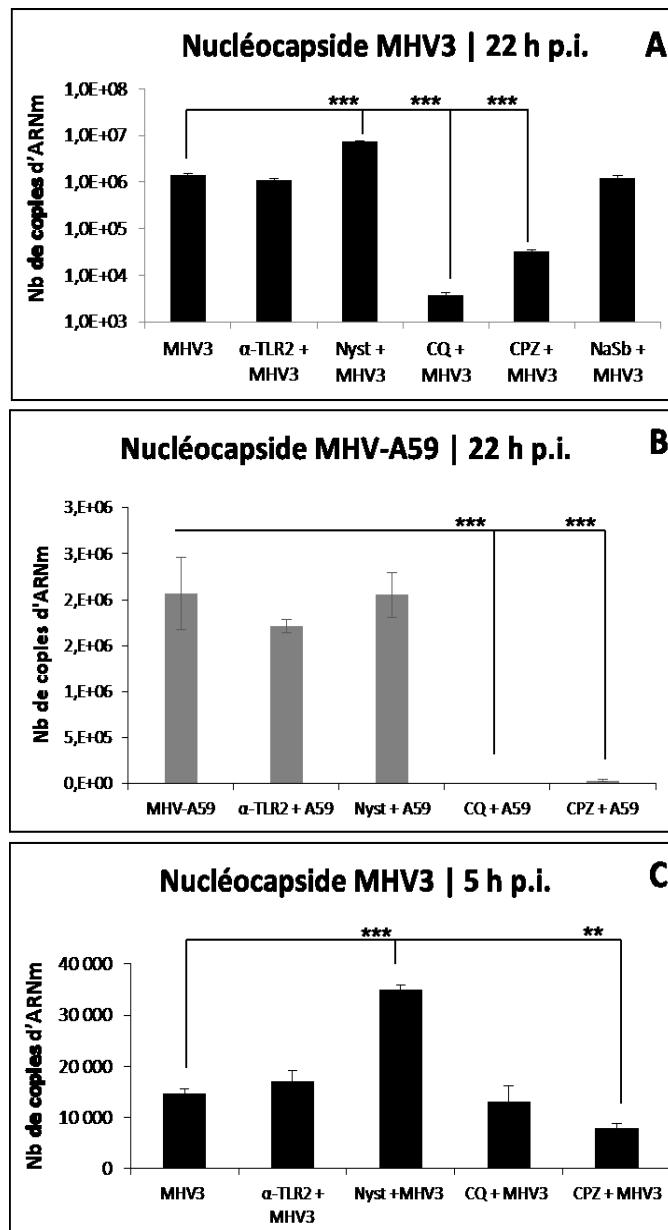


Figure 21: Niveaux d'expression de l'ARN viral de la nucléocapside dans les cellules macrophagiques J774A.1 traitées avec un anticorps anti-TLR2, des inhibiteurs des différentes voies d'endocytose ou de la phosphatase SHP-1 avant infection avec le virus L2-MHV-3 (A, C) ou MHV-A59 (B) pour 5 h (C) ou 22 h (A, B). Des cellules ont été traitées avec des concentrations optimales de chacun des inhibiteurs des voies d'endocytose, soient dépendante de la cavéoline/radeaux lipidiques (nystatin: Nyst), de la fusion endosomale dépendante du pH (chloroquine: CQ), de la voie d'endocytose dépendant de la clathrine (chlorpromazine: CPZ), de la phosphatase SHP-1 activée par le récepteur CEACAM1a (NaSb) ou de l'anticorps anti-TLR2 (α -TLR2). Elles ont ensuite été infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3 ou MHV-A59 et l'ARN a été extrait des cellules infectées et non-infectées (non présentés) à 5 h (B) ou 22 h p.i. (A, C). Les niveaux d'ARN viraux ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta$ CT sur la base des cellules non-infectées (non présentés). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

acide, et 2) que seule la réplication du virus MHV-3 a été affectée par le nystatin, un inhibiteur de la voie endosomale dépendante de la cavéoline/radeaux lipidiques.

3.2.10. Les radeaux lipidiques sont impliqués dans l'infection au MHV-3

Afin de confirmer que l'effet apparemment stimulateur du nystatin sur la réplication du MHV-3 est reliée à une altération de la voie endosomale dépendant du cholestérol et de la cavéoline/radeaux lipidiques, des cellules J774A.1 ont été traitées avec du cholestérol hydrosoluble en présence ou non de nystatin avant leur infection avec le MHV-3. Les résultats de la figure 22A montrent que l'ajout seul du cholestérol exogène n'a aucun effet sur la réplication virale. Par contre, cet ajout de cholestérol en présence de nystatin a inhibé complètement l'augmentation des niveaux de l'ARN du gène de N-MHV induit par le nystatin lors de l'infection au MHV-3 ($p \leq 0.01$). Ces résultats confirment que l'effet observé lors du traitement des cellules au nystatin est en rapport avec son action de séquestration du cholestérol.

Afin de vérifier si l'augmentation de la réplication virale par le nystatin résulterait d'un transfert de l'endocytose par la voie caveoline/radeaux lipidiques vers la voie dépendante de la clathrine, tel que récemment proposé pour l'intéARNlisation de l'endostatine (Chen *et al.*, 2011), des cellules J774A.1 ont été simultanément traitées avec du nystatin et des inhibiteurs de la voie clathrine, soit avec du dynasore (inhibiteur de la dynamine), de la chlorpromazine ou de la chloroquine avant l'infection avec le virus MHV-3 pour 22 h. Ainsi, l'augmentation des niveaux d'ARN du gène du N-MHV par le nystatin dans les cellules infectées au MHV-3 a été partiellement réduit par l'ajout du dynasore, de la chloroquine ou de la chlorpromazine ($p \leq 0.05$ à 0.01 lorsque comparés aux cellules infectées en présence de nystatin) (Fig. 22B).

3.2.11. La séquestration du MHV-3 par le complexe TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline réduit sa reconnaissance par les TLRs et les hélicases

Il a été démontré à la figure 14 que la transcription des gènes des TLRs et des hélicases était plus importante dans les cellules infectées avec le MHV-A59 plutôt qu'avec le MHV-3. Afin de vérifier si la fixation et/ou l'intéARNlisation du MHV-3 via la voie endosomale dépendant des radeaux lipidiques/cavéoline est responsable de l'absence de transcription des senseurs viraux lors de l'infection par le MHV-3, les niveaux d'expression d'ARNm des gènes des TLRs, incluant celui du TLR2, ont été quantifiés par qRT-PCR dans des cellules J774A.1 traitées avec un anticorps anti-TLR2 ou avec le nystatin et infectés avec le MHV-3. Tel que montré dans la figure 23A, la perturbation de la voie endosomale

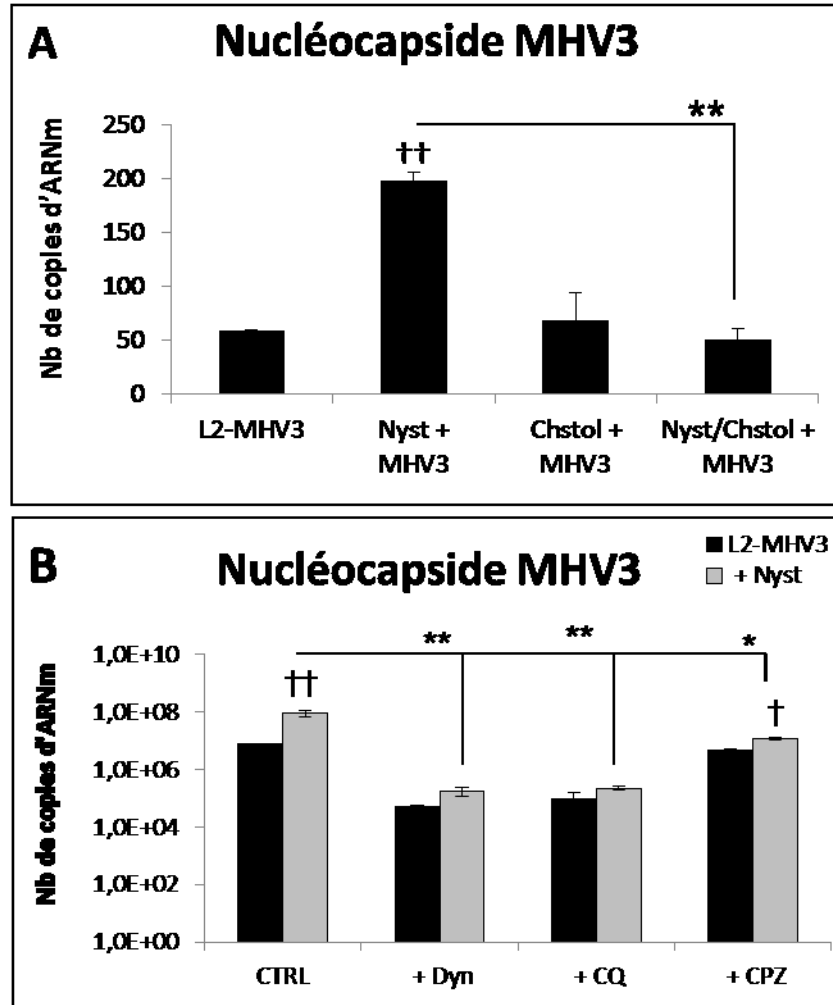


Figure 22: Niveaux d'expression de l'ARN viral de la nucléocapside dans les cellules macrophagiques J774A.1 traitées au nystatin en présence ou non de cholestérol (A) ou d'inhibiteurs des autres voies d'endocytoses (B) et infectées avec le virus L2-MHV-3 (A, B) pour 22 h. Des cellules ont été traitées au nystatin en présence ou non de cholestérol hydrosoluble exogène (A) ou en présence d'inhibiteurs de la dynamine (dynasore), de la fusion endosomale pH-dépendante (chloroquine) ou de la voie endocytairre clathrine dépendante (chlorpromazine) avant infection avec une m.o.i. de 1 du virus L2-MHV-3 et l'ARN extrait des cellules infectées et non-infectées (non présentés) à 22 h p.i. Les niveaux d'ARN viraux ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des cellules non-infectées (non présentés). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. Lorsque comparé entre traitements additionnels au nystatin * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$ lorsque comparés aux cellules infectées contrôles.

cavéoline/radeaux lipidiques par le traitement au nystatin a augmenté l'expression de l'ARNm des gènes du TLR2 dans les cellules infectées avec le MHV-3 ($p \leq 0.001$) et également celui du TLR-3 et des gènes des hélicases RIG-I et MDA5 ($p \leq 0.05$ à 0.01) tandis que le traitement à l' α -TLR2 n'a eu aucun effet sur les autres senseurs, même si l'anticorps anti-TLR2 seul a diminué la transcription du TLR2 et du MDA5 par rapport aux faibles niveaux induits par le virus MHV-3 ($p \leq 0.05$) (Fig. 23 A et E). Ces résultats indiquent que la séquestration du MHV-3 par la fixation au TLR2 dans les radeaux lipidiques/cavéoline serait impliqué dans la diminution de la transcription des gènes des senseurs antiviraux, tels que le TLR-3 et les hélicases, ce qui constitue un moyen d'évasion du MHV-3 de ces senseurs viraux.

3.2.12. La séquestration du MHV-3 par le complexe TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline module les niveaux d'expression de l'IL-6 et de l'IFN- β dans les macrophages J774A.1

Afin de vérifier si l'induction rapide de l'IL-6 et/ou l'absence de production de l'IFN- β dans les macrophages infectés au MHV-3 dépendent aussi de la fixation virale au TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline, les niveaux d'induction génique de ces cytokines ont été mesurés par qRT-PCR dans des J774A.1 traités avec l'anticorps anti-TLR2, le nystatin, la chlorpromazine ou le stibogluconate de sodium (SS) et infectés avec le MHV-3 pour 22 h. Tel que montré dans la figure 24A, le nystatin a fortement diminué la production d'ARNm de l'IL-6 ($p \leq 0.001$), la chlorpromazine l'a aussi diminué ($p \leq 0.001$) dans les cellules infectées avec le MHV-3 tandis que le SS n'a eu aucun effet à 22 h p.i. Comme il était attendu, le traitement avec l'anti-TLR2 a abrogé complètement l'induction génique de l'IL-6 ($p \leq 0.001$). Nous avons précédemment observé que le niveau d'ARN de l'IL-6 était plus élevé à 5 h p.i. qu'à 22 h p.i. (Fig. 24A et C). L'expérience a donc été réalisée durant 5 h p.i. Le traitement avec le nystatin a augmenté significativement les niveaux d'ARNm de l'IL-6 à 5 h p.i. ($p \leq 0.001$) et que le traitement avec l'anticorps anti-TLR2 a inhibé la transcription de l'IL-6 ($p \leq 0.01$ à 0.001) alors que la chlorpromazine n'a eu aucun effet (Fig. 24B). Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que la production d'IL-6 induit par le MHV-3 dès 5 h p.i. dépend de la présence du TLR2 et non pas de l'endocytose par la voie de la clathrine et que l'augmentation observée avec le nystatin pourrait résulter de l'augmentation de la transcription du TLR2, tel que montré dans la figure 17A. Par contre, à 22 h p.i., la faible transcription de l'IL-6 dépendrait aussi bien de la présence du TLR2 que de l'endocytose via la clathrine.

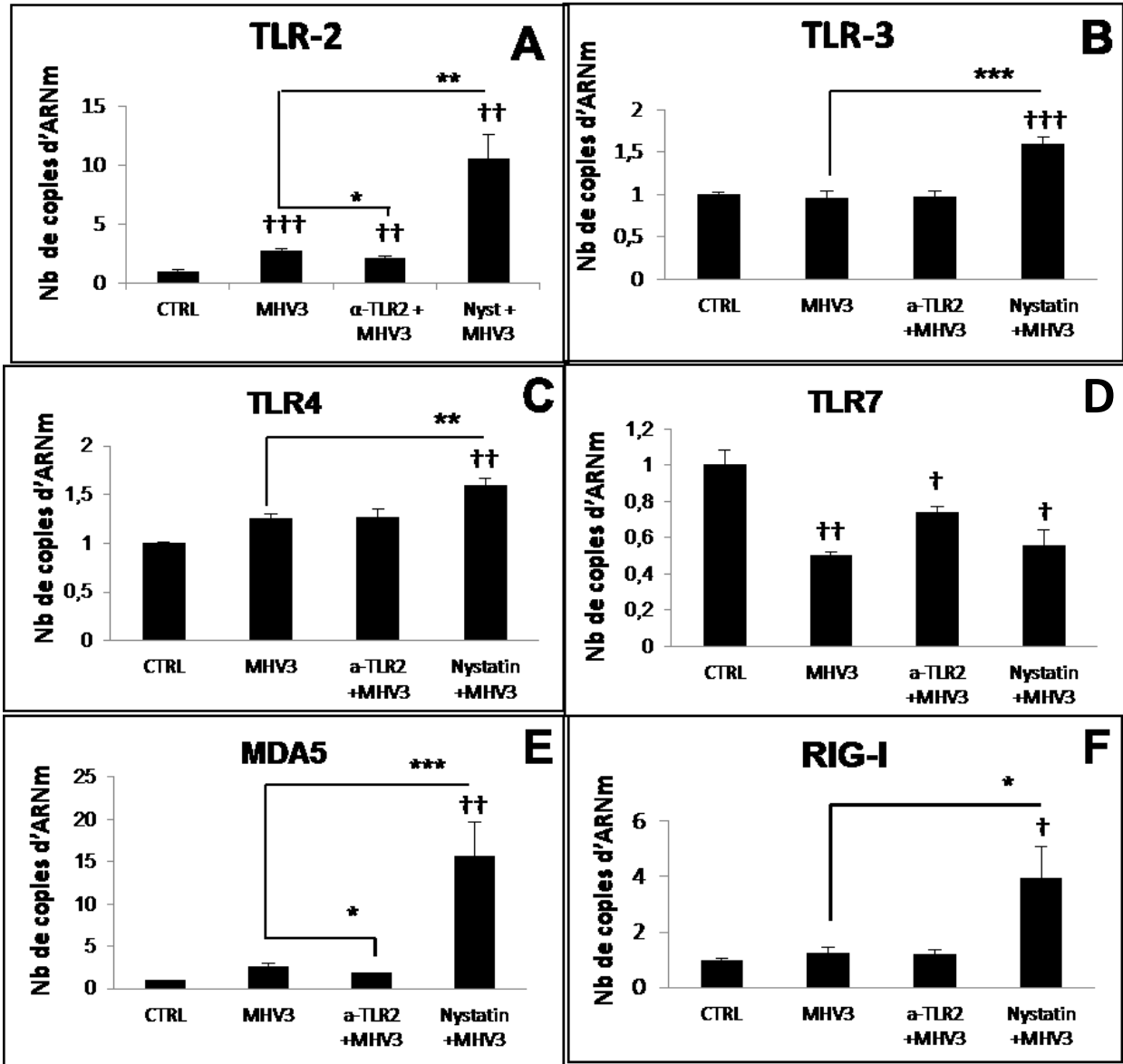


Figure 23: Niveaux d'expression génique du TLR2, 3, 4, et 7 (A à D), MDA-5 (E) et RIG-1 (F) dans les cellules macrophagiques J774A.1 traitées avec l'anticorps anti-TLR2 ou avec du nystatin et infectées avec le virus L2-MHV-3 durant 22 h. Des cellules ont été traitées avec l'anticorps anti-TLR2 et/ou du nystatin avant d'être infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3. L'ARN des cellules infectées et non-infectées (CTRL) a été extrait à 22h p.i. et les niveaux d'ARNm pour les différents gènes ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des cellules non-infectées. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ lorsque comparés à l'infection seule ; † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$ lorsque comparés aux cellules contrôles.

D'autre part, les niveaux d'ARNm de l'IFN- β ont été fortement augmentés lorsque les cellules étaient traitées avec le nystatin ($p \leq 0.001$) alors qu'ils étaient diminués lorsque traitées avec de la chlorpromazine avant l'infection avec le MHV-3 durant 22 h (Fig. 24C). Par contre, l'effet du nystatin sur le niveau de transcription du gène de l'IFN- β a été plus mitigé à 5 h p.i. ($p \leq 0.01$) (Fig. 24D). Les effets du nystatin et d'un anticorps anti-TLR2 ont aussi été vérifiés avec le virus moins virulent MHV-A59 et ces deux traitements n'ont eu aucun effet (résultats non-montrés). Ces résultats suggèrent que la capacité du MHV-3 de se fixer sur le TLR2 dans les radeaux lipidiques serait impliquée dans la faible transcription de l'IFN- β , probablement via son évasion des senseurs endosomaux et des hélicases, tel que montré à la Figure 14, évasion qui disparaît lorsque les cellules sont traitées avec le nystatin (Figure 23).

3.3 Les hépatocytes sont permissifs à l'infection *in vitro* avec le virus L2-MHV-3 et deviennent inflammatoires.

La gravité de l'hépatite induite par le MHV-3 ne se limite pas à l'infection des macrophages car les hépatocytes sont une cible importante pour ce virus hautement hépatotrope, tel que montré dans les coupes histologiques de foie de souris C57BL/6 infectées avec le virus MHV-3 (Fig. 7, section I). D'ailleurs, les hépatocytes expriment de grandes quantités de la molécule CEACAM1 (Godfraind & Coutelier, 1998), le récepteur du MHV, et ils sont connus comme étant permissifs à l'infection au MHV-3 (Taguchi *et al.*, 1986). De plus, les hépatocytes expriment aussi certains senseurs viraux, dont le TLR2 (Matsumura *et al.*, 2004). Il est postulé que la permissivité des hépatocytes à l'infection par le MHV-3 et la présence du TLR2 seraient impliquées dans l'augmentation de l'expression des cytokines et chimiokines inflammatoires.

3.3.1. La permissivité des hépatocytes à l'infection par le virus MHV-3.

Le foie est majoritairement composé d'hépatocytes (Ishibash *et al.*, 2009) et ces cellules sont parmi les premières à enclencher la réponse immunitaire innée hépatique (Nemeth *et al.*, 2009). Afin d'étudier la réponse immunitaire innée des hépatocytes lors de l'infection avec le virus L2-MHV-3, une lignée cellulaire hépatocytaire, les FL83-B, a été utilisée. Ces cellules ont été infectées avec ce virus et à 4, 8, 12 et 16 h p.i., leur ARN a été extrait et le surnageant récolté.

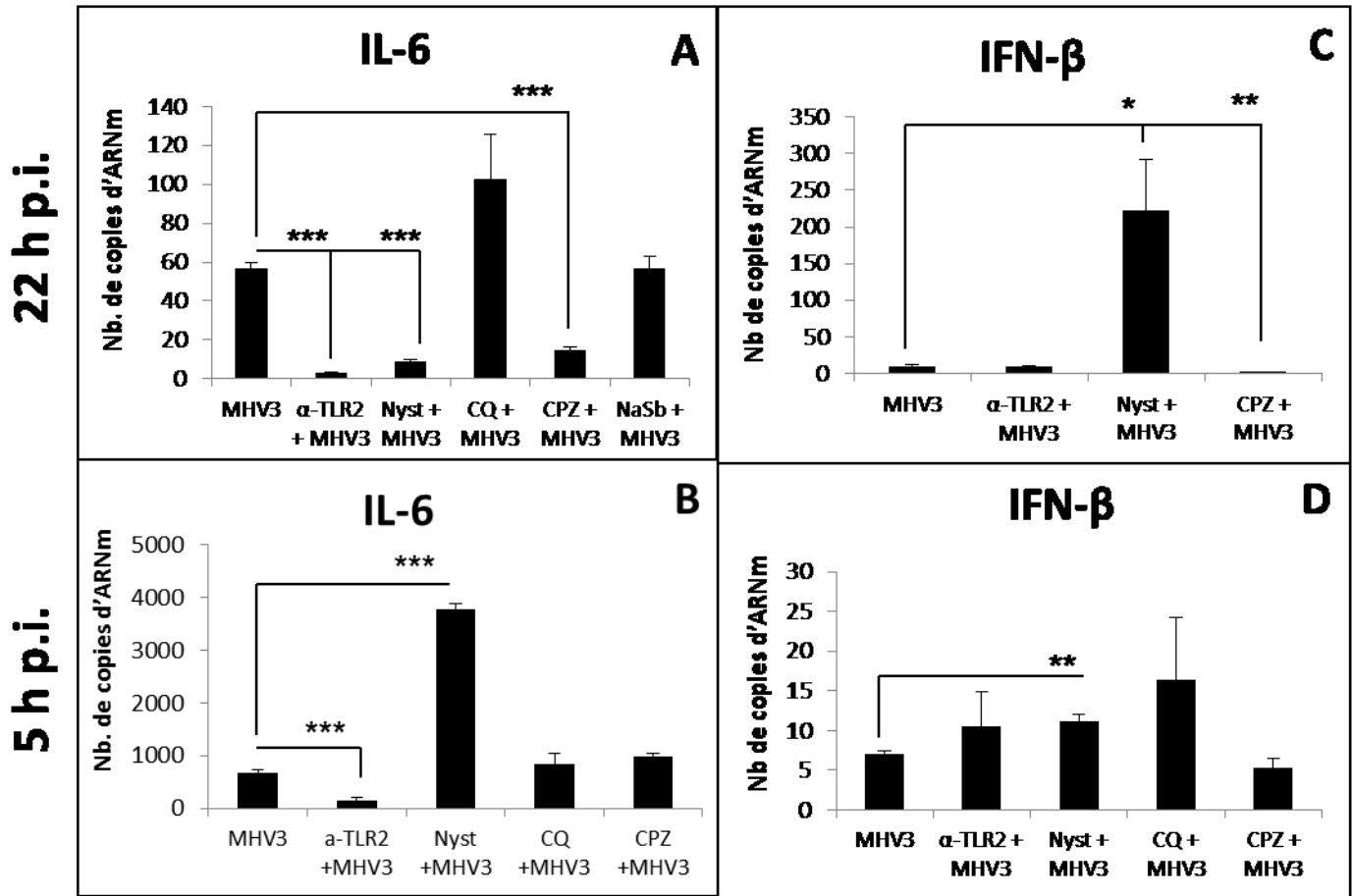


Figure 24: Niveaux d'expression génique de l'IL-6 (A, B) et de l'IFN-β (C, D) dans les cellules macrophagiques J774A.1 traitées avec un anticorps anti-TLR2 ou différents inhibiteurs de la voie d'endocytose ou de la phosphatase SHP-1 (NaSb) et infectées avec le virus L2-MHV-3 pour 22 h (A, C) ou 5 h (B, D). Des cellules ont été traitées avec l'anticorps anti-TLR2 ou avec chacun des inhibiteurs d'endocytose (voir Matériel et Méthodes) avant d'être infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3. L'ARN des cellules infectées et traitées ou non-traitées a été extrait à 5 h ou 22 h p.i. et les niveaux d'ARN cellulaire pour l'IL-6 et l'IFN-β ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des cellules non-infectées. Les résultats représentent trois expériences indépendantes. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Les cellules infectées ont montré un ECP caractérisé par la formation de grappes cellulaires et la perturbation du tapis cellulaire et une baisse de viabilité cellulaire, tel que mesuré par les niveaux de MTS/PMS, vers 16 h p.i. (résultats non-montrés). Les niveaux de réplication virale ont été évalués par les quantités relatives d'ARN du gène N-MHV par qRT-PCR et les titres viraux ont été déterminés selon la méthode de dilutions décimales sur cellules L2. La figure 25A montre que le L2-MHV-3 a infecté les cellules hépatocytaires FL83-B et s'est répliqué progressivement jusqu'à 12 h p.i., tel que mis en évidence par les niveaux d'ARN du gène N-MHV ($p \leq 0.001$). Par contre, à 16 h p.i., le niveau d'ARN viral a diminué en-deçà des niveaux mesurés à 8 h p.i. ($p \leq 0.001$) (Fig. 25A). Cette cinétique reflète la production de particules virales infectieuses, tel que démontré par les titres de virus dans des surnageants cellulaires, puisque les titres de particules virales infectieuses ont graduellement augmenté jusqu'à 12 h p.i. ($p \leq 0.05$ à 0.001) suivi d'une baisse à 16 h p.i. à des niveaux similaires à ceux observés à 8 h p.i. ($p \leq 0.001$). Ces résultats démontrent que le virus L2-MHV-3 infecte les hépatocytes et se réplique rapidement dans ces cellules jusqu'à la mort cellulaire.

3.3.2. Le L2-MHV-3 active les réponses inflammatoires antivirales chez les hépatocytes via sa fixation au TLR2

Nous avons observé une augmentation des cytokines et des chimiokines inflammatoires dans le foie des souris infectées avec le virus MHV-3 en présence d'une augmentation de la transcription seulement du TLR2 (Figs 8, 10 et 11), suggérant que les hépatocytes pourraient, à l'instar des macrophages (Figs 8 et 10) activer ces facteurs inflammatoires via sa fixation du virus au TLR2. Afin de vérifier les propriétés pro-inflammatoires des hépatocytes, les cellules FL83-B ont été infectées avec le virus L2-MHV-3 et leur ARN a été extrait à 4, 8, 12 et 16 h p.i. Les niveaux d'induction génique des cytokines IL-6, TNF- α , de l'IFN- β et des chimiokines CCL2, CXCL-1 et CXCL-10 ont été évalués par qRT-PCR. La figure 26A révèle une induction rapide, dès 4 h p.i. ($p \leq 0.01$) et soutenue jusqu'à 16 h p.i. ($p \leq 0.01$ à 0.001) du TLR2 dans les hépatocytes infectés avec le L2-MHV-3. Une telle cinétique d'induction est également observée pour l'ARNm de l'IFN- β qui est significativement induit dès 8 h p.i. ($p \leq 0.05$) et ce jusqu'à 16 h p.i. ($p \leq 0.001$) mais à des niveaux très faibles. La figure 26D indique que le TNF- α a été significativement transcrit chez les hépatocytes FL83-B infectés avec le virus L2-MHV-3 dès 8 h p.i. ($p \leq 0.01$) et que cette induction a progressé lentement pour atteindre des niveaux beaucoup plus élevés entre 12 et 16 h p.i. ($p \leq 0.01$ à 0.001). La cinétique de transcription de l'IL-6, tel que représentée à la figure 26C, indique une induction significative à 8 h p.i. ($p \leq$

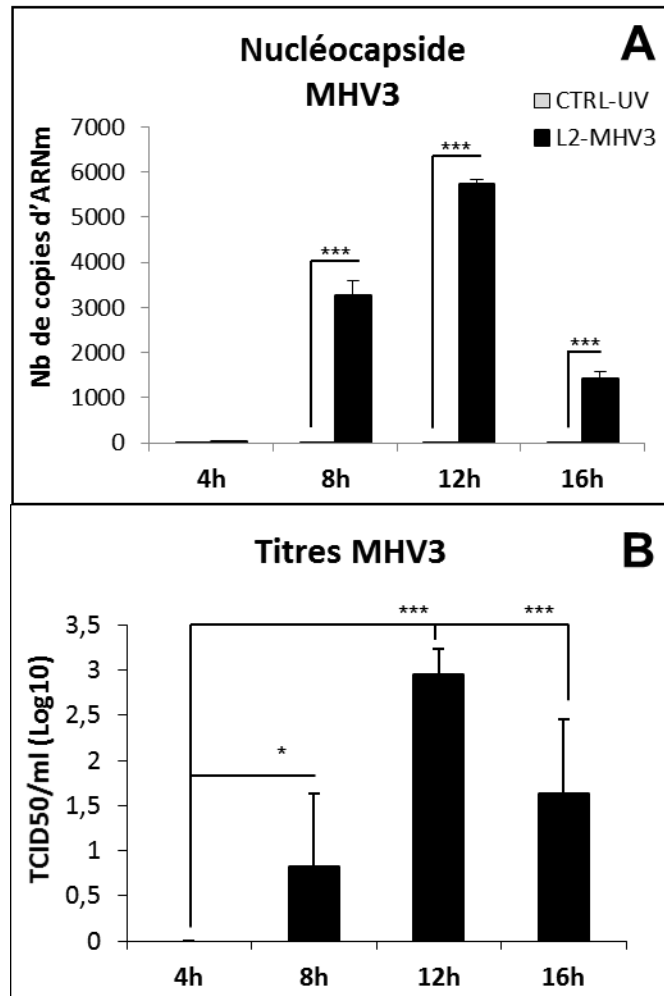


Figure 25: Cinétique des niveaux d'expression de l'ARN de la nucléocapside du virus MHV-3 (A) et titres viraux (B) dans les surnageants d'hépatocytes FL83-B infectés avec le virus L2-MHV-3. Des cellules ont été infectées à une m.o.i. de 1 et l'ARN cellulaire a été extrait des cellules infectées ou non-infectées avec du L2-MHV-3 inactivé aux U.V. (CTRL-UV) ou infectieux à différents temps p.i. Les niveaux d'ARN viral de la nucléocapside ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$. Les particules virales infectieuses sécrétées dans les surnageants ont été titrées par la technique de dilutions décimales sur des cellules L2 et les résultats exprimés en $DICT_{50}/ml$. Les expériences ont été réalisées en triplicata. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

0.05) et une augmentation importante des niveaux d'ARNm à 12 h p.i. ($p \leq 0.001$) avant la diminution observée à 16 h p.i. ($p \leq 0.001$) où les niveaux restent tout de même plus élevés qu'à 8 h p.i. Les niveaux de transcription du gène de la chimiokine CCL2 ont été très peu augmentés dans ces cellules lorsqu'infectées avec le virus L2-MHV-3 et n'a atteint des niveaux significatifs qu'à 12 h p.i. ($p \leq 0.05$) avec une légère augmentation à 16 h p.i. ($p \leq 0.01$) (Fig. 26E). Par contre, les chimiokines CXCL1 et CXCL10 ont atteint des niveaux significatifs dès 8 h p.i. ($p \leq 0.01$ et 0.05 respectivement) (Fig. 26 F et G) et ces niveaux ont progressé jusqu'à 16 h p.i. ($p \leq 0.001$). Ces résultats démontrent que le TLR2 est induit dans les hépatocytes infectés au L2-MHV-3 et que les éléments primaires de la réponse immunitaire innée tels que les cytokines inflammatoires IL-6, TNF- α , les chimiokines CCL2, CXCL1, CXCL10 et l'IFN- β ont également été induits lors de cette infection.

3.3.3. L'infection des hépatocytes FL83-B par le virus hautement virulent L2-MHV-3 entraîne une production rapide et soutenue des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et de l'IFN- β .

Afin de vérifier si la transcription des facteurs inflammatoires observée dans les hépatocytes FL83-B infectés avec le virus L2-MHV-3 se traduit par un effet biologique, des cellules FL83-B ont été infectées et les protéines totales ont été extraites à 8, 12 et 16 h p.i. Les niveaux de l'IL-6, du TNF- α , de l'IFN- β et des chimiokines CCL2 et CXCL10 ont été quantifiés par des tests ELISA. Les figures 27A et B montrent que les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α suivent la même cinétique de sécrétion que celle de leur transcription, c'est-à-dire que des niveaux significatifs de sécrétion ont été détectés à 12 h p.i. ($p \leq 0.001$ et 0.01 respectivement) et ont atteint leur maximum à 16 h p.i. ($p \leq 0.001$). Cette même progression dans la production d'IFN- β a été observée et des niveaux significatifs ont été atteints dès 8 h p.i. ($p \leq 0.001$) suivis d'augmentations graduelles à 12 et 16 h p.i. ($p \leq 0.001$) (Fig. 27E), quoique les concentrations produites soient demeurées assez faibles. Par contre, la production des chimiokines CXCL10 et CCL2 a été rapidement augmentée, dès 8 h p.i. ($p \leq 0.001$) et cette production est restée stable pour la durée étudiée de l'infection ($p \leq 0.05$ à 0.01) (Fig. 27C et D). Ces résultats indiquent que la transcription de ces facteurs inflammatoires par les hépatocytes est suivie de leur sécrétion dans les surnageants cellulaires.

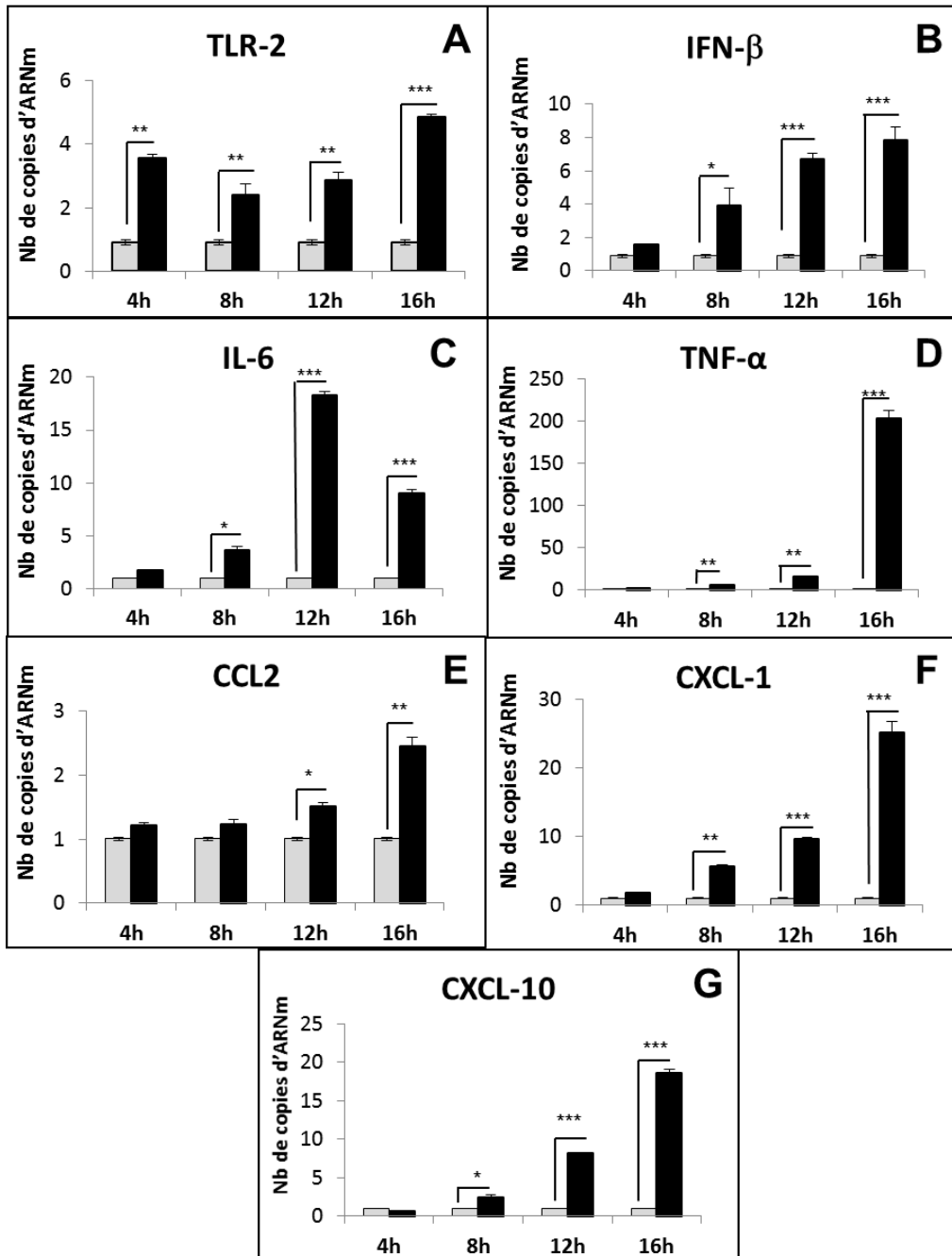


Figure 26: Cinétique des niveaux d'expression génique de TLR2 (A), IFN-β (B), IL-6 (C), TNF-α (D), CCL2 (E), CXCL-1(F) et CXCL-10(G) dans les hépatocytes FL83-B infectés avec le virus L2-MHV-3. Des cellules ont été infectées à une m.o.i. de 1 et l'ARN extrait à différents temps p.i. Les niveaux d'ARN pour chacun des gènes ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des niveaux dans des cellules non-infectées. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

3.3.4. La production des cytokines et chimiokines par les hépatocytes infectés par le L2-MHV-3 est partiellement dépendante du TLR2.

Afin de vérifier si le récepteur de surface TLR2 joue un rôle dans la production des cytokines et chimiokines inflammatoires chez les hépatocytes infectés avec le L2-MHV-3, des cellules FL83-B ont été traitées avec des siTLR2 avant leur infection et l'ARNm a été extrait à 16 h p.i. Les niveaux d'ARNm des gènes de l'IL-6, du TNF- α , des chimiokines CXCL1, CXCL10, CCL2 et de l'IFN- β dans les cellules traitées avec des siTLR2 ont été mesurés par qRT-PCR et comparés à ceux observés chez des hépatocytes infectés mais non-traités avec les siTLR2 ou ceux non-infectés et seulement traités avec des siTLR2. Le blocage de l'expression du TLR2 dans les cellules FL83-B a entraîné une réduction quasi-totale de l'induction du TNF- α suite à l'infection au L2-MHV-3 ($p \leq 0.001$). Seules de faibles quantités d'ARNm du TNF- α ont été détectées dans ces cellules suite à la diminution de l'expression génique de TLR2 chez les cellules infectées par rapport aux cellules non-infectées mais traitées ($p \leq 0.01$). Par contre, le niveau de transcription de l'IL-6 à 16 h p.i. a été augmenté en présence des siTLR2 par rapport au niveau de transcription des cellules infectées mais non-traitées ($p \leq 0.01$) (Fig. 28A). Il est à remarquer que le niveau de transcription de l'IL-6 reste relativement faible dans les hépatocytes même si l'infection virale entraîne son augmentation ($p \leq 0.001$).

D'autre part, les cellules traitées avec les siTLR2 ont montré un niveau significativement inférieur de la transcription de l'IFN- β ($p \leq 0.01$) malgré une augmentation de la transcription de ce gène suite à l'infection virale ($p \leq 0.01$). Les niveaux d'IFN- β demeurent très faibles (Fig. 28C). Le TLR2 semble également impliqué dans l'induction des chimiokines pro-inflammatoires par les hépatocytes infectés avec le L2-MHV-3 puisque la réduction de son expression a significativement diminué la transcription des chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2 ($p \leq 0.01$ à 0.001) (Fig. 28D, E, F respectivement). Des niveaux significatifs de ces chimiokines sont tout de même détectés dans les cellules FL83-B prétraitées aux siTLR2 ($p \leq 0.05$ à 0.001) (Fig. 28D, E, F). Ces résultats supportent le rôle du TLR2 stimulateur de la réponse inflammatoire des hépatocytes suite à l'infection avec le virus hautement hépatotrope L2-MHV-3.

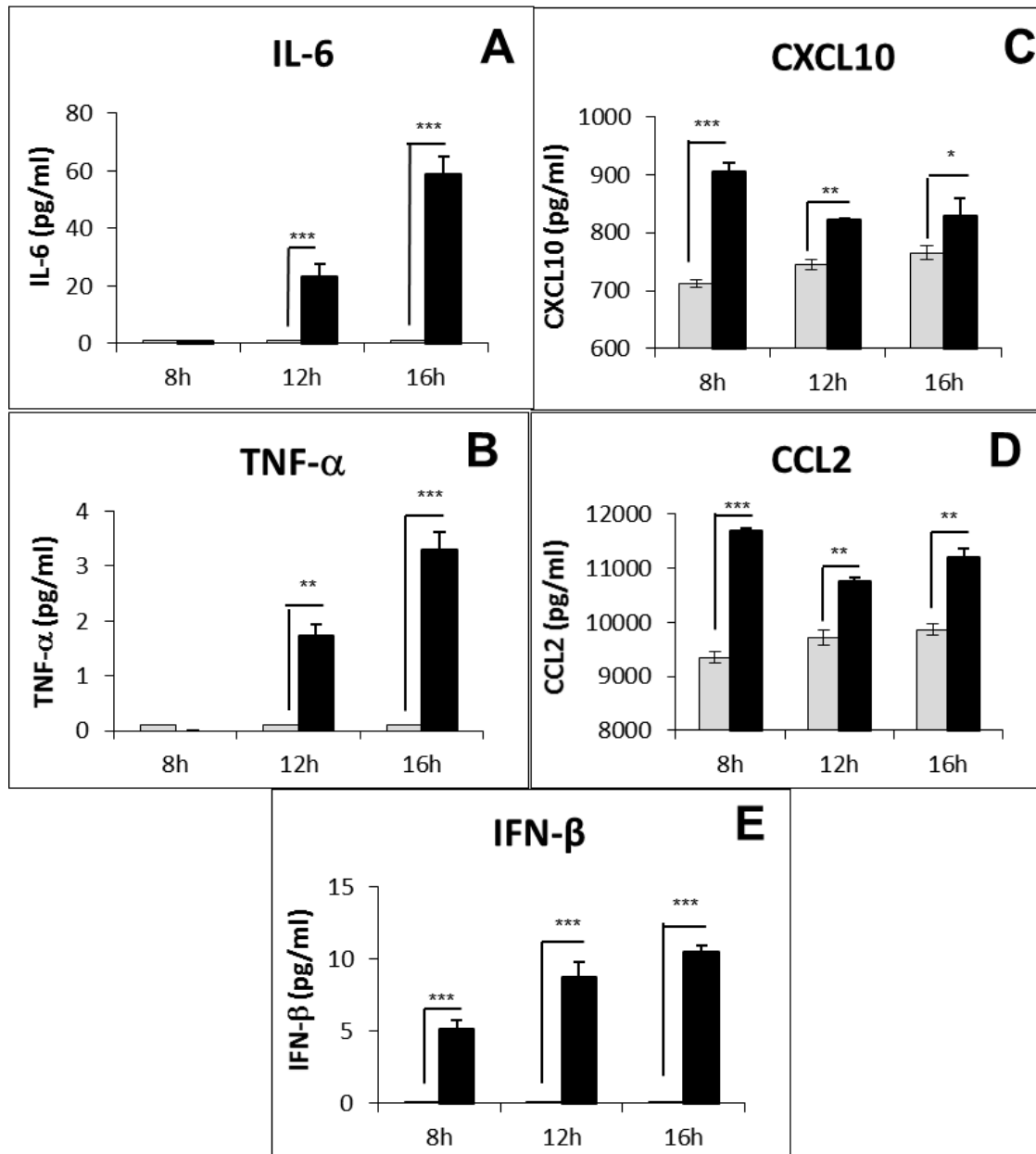


Figure 27: Cinétique des niveaux de sécrétion protéique de l'IL-6 (A), du TNF-α (B), du CXCL10 (C), du CCL2 (D) et de l'IFN-β (E) dans le surnageant d'hépatocytes FL83-B infectés avec le virus L2-MHV-3. Des cellules ont été infectées à une m.o.i. de 1 et l'ARN des cellules infectées et non-infectées (CTRL) extrait à différents temps p.i. Les niveaux de cytokines et de chimiokines sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par des tests ELISA. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type.. * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001.

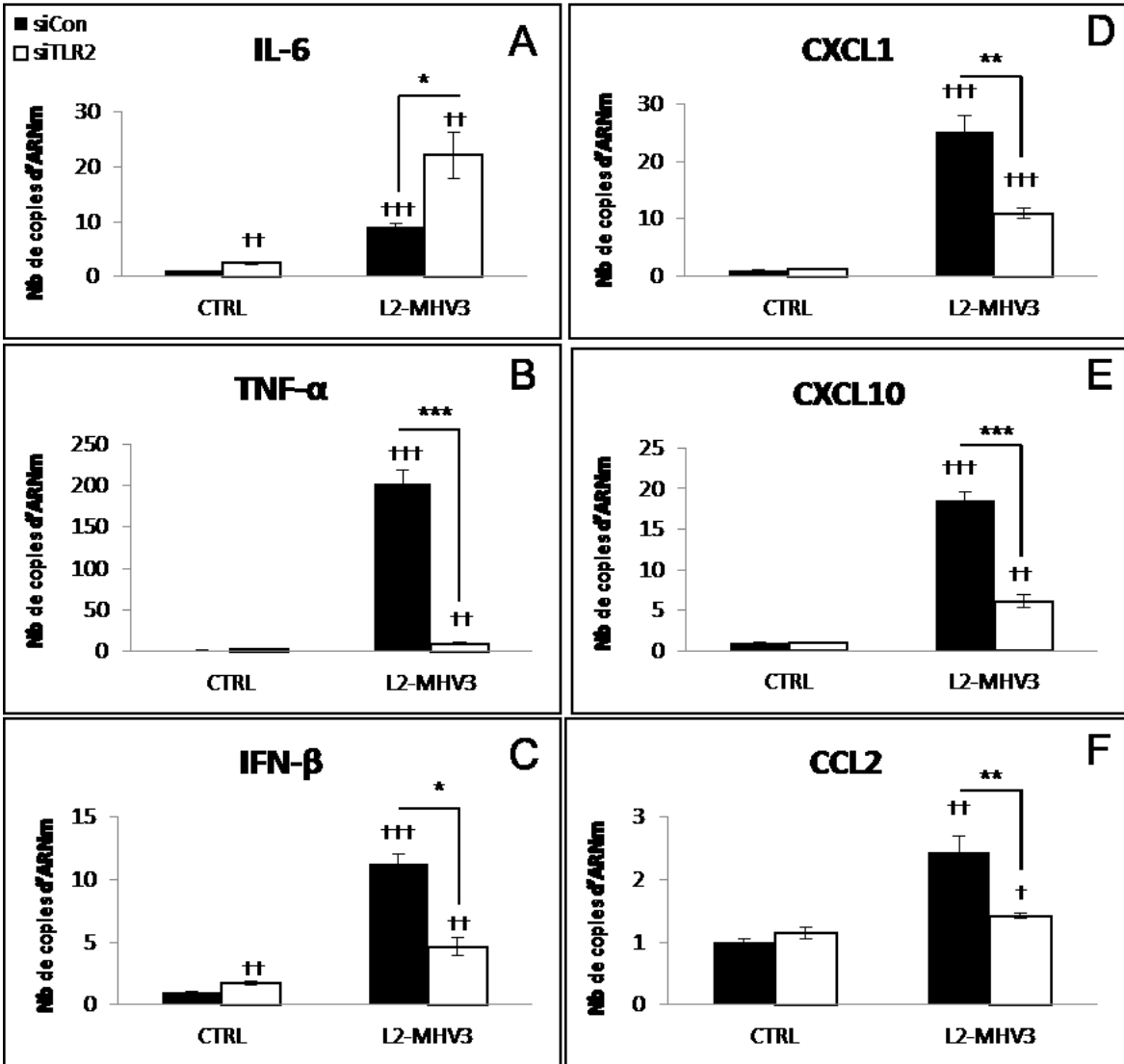


Figure 28: Niveaux d'expression de l'ARNm de l'IL-6 (A), du TNF- α (B), de l'IFN- β (C), du CXCL1 (D), du CXCL10 (E) et du CCL2 (F) dans les hépatocytes FL83-B traités avec des petits ARNs interférants pour le gène TLR2 (siTLR2) et infectés avec les virus L2-MHV-3 ou MHV-A59 durant 22 h. Des cellules ont été transfectées ou non avec 25nM d'ARN interférants murins siTLR2 avant d'être infectées à une m.o.i. de 1 avec le virus L2-MHV-3. L'ARN a été extrait des cellules infectées traitées ou non-traitées à 16 h p.i. Les niveaux d'ARN cellulaires pour les différents gènes ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel selon la méthode $\Delta\Delta CT$ sur la base des niveaux dans des cellules non-infectées. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et leur erreur type. Lorsque comparé aux cellules infectées traitées aux siCon * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ***; $p \leq 0.001$ et † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$ lorsque comparés aux cellules contrôles traitées aux siCon +/- infectées au L2-MHV-3.

Discussion

4.1. Le rôle du TLR2 dans la gravité de l'hépatite aiguë induite par le virus L2-MHV-3

L'étude comparative des niveaux d'expression des gènes des senseurs microbiens, des cytokines et alarmino, des IFN de type 1 et des chimiokines dans le foie suite à l'infection des souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} avec le virus hautement hépatotrope MHV-3 a permis de confirmer le rôle inhibiteur du TLR2 dans l'induction des niveaux d'expression de l'ARNm des senseurs TLRs et des hélicases, à l'exception du TLR2, et, simultanément, dans l'augmentation de la réplication virale et de la réponse inflammatoire autant au niveau des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α que des chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2.

Le sérotype MHV-3 est le plus virulent des MHV induisant une hépatite fulminante chez les souris susceptibles infectées menant à la mort en 3 à 5 jours p.i. (Le Prévost *et al.*, 1975). Par ailleurs, des études réalisées par Jacques *et al.* (2009) ont démontré que ce sérotype active le récepteur de surface cellulaire TLR2 et que ceci mène à une forte induction des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α dans les macrophages péritoneaux. Il était donc nécessaire de vérifier si effectivement, la présence du TLR2 pouvait être impliquée dans l'aggravation de l'hépatite virale et la réplication virale avant de chercher à identifier le ou les mécanismes viraux responsables de l'activation du TLR2 dans les macrophages infectés avec le sérotype MHV-3.

L'aggravation de l'hépatite par le TLR2 lors de l'infection avec le virus MHV-3 s'est tout d'abord révélée par la diminution des symptômes cliniques observés chez les souris *tlr2*^{-/-} infectées par rapport à ceux observés chez les souris C57BL/6 infectées. Cette diminution des symptômes s'explique par une diminution des lésions hépatiques telle que révélée par l'histopathologie du foie. Les régions nécrotiques extensives observées dans le foie de souris C57BL/6 infectées étaient de beaucoup diminuées chez les souris *tlr2*^{-/-}. La forte baisse des niveaux sériques des transaminases hépatiques ASAT/ALAT chez ces souris confirment la diminution de la gravité de l'hépatite en absence du TLR2. Par ailleurs, la gravité de l'hépatite chez les souris possédant le TLR2 concorde avec les niveaux de réplication virale, telle que mesurée par les niveaux d'ARN de la nucléocapside virale (N-MHV) par qRT-PCR et les titres viraux plus élevés retrouvés dans les foies de souris C57BL/6 infectées.

La virulence du sérotype MHV-3 dont l'hépatite fulminante mène à la mort des souris, dans la plupart des lignées, de 3 à 5 jours suivant l'infection est liée à une réplication virale plus élevée dans le

foie (Le Prévost *et al.*, 1975). *In vitro*, cette virulence du MHV-3 a été associée à la formation de très larges syncytia, essentiellement des cellules multi-nucléées (Schindler *et al.*, 1983; Lamontagne et Dupuy, 1984), phénomène beaucoup moins évident lors d'infection chez des souris dites semi-susceptibles où les niveaux de réplication virale étaient aussi plus faibles (Virelizier et Allison, 1976).

Par ailleurs, l'étude des niveaux d'induction génique des senseurs microbiens au niveau des foies de souris C57BL/6 ou *tlr2*^{-/-} infectées avec le virus L2-MHV-3 a révélé que seul le détecteur viral TLR2 a été induit de façon significative dans le foie des souris C57BL/6 et que cette induction a progressé significativement tout au long du développement de l'hépatite, suggérant une activation soit proportionnelle à la quantité de virus infectieux produits, soit reflétant un nombre accru de cellules infectées exprimant le TLR2 et/ou les deux mécanismes simultanément. L'induction de la transcription du gène du TLR2 est connue comme étant sous la dépendance de la voie MyD88 et cette voie est aussi impliquée dans l'activation de la transcription des autres senseurs microbiens via le facteur de transcription NF-κB (revue dans Hu *et al.*, 2007). Malgré l'activation du TLR2 lors de l'infection par le virus L2-MHV-3, aucun autre senseur microbiens n'a été significativement transcrit, ce qui suggère l'absence d'activation de la voie NF-κB. Aucune augmentation de mRNA pour le gène MyD88 n'a été observé chez les souris C57BL/6 infectées avec le virus MHV-3 (résultats non-montrés), ce qui supporte en partie cette hypothèse puisque l'activation du MyD88 déjà présent dans les cellules pourrait permettre l'augmentation de l'expression des TLRs. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'inactivation du TLR2 chez les souris *tlr2*^{-/-} n'a eu quasi aucun effet sur les niveaux de transcription des autres senseurs microbiens. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'inactivation du TLR2 chez les souris *tlr2*^{-/-} n'a eu quasi aucun effet sur les autres senseurs microbiens, suggérant l'existence d'un mécanisme d'évasion des senseurs viraux indépendant du rôle du TLR2. La réplication virale du MHV se produit entièrement dans le cytoplasme où elle est catalysée par un complexe de réplication-transcription encore mal connu et possiblement transitoirement situé à l'intérieur de vésicules à double membranes présumément dérivées du réticulum endoplasmique et recrutées par certaines des nsp contenues dans la réplicase (revue en King *et al.*, 2011). Cette structure en double membrane pourrait alors être impliquée dans l'absence d'activation des senseurs viraux .

Le fait que seule la transcription du TLR2 ait été augmentée suite à l'infection virale, suggère une voie d'activation spécifique pour ce senseur, qui ne peut être identifiée par une approche *in vivo*.

Les rôles des différents senseurs microbiens dans la détection des virus MHV et le déclenchement des réponses immunitaires innées contre ces virus sont très peu connus. Le TLR-4 a été impliqué dans la pathogénèse de l'infection respiratoire par le MHV-Khanolkar *et al.* (2009) et Cervantes-Barragan *et al.*, (2007) ont démontré que le TLR-7 détectait le MHV-A59 dans les cellules dendritiques. D'autre part, il a été récemment démontré que la stimulation des TLR2, TLR4 ou TLR7 avant l'infection n'affectait pas la production de MHV infectieux dans les macrophages J774A.1 mais que la pré-stimulation du TLR-3 diminuait l'infection induite par le MHV-A59 et le MHV-3 dans ces macrophages via la production d'IFN- β (Mazaleuskaya *et al.*, 2012). Pourtant, l'infection des macrophages de souris susceptibles C57BL/6 avec le virus MHV-3 induit une production rapide de d'IL-6 et de TNF- α et cette réponse hâtive est dépendante du TLR2 (Jacques *et al.*, 2009). Nous avons mis en évidence cet effet activateur du MHV-3 sur le niveau d'expression génique du TLR2 dans le foie des souris C57BL/6 infectées avec ce virus, au contraire ce qui a été mis en évidence chez des souris *tlr2*^{-/-} infectées, supportant le rôle du TLR2 dans l'aggravation de l'inflammation hépatique induit par le virus MHV-3, et non seulement dans des macrophages infectés *in vitro*.

Cette propriété d'activation spécifique du TLR2 serait propre au sérotype MHV-3 puisque cette induction rapide de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages n'a pas été observée lors de l'infection avec le virus MHV-A59 (Zhou *et al.*, 2012). Des études *in vivo* seraient nécessaires pour confirmer qu'effectivement, le virus MHV-A59 n'induit pas spécifiquement la transcription du TLR2. Le fait que seul la transcription du TLR2 ait été augmentée suite à l'infection par le MHV-3, suggère une voie d'activation spécifique pour ce senseur, mais l'identification de cette voie nécessite des approches *in vitro* par l'infection des cellules hépatiques responsables.

La plupart des études sur les senseurs microbiens lors d'infections avec des virus MHV ont été réalisées dans le contexte de l'infection neurologique induite par le MHV-A59 et non dans un contexte de l'hépatite puisque ce sérotype induit une hépatite très modérée par rapport aux effets neurologiques (Roth-Cross *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). De plus, ces études se sont surtout intéressées à l'induction de la réponse IFN de type I, déclenchée entre autre par les TLRs endosomaux TLR-3, TLR-7/8, TLR-9 et les hélicases RIG-I et MDA5 (Yang *et al.*, 2012) puisqu'il s'agit de la réponse antivirale permettant de contrôler la réplication virale.

Les résultats observés *in vivo* sur les niveaux de transcription et de traduction des IFN de type 1 dans le foie des souris infectées avec le virus MHV-3 a montré l'absence de réponse pour l'IFN- α , au

contraire de celle de l'IFN- β via la voie IRF-7 principalement. Par contre, la cette réponse en IFN- β ne s'est pas traduite par un niveau élevé d'IFN- β et au contraire, semble est en relation avec l'augmentation de la réplication virale suggérant que cette augmentation de transcription d'IFN- β ne reflète que l'aggravation de l'infection virale Il n'est alors pas surprenant d'observer que les niveaux d'induction génique et de sécrétion protéique de l'IFN- β soient significativement moindres chez les souris *tlr2*^{-/-}, compte tenu de la réplication moins forte dans le foie de ces souris. Ces résultats suggèrent que le TLR2 activé lors de l'infection par le virus MHV-3 pourrait moduler légèrement la réponse IFN- β face à ce pathogène. Cette réponse différentielle de la transcription de l'IFN- β entre les souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} face à l'infection avec le virus MHV-3 serait dépendante de la voie IRF-7 puisque la cinétique de transcription de ce facteur est similaire à celle de l'IFN- β , possiblement par les voies des hélicases (Yang *et al.*, 2012). Néanmoins, seuls de faibles niveaux de production protéique de l'IFN- β ont été observés même dans les souris C57BL/6, suggérant un mécanisme d'évasion de l'immunité innée peu modulée par la présence du TLR2 dans le cas de l'infection par le MHV-3. Il a été démontré que le MHV-A59 possède plusieurs mécanismes d'évasion de la réponse antivirale IFN de type I, autant au niveau de la transcription que de la traduction, notamment grâce à certaines nsp (revue dans Rose et Weiss, 2009). Par contre, ces mécanismes n'ont pas encore été étudiés lors de l'infection par le MHV-3 et la résistance du sérotype MHV-3 face à la réponse IFN type I n'est pas connue. Il est fort possible que les mécanismes d'évasion de l'IFN de type I observé chez les cellules infectées avec le sérotype MHV-A59 soient aussi présents lors de l'infection avec le MHV-3, puisque les niveaux de traduction de l'IFN- β demeurent faibles malgré une augmentation de sa transcription dans le foie des souris infectées.

Par ailleurs, des études réalisées par Jacques *et al.* (2009) ont démontré que le MHV-3 activait le récepteur de surface cellulaire TLR2, en association avec l'héparane sulfate, menant à une forte induction des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α . L'importance du TLR2 dans l'infection *in vivo* avec le virus hautement hépatotrope L2-MHV-3 s'est révélée confirmée au niveau de la transcription et de la traduction des cytokines et chimiokines pro-inflammatoire puisque que les souris *tlr2*^{-/-} infectées avec le MHV-3 ne développent pas une réponse en IL-6 et TNF- α aussi importante, autant au niveau de la transcription que de la traduction, que les souris C57BL/6 possédant le récepteur TLR2, et ce, à tous les temps p.i. De plus, l'importance de cette différence des niveaux d'IL-6 et de TNF- α entre souris possédant le TLR2 et celles dépourvues de ce récepteur augment au courant de l'infection, corrélant ainsi avec les manifestations cliniques de l'hépatite. Il est

bien connu que lors d'hépatite aiguë, l'amplification de la réponse inflammatoire induite par l'activation des TLR mène à la production excessive de cytokines inflammatoires, tel que l'IL-6 et le TNF- α ce qui peut contribuer activement à la pathologie (revue dans Parker *et al.*, 2007). La fixation du L2-MHV-3 au TLR2 serait donc un déterminant clé dans la sévérité de l'hépatite induite par un excès de cytokines pro-inflammatoires observée lors d'infections avec ce sérotype. L'approche *in vivo* ne permet pas d'identifier le mécanisme responsable de cette activation inflammatoire. Par contre, il est connu que l'activation du TLR2 déclenche les cascades de signalisation menant à l'activation du NF- κ B et des MAPKs JNK1/2 et p38 nécessaires à l'induction des facteurs de transcription des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α , p50/p65 et AP-1 respectivement (Yang *et al.*, 2012). D'autre part, la réplication virale du MHV-3 implique l'activation rapide de la p38 par un mécanisme toujours inconnu (McGilvray *et al.*, 1998) et les cellules spécifiquement impliquées dans cette voie restent à être déterminés.

L'importance de la fixation du MHV-3 au TLR2 sur les niveaux de chimiokines libérées est également révélée par l'étude comparative entre souris C57BL/6 et *tlr2*^{-/-} infectées. Nos résultats révèlent que l'infection des souris avec le L2-MHV-3 a induit des niveaux importants de transcription des gènes des chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2 dans le foie et ces augmentations ont progressé tout au long de l'infection à 72 h p.i. L'induction de ces chimiokines lors de l'infection au L2-MHV-3 est fortement dépendante de l'activation du TLR2 puisque les niveaux d'ARNm et de protéines de celles-ci ont chuté drastiquement dans les souris *tlr2*^{-/-}. La transcription de ces chimiokines est aussi dépendante des voies NF- κ B et p38 MAPK, notamment activées par le TLR2 (revue en Newton & Dixit, 2012).

Le rôle des chimiokines est très peu connu au niveau du foie lors d'une infection avec un MHV, puisque les travaux réalisés se sont intéressés au recrutement de cellules inflammatoires dans le cerveau. Pourtant les chimiokines jouent un rôle primaire dans l'inflammation notamment au niveau du foie où les hépatocytes sont parmi les cellules hépatiques produisant les niveaux les plus importants de chimiokines (Wasmuth *et al.*, 2010) et l'augmentation de l'expression de ces chimiokines au niveau des hépatocytes se produit avant l'observation des dommages hépatiques et l'infiltration de cellules inflammatoires (Leifeld *et al.*, 2003). Les chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2 possèdent des propriétés chemoattractives pour les populations de neutrophiles, macrophages, cellules NK, lymphocytes et monocytes respectivement (Saiman et Friedman, 2012) et ces cellules sont massivement recrutées au niveau du foie lors d'hépatite grâce à leur sécrétion rapide (revue

dans Zimmermann *et al.*, 2012). Effectivement, un recrutement des cellules NK1.1+ et NK-T au niveau du foie lors d'infection avec différents variants de pathogénicité dérivés du virus MHV-3 a déjà été observé (Lehoux *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 2008) mais ces cellules se sont avérées permissives à l'infection par le MHV-3 et sont mortes rapidement par apoptose. Les autres populations cellulaires recrutées par ces chimiokines, telles que les macrophages et les lymphocytes B ont été montrés également permissives à l'infection par le MHV-3 (Jolicoeur et Lamontagne, 1989; Taguchi *et al.*, 1986). Il est postulé que la forte induction de chimiokines dépendant du TLR2 favorise le recrutement important de ces cellules inflammatoires, mais leurs effets anti-viraux ne peuvent être efficaces suite à leur permissivité à l'infection virale. Il est fort probable que les cellules recrutées aient quand même le temps ou soient activés à produire encore plus de cytokines inflammatoires, aggravant ainsi l'hépatite. Des études *in vivo* sur la cinétique de recrutement de ces cellules seraient alors très pertinentes.

Nos résultats des expériences d'infection *in vivo* a mis en lumière, pour la première fois, le rôle aggravant du TLR2 dans la production de cytokines et chimiokines dans le foie de souris infectées avec le virus MHV-3. En se liant au TLR2, le virus MHV-3 sur-stimule la réponse inflammatoire, tel que montré par des niveaux importants des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α , des chimiokines CXCL1, CXCL10 et CCL2 et une induction de l'ARNM de l'IFN- β accrue. Par ailleurs, l'activation de la voie TLR2 semble favoriser la réplication virale, probablement via la phosphorylation de la MAPK p38 qui est aussi essentielle à la réplication virale tel que décrit par McGilvray *et al.* (1998). Des études sont en cours afin d'identifier les cellules hépatiques exprimant le TLR2 responsables de cette hépatite aiguë et les mécanismes spécifiques de l'activation du TLR2 par le L2-MHV-3.

4.2. Un nouveau mécanisme d'évasion de la réponse immune innée du virus hautement hépatotrope MHV-3 via la voie endocytaire TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline.

L'étude du rôle du TLR2 sur les propriétés inflammatoires des lignées macrophagiques infectées avec le sérotype fortement hépatotrope MHV-3 par rapport au virus modérément hépatotrope MHV-A59, a permis de démontrer que la forte virulence du MHV-3, à l'opposé du virus MHV-A59, était modulée par sa capacité à se fixer aux récepteurs TLR2 et CEACAM1 à l'intérieur de complexes radeaux lipidiques/cavéoline à la surface des macrophages. Cette propriété a été seulement retrouvée avec le sérotype MHV-3, lui permettant de s'échapper de l'endocytose dépendante de la clathrine et sa

détection subséquente par les TLRs endosomaux et les hélicases cytoplasmiques. Par ailleurs, cette stratégie nouvelle d'échappement viral empêche le développement de la réponse antivirale par les IFN de type I, tout en stimulant la production de cytokines inflammatoires via une voie d'activation dépendante du TLR2.

Il avait déjà été démontré que la réplication du sérotype modérément virulent MHV-A59 dans les macrophages était une étape critique dans l'expression de son hépatotropisme et dans la défense innée antivirale, puisque la déplétion des macrophages augmentait la propagation virale et l'hépatite et conduisait à la mort subite des souris en moins de quatre jours (Wijburg *et al.*, 1997). Cet effet «protecteur» de l'infection des macrophages n'a jamais été observé chez des souris normales infectées avec le sérotype hautement virulent MHV-3, suggérant l'existence d'un mécanisme d'échappement viral de la réponse antivirale des macrophages, mécanisme qui était encore inconnu avant cette étude.

Nous avons démontré que le variant hautement virulent MHV-3 se répliquait plus rapidement et atteignait des niveaux plus élevés de production *de novo* de particules virales infectieuses dans les lignées macrophagiques J774A.1 et RAW264.7 que le variant MHV-A59, et ce, malgré des pourcentages d'ECP comparables. Ces observations suggèrent que le virus MHV-3 échapperait potentiellement aux mécanismes antiviraux innés des macrophages. Effectivement, les niveaux d'expression génique des TLR-3 et TLR-7 endosomaux ainsi que du TLR-4 de surface et des hélicases cytoplasmiques n'ont pas été significativement induits par l'infection avec le virus MHV-3 tandis qu'ils l'ont été suite à l'infection avec le virus MHV-A59. Seuls les niveaux d'ARNm du TLR2 ont été augmentés de façon importante lors de l'infection des macrophages avec le virus MHV-3 et non pas avec le virus MHV-A59.

Les principaux rôles des capteurs viraux que sont les TLRs de surface et endosomaux et les hélicases sont la détection d'acides nucléiques viraux et l'induction de la réponse interféron de type I sous forme de sécrétion d'IFN- α/β impliqués dans le contrôle et/ou l'élimination virale. L'activation des récepteurs de surface TLR2 et TLR-4 ou endosomaux TLR-7/8 et TLR-9 passe par la voie NF- κ B impliquée dans la transcription des gènes des cytokines tandis que l'activation du TLR-3 endosomal et des hélicases intracytoplasmiques RIG-I et MDA5 activent plutôt la production d'IFN de type I (Yang *et al.*, 2012; Satoh *et al.*, 2010). Nos résultats ont montré que ni l'expression génique de l'IFN- β , ni celle des TLR-3, ou des RIG-I ou MDA n'ont été induite de façon importante dans les cellules infectées avec

le MHV-3 alors, qu'au contraire, tous ces marqueurs de réponse antivirale ont été fortement induits dans les macrophages infectés avec le virus MHV-A59. Cette absence de réponse des macrophages infectés avec le virus MHV-3 aurait dû entraîner une faible ou une absence de production des cytokines inflammatoires. Au contraire, quoiqu'aucune induction des détecteurs viraux, à l'exception du TLR2, n'ait été exclusivement observée dans les macrophages J774A.1 et RAW264.7 infectées avec le MHV-3, les niveaux de transcription génique des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α ont été rapidement augmentés dans ces cellules infectées par ce virus et la production de ces cytokines a atteint des niveaux beaucoup plus importants que ceux observés dans les cellules infectées avec le virus MHV-A59. Ces résultats suggèrent que l'infection des macrophages avec le virus MHV-3 peut non seulement activer rapidement la voie TLR2 mais que cette seule activation pourrait être responsable de la production rapide et importante des cytokines inflammatoires.

L'activation des TLRs de surface via la voie MyD88-dépendante peut conduire directement à la phosphorylation des MAPKs p38, ERK1/2 et JNK, impliquées dans la transcription de l'IL-6 (Kawai & Akira, 2008). Nous avons démontré que la MAPK p38 était rapidement phosphorylée, dans les premières 30 minutes, lors de l'infection des macrophages avec le virus MHV-3 mais non pas avec le virus MHV-A59. Une telle rapidité de phosphorylation de la MAPK p38 est similaire à la cinétique observée avec un agoniste synthétique du TLR2 suggérant que la fixation du MHV-3 au TLR2 jouerait un rôle dans l'activation de la voie p38 MAPK et l'induction subséquente de l'IL-6. De plus, l'ajout d'un anticorps neutralisant contre le TLR2 a bloqué la production d'IL-6 associée à l'infection au MHV-3, renforçant le rôle du TLR2 dans cette induction de cytokines. McGilvray *et al.* (1998) ont révélé une activation rapide de la MAPK p38, dans les cinq premières minutes de l'infection des macrophages avec le MHV-3, suivie de la phosphorylation des ERK MAPK impliqué dans la production de la prothrombinase fgl2, responsable de la thrombose des sinusoides hépatiques des souris infectées avec le MHV-3. Jacques *et al.* (2009) ont aussi mis en évidence une production d'IL-6 et de TNF- α dépendante du NF- κ B et de la MAPK p38 dans les macrophages infectés avec le MHV-3 suite à la liaison de la protéine de surface virale avec les molécules TLR2 situées dans les régions riches en héparane sulfate de la surface cellulaire. Nous avons observé une augmentation rapide de l'ARN de la nucléoprotéine virale chez des macrophages infectés avec le virus MHV-3 infectieux (en moins de 10 minutes p.i.) et de façon similaire, mis en contact avec le virus MHV-3 inactivé aux rayons UV (réponse maximale à 10 minutes p.i.), mais pas avec le virus MHV-A59, suggérant que la fixation virale rapide à des récepteurs de surface cellulaire suivie ou non de la transcription rapide du génome du

MHV-3 sont impliqués dans la réplication rapide et forte (à moins de 60 minutes), tel qu'observée dans les macrophages infectées. Ces résultats suggèrent que la fixation du virus MHV-3 à des récepteurs et/ou d'autres molécules de surface cellulaire serait suffisante pour l'induction de la voie de signalisation intracellulaire menant à la production de l'IL-6.

Il a été récemment démontré que la voie p38 MAPK peut jouer un rôle majeur dans l'induction de l'IL-6 et du TNF- α dans les macrophages stimulés avec du LPS (Tapia-Abellan *et al.*, 2013), suggérant qu'une voie TLR de surface est impliquée, probablement la voie TLR-4 dans ce cas. Cependant, l'infection avec le virus MHV-A59 a également induit la phosphorylation de la MAPK p38 dans les cellules infectées, mais seulement à partir de 6 h p.i. (Banerjee *et al.*, 2002) tandis que cette voie de signalisation a été beaucoup plus rapidement activée dans les cellules infectées avec le MHV-3 suggérant que les voies d'activation de la MAPK p38 par le MHV-3 et les MHV-A59 seraient très différentes.

La fixation de particules virales à leur récepteur cellulaire peut activer des voies de signalisation menant à des changements dans la membrane de la cellule-hôte nécessaire pour favoriser la fixation, l'entrée, l'infection et, aussi, la neutralisation des défenses cellulaires. La molécule CEACAM1a est bien connue pour être le récepteur de tous les sérotypes de virus MHV. Cette protéine est présente à la surface des hépatocytes, des cellules endothéliales et des macrophages (Beauchemin *et al.*, 1999; Godfraind et Coutelier, 1998). En dépit du fait que tous les sérotypes utilisent le CEACAM1a comme récepteur viral, les souris dépourvues du gène *ceacam1* sont résistantes à l'infection par le virus MHV-A59, mais non pas à l'infection avec le virus MHV-JHM ou, *in vitro*, avec le virus MHV-3 dans les macrophages (Miura *et al.*, 2008; Jacques *et al.*, 2009), suggérant la possibilité qu'un autre récepteur puisse être impliqué dans l'induction de l'hépatite virale. Nous avons démontré, grâce à l'usage de siRNAs dirigés contre le gène *ceacam1* et/ou celui du *tlr2*, que la réplication virale du MHV-3 dépendait de ces deux récepteurs tandis que la réplication du MHV-A59 ne dépendait que de l'expression de la molécule CEACAM1.

La co-association de récepteurs spécifiques, comme le TLR2, avec d'autres molécules présentes à la surface cellulaire a déjà été rapportée (Hajishengallis *et al.*, 2008). De fait, les protéoglycanes de l'héparane sulfate peuvent servir comme facteurs d'attachement pour plusieurs virus comme les flavivirus, le virus de l'hépatite C et des rétrovirus (revue dans Kalia et Jameel, 2011). Jacques *et al.* (2009) ont démontré que les deux éléments du complexe TLR2/héparane sulfate étaient impliqués

dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages infectés avec le virus MHV-3. Nos résultats révèlent que le CEACAM1a collabore avec le TLR2 dans l'induction de la réplication virale et dans la production de la réponse IL-6, suggérant qu'un complexe CEACAM1a/TLR2/héparane sulfate pourrait être impliqué dans l'activation de la production de cytokines inflammatoires. Cette hypothèse est aussi supportée par la réduction des niveaux d'induction des gènes de la nucléocapside virale, de l'IL-6 et des niveaux de sécrétion protéique de cette cytokine, dans les macrophages traitées avec des siCC1 et/ou des siTLR2 avant l'infection avec le MHV-3. Le TLR2, tout comme le CEACAM1 seraient donc impliqués autant dans la réplication virale du MHV-3 que dans la réponse inflammatoire consécutive à l'infection. Nous avons également validé les observations de Zhou *et al.* (2010) à l'effet que la voie TLR2 n'était pas impliquée dans la réponse inflammatoire des macrophages infectés avec le virus MHV-A59. Une étude récente avait également observée que la stimulation par des agonistes des voies TLR2 et TLR-4 n'avait aucun effet sur la réplication virale du MHV-A59, supportant encore une fois le fait que le TLR2 n'était pas impliqué dans le réplication virale et la réponse inflammatoire des macrophages infectés avec ce virus (Mazaleuskaya *et al.*, 2012).

La fixation des particules virales aux récepteurs, co-récepteurs et/ou molécules d'attachement à la surface cellulaire est normalement suivie par l'intéARNlisation de ces particules via plusieurs voies endosomales ou par fusion cellulaire dans le cas de virus enveloppés (revue dans Pelkmans et Helenius, 2003). À cet effet, lors de l'infection des macrophages par le virus MHV-3, nous avons observé une augmentation très rapide des niveaux du gène viral N-MHV par qRT-PCR, dès 5 minutes p.i., ce qui n'a pas été le cas avec le virus MHV-A59, suggérant une fixation plus efficace et/ou une intéARNlisation plus rapide des particules MHV-3. Grâce à l'usage d'inhibiteurs d'endocytose ou d'acidification de vésicules endosomales, comme la chlorpromazine et la chloroquine, nous avons démontré que l'intéARNlisation des deux sérotypes MHV-3 et MHV-A59 se faisait par la voie endosomale dépendante de la clathrine et que la réplication virale de ceux-ci dépendait aussi de la fusion membranaire pH-dépendante dans les vésicules endosomales.

La voie endosomale dépendante de la clathrine est la voie d'intéARNlisation de substances via un récepteur la plus utilisée par les virus et l'acidification subséquente des endosomes contenant les particules virales initie la fusion cellulaire intracytoplasmique de plusieurs virus enveloppés. Il a été rapporté que l'entrée du virus MHV-A59 dépendait non seulement de l'endocytose via la clathrine, mais également de la fusion cellulaire qui est affectée par le niveau de cholestérol (Thorp et

Gallagher, 2004). Par contre, cette dépendance du cholestérol avec le virus MHV-A59 n'affecterait pas la fixation de la protéine virale S à son récepteur CEACAM1a mais serait plutôt nécessaire aux étapes subséquentes de la fusion membranaire. L'absence d'effet du traitement des macrophages avec le nystatin, un agent séquestrant le cholestérol, sur la réplication virale du MHV-A59 supporte l'hypothèse à l'effet que l'entrée de ce virus dans les macrophages se fait entièrement par la voie endosomale dépendante de la clathrine plutôt que par la fusion cellulaire dépendante du cholestérol.

Par ailleurs, nous avons observé que la production d'IL-6 par les macrophages infectés avec le virus MHV-3 n'était pas altérée par le traitement avec un inhibiteur de la voie endosomale dépendante de la clathrine, suggérant que les détecteurs endosomaux comme le TLR-3 et le TLR-7 ne sont pas impliqués dans l'induction rapide de cette réponse IL-6. Il a déjà été démontré que la protéine S du virus MHV pouvait se lier de façon spontanée aux radeaux lipidiques de la membrane cellulaire et que la réduction des niveaux de cholestérol retardait la fusion cellule à cellule médiée par la protéine virale S. Par contre, le mécanisme impliqué n'a jamais été identifié (Choi *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent un rôle possible du TLR2 comme facteur d'attachement responsable de l'association de la protéine S avec les radeaux lipidiques cellulaires, possiblement en collaboration avec l'héparane sulfate (Jacques *et al.*, 2009). L'association du MHV-3 au complexe TLR2/radeaux lipidiques suggère que ce virus pourrait également utiliser la voie endocytaire dépendante de la cavéoline, qui elle dépend du cholestérol et de la dynamine, comme mode d'infection en plus de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Cette voie d'endocytose dépendante de la cavéoline est utilisée par certains virus, mais elle semble être moins efficace et surtout plus lente (Parpal *et al.*, 2001). Les endosomes qui en résultent ne sont d'ailleurs pas acidifiés, étape parfois cruciale à la fusion membranaire de certains virus, ce qui réduit significativement leur réplication virale (Pelkmans *et al.*, 2004). Effectivement, la fusion de l'enveloppe des virus MHV avec la membrane cellulaire est pH-dépendante (Bosch *et al.*, 2003).

Nous avons démontré que le TLR2 est impliqué dans l'activation rapide de la MAPK p38 par le MHV-3 dans les macrophages infectés et que cette rapidité d'activation est similaire à la vitesse observée avec un ligand synthétique du TLR2. Il est connu que le TLR2 peut se déplacer à l'intérieur de radeaux lipidiques suite à sa stimulation par un agoniste TLR2/-1 et ainsi déclencher une réponse inflammatoire via la voie MyD88 (Shin *et al.* 2008; Yoon *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'intégrité des radeaux lipidiques est nécessaire à l'activation des MAPKs (Calzolari *et al.* 2006). La perturbation des

radeaux lipidiques suite au traitement avec du nystatin, un inhibiteur de la voie cavéoline/radeaux lipidiques, augmente la réplication du MHV-3 mais pas celle du MHV-A59 dans les macrophages infectés. Cette augmentation des niveaux d'ARN de la N-MHV est observable dès 5 h p.i. Pourtant, la réduction des niveaux de cholestérol devrait inhiber l'entrée des virus MHV et la fusion cellule à cellule lors d'infections par ces virus (Thorpe & Gallagher, 2004). Le remodelage des radeaux lipidiques de la membrane plasmique suite à la modulation des niveaux de cholestérol peut activer la MAPK p38 via les voies TLR2, TLR-4 et MyD88 dans les macrophages (Smoak *et al.*, 2010). Les mécanismes responsables de l'activation de voies de signalisation par les complexes TLR/cholestérol ne sont pas bien élucidés mais l'interaction de la cavéoline-1 avec d'autres molécules de surface, telle que le TLR-4, joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'endocytose dépendante de la cavéoline (Wang *et al.*, 2009). Il a été récemment proposé qu'une certaine compétitivité existait entre la voie endosomale dépendante de la clathrine et celle dépendante de la cavéoline puisque l'atténuation de la voie cavéoline par le traitement avec du nystatin augmentait l'endocytose, par la voie de la clathrine, de molécules solubles par des cellules tumorales (Cheng *et al.*, 2011).

Nous pouvons postuler que la séquestration des particules du virus MHV-3 dans les vésicules TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline permet au virus d'échapper aux détecteurs viraux endosomaux comme les TLR3 et 7 et subséquentement aux hélicases cytoplasmiques RIG-1 et MDA5. L'hypothèse d'échappement du MHV-3 par sa fixation et/ou son inteARNlisation dans le complexe d'endocytose TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline est soutenue par l'observation que les niveaux d'induction génique des TLRs endosomaux et des hélicases, responsables de la détection virale, représentent les mêmes niveaux que ceux observés lors de l'infection avec le virus MHV-A59 lorsque le cholestérol est séquestré par traitement avec du nystatin. Par ailleurs, la destruction des radeaux lipidiques par le traitement avec du nystatin rétablit aussi l'induction génique de l'IFN- β dans les macrophages infectés avec le MHV-3. Itoh *et al.*, (2008) ont démontré que la voie endosomale dépendante de la clathrine est importante dans la production de l'IFN- β en réponse à de l'ARNdb. Ces résultats supportent l'hypothèse à l'effet que l'absence de réponse antivirale via la transcription et la traduction de l'IFN- β suite à l'infection de macrophages avec MHV-3 est une conséquence de la capacité du virus à exploiter la voie d'endocytose dépendant de la cavéoline via sa fixation sur le TLR2 et ainsi, éviter la détection par les TLR endosomaux et hélicases cytoplasmiques de la voie dépendante de la clathrine et la production d'IFN de type 1.

Néanmoins, l'activation de la voie d'endocytose radeaux lipidiques/cavéoline dépendante par les particules virales peut également déclencher des voies de signalisation intracellulaires dès leur attachement à la surface (revue dans Kalia et Jameel, 2011). Nos résultats indiquent que la transcription plus hâtive et la production plus importante des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α par les macrophages infectés avec le MHV-3 comparativement à ceux infectés avec le virus MHV-A59 impliquent des voies de signalisation par des récepteurs CEACAM1 et TLR2, tel que démontré par les traitements aux siCC1, siTLR2 et les anticorps neutralisant α -TLR2. Il est postulé que la fixation de la protéine S virale du MHV-3 à ces récepteurs localisés dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique serait responsable de l'activation rapide des voies de signalisation via le MyD88 menant à la transcription et à la production des cytokines inflammatoires. Islam *et al.* (2011) ont démontré que la perturbation des radeaux lipidiques inhibait la sécrétion de TNF- α induite par le LPS. Plus récemment, Ben *et al.* (2013) ont démontré que la production du TNF- α via la voie d'endocytose dépendante de la cavéoline était reliée aux voies de signalisation des MAPKs p38 et JNK. L'activation rapide de ces cytokines dans les macrophages péritonéaux infectés avec L2-MHV-3 infectieux et, aussi inactivé par les UV est également dépendante de la MAPK p38 (Jacques *et al.*, 2009). De plus, nous avons observé une phosphorylation rapide de la p38 dans les macrophages infectés au L2-MHV-3 suggérant qu'elle est impliquée dans la production rapide de l'IL-6. Il a également été démontré que la production rapide de la prothrombinase fgl-2 dans les macrophages J774A.1 infectés avec le MHV-3 était dépendante de la MAPK p38 (McGilvray *et al.*, 1998), mais le mécanisme responsable n'avait pas été identifié. Ces auteurs, par contre, ont observé que la production d'IL-6 dans ces cellules n'était pas reliée à la réplication virale, alors que c'était le cas pour le fgl-2. Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la phosphorylation rapide de la MAPK p38 est un facteur de première importance dans la réponse pro-inflammatoire des macrophages infectés au L2-MHV-3. Nos résultats indiquent que les niveaux significatifs précoces d'ARN de la N-MHV et l'induction hâtive de facteurs pro-inflammatoires dépendant de la MAPK p38 sont reliés à la fixation de la protéine virale S aux complexes TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline et possiblement son inteARNisation via cette voie endocytaire.

Les coronavirus exploitent différents mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire innée. À cet effet, plusieurs protéines structurales et non-structurales virales inhibent les voies d'induction de la réponse antivirale IFN de type I, mais cette inhibition est moins importante chez les macrophages (revue dans Rose and Weiss, 2009). Néanmoins, l'induction rapide et démesurée de cytokines pro-

inflammatoires dans les macrophages infectés avec d'autres coronavirus a également été observée, notamment dans le cas des virus humain SRAS et HCoV-229E (Tseng *et al.*, 2005; Desforges *et al.*, 2007; Takano *et al.*, 2007), indiquant l'importance des macrophages dans l'exacerbation des symptômes cliniques lors d'infections par les coronavirus. Le sérotype MHV-A59 n'induit quant à lui qu'une hépatite légère caractérisée par des foyers et zones nécrotiques modérés (Navas *et al.*, 2001) et la réplication moins importante du MHV-A59 dans le foie est en partie due à la production d'IFN dès le début de l'infection par les macrophages (Zhou *et al.*, 2010). Contrairement à ce que nous avons démontré pour le virus MHV-3 hautement virulent, la production d'IL-6 et de TNF- α dans les macrophages péritonéaux infectés avec le MHV-A59 n'est pas reliée au TLR2 (Zhou *et al.*, 2010).

4.3 Le rôle du TLR2 dans la permissivité des hépatocytes au virus MHV-3 et dans les propriétés inflammatoires induites par l'infection virale.

Cette étude a aussi permis de confirmer le rôle de première importance du TLR2 dans la réponse immunitaire innée des hépatocytes face à l'infection avec le virus hautement hépatotrope L2-MHV-3. Le foie est majoritairement composé d'hépatocytes, l'unité fonctionnelle de cet organe (Ishibash *et al.*, 2009), et ceux-ci sont parmi les premières cellules hépatiques à déclencher la réponse immunitaire innée, notamment par la sécrétion massive de protéines de phase aiguë, de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (Nemeth *et al.*, 2009).

Nos résultats montrent, au départ, que les hépatocytes FL83B, considérés comme des hépatocytes murins matures et fonctionnels pour le métabolisme hépatique, sont permissifs à la réplication du virus L2-MHV-3. Cette permissivité était attendue puisque les travaux de Arnheiter *et al.*, (1982), avait montré que les hépatocytes isolées de souris hautement susceptibles BALB/c supportaient la réplication du MHV-3 avec un haut taux de réplication et l'apparition de nombreux syncytia. Par contre, les titres viraux atteints dans les hépatocytes de ces souris sont plus élevés que ceux observés avec les cellules FL83B. D'autre part, les auteurs ont remarqué que les titres viraux obtenus reflétaient le niveau de résistance génétique puisque les cellules de souris résistantes A/J supportaient beaucoup plus faiblement la réplication du MHV-3. Ces observations suggèrent l'existence de mécanismes de résistance intrinsèque des hépatocytes en fonction de facteurs génétiques non-identifiés.

Nous avons montré que l'infection des hépatocytes FL83B avec le MHV-3 activait rapidement la transcription du TLR2 (dès 4 h p.i.) avant même que la transcription du gène N-MHV soit détectable, ce qui suggère que la fixation virale ou son inteARNisation était suffisant pour déclencher la transcription du TLR2. D'autre part, l'infection virale a aussi activé la transcription de l'IFN- β dès 8 h p.i. et la traduction a aussi été observée au même moment. Le rôle de l'IFN- β dans la réplication du MHV-3 chez les hépatocytes n'est pas connu. Par contre, il a déjà été démontré que la réplication du MHV-3 dans les hépatocytes n'était aucunement diminuée soit par l'ajout d'IFN- β exogène aux cellules soit chez des souris dont le gène de l'IFN- β avait été invalidé (Arnheiter *et al.*, 1982; Kyuwa *et al.*, 2003). Il est fort peu probable que la faible concentration d'IFN- β sécrété dans le surnageant des cellules FL83B infectées soit responsable de la réplication mitigée du virus MHV-3 par rapport aux titres viraux rapportés dans les hépatocytes de souris BALB/c.

Les hépatocytes FL83B infectés par le MHV-3 ont aussi montré une augmentation de la transcription et de la traduction des cytokines inflammatoires IL-6 et, un plus tardivement du TNF- α . Jacques *et al.*, (2009) avaient rapporté que la fixation du virus MHV-3 à la surface de macrophages péritonéaux induisait rapidement la production d'IL-6 et de TNF- α . En comparaison avec ces observations, nos résultats avec les macrophages J774A montrent que l'induction de ces cytokines inflammatoires a été plus tardive puisque la transcription de l'IL-6 est apparue à 8 h p.i. et celle du TNF- α à 12 h p.i., ce qui suggère que ces cellules expriment peu le TLR2 et/ou le récepteur viral CEACAM1a puisque nous avons montré que ces deux récepteurs étaient impliqués dans la production rapide d'IL-6 par les macrophages J774A.1.

D'autre part, les hépatocytes FL83B infectés ont aussi induit la transcription et la production de chimiokines, telles que le CXCL-1, le CXCL-10 et le CCL-2, indiquant un rôle important des hépatocytes dans le recrutement de cellules inflammatoires lors de l'infection virale. La cinétique d'apparition des ARNm de ces cytokines révèle, similairement à ce qui a été observé au niveau de la réplication virale et de la production de cytokines, une induction relativement tardive, vers 8 h p.i, suggérant un mécanisme commun d'activation de tous ces facteurs inflammatoires. Cette réponse inflammatoire se poursuit jusqu'à la mort des hépatocytes (entre 12 et 16 h p.i.).

Le blocage des ARNm du gène du TLR2 à l'aide de ARN interférants a permis de montrer que, à l'exception de l'IL-6, la transcription du TNF- α , des chimiokines et de l'IFN- β était totalement ou partiellement dépendante de l'activation du TLR2. Matsumura *et al.*, (2003) ont démontré que

l'expression du TLR2 par les hépatocytes dépendait directement de l'activation du facteur de transcription NF- κ B, que cette activation était dépendante soit de l'IL-1 α ou du TNF- α et que l'augmentation du TLR2 augmentait la réponse des hépatocytes en présence de produits microbiens. Quoique l'augmentation de la transcription du TLR2 dépende du TNF- α , nos résultats montrent que cette transcription apparaît plus tôt que celle de la sécrétion de TNF- α dans le surnageant des cellules FL83B infectées avec le virus MHV-3, ce qui suggère que l'augmentation de la transcription de TLR2 n'est pas induite par le TNF- α mais bien par un autre mécanisme rapide, probablement relié à la fixation de la protéine virale S et/ou l'intégration du virus dans ces cellules. D'autre part, l'augmentation de la transcription de l'IL-6 en absence de TLR2 apparaît surprenante de premier abord, mais nous avons montré chez les cellules J774A.1 infectées avec le MHV-3 que le blocage de la voie d'endocytose dépendant des complexes radeaux lipidiques/TLR2/cavéoline favorisait l'utilisation de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et que l'IL-6 pouvait alors être transcrit via les senseurs viraux endosomaux, tel le TLR-3. Il est probable que le blocage de l'expression du TLR2 par les siRNA ait eu comme conséquence d'augmenter l'utilisation de la voie d'endocytose via la clathrine et d'induire de l'IL-6 via la voie TLR-3/NF- κ B, tel que nous l'avons montré avec les macrophages J774A.1 traités avec du nystatin.

Le sérotype MHV-A59 induit une infection chronique des souris qui peut durer jusqu'à 6 mois après l'infection (Matthews *et al.*, 2001; Rempel *et al.*, 2004). Le sérotype MHV-A59, moins virulent et moins hépatotrope, est connu pour sa capacité à infecter aussi les hépatocytes, comme le fait le MHV-3. Par contre, le niveau de réplication virale est très faible dans les hépatocytes primaires infectés *in vitro* et les virus produits restent très associés aux cellules (Hingley *et al.*, 1998). L'apparition de petits syncytia est aussi retardée. Ces auteurs ont montré que la faible réplication de ce MHV et sa forte association avec les cellules étaient dues à l'absence de clivage de la protéine S essentielle à la fusion pH-dépendante par les hépatocytes, ce qui empêcherait l'infection virale via l'endocytose dépendant de la clathrine. Il ne resterait au virus MHV-A59 que la voie de la fusion cellulaire pour infecter les hépatocytes. Nous avons confirmé que le L2-MHV-3, à l'opposé du MHV-A59, se liait au TLR2 dans les premiers moments de l'infection des macrophages et activait dès lors les voies de signalisation intracellulaire dépendante du TLR2 dont celle de la MAPK p38 dès 5 minutes p.i. Cette activation du TLR2 par le L2-MHV-3 s'est aussi traduite dans les cellules FL83B par une production importante des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et de la réponse IFN- β telle qu'observée chez les cellules J774A.1 infectées avec le MHV-3. Il est donc probable que la plus forte

capacité du MHV-3 à infecter les hépatocytes soit reliée à sa capacité à se fixer sur le TLR2, propriété que ne possède pas le MHV-A59, et à utiliser la voie endosomale dépendante des radeaux lipidiques/cavéoline. Cette hypothèse sera intéressante à vérifier chez les cellules FL83B infectées avec l'un ou l'autre des virus mais aussi chez des hépatocytes primaires infectés.

Les résultats obtenus chez les hépatocytes FL83B infectées avec les virus MHV-3 pourraient représenter un outil d'étude sur les rôles des hépatocytes dans l'immunité innée lors d'hépatites virales puisque les hépatocytes sont les cibles primaires des virus de l'hépatite humaine et servent aussi de réservoir pour la réplication virale. Le virus VHC, qui cause dans 80% des cas une infection chronique chez l'humain et pouvant durer plusieurs décennies, peut également causer une hépatite aiguë mortelle (Hoofnagle, 1997). Il a été montré que ce virus pouvait infecter plus rapidement et efficacement les hépatocytes, car il pouvait exploiter plusieurs molécules présentes à la surface cellulaire (Helle & Dubuisson, 2008) dont le TLR2 (Chung *et al.*, 2010). Il est connu que la fixation au TLR2 par certains virus comme l'entérovirus 71 exacerbe la réponse immunitaire (Gong *et al.*, 2012).

Le sérotype L2-MHV-3 est le plus virulent des MHVs causant une hépatite fulminante menant à la mort des souris de la plupart des lignées de 3 à 5 j. p.i. (Le Prévost *et al.*, 1975). L'hépatite fulminante menant à la mort est caractérisée par une réponse inflammatoire élevée face à l'infection virale (revue dans Zimmermann *et al.*, 2012). Nous avons démontré l'importance, dans la première partie de ce mémoire, du TLR2 dans la réponse inflammatoire *in vivo* face à l'infection avec le L2-MHV-3. Nous avons démontré dans la 3^e section de ce mémoire que le L2-MHV-3 infectait aisément les hépatocytes FL83B et se répliquait de façon croissante jusqu'à la mort cellulaire apparaissant entre 12 et 16 h p.i. L'infection des hépatocytes par le L2-MHV-3 a aussi induit une forte réponse inflammatoire caractérisée par l'induction des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α , des chimiokines CCL2, CXCL-1 et -10 et de l'IFN- β . Nos résultats, pris dans leur ensemble, suggère que la réponse inflammatoire induite par l'infection des hépatocytes avec le virus MHV-3 est modulée par sa fixation au TLR2 et nous proposons que cette capacité du L2-MHV-3 à activer les voies de signalisation dépendantes du TLR2 dans les hépatocytes est un autre facteur important impliqué dans l'hépatite aiguë fulminante induite par ce virus.

Conclusions

Notre travail sur le rôle du TLR2 dans le développement de l'hépatite virale aiguë *in vivo*, dans les macrophages et les hépatocytes infectés avec le virus MHV-3 a révélé plusieurs similarités entre les mécanismes d'évasion des détecteurs viraux démontrés avec ce virus et les mécanismes d'évasion de l'immunité innée utilisés par certains autres virus dont ceux de l'hépatite humaine, confirmant la valeur de ce modèle murin dans l'étude des mécanismes des hépatites aiguës.

L'activation des voies de signalisation enclenchées par les senseurs microbiens (PRRs) a récemment été associée à l'hépatite fulminante, à des niveaux élevés de transaminases et à de plus grandes concentrations de bilirubine dans les hépatites spontanées (Kadowaki *et al.*, 2013). Malgré que les TLRs endosomaux et les hélicases cytoplasmiques détectent la présence de virus par leurs acides nucléiques dans les endosomes ou le cytosol, les TLRs de surface peuvent reconnaître des motifs glycoprotéiques viraux et pourraient donc, également être impliqués dans la réponse inflammatoire lors d'infections avec des virus enveloppés comme dans le cas du virus de l'herpès, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou de l'hépatite B et C (revue dans Oliviera-Nascimento *et al.*, 2012) mais les mécanismes impliqués n'ont pas encore été élucidés. L'activation du TLR2 dans les macrophages humains par les virus de la rougeole ou de la varicelle-zona mène aussi à la production d'IL-6 quoique les mécanismes spécifiques ne soient toujours pas connus (Bieback *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). De plus, la production d'IL-6, de TNF- α et d'IL-12 par des macrophages peut être induite par la fixation de la protéine de capsid du virus de l'hépatite B aux protéoglycane de l'héparane sulfate et au TLR2 de surface menant à l'activation des voies MAPKs NF- κ B, p38 et ERK1/2 (Cooper *et al.*, 2005). Plusieurs protéines du virus de l'hépatite B (VHB) (HBsAg, HBeAG or HVB virions) ont la capacité d'inhiber les effets antiviraux de l'activation des TLR en réduisant l'activation du NF- κ B, du IRF-3, de l'ERK et des ISGs mais les mécanismes restent encore inconnus (Wu *et al.*, 2009). Récemment, le TLR2 a été co-localisé avec la protéine virale HBeAG impliquée dans l'inhibition du NF- κ B et des IFNs, suggérant une nouvelle voie d'échappement virale via le TLR2 (Lang *et al.*, 2011). De plus, la phosphorylation de la MAPK p38 aiderait à la réplication du VHB dans les hépatocytes (Chang *et al.*, 2008).

Nos résultats suggèrent que le mécanisme impliqué dans ces observations pourraient être la capacité de ces virus à se fixer au TLR2 et à moduler les voies de signalisation dépendante de la voie TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline au dépend de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine,

protégeant partiellement les virus de leur détection par les senseurs microbiens tout en activant rapidement les facteurs pro-inflammatoires dépendant du TLR2.

A l'aide du modèle d'infection par le virus MHV-3, des études pourraient être entreprises pour vérifier le rôle du TLR2 et de l'importance des complexes TLR2/radeaux lipidiques/cavéoline comme mécanisme d'échappement des détecteurs viraux dans les hépatocytes et aussi dans d'autres cellules hépatiques, dont les cellules endothéliales sinusoides. Il sera aussi intéressant de vérifier s'il est possible de diminuer la gravité de l'hépatite induite par le MHV-3 en utilisant de nouveaux inhibiteurs spécifiques de TLR2 et ce, dans ce modèle murin. Fort de tous ces résultats, il sera alors possible de modéliser le processus de l'hépatite aiguë et de la réponse innée précoce résultant des effets de l'infection virale sur chacune des cellules hépatiques permissives à la réplication virale et des interactions pouvant se produire, via les facteurs inflammatoires sécrétés par chacune d'elle, dans le processus d'aggravation de l'hépatite aiguë.

Bibliographie

Abe M, Tokita D, Raimondi G, Thomson AW. «Endotoxin modulates the capacity of CpG-activated liver myeloid DC to direct Th1-type responses.» *Eur J Immunol.*, 2006: 36(9):2483-93.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. «Recognition of double-stranded ARN and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.» *Nature*, 2001: 413(6857):732-8.

Berry JD, Cunningham DM, Hamre CH, Hofstad D, Mallucci MS, McIntosh L, Tyrrell DAJ. «Coronaviruses.» *Nature*, 1968: 220:650.

Antoniades CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. «The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure.» *J Hepatol.*, 2008: 49(5):845-61.

Arshad MI, Patrat-Delon S, Piquet-Pellorce C, L'helgoualc'h A, Rauch M, Genet V, Lucas-Clerc C, Bleau C, Lamontagne L, Samson M. «Pathogenic mouse hepatitis virus or poly(I:C) induce IL-33 in hepatocytes in murine models of hepatitis.» *PLoS One*, 2013: 13;8(9):e74278.

Arpaia N, Barton GM. «Toll-like receptors: key players in antiviral immunity.» *Curr Opin Virol.*, 2011: 1(6):447-54.

Baker SC «Coronaviruses: Molecular Biology.» Dans *Desk Encyclopedia of General Virology*, de Mahy B et Van Regenmortel M, Academic Press, 2009:445-53.

Balter M. « Malaria. Can WHO roll back malaria?» *Science*, 2000: 290(5491):430.

Banerjee A, Gerondakis S. « Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system.» *Immunol Cell Biol* , 2007: 85: 420-24.

Banerjee S, Narayanan K, Mizutani T, Makino S. «Murine coronavirus replication-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation promotes interleukin-6 production and virus replication in cultured cells.» *J Virol.*, 2002: 76(12):5937-48.

Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. «Nucleic acid recognition by the innate immune system.» *Annual review of immunology.*, 2011: 29:185-214.

Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. « Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands.» *Nat Immunol.* 2009; 10(11):1200–07.

Baric RS, Fu K, Schaad MC, Stohlman SA. «Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation groups.» *Virology*, 1990: 177(2):646-56.

Baric RS, Shieh CK, Stohlman SA, Lai MM. «Analysis of intracellular small RNAs of mouse hepatitis virus: evidence for discontinuous transcription.» *Virology*, 1987: 156(2):342-54.

Barnes E, Salio M, Cerundolo V, Medlin J, Murphy S, Dusheiko G, Klenerman P. «Impact of alpha interferon and ribavirin on the function of maturing dendritic cells.» *Antimicrob. Ag. Chemother.* 2004: 48(9):3382-9.

Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. «Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection.» *J Med Virol.*, 2003: 71(2):212-8.

Barthold SW, Smith AL. «Mouse hepatitis virus strain--related patterns of tissue tropism in suckling mice.» *Arch Virol.* , 1984: 81(1-2):103-12.

Barton GM, Kagan JC. «A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization.» *Nat Rev Immunol.*, 2009: 9(8):535-42.

Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, Veillette A. «Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells.» *Oncogene*, 1997: 14(7):783-90.

Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, Hammarström S, Holmes KV, Karlsson A, Kuroki M, Lin SH, Lucka L, Najjar SM, Neumaier M, Obrink B, Shively JE, Skubitz KM, Stanners CP, Thomas P, Thompson JA, Virji M, von Kleist S, Wagene. «Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family.» *Exp Cell Res.*, 1999: 252(2):243-9.

Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR «Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein.» *Viruses*, 2012: 4: 1011-33.

Bender SJ, Phillips JM, Scott EP, Weiss SR. «Murine coronavirus receptors are differentially expressed in the central nervous system and play virus strain-dependent roles in neuronal spread.» *J Virol.*, 2010: 84(21):11030-44.

Bender SJ, Weiss SR. «Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system.» *J Neuroimmune Pharmacol.*, 2010: 5(3):336-54.

Berry DM, Cruickshank JG, Chu HP, Wells RJ. «The structure of infectious bronchitis virus.» *Virology*, 1964: 23:403-7.

Beutler B, Rehli M. «Evolution of the TIR, tolls and TLRs: functional inferences from computational biology.» *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2002: 270:1-21.

Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, Ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. «Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling.» *J Virol.*, 2002: 76(17):8729-36.

Bingen A, Martin JP, Klein F, Pessah M. «Modification of the amount of cholesterol in hepatic steatosis induced in susceptible and resistant mice infected with MHV-3: a biochemical and ultrastructural study.» *Hepatology*, 1992: 15(6):1137-46.

Blau DM, Holmes KV. «Human coronavirus HCoV-229E enters susceptible cells via the endocytic pathway.» *Adv Exp Med Biol.*, 2001: 494:193-8.

Bode JG, Albrecht U, Häussinger D, Heinrich PC, Schaper F. «Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling.» *Eur J Cell Biol.*, 2012: 91(6-7):496-505.

Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. «The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex.» *J Virol.*, 2003: 77(16):8801-11.

Boulton IC, Gray-Owen SD. «Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes.» *Nat Immunol.*, 2002: 3(3):229-36.

Boyle JF, Weismiller DG, Holmes KV. «Genetic resistance to mouse hepatitis virus correlates with absence of virus-binding activity on target tissues.» *J Virol.*, 1987: 61(1):185-9.

Braet F, de Zanger R et coll. «A comparative atomic force microscopy study on living skin fibroblasts and liver endothelial cells.» *J Electron Microscop (Tokyo)*, 2001: 50(4):283-90.

Braunwald J, Nonnenmacher H, Pereira CA, Kirn A. «Increased susceptibility to mouse hepatitis virus type 3 (MHV-3) infection induced by a hypercholesterolaemic diet with increased adsorption of MHV-3 to primary hepatocyte cultures.» *Res Virol.*, 1991: 142(1):5-15.

Bredenbeek PJ, Pachuk CJ, Noten AF, Charite J, Luytjes W, Weiss SR, Spaan WJ. «The primary structure and expression of the second open reading frame of the polymerase gene of the coronavirus MHV-A59: a highly conserved polymerase is expressed by an efficient ribosomal frameshifting mechanism.» *Nucleic Acids Res.*, 1990: 18:1825-32.

Brierley I, Jenner AJ, Inglis SC. «Mutational analysis of the "slippery-sequence" component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal.» *J Mol Biol.*, 1992: 227(2):463-79.

Brockway SM, Lu XT, Peters TR, Dermody TS, Denison MR. «Intracellular localization and protein interactions of the gene 1 protein p28 during mouse hepatitis virus replication.» *J. Virol.*, 2004: 78:11551-62.

Budhu A, Wang XW. «The role of cytokines in hepatocellular carcinoma.» *J Leukoc Biol.*, 2006: 80(6):1197-213.

Bull JJ, Meyers LA, Lachmann M. «Quasispecies made simple.» *PLoS Comput Biol.* , 2005: 1(6):e61.
Callery MP, Mangino MJ, Flye MW. «Arginine-specific suppression of mixed lymphocyte culture reactivity by Kupffer cells--a basis of portal venous tolerance.» *Transplantation*, 1991: 51(5):1076-80.

Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, Binns RM, Davies DA. «Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts.» *Nature*, 1969: 223(5205):472-6.

Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. «Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression.» *Hepatology*, 2003: 38: 1188-98.

Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. «The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling.» *Nature Immunology*, 2006: 7, 1074-81.

Cavanagh D. «Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae.» *Arch Virol.*, 1997: 142(3):629-33.

Cavanagh D, Britton P. «Coronaviruses: General Features.» Dans *Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology*, de Mahy B et Van Regenmortel M, Academic Press, 2009: 52-8.

Cervantes-Barragan L, Zust R, Weber F, Spiegel M, Lang KS, Akira S, Thiel V, Ludewig B. «Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon.» *Blood*, 2007: 109: 1131-37.

Cervin M, Anderson R. «Modulation of coronavirus-mediated cell fusion by homeostatic control of cholesterol and fatty acid metabolism.» *J Med Virol.*, 1991: 35(2):142-9.

Cheever FS, Daniels JB, Pappenheimer AM, Bailey OT. «A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin.» *J Exp Med.*, 1949: 90:181-94.

Chen Z, Chen L, Blumberg RS. «Editorial: CEACAM1: fine-tuned for fine-tuning.» *J Leukoc Biol.*, 2009: 86(2):195-7.

Chen T, Zimmermann W, Parker J, Chen I, Maeda A, Bolland S. «Biliary glycoprotein (BGP, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals.» *J. Leukoc. Biol.*, 2001: 70: 335-40.

Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. «ARN polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway.» *Cell*, 2009: 138(3):576-91.

Choi I, Kang H-S, Yang Y, Pyun K-H. «IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis in vivo.» *Clin Exp Immunol.*, 1994: 95:330-35.

Choi KS, Aizaki H, Lai MM. «Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release.» *J Virol.*, 2005: 79(15):9862-71.

Choice CV, Howard MJ, Poy MN, Hankin MH, Najjar SM. «Insulin stimulates pp120 endocytosis in cells co-expressing insulin receptors.» *J Biol Chem.*, 1998: 273(35):22194-200.

Chu VC, McElroy LJ, Ferguson AD, Bauman BE, Whittaker GR. «Avian infectious bronchitis virus enters cells via the endocytic pathway.» *Adv Exp Med Biol.*, 2006: 581:309-12.

Chu WM. «Tumor necrosis factor.» *Cancer Lett.*, 2013: 328(2):222-5.

Compton SR, Rogers DB, Holmes KV, Fertsch D, Remenick J, McGowan JJ. «In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A59.» *J Virol.*, 1987: 61(6):1814-20.

Compton SR, Barthold SW, Smith AL. «The cell and molecular pathogenesis of coronaviruses.» *Lab. Anim. Sci.*, 1993: 43: 15-28.

Coutelier JP, Godfraind C, Dveksler GS, Wysocka M, Cardellichio CB, Noël H, Holmes KV. «B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules that serve as receptors for murine coronavirus.» *Eur J Immunol.*, 1994: 24(6):1383-90.

Crispe IN. «The liver as a lymphoid organ.» *Annu Rev Immunol.*, 2009: 27:147-63.

Czaja MJ, Geerts A, Xu J, Schmiedeberg P, Ju Y. «Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression occurs in toxic rat liver injury and human liver disease.» *J. Leukoc. Biol.*, 1994: 55, 120-6.

Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Kräusslich HG. «Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry.» *J Virol.*, 2005: 79(3):1581-94.

Das M, Sabio G, Jiang F, Rincón M, Flavell RA, Davis RJ. «Induction of hepatitis by JNK-mediated expression of TNF-alpha.» *Cell*, 2009: 136(2):249-60.

Daya M, Cervin M, Anderson R. «Cholesterol enhances mouse hepatitis virus-mediated cell fusion.» *Virology*, 1988: 163(2):276-83.

De Groot RJ. «Coronaviridae.» Dans *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, de Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, King AMQ, Elsevier Academic Press, 2011: 806-28.

De Groot RJ, Van Leen RW, Dalderup MJ, Vennema H, Horzinek MC, Spaan WJ. «Stably expressed FIPV peplomer protein induces cell fusion and elicits neutralizing antibodies in mice.» *Virology*, 1989: 171(2):493-502.

Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. «An ARN proofreading machine regulates replication fidelity and diversity.» *ARN Biology*, 2011: 8:2, 270-79.

de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR. «Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays.» *J Leukoc Biol.*, 2001: 69(6):912-20.

Devictor D, Decimo D, Sebire G, Tardieu M, Hadchouel M. «Enhanced tumor necrosis factor alpha in coronavirus but not in paracetamol-induced acute hepatic necrosis in mice.» *Liver*, 1992: 12(1):205-8.

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. «Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded ARN.» *Science*, 2004: 303(5663):1529-31.

Doherty D, O'Farrelly C. «Dendritic cells: regulators of hepatic immunity or tolerance.» *J Hepatol.*, 2001: 34:156-60.

Dubois-Dalcq M, Doller E, Haspel M, Holmes KV. «Cell tropism and expression of mouse hepatitis viruses (MHV) in mouse spinal cord cultures.» *Virology*, 1982: 119: 317-31.

Dveksler GS, Pensiero MN, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, Basile AA, Elia PE, Holmes KV. «Mouse hepatitis virus strain A59 and blocking antireceptor monoclonal antibody bind to the N-terminal domain of cellular receptor.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993: 90(5):1716-20.

Dveksler GS, Pensiero MN, Cardellichio CB, Williams RK, Jiang GS, Holmes KV. «Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: Expression in human.» *J. Virol.*, 1991: 65, 6881-91.

Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. «The human polyomaviruses.» *Cell Mol Life Sci.*, 2006: 63(7-8):865-76.

Eickmann M, Becker S, Klenk HD, Doerr HW, Stadler K, Censini S, Guidotti S, Massignani V, Scarselli M, Mora M, Donati C, Han JH, Song HC, Abrignani S, Covacci A, Rappuoli R. «Phylogeny of the SARS coronavirus.» *Science*, 2003: 302:1504-05.

Eifart P, Ludwig K, Böttcher C, de Haan CA, Rottier PJ, Korte T, Herrmann A. «Role of endocytosis and low pH in murine hepatitis virus strain A59 cell entry.» *J Virol.*, 2007: 81(19):10758-68.

Eriksson KK, Cervantes-Barragán L, Ludewig B, Thiel V. «Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1"-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup.» *J Virol.*, 2008: 82(24):12325-34.

Feliciangeli SF, Thomas L, Scott GK, Subbian E, Hung CH, Molloy SS, Jean F, Shinde U, Thomas G. «Identification of a pH sensor in the furin propeptide that regulates enzyme activation.» *J. Biol. Chem.*, 2006: 281, 16108-16.

Fleming JO, Trousdale MD, el-Zaatari FA, Stohlman SA, Weiner LP. «Pathogenicity of antigenic variants of murine coronavirus JHM selected with monoclonal antibodies.» *J Virol.*, 1986: 58(3):869-75.

Frana MF, Behnke JN, Sturman LS, Holmes KV. «Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion.» *J Virol.*, 1985: 56(3):912-20.

Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S. «Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria.» *Nature*, 1993: 364(6438):639-42.

Fraser R, Dobbs BR, Rogers GW. «Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis.» *Hepatology*, 1995: 21(3):863-74.

Frevert U, Engelmann S, Zougbedé S, Stange J, Ng B, Matuschewski K, Liebes L, Yee H. «Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver.» *PLoS Biol.*, 2005: 3(6):e192.

Gabay C, Kushner I. «Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation.» *N Engl J Med.*, 1999: 340(6):448-54.

Gallagher TM, Parker SE, Buchmeier MJ. « Neutralization-resistant variants of a neurotropic.» *J. Virol.*, 1990: 64: 731-41.

Gao B, Jeong WI, Tian Z. «Liver: An organ with predominant innate immunity.» *Hepatology*, 2008: 47(2):729-36.

Gao B. «Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease.» *J Gastroenterol Hepatol.*, 2012: 27(Suppl.2):89-93.

Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. «L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003: 100(8):4498-503.

Godfraind C, Langreth SG, Cardellichio CB, Knobler R, Coutelier JP, Dubois-Dalcq M, Holmes KV. «Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus.» *Lab Invest.*, 1995: 73(5):615-27.

Godfraind C, Coutelier JP. «Morphological analysis of mouse hepatitis virus A59-induced pathology with regard to viral receptor expression.» *Histol. Histopathol.*, 1998: 13: 181-99.

Gombold JL, Hingley ST, Weiss SR. «Fusion-defective mutants of mouse hepatitis virus A59 contain a mutation in the spike protein cleavage signal.» *J Virol.*, 1993: 67(8):4504-12.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. «Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis.» *Nucleic Acids Res.*, 1989: 17:4847-61.

Gordon S. «The role of the macrophage in immune regulation.» *Research in Immunology*, 1998: 149(7-8): 685-8.

Graham RL, Sims AC, Brockway SM, Baric RS, Denison MR. «The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication.» *J. Virol.*, 2005: 79:13399-411.

Gray-Owen SD, Blumberg R. «CEACAM1: contact-dependant control of immunity.» *Nat. Rev. Immunol.*, 2006: 6: 433-46.

Green D. «Cell Death.» *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012: doi: 10.1101/cshperspect.a006080.

Gregory SH, Wing EJ. «Neutrophil-Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections.» *Immunology Today*, 1998: 19(11): 507-10.

Guan Y, Ranoa DR, Jiang S, Mutha SK, Li X, Baudry J, Tapping RI. «Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling.» *J Immunol.*, 2010: 184(9):5094-103.

Guy JS, Barnes HJ, Smith LG, Breslin J. «Antigenic characterization of a turkey coronavirus identified in poult enteritis- and mortality syndrome-affected turkeys.» *Avian Dis.*, 1997: 41(3):583-90.

Hajishengallis G, Tapping RI, Harokopakis E, Nishiyama S, Ratti P, Schifferle RE, Lyle EA, Triantafilou M, Triantafilou K, Yoshimura F. «Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* with the Toll-like receptor 2-centred pattern recognition apparatus.» *Cell Microbiol.*, 2006: 8(10):1557-70.

Hamre D, Procknow JJ. «A new virus isolated from the human respiratory tract.» *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966: 121: 190-3.

Haring J, Perlman S. «Mouse hepatitis virus.» *Curr Opin Microbiol.*, 2001: 4(4):462-6.

Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. «Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation.» *J Leukoc Biol.*, 2003: 74(3):360-9.

Heald-Sargent T, Gallagher T. «Ready, Set, Fuse! The Coronavirus Spike Protein and Acquisition of Fusion Competence.» *Viruses*, 2012: 4:557-80.

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. «Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway.» *Biochem J.*, 1998: 334 (Pt 2):297-314.

Helenius A, Kartenbeck J, Simons K, Fries E. «On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells.» *J Cell Biol.*, 1980: 84(2):404-20.

Helle F, Dubuisson J. «Hepatitis C virus entry into host cells.» *Cell Mol Life Sci.*, 2008: 65(1):100-12.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. «A toll-like receptor recognizes bacterial DNA.» *Nature*, 2000: 408(6813):740-5.

Hendriks HF, Verhoofstad WA, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL. «Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. » *Exp Cell Res.*, 1985: 160:138-49.

Hoebe K, Beutler B. «TRAF3: a new component of the TLR-signaling apparatus.» *Trends Mol Med.*, 2006: 12(5):187-9.

Hoehme S, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Schormann W, Hermes M, Puppe V, Gebhardt R, Zellmer S, Schwarz M, Bockamp E, Timmel T, Hengstler JG, Drasdo D. «Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010: 107(23):10371-6.

Hoffmann PR, de Cathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, Ridley AJ, Fadok VA, Henson PM. «Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells.» *J Cell Biol.*, 2001: 155(4):649-59.

Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T. «Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection.» *J Immunol.*, 1992: 148(7):2175-80.

Horner SM, Gale M Jr. «Intracellular innate immune cascades and interferon defenses that control hepatitis C virus.» *J Interferon Cytokine Res.*, 2009: 29(9):489-98.

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. «Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides.» *J Immunol.*, 2002: 168(9):4531-7.

Hoshida Y, Kato N, Yoshida H, Wang Y, Tanaka M, Goto T, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Imazeki F, Yokosuka O, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. «Hepatitis C virus core protein and hepatitis activity are associated through transactivation of interleukin-8.» *Infect Dis.* 2005: 192(2):266-75.

Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB. «Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. » *J Leukoc Biol.* 2007: 82(2):237-43.

Hudson CB, Beaudette FR. « Infection of the cloaca with the virus of infectious bronchitis.» *Science*, 1932: 76: 34.

Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T. «Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity.» *EMBO J.*, 2006: 25(4):683-92.

Ishibash H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S. «Liver architecture, cell function, and disease.» *Semin Immunopathol.*, 2009: 31:399-409.

Ishikawa H, Barber GN. «STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling.» *Nature*, 2008: 455(7213):674-8.

Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. «Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV.» *J Virol.*, 2005: 79(11):7269-72.

Israël A. «The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation.» *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2010: 2(3):a000158.

Iwasaki A, Medzhitov R. «Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.» *Nat Immunol.*, 2004: 5(10):987-95.

Jacobs L, Spaan WJ, Horzinek MC, van der Zeijst BA. «Synthesis of subgenomic mARN's of mouse hepatitis virus is initiated independently: evidence from UV transcription mapping.» *J Virol.*, 1981: 39(2):401-6.

Jacques A, Bleau C, Martin JP, Lamontagne L. «Intrahepatic endothelial and Kupffer cells involved in immunosuppressive cytokines and natural killer (NK)/NK T cell disorders in viral acute hepatitis.» *Clin Exp Immunol.*, 2008: 152(2):298-310.

Jacques A, Bleau C, Turbide C, Beauchemin N, Lamontagne L. «Macrophage interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha are induced by coronavirus fixation to Toll-like receptor 2/heparan sulphate receptors but not carcinoembryonic cell adhesion antigen 1a.» *Immunology*, 2009: 128(1 Suppl).

Jacques A, Bleau C, Turbide C, Beauchemin N, Lamontagne L. «A synergistic interferon- γ production is induced by mouse hepatitis virus in interleukin-12 (IL-12)/IL-18-activated natural killer cells and modulated by carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1a receptor.» *Immunol.*, 2009: 128(1 Suppl).

Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC. «Rates of molecular evolution in ARN viruses: a quantitative phylogenetic analysis.» *J Mol Evol.*, 2002: 54(2):156-65.

Jeong YS, Makino S. «Evidence for coronavirus discontinuous transcription.» *J Virol.*, 1994: 68(4):2615-23.

Jiang F, Ramanathan A, Miller MT, Tang GQ, Gale M Jr, Patel SS, Marcotrigiano J. «Structural basis of ARN recognition and activation by innate immune receptor RIG-I.» *Nature*, 2011: 479(7373):423-7.

Johannsdottir HK, Mancini R, Kartenbeck J, Amato L, Helenius A. «Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry.» *J Virol.*, 2009: 83(1):440-53.

Jolicoeur P, Lamontagne L. «Mouse hepatitis virus 3 pathogenicity expressed by a lytic viral infection in bone marrow 14.8+ μ + B lymphocyte subpopulations.» *J Immunol.*, 1989: 143(11):3722-30.

Jomantaite I, Dikopoulos N, Kröger A, Leithäuser F, Hauser H, Schirmbeck R, Reimann J. «Hepatic dendritic cell subsets in the mouse.» *Eur J Immunol*, 2004: 34(2):355-65.

Jones SA, Scheller J, Rose-John S. «Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling.» *J Clin Invest*, 2011: 121:3375-83.

Janeway Jr. CA. «Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.» *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 1989: 54(Pt 1):1-13.

Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. «TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta.» *Nat Immunol.*, 2008: 9(4):361-8.

Kammerer R, Stober D, Singer BB, Obrink B, Reimann J. «Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation.» *J Immunol.*, 2001: 166(11):6537-44.

Kang YJ, Chen J, Otsuka M, Mols J, Ren S, Wang Y, Han J. «Macrophage deletion of p38a partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation.» *J Immunol*, 2008: 180: 5075-82.

Karin M. «NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer.» *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2009: 1(5):a000141.

Karlmark KR, Wasmuth HE, Trautwein C, Tacke F. «Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease.» *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2008: 2: 233-42.

Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. «Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5.» *J Exp Med.*, 2008: 205(7):1601-10.

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. «Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes.» *J Immunol.*, 2001: 167(10):5887-94.

Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. «IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction.» *Nat Immunol.*, 2005: 6(10):981-8.

Kawai T, Akira S. «Innate immune recognition of viral infection.» *Nat Immunol.*, 2006: 7(2):131-7.

Kawai T, Akira S. «Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling.» *Ann N Y Acad Sci.*, 2008: 1143:1-20.

Kawai T, Akira S. «The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.» *Nature Immunology*, 2010: 11:373-84.

Kerr MC, Teasdale RD. «Defining macropinocytosis.» *Traffic.*, 2009: 10(4):364-71.

Khanolkar A, Hartwig SM, Haag BA, Meyerholz DK, Harty JT, Varga SM. «Toll-like receptor 4 deficiency increases disease and mortality after mouse hepatitis virus type 1 infection of susceptible C3H mice.» *J. Virol.* 2009: 83:8946-56.

King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. «Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.» Elsevier, 2011: 95-111.

Kirkham M, Parton RG. «Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers.» *Biochim Biophys Acta.*, 2005: 1746(3):349-63.

Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John B, Wuensch SA, Topham DJ, Pierce RH, Crispe IN. «Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages.» *Blood*, 2007: 110: 4077-85.

Knolle PA, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. «Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge.» *J Hepatol.*, 1995: 22(2):226-9.

Knolle PA, Limmer A. « Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells.» *Trends Immunol.*, 2001: 22:432–37.

Knolle PA, Uhrig A, Hegenbarth S, Löser E, Schmitt E, Gerken G, Lohse AW. «IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules.» *Clin Exp Immunol.*, 1998: 114(3):427-33.

Knolle PA, Gerken G. «Local control of the immune response in the liver.» *Immunol. Rev.*, 2000: 174:21–34.

Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. «Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease.» *World J Gastroenterol*, 2006: 12(46):7413-20.

Komuro A, Horvath CM. «ARN- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by ARN helicase LGP2.» *J Virol.*, 2006: 80(24):12332-42.

Kondo T, Kawai T, Akira S. «Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling.» *Trends Immunol.*, 2012: 33(9):449-58.

Kooi C, Cervin M, Anderson R. «Differentiation of acid-pH-dependent and -nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus.» *Virology*, 1991: 180(1):108-19.

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. «IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex.» *Nature Immunol.*, 2003: 4:69–77.

Kubo H, Yamada YK, Taguchi F. «Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein.» *J Virol.*, 1994: 68(9):5403-10.

Kuespert K, Pils S, Hauck CR. «CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology.» *Curr Opin Cell Biol.*, 2006: 18(5):565-71.

Kuroki M, Matsuo Y, Kinugasa T, Matsuoka Y. «Augmented expression and release of nonspecific cross-reacting antigens (NCAs), members of the CEA family, by human neutrophils during cell activation.» *J Leukoc Biol.*, 1992: 52(5):551-7.

Lai MM, Patton CD, Baric RS, Stohlman SA. «Presence of leader sequences in the mARN of mouse hepatitis virus.» *J Virol.* , 1983: 46(3):1027-33.

Lai MM. «Coronavirus leader-ARN-primed transcription: an alteARNtive mechanism to ARN splicing.» *Bioessays.*, 1986: 5(6):257-60.

Lai MM, Cavanagh D. «The molecular biology of coronaviruses.» Dans *Advances in virus reasearch*, de Murphy FA, Shatkin A. Maramorosch K, *Academic Press*, 1997:48:1-100.

Lai MM, Holmes KV. «Coronaviridae: The viruses and their replication.» Dans *Fields Virology*, de Howley PM Knipe DM, *Lippincott, Williams & Wilkins*, 2001: (1)1163-85.

Lai MM. «ARN recombination in animal and plant viruses.» *Microbiol Rev.*, 1992: 56(1):61-79.

Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. «Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes.» *Cell*, 2006: 124(5):997-1009.

Lalor PF, Lai W, Curbishley SM, Shetty S, Adams DH. «Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo.» *World J. Gastroenterol.*, 2006: 12: 5429-39.

Lamontagne L, Jolicoeur P, Decarie D, Menezes J. «Effect of adoptive transfer of CD4, CD8 and B cells on recovery from MHV-3-induced immunodeficiencies.» *Immunology*, 1996: 88(2):220-9.

Lamontagne L, Dupuy JM. «Persistent infection with mouse hepatitis virus 3 in mouse lymphoid cell lines.» *Infect. Immunol.*, 1984: 44: 716-23.

Lardans V, Godfraind C, van der Logt JT, Heessen WA, Gonzalez MD, Coutelier JP. «Polyclonal B lymphocyte activation induced by mouse hepatitis virus A59 infection.» *J Gen Virol.*, 1996: 77(Pt 5):1005-9.

Lavi E, Gilden DH, Highkin MK, Weiss SR. «Persistence of mouse hepatitis virus A59 ARN in a slow virus demyelinating infection in mice as detected by in situ hybridization.» *J Virol.* , 1984: 51(2):563-6.

Lavi E, Gilden DH, Highkin MK, Weiss SR. «The organ tropism of mouse hepatitis virus A59 in mice is dependent on dose and route of inoculation.» *Lab Anim Sci.*, 1986: 36(2):130-5.

Le Couteur DG, Warren A, Cogger VC, Smedsrod B, Sorensen KK, De Cabo R, Fraser R, McCuskey RS. «Old age and the hepatic sinusoid.» *Anat Rec.*, 2008: 291: 672–83.

Le Prevost C, Levy-Leblond E, Virelizier JL, Dupuy JM. «Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. Role of humoral and cell-mediated immunity in resistance mechanisms.» *J. Immunol.*, 1975: 114: 221-5.

Lee HJ, Shieh CK, Gorbalenya AE, Koonin EV, La Monica N, Tuler J, Bagdzhadzhyan A, Lai MM. «The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and ARN polymerase.» *Virology*, 1991: 180:567-82.

Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H. «Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors.» *Cancer Cell*, 2009: 15: 283–93.

Lehoux M, Jacques A, Lusignan S, Lamontagne L. «Murine viral hepatitis involves NK cell depletion associated with virus-induced apoptosis.» *Clin Exp Immunol.*, 2004: 137(1):41-51.

Leifeld L, Dumoulin F-L, Purr I, Janberg K, Trautwein C, Wolff M, Mann, MP, Sauerbruch T, Spengler U. «Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure.» *J. Pathol.*, 2003: 199: 335–44.

Lemaître B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. «The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.» *Cell*, 1996: 86(6):973-83.

Li GM, Li YG, Yamate M, Li SM, Ikuta K. «Lipid rafts play an important role in the early stage of severe acute respiratory syndrome-coronavirus life cycle.» *Microbes Infect.*, 2007: 9(1):96-102.

Liang Y, Jie Z, Hou L, Aguilar-Valenzuela R, Vu D, Soong L, Sun J. «IL-33 induces neutrophils and modulates liver injury in viral hepatitis.» *J Immunol.*, 2013: 190(11):5666-75.

Liberali P, Kakkonen E, Turacchio G, Valente C, Spaar A, Perinetti G, Böckmann RA, Corda D, Colanzi A, Marjomaki V, Luini A. «The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS.» *EMBO J.*, 2008: 27(7):970-81.

Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. «Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses.» *Nat Rev Immunol.*, 2005: 5(6):446-58.

Lin SC, Lo YC, Wu H. «Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling.» *Nature*, 2010: 465(7300):885-90.

Lio D, Caruso C, Di Stefano R, Colonna Romano G, Ferraro D, Scola L, Crivello A, Licata A, Valenza LM, Candore G, Craxì A, Almasio PL. «IL-10 and TNF-alpha polymorphisms and the recovery from VHC infection.» *Hum Immunol.* 2003;64(7):674-80.

Litvak V, Ramsey SA, Rust AG, Zak DE, Kennedy KA, Lampano AE, Nykter M, Shmulevich I, Aderem A. «Function of C/EBPdelta in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals.» *Nat Immunol.*, 2009: 10(4):437-43.

Lloyd CM, Phillips AR et al. «Three-colour fluorescence immunohistochemistry reveals the diversity of cells staining for macrophage markers in murine spleen and liver.» *J Immunol Methods*, 2008: 334(1-2):70-81.

Locker JK, Rose JK, Horzinek MC, Rottier PJ. «Membrane assembly of the triple-spanning coronavirus M protein. Individual transmembrane domains show preferred orientation.» *J Biol Chem.*, 1992: 267(30):21911-8.

Lomniczi B. «Biological properties of avian coronavirus ARN.» *J Gen Virol.*, 1977: 36(3):531-3.

Løvdal T, Brech A, Kjekken R, Berg T. «Receptor-mediated and fluid phase endocytosis in hepatic sinusoidal cells.» Dans *Cells of the Hepatic Sinusoid, Volume 8*, de Knook D, De Zanger, Arthur MJP. Leiden Wisse E. *The Kupffer Cell Foundation*, 2001. 125-31.

Lu C, Xu H, Ranjith-Kumar CT, Brooks MT, Hou TY, Hu F, Herr AB, Strong RK, Kao CC, Li P. «The structural basis of 5' triphosphate double-stranded ARN recognition by RIG-I C-terminal domain.» *Structure*, 2010: 18(8):1032-43.

Lu Y, Lu X, Denison MR. « Identification and characterization of a serine-like proteinase of the murine coronavirus MHV-A59.» *J. Virol.*, 1995: 69:3554-9.

Lucchiari MA, Pereira CA, Kuhn L, Lefkovits I. «The pattern of proteins synthesized in the liver is profoundly modified upon infection of susceptible mice with mouse hepatitis virus 3.» *Res Virol.*, 1992: 143(4):231-40.

Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. «Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.» *J Exp Med.*, 2003: 198(3):513-20.

Luo Z, Weiss SR. «Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein.» *Virology*, 1998: 244(2):483-94.

Luytjes W, Bredenbeek PJ, Noten AF, Horzinek MC, Spaan WJ. «Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA recombination between coronaviruses and influenza C virus.» *Virology*, 1988: 166(2):415-22.

Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. «Lysosomes: fusion and function.» *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2007: 8(8):622-32.

MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. «Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy.» *Am J Physiol.*, 1995: 269(Pt 1):G692-8.

MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. «Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy.» *Am. J. Physiol.*, 1992: 263(Pt 1), G17–G23.

Maeda A, An S, Makino S. «Importance of coronavirus negative-strand genomic RNA synthesis prior to subgenomic RNA transcription.» *Virus Res.*, 1998: 57(1):35-42.

Makino S, Stohlman SA, Lai MM. «Leader sequences of murine coronavirus mRNAs can be freely reassorted: evidence for the role of free leader RNA in transcription.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986: 83(12):4204-8.

Malhi H, Gores GJ. «Cellular and molecular mechanisms of liver injury.» *Gastroenterology*, 2008: 134: 1641-54.

Marinkovic S, Jahreis GP, Wong G. «IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo.» *J Immunol.*, 1989: 142:808-12.

Marsh M, Bron R. «Sfv infection in CHO cells: Cell-type specific restrictions to productive virus.» *J. Cell Sci.*, 1997: 110 (Pt 1), 95–103.

Martin JP, Chen W, Koehren F, Pereira CA. «The virulence of mouse hepatitis virus 3, as evidenced by permissivity of cultured hepatic cells toward escape mutants.» *Res Virol.*, 1994: 145(5):297-302.

Masters PS. «Localization of an ARN-binding domain in the nucleocapsid protein of the coronavirus mouse hepatitis virus.» *Arch Virol.*, 1992: 125(1-4):141-60.

Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. «Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease tmprss2.» *J. Virol.* , 2010: 84, 12658-64.

Matthews AE, Weiss SR, Shlomchik MJ, Hannum LG, Gombold JL, Paterson Y. «Antibody is required for clearance of infectious murine hepatitis virus A59 from the central nervous system, but not the liver.» *J Immunol.*, 2001: 167(9):5254-63.

Maxfield FR, McGraw TE. «Endocytic recycling.» *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2004: 5(2):121-32.

Mayor S, Viola A, Stan RV, del Pozo MA. «Flying kites on slippery slopes at Keystone. Symposium on Lipid Rafts and Cell Function.» *EMBO Rep.*, 2006: 7(11):1089-93.

Mazaleuskaya L, Veltrop R, Ikpeze N, Martin-Garcia J, Navas-Martin S. «Protective role of Toll-like Receptor 3-induced type I interferon in murine coronavirus infection of macrophages.» *Viruses*, 2012: 4(5):901-23.

McGilvray ID, Lu Z, Wei AC, Dackiw AP, Marshall JC, Kapus A, Levy G, Rotstein OD. «Murine hepatitis virus strain 3 induces the macrophage prothrombinase fgl-2 through p38 mitogen-activated protein kinase activation.» *J Biol Chem.*, 1998: 273(48):32222-9.

McIntosh K, Becker WB, Chanock RM.«Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1967: 58: 2268-73.

Medsrød B, Pertoft H, Kjelløn L, Johansson S, Eskild W, Laurent TC. «Endocytosis of connective tissue macromolecules by liver endothelial cells.» Dans *Cells of the Hepatic Sinusoid*, de Knook DL, Wisse E. Leiden Kirn A, *The Kupffer Cell Foundation*, 1986:245-50.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. «A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.» *Nature*, 1997: 388: 394-7.

Mercer J, Helenius A. «Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells.» *Science*, 2008: 320(5875):531-5.

Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. «Virus entry by endocytosis.» *Annu Rev Biochem.*, 2010: 79:803-33.

Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J. «RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation.» *Nat Immunol.*, 2004: 5(5):503-7.

Mihindukulasuriya KA, Wu G, St Leger J, Nordhausen RW, Wang D. «Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray.» *J Virol.*, 2008: 82:5084-8.

Miura TA, Travanty EA, Oko L, Bielefeldt-Ohmann H, Weiss SR, Beauchemin N, Holmes KV. «The spike glycoprotein of murine coronavirus MHV-JHM mediates receptor-independent infection and spread in the central nervous systems of Ceacam1a^{-/-} Mice.» *J Virol.*, 2008: 82(2):755-63.

Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB. «HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes.» *Cell*, 2009:137(3):433-44.

Muenzner P, Bachmann V, Kuespert K, Hauck CR. «The CEACAM1 transmembrane domain, but not the cytoplasmic domain, directs internalization of human pathogens via membrane microdomains.» *Cell Microbiol.*, 2008: 10(5):1074-92.

Müller MM, Klaile E, Vorontsova O, Singer BB, Obrink B. «Homophilic adhesion and CEACAM1-S regulate dimerization of CEACAM1-L and recruitment of SHP-2 and c-Src.» *J Cell Biol.*, 2009: 187(4):569-81.

Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, ZinkeARNgel RM, Aguet M. «Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense.» *Science*, 1994: 264:1918–21.

Murawski MR, Bowen GN, Cerny AM, Anderson LJ, Haynes LM, Tripp RA, Kurt-Jones EA, Finberg RW. «Respiratory syncytial virus activates innate immunity through toll-like receptor 2.» *J Virol.*, 2009: 83(3):1492–1500.

Nagaishi T, Iijima H, Nakajima A, Chen D, Blumberg RS. «Role of CEACAM1 as a regulator of T cells.» *Ann N Y Acad Sci.*, 2006: 1072:155-75.

Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. «Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells.» *Microsc Res Tech.*, 1997: 39:350-64.

Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. «Differentiation and function of Kupffer cells.» *Med Electron Microsc.*, 2004: 37:16-28.

Najjar SM, Philippe N, Suzuki Y, Ignacio GA, Formisano P, Accili D, Taylor SI. «Insulin-stimulated phosphorylation of recombinant pp120/HA4, an endogenous substrate of the insulin receptor tyrosine kinase.» *Biochemistry*, 1995: 34(29):9341-9.

Nakagaki K, Nakagaki K, Taguchi F. «Receptor-independent spread of a neurotropic murine coronavirus MHV-JHMV in mixed neural culture.» *Adv Exp Med Biol.*, 2006: 581:327-30.

Nakajima A, Iijima H, Neurath MF, Nagaishi T, Nieuwenhuis EE, Raychowdhury R, Glickman J, Blau DM, Russell S, Holmes KV, Blumberg RS. «Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function.» *J Immunol.*, 2002: 168(3):1028-35.

Nakatani, K., Kaneda, K., Seki, S., and Nakajima, Y. «Pit cells as liver-associated natural killer cells: Morphology and function.» *Med Electron Microsc.*, 2004: 37:29-36.

Nash TC, Buchmeier MJ. «Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways.» *Virology*, 1997: 233(1):1-8.

Nature(Lond.). «Coronaviruses.» 1968: 220: 650.

Navas S, Seo SH, Chua MM, Das Sarma J, Lavi E, Hingley ST, Weiss SR. «Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in the liver and cause hepatitis.» *J Virol.* 2001;75:2452-7.

Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C. «Microanatomy of the liver immune system.» *Semin Immunopathol.*, 2009: 31:333-43.

Neuman BW, Adair BD, Yoshioka C, Quispe JD, Orca G, Kuhn P, Milligan RA, Yeager M, Buchmeier MJ. «Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy.» *J Virol.*, 2006: 80(16):7918-28.

Newton K, Dixit VM. «Signaling in innate immunity and inflammation.» *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2012: 4(3). pii: a006049.

Nguyen VP, Hogue BG. «Protein interactions during coronavirus assembly.» *J Virol.*, 1997: 71(12):9278-84.

Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE. «Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells.» *J Virol.*, 2003: 77(9):5324-32.

Nomura R, Kiyota A, Suzaki E, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda T, Fujimoto T. «Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae.» *J. Virol.*, 2004: 78(16):8701-8.

Nonnenmacher H, Illinger D, Kuhry JG, Kirn A, Braunwald J. «Contrary results on mouse hepatitis virus type 3 susceptibility in A/J mouse hepatocytes of phosphatidylserine treatment and of a hypercholesterolaemic diet: no correlation with membrane fluidity levels.» *Biochem Biophys Res Commun.*, 1994: 204(3):1299-304.

Obrink B. «CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties.» *Curr Opin Cell Biol.*, 1997: 9(5):616-26.

O'Connell PJ, Morelli AE, Logar AJ, Thomson AW. «Phenotypic and functional characterization of mouse hepatic CD8 α lymphoid-related dendritic cells.» *J. Immunol.*, 2000: 165:795–803.

Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, Takeuchi T, Matsuda S, Koyasu S. «Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells.» *Blood*, 2008: 112(3):635-43.

O'Neill LA, Bowie AG. «The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.» *Nat Rev Immunol.*, 2007: 7:353-64.

Opstelten DJ, Raamsman MJ, Wolfs K, Horzinek MC, Rottier PJ. «Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly.» *J Cell Biol.*, 1995: 131(2):339-49.

Opstelten DJ, de Groote P, Horzinek MC, Vennema H, Rottier PJ. «Disulfide bonds in folding and transport of mouse hepatitis coronavirus glycoproteins.» *J Virol.*, 1993: 67, 7394-401.

Oyanagi Y, Takahashi T, Matsui S, Takahashi S, Boku S, Takahashi K, Furukawa K, Arai F, Asakura H. «Enhanced expression of interleukin-6 in chronic hepatitis C.» *Liver*. 1999:19(6):464-72.

Parker LC, Prince LR, Sabroe I. «Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity.» *Clin Exp Immunol.*, 2007: 147(2):199-207.

Parker GA, Picut CA. «Immune Functioning in Non lymphoid Organs: The Liver.» *Toxicol Pathol.*, 2012: 40: 237-47.

PasteRNk AO, Spaan WJ, Snijder EJ. «Nidovirus transcription: how to make sense...?» *J Gen Virol.*, 2006: 87(Pt 6):1403-21.

Patil C, Zhu X, Rossa, Jr. C, Kim YJ, Kirkwood KL. «p38 MAPK Regulates IL-1 β Induced IL-6 Expression Through mARN Stability in Osteoblasts.» *Immunol Invest.*, 2004: 33(2): 213-33.

Pedersen NC, Ward J, Mengeling WL. «Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species.» *Arch Virol.*, 1978: 58(1):45-53.

Pelkmans L, Fava E, Grabner H, Hannus M, Habermann B, Krausz E, Zerial M. «Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis.» *Nature*, 2005: 436(7047):78-86.

Pelkmans L, Püntener D, Helenius A. «Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae.» *Science*, 2002: 296(5567):535-9.

Peng X, Gralinski L, Armour CD, Ferris MT, Thomas MJ, Proll S, et al. « Unique signatures of long noncoding RNA expression in response to virus infection and altered innate immune signaling.» *MBio.*, 2010: 1(5):e00206-10. doi:10.1128/mBio.00206-10.

Perlman S, Netland J. « Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. » *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009: 7:439-50.

Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM. «TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation.» *J Immunol.*, 1998: 160(2):943-52.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. «Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.» *Immunol. Rev.*, 2004: 202:8-32.

Peters M, Müller AM, Rose-John S. «Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis.» *Blood*, 1998: 92(10):3495-504.

Phillips JM, Weiss SR. «Pathogenesis of neurotropic murine.» *Trends Pharmacol Sci.*, 2011: 32(2):2-7.

Pillarisetty VG, Katz SC, Bleier JI, Shah AB, Dematteo RP. «Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN- γ via autocrine IL-12.» *J. Immunol.*, 2005: 174:2612–18.

Pöhlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. «Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR.» *J Virol.*, 2003: 77(7):4070-80.

Poy MN, Yang Y, Rezaei K, Fernström MA, Lee AD, Kido Y, Erickson SK, Najjar SM. «CEACAM1 regulates insulin clearance in liver.» *Nat Genet.*, 2002: 30(3):270-6.

Protzer U, Maini MK, Knolle PA. «Living in the liver: hepatic infections.» *Nat Rev Immunol.*, 2012: 12(3):201-13.

Pu Y, Zhang X. «Mouse hepatitis virus type 2 enters cells through a clathrin-mediated endocytic pathway independent of Eps15.» *J Virol.*, 2008: 82(16):8112-23.

Quinton LJ, Jones MR, Robson BE, Mizgerd JP. «Mechanisms of the hepatic acute-phase response during bacterial pneumonia.» *Infect Immun.*, 2009: 77(6):2417-26.

Racanelli V, Rehermann B. «The liver as an immunological organ.» *Hepatology*, 2006: 43 (2 Suppl. 1), S54–S62.

Raghu H, Sharma-Walia N, Veettil MV, Sadagopan S, Chandran B. «Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells.» *J Virol.*, 2009: 83(10):4895-911.

Rao PV, Kumari S, Gallagher TM. «Identification of a contiguous 6-residue determinant in the MHV receptor that controls the level of virion binding to cells.» *Virology*, 1997: 229(2):336-48.

Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. «Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology.» *Anat Rec.*, 1954: 119:11-33.

Raz E. «Organ-specific regulation of innate immunity.» *Nat Immunol.*, 2007: 8(1):3-4.

Rempel JD, Murray SJ, Meisner J, Buchmeier MJ. «Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis.» *Virology*, 2004: 318(1):381-92.

Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. «Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes.» *Cell*, 2005: 122(5):735-49.

Risco C, Antón IM, Enjuanes L, Carrascosa JL. «The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins.» *J Virol.*, 1996: 70(7):4773-7.

Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. «Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles.» *Mol Biol Cell.*, 1999: 10(4):961-74.

Roos DS, Duchala CS, Stephensen CB, Holmes KV, Choppin PW. «Control of virus-induced cell fusion by host cell lipid composition.» *Virology*, 1990: 175(2):345-57.

Rose-John S, Heinrich PC. «Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function.» *Biochem J.*, 1994: 300 (Pt 2):281-90.

Rossa C, Ehmann K, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. «MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1beta and TNF-alpha-induced RANKL expression in bone marrow stromal cells.» *J Interferon Cytokine Res.*, 2006: 26(10):719-29.

Roth-Cross JK, Bender SJ, Weiss SR. «Murine coronavirus mouse hepatitis virus is recognized by MDA5 and induces type I interferon in brain macrophages/microglia.» *J. Virol.* 2008:82:9829-38.

Rothenfusser S, Goutagny N, DiPeARN G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. «The ARN helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I.» *J Immunol.*, 2005: 175(8):5260-8.

Routledge E, Stauber R, Pfeleiderer M, Siddell SG. «Analysis of murine coronavirus surface glycoprotein functions by using monoclonal antibodies.» *J Virol.*, 1991: 65(1):254-62.

Rowe CL, Fleming JO, Nathan MJ, Sgro JY, Palmenberg AC, Baker SC. «Generation of coronavirus spike deletion variants by high-frequency recombination at regions of predicted ARN secondary structure.» *J Virol.*, 1997: 71, 6183-90.

Rowell DL, Eckmann L, Dwinell MB, Carpenter SP, Raucy JL, Yang SK, Kagnoff MF. «Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion.» *Am J Physiol.*, 1997: 273(2 Pt 1):G322-32.

Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X. «Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry.» *Nat Struct Mol Biol.*, 2004: 11(6):567-73.

Saiman Y, Friedman SL. «The role of chemokines in acute liver injury.» *Front Physiol.*, 2012: 3:213.

Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M Jr. «Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007: 104(2):582-7.

Samuelsson C, Hausmann J, Lauterbach H, Schmidt M, Akira S, Wagner H, Chaplin P, Suter M, O'Keefe M, Hochrein H. «Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on tlr9, and therapeutic vaccination provides protection. .» *J Clin Invest.*, 2008: 118(5):1776-84.

Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. «LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010: 107(4):1512-7.

Sawicki SG, Sawicki DL, Younker D, Meyer Y, Thiel V, Stokes H, Siddell SG. «Functional and genetic analysis of coronavirus replicase-transcriptase proteins.» *PLoS Pathog.*, 2005: 1(4):e39.

Sawicki SG, Sawicki DL. «Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in ARN synthesis.» *J Virol.*, 1990: 64(3):1050-6.

Schelhaas M, Malmström J, Pelkmans L, Haugstetter J, Ellgaard L, Grünewald K, Helenius A. «Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells.» *Cell*, 2007: 131(3):516-29.

Schindler L, Klimetzek V, Kirchner H. «Bone-marrow derived macrophages as targets for the replication of mouse hepatitis virus type 3.» *Immunol Lett.*, 1983: 7(2):107-10.

Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. «Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded ARN as contained in panhandle of negative-strand virus.» *Immunity*, 2009: 31(1):25-34.

Schochetman G, Stevens RH, Simpson RW. «Presence of infectious polyadenylated ARN in coronavirus avian bronchitis virus.» *Virology*, 1977: 77(2):772-82.

Schultze B, Wahn K, Klenk HD, Herrler G. «Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity.» *Virology*, 1991: 180(1):221-8.

Seki E, Brenner DA. «Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update.» *Hepatology*, 2008: 48(1):322-35.

Seki E, Tsutsui H, Nakano H, Tsuji N, Hoshino K, Adachi O, Adachi K, Futatsugi S, Kuida K, Takeuchi O, Okamura H, Fujimoto J, Akira S, Nakanishi K. «Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta.» *J Immunol.*, 2001: 166(4):2651-7.

Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, Leiner I, Li MO, Frenette PS, Pamer EG. « Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands.» *Immunity*, 2011: 34(4):590–601.

Shi ST, Schiller JJ, Kanjanahaluethai A, Baker SC, Oh JW, Lai MM. « Colocalization and membrane association of murine hepatitis virus gene 1 products and de novo-synthesized viral ARN in infected cells.» *J. Virol.*, 1999: 73:5957-69.

Shieh CK, Soe LH, Makino S, Chang MF, Stohlman SA, Lai MM. «The 5'-end sequence of the murine coronavirus genome: implications for multiple fusion sites in leader-primed transcription.» *Virology*, 1987: 156(2):321-30.

Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, Bussey C, Steckel M, Tanaka N, Yamada G, Akira S, Matsumoto K, Ghosh S. «TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo.» *Genes Dev.*, 2005: 19(22):2668-81.

Siddell S, Wege H, Ter Meulen V. «The biology of coronaviruses.» *J Gen Virol.*, 1983: 64 (Pt 4):761-76.

Sieczkarski SB, Whittaker GR. «Dissecting virus entry via endocytosis.» *J Gen Virol.*, 2002: 83(Pt 7):1535-45.

Simons K, van Meer G. «Lipid sorting in epithelial cells.» *Biochemistry*, 1988: 27(17):6197-202.

Singer BB, Scheffrahn I, Obrink B. «The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation.» *Cancer Res.*, 2000: 60(5):1236-44.

Sleyster EC, Knook DL. « Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells.» *Lab Invest.*, 1982: 47: 484–90.

Slobodskaya O, Snijder EJ, Spaan WJ. «Organ tropism of murine coronavirus does not correlate with the expression levels of the membrane-anchored or secreted isoforms of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 receptor.» *J Gen Virol.*, 2012: 93(Pt 9):1918-23.

Smedsrød B, Pertoft H, Eriksson S, Fraser JRE, Laurent TC. «Studies in vitro on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelial cells.» *Biochem J.*, 1984: 617-26.

Smedsrød B. «Clearance function of scavenger endothelial cells.» *Comp Hepatol.*, 2004: 3 Suppl 1:S22.

Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, Thiel V, Ziebuhr J, Poon LL, Guan Y, Rozanov M, Spaan WJ, Gorbalenya AE. «Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage.» *J Mol Biol.*, 2003: 331:991-1004.

Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. «Coronaviruses: structure and genome expression.» *J Gen Virol.*, 1988: 69 (Pt 12):2939-52.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. «How cells respond to interferons.» *Annu. Rev. Biochem.*, 1998: 67:227-64.

Stauffer JK, Scarzello AJ, Jiang Q, Wiltrott RH. «Chronic inflammation, immune escape, and oncogenesis in the liver: a unique neighborhood for novel intersections.» *Hepatology*, 2012: 56(4):1567-74.

Steinhauer DA, Holland JJ. «Direct method for quantitation of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral ARN.» *J Virol.*, 1986 : 57(1):219-28.

Steinman RM, Cohn ZA. «Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.» *JouARNI of Experimental Medicine*, 1973: 137(5): 1142-62.

Stern DF, Sefton BM. «Synthesis of coronavirus mARNs: kinetics of inactivation of infectious bronchitis virus ARN synthesis by UV light.» *J Virol.*, 1982: 42(2):755-9.

Stetson DB, Medzhitov R. «Type I interferons in host defense.» *Immunity*, 2006: 25(3):373-81.

Stohlman SA, Baric RS, Nelson GN, Soe LH, Welter LM, Deans RJ. «Specific interaction between coronavirus leader ARN and nucleocapsid protein.» *J Virol.*, 1988: 62(11):4288-95.

Stohlman SA, Bergmann CC, Perlman S. «Mouse hepatitis virus. In: Ahmed R, Chen I. «Persistant viral infections.» *John Wiley & Sons*, 1998: 537-57.

Sturman LS, Holmes KV, Behnke J. «Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid.» *J Virol.*, 1980: 33(1): 449-62.

Sturman LS, Ricard CS, Holmes KV. «Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments.» *J Virol.*, 1985: 56(3):904-11.

Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE. «Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding.» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999: 96(12):6775-80.

Suzuki H, Taguchi F. «Analysis of the receptor-binding site of murine coronavirus spike protein.» *J Virol.*, 1996: 70(4):2632-6.

Tacke F, Luedde T, Trautwein C. «Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury.» *Clin. Rev. Allergy Immunol.* , 2009: 36:4–12.

Taga T, Kishimoto T. «Signaling mechanisms through cytokine receptors that share signal transducing receptor components.» *Curr Opin Immunol.*, 1995: 7(1):17-23.

Taguchi F, Massa PT, Ter Meulen V. «Characterization of a variant virus isolated from neural cell culture after infection of mouse coronavirus JHMV.» *Virology*, 1986: 155: 267-70.

Taguchi F. «Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2.» *J Virol.*, 1993: 67(3):1195-202.

Takeuchi O, Akira S. «Pattern recognition receptors and inflammation.» *Cell*, 2010: 140(6):805-20.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. «Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components.» *Immunity*, 1999: 11(4):443-51.

Tardieu M, Boespflug O, Barbé T. «Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons, and meningeal cells.» *J Virol.*, 1986: 60(2):574-82.

Taub R. «Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway.» *J. Clin. Invest.*, 2003: 12:978–980.

Terahara K, Yoshida M, Taguchi F, Igarashi O, Nochi T, Gotoh Y, Yamamoto T, Tsunetsugu-Yokota Y, Beauchemin N, Kiyono H. «Expression of newly identified secretory CEACAM1(a) isoforms in the intestinal epithelium.» *Biochem Biophys Res Commun.*, 2009: 383(3):340-6.

Thorp EB, Gallagher TM. «Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry.» *J. Virol.*, 2004: (78) 2682-2692.

Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL. «A CD14-independent LPS receptor cluster.» *Nat Immunol.*, 2001: 2(4):338-45.

Triantafilou M, Lepper PM, Olden R, Dias IS, Triantafilou K. «Location, location, location: is membrane partitioning everything when it comes to innate immune activation?» *Mediators Inflamm.*, 2011:186093, doi: 10.1155/2011/186093.

Tseng PH, Matsuzawa A, Zhang W, Mino T, Vignali DA, Karin M. «Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines.» *Nat Immunol.*, 2010: 11(1):70-5.

Tu Z, Bozorgzadeh A, Crispe IN, Orloff MS. «The activation state of human intrahepatic lymphocytes.» *Clin Exp Immunol*, 2007: (149)186-93.

Tyrrell DA, Almeida JD. «Direct electron-microscopy of organ culture for the detection and characterization of viruses.» *Arch. Ges. Virusforsch*, 1967: 22: 417-25.

Tyrrell DA, Almeida JD, Berry DM, Cunningham CH, Hamre D, Hofstad MS, Mallucci L. «Coronaviruses.» *Nature*, 1968: (220) 650.

Tzeng HT, Hsu PN, Chen PJ. «Immunocompetent nontransgenic mouse models for studying hepatitis B virus immune responses.» *J Gastroenterol Hepatol.*, 2013: 28 Suppl 1:116-9.

Van Hamme E, Dewerchin HL, Cornelissen E, Verhasselt B, Nauwynck HJ. «Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin.» *J Gen Virol.*, 2008: 89(Pt 9):2147-56.

Van Meel E, Klumperman J. «Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system.» *Histochem Cell Biol.*, 2008: 129(3):253-66.

Vassão RC, Mello IG, Pereira CA. «Role of macrophages, interferon gamma and procoagulant activity in the resistance of genetic heterogeneous mouse populations to mouse hepatitis virus infection.» *Arch Virol.* 1994:137 :277-88.

Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, Rottier PJ. «Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes.» *EMBO J.*, 1996: 15(8):2020-8.

Versteeg GA, Bredenbeek PJ, van den Worm SH, Spaan WJ. «Group 2 coronaviruses prevent immediate early interferon induction by protection of viral ARN from host cell recognition.» *Virology*, 2007: 361(1):18-26.

Virelizier JL, Allison AC. «Correlation of persistent mouse hepatitis virus (MHV-3) infection with its effect on mouse macrophage cultures.» *Arch Virol.*, 1976: 50(4):279-85.

Virelizier JL, Dayan AD, Allison AC. «Neuropathological effects of persistent infection of mice by mouse hepatitis virus.» *Infect Immun.*, 1975: 12(5):1127-40.

Vogel SN. «How discovery of Toll-mediated innate immunity in *Drosophila* impacted our understanding of TLR signaling (and vice versa).» *J Immunol.*, 2012: 188(11):5207-9.

Voges M, Bachmann V, Naujoks J, Kopp K, Hauck CR. «Extracellular IgC2 constant domains of CEACAMs mediate PI3K sensitivity during uptake of pathogens.» *PLoS One*, 2012: 7(6):e39908.

Wan Y, Xiao H, Affolter J, Kim TW, Bulek K, Chaudhuri S, Carlson D, Hamilton T, Mazumder B, Stark GR, Thomas J, Li X. «Interleukin-1 receptor-associated kinase 2 is critical for lipopolysaccharide-mediated post-transcriptional control.» *J Biol Chem.*, 2009: 284(16):10367-75.

Wang H, Lafdil F, Kong X, Gao B. «Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target.» *Int J Biol Sci.*, 2011: 7(5):536-50.

Wang H, Yang P, Liu K, Guo F, Zhang Y, Zhang G, Jiang C. «SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway.» *Cell Res.*, 2008: 18(2):290-301.

Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. «Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation.» *J Cell Biol.*, 1993: 123(5):1107-17.

Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. «T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells.» *Hepatology*, 2006: 44:1182–90.

Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. «Chemokines in liver inflammation and fibrosis.» *Semin Liver Dis.*, 2010: 30(3):215-25.

Watts C, Marsh M. «Endocytosis: what goes in and how?» *J Cell Sci.*, 1992: 103 (Pt 1):1-8.

Webster DP, Klenerman P, Collier J, Jeffery KJ. «Development of novel treatments for hepatitis C.» *Lancet Infect Dis.*, 2009: 9(2):108 – 117.

Wijburg, O.L., Heemskerk, M.H., Boog, C.J., Van Rooijen, N. «Role of spleen macrophages in innate and acquired immune responses against mouse hepatitis virus strain A59.» *Immunology*. 1997: 92(2):252-8.

Williams RK, Jiang GS, Holmes KV. «Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991: 88(13):5533-6.

Wisse E, van't Noordende JM, van der Meulen J, Daems TW. «The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood.» *Cell and Tissue Research*, 1976: 173(4): 423-35.

Wisse E, Braet F, Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbé E, Vermoesen A. «Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver.» *Toxicol Pathol.*, 1996: 24:100-11.

Woo PC, Lau SK, Yuen KY. «Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: zoonotic origins of severe respiratory viral infections.» *Curr Opin Infect Dis.*, 2006: 19(5):401-7.

Woo PC, Wang M, Lau SK, Xu H, Poon RW, Guo R, Wong BH, Gao K, Tsoi HW, Huang Y, Li KS, Lam CS, Chan KH, Zheng BJ, Yuen KY. «Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features.» *J Virol.*, 2007: 81:1574–1585.

Woo PC, Lau SKP, Huang Y, Yuen K-Y. «Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping.» *Exper. Biol. and Med.*, 2009: 234:1117-27.

Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lai KK, Huang Y, Lee P, Luk GS, Dyrting KC, Chan KH, Yuen KY. « Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus.» *J Virol.*, 2009: 83:908–917.

Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. «Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavi.» *J Virol.*, 2012: 86(7):3995-4008.

Wu J, Meng Z, Jiang M, Zhang E, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Krux F, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. «Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific.» *Immunology*, 2010: 129(3):363-74.

Wu Z, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q. «Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury.» *Liver Int.*, 2010: 30(6):782-94.

Xu E, Dubois MJ, Leung N, Charbonneau A, Turbide C, Avramoglu RK, DeMarte L, Elchebly M, Streichert T, Lévy E, Beauchemin N, Marette A. «Targeted disruption of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance.» *Endocrinology*, 2009: 150(8):3503-12.

Xu Y, Liu Y, Lou Z, Qin L, Li X, Bai Z, Pang H, Tien P, Gao GF, Rao Z. «Structural basis for coronavirus-mediated membrane fusion. Crystal structure of mouse hepatitis virus spike protein fusion core.» *J. Biol. Chem.*, 2004: 279, 30514-22.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. «TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway.» *Nat Immunol.*, 2003: 4(11):1144-50.

Yamamoto M, Takeda K. «Current views of toll-like receptor signaling pathways.» *Gastroenterol Res Pract.*, 2010: 240365, doi: 10.1155/2010/240365

Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Takeuchi O, Takeshige K, Saitoh T, Yamaoka S, Yamamoto N, Yamamoto S, Muta T, Takeda K, Akira S. «Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ .» *Nature*, 2004: 430(6996):218-22.

Yang L, Seki E. «Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms.» *Front Physiol.*, 2012: 3:138.

Yokomori K, Baker SC, Stohlman SA, Lai MM. «Hemagglutinin-esterase-specific monoclonal antibodies alter the neuropathogenicity of mouse hepatitis virus.» *J Virol.*, 1992: 66(5):2865-74.

Yokomori K, Banner LR, Lai MM. «Coronavirus mARN transcription: UV light transcriptional mapping studies suggest an early requirement for a genomic-length template.» *J Virol.*, 1992: 66(8):4671-8.

Yokomori K, Banner LR, Lai MM. «Heterogeneity of gene expression of the hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronaviruses.» *Virology*, 1991: 183(2):647-57.

Yokomori K, La Monica N, Makino S, Shieh CK, Lai MM. «Biosynthesis, structure, and biological activities of envelope protein gp65 of murine coronavirus.» *Virology*, 1989: 173(2):683-91.

Yoneyama M, Fujita T. «Structural mechanism of ARN recognition by the RIG-I-like receptors.» *Immunity*, 2008: 29(2):178-81.

Yoo DW, Parker MD, Babiuk LA. «The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells.» *Virology*, 1991: 180(1):395-9.

Yu D, Zhu H, Liu Y, Cao J, Zhang X. «Regulation of proinflammatory cytokine expression in primary mouse astrocytes by coronavirus infection.» *J Virol.*, 2009: 83(23):12204-14.

Yuk JM, Shin DM, Lee HM, Kim JJ, Kim SW, Jin HS, Yang CS, Park KA, Chanda D, Kim DK, Huang SM, Lee SK, Lee CH, Kim JM, Song CH, Lee SY, Hur GM, Moore DD, Choi HS, Jo EK. «The orphan nuclear receptor SHP acts as a negative regulator in inflammatory signaling triggered by Toll-like receptors.» *Nat Immunol.*, 2011: 12(8):742-51.

Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. «CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4.» *Cell*, 2011: 147(4):868-80.

Zeng W, Sun L, Jiang X, Chen X, Hou F, Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. «Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity.» *Cell*, 2010: 141(2):315-30.

Zhang X, Liao CL, Lai MM. «Coronavirus leader ARN regulates and initiates subgenomic mARN transcription both in trans and in cis.» *J Virol.*, 1994: 68(8):4738-46.

Zhang Z, Kim T, Bao M, Facchinetti V, Jung SY, Ghaffari AA, Qin J, Cheng G, Liu YJ. «DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsARN in dendritic cells.» *Immunity*, 2011: 34(6):866-78. .

Zhao L, Rose KM, Elliott R, Van Rooijen N, Weiss SR. «Cell-type-specific type I interferon antagonism influences organ tropism of murine coronavirus.» *J Virol.* 2011;85:10058-68.

Zhou H, Zhao J, Perlman S. «Autocrine interferon priming in macrophages but not dendritic cells results in enhanced cytokine and chemokine production after coronavirus infection.» *MBio.*, 2010: 1(4). pii: e219-10.

Zhu J, Huang X, Yang Y. « Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both toll-like receptor-dependent and -independent pathways.» *J Virol.*, 2007: 81(7):3170–80.

Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. «Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury.» *Front. Physiol.*, 2012;3:56.doi: 10.3389/fphys.2012.00056.

Zucchini N, Bessou G, Traub S, Robbins SH, Uematsu S, Akira S, Alexopoulou L, Dalod M. «Cutting edge: Overlapping functions of tlr7 and tlr9 for innate defense against a herpesvirus infection.» *J Immunol.*, 2008: 180(9):5799-803.

Zuniga S, Sola I, Alonso S, Enjuanes L. «Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic ARN synthesis.» *J Virol.*, 2004: 78:980-94.